

ALTERACIONES EN EL EJE SIMPATOADRENAL CON EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Alicia Muñoz Montero
Director: Luis Gandía Juan

Madrid, 2022



A mi familia.



Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

ALTERACIONES EN EL EJE SIMPATOADRENAL CON EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por:
Alicia Muñoz Montero

Director:
Luis Gandia Juan

Madrid, 2022

Índice

LISTADO DE ABREVIATURAS	13
RESUMEN	17
Abstract	18
INTRODUCCIÓN	23
1. La enfermedad de Alzheimer	24
1.1. Neuropatología de la enfermedad	24
1.2. Hipótesis Fisiopatológicas de la Enfermedad de Alzheimer	26
1.2.1. Hipótesis colinérgica	26
1.2.2. Hipótesis amiloidogénica	26
1.2.3. Hipótesis de la propagación de Tau	28
1.2.4. Hipótesis del calcio	29
1.2.5. Hipótesis neurovascular	29
1.2.6. Hipótesis inflamatoria	30
1.2.7. Hipótesis de la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo	30
1.2.8. Otras hipótesis	31
1.3. Modelos animales para el estudio de la Enfermedad de Alzheimer	32
1.3.1. El modelo 3xTg-AD	34
1.3.2. El modelo APP/PS1	35
2. La célula cromafín como modelo neurosecretor	36
2.1. Características anatómicas e histológicas de la glándula adrenal	36
2.2. La célula cromafín adrenomedular	37
2.2.1. Funciones fisiológicas. El eje simpato-adrenomedular	38
2.2.2. Síntesis y almacenamiento de catecolaminas	40
2.2.3. Excitabilidad celular y exocitosis de las catecolaminas	41
2.2.4. El citoesqueleto de actina y su papel en la exocitosis en la célula cromafín	43
2.2.5. La célula cromafín como modelo para el estudio de enfermedades neurodegenerativas	44
2.2.6. Alteraciones en la exocitosis en el modelo 3xTg-AD de enfermedad de Alzheimer	46
3. Señales de calcio y exocitosis	47
3.1. Canales de calcio dependientes de voltaje	47
3.1.1. Subtipos de canales de calcio	48

Canales tipo L (Cav1)	49
Canales tipo N (Cav2.2)	49
Canales tipo P/Q (Cav2.1)	49
Canales tipo R (Cav2.3)	50
3.1.2. Mecanismos moduladores de los canales de calcio	50
Modulación por calcio	51
Modulación por voltaje	51
Modulación por proteínas G	52
3.2. Mitocondria y retículo endoplásmico	54
3.3. Señales de calcio y enfermedad de Alzheimer	56
4. Receptores purinérgicos	57
4.1. Receptores purinérgicos metabotrópicos P2Y	58
4.2. Receptores purinérgicos ionotrópicos P2X	59
4.2.1. El receptor P2X7	60
4.3. Receptores purinérgicos y enfermedad de Alzheimer	61
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	67
MATERIAL Y MÉTODOS	73
1. Animales utilizados	73
1.1. Caracterización genotípica de los ratones	73
1.2. Caracterización fenotípica de los ratones	75
1.2.1. Peso de los ratones	75
1.2.2. Pruebas de comportamiento	76
Test de campo abierto	76
Test de reconocimiento de objetos	76
Test de suspensión por la cola	77
Laberinto en cruz elevado	78
2. Cultivos celulares	79
2.1. Aislamiento y cultivo primario de células cromafines de ratón	79
2.2. Aislamiento y cultivo primario de neuronas de hipocampo	80
2.3. Aislamiento y cultivo primario de astrocitos corticales	81
3. Determinación de neurotransmisores mediante HPLC	82
3.1. Obtención y preparación de las muestras	82
3.2. HPLC-MS	82
4. Registros electrofisiológicos	83
4.1. Fundamento de la técnica	83

4.2. Registro de las corrientes a través de los canales de calcio	84
5. Cuantificación de los niveles de ARNm por rt-qPCR	85
5.1. Extracción de ARNm y conversión a ADNc	85
5.2. PCR cuantitativa (RT-qPCR)	86
6. Western Blot	88
6.1. Extracción de proteínas y preparación de muestras	88
6.2. Electroforesis, transferencia y revelado	89
6.3. WB-cultivos de astrocitos	90
7. Identificación y cuantificación de proteínas mediante técnicas de imagen	90
7.1. Identificación de proteínas en cortes de tejido	91
7.2. Tinción del citoesqueleto de actina	92
7.3. Caracterización de los cultivos de astrocitos mediante inmunocitoquímica	93
8. Cuantificación de señales de calcio intracelular en astrocitos	93
9. Análisis estadístico de los resultados	94
10. Resumen de soluciones y reactivos empleados	95
RESULTADOS	103
1. Caracterización fenotípica del ratón 3xTg-AD, modelo de EA	103
1.1. Peso corporal de los animales 3xTg-AD	103
1.2. Alteraciones cognitivas en la prueba de reconocimiento de objetos	105
1.3. Alteraciones locomotoras en la prueba de campo abierto	107
1.4. Alteraciones en el estado de ansiedad de los animales	108
1.5. Alteraciones en el test de suspensión de la cola	111
1.6. Marcadores histopatológicos en el hipocampo	112
1.8. Marcadores histopatológicos en la médula adrenal	114
2. Niveles de neurotransmisores en la EA	115
2.1. Niveles de neurotransmisores en el plasma	115
2.2. Niveles de neurotransmisores a nivel del SNC	117
3. Alteraciones en el citoesqueleto de actina en células cromafines	120
3.1. Alteraciones en la densidad del citoesqueleto de actina	120
3.2. Alteraciones en la distribución del citoesqueleto de actina	121
4. Alteraciones en la modulación por ATP de las corrientes de calcio	123
4.1. Efectos del ATP sobre las corrientes a través de los CCDV	124
4.2. Expresión de receptores purinérgicos	126
4.2.1. Receptores purinérgicos en médula adrenal	126
4.2.2. Receptores purinérgicos en hipocampo	127

4.2.3. Receptor purinérgico P2X7	128
Receptores P2X7 en células cromafines	130
Receptores P2X7 en el hipocampo	132
4.3. Expresión de canales de calcio	136
4.3.1. Estudios electrofisiológicos	136
4.3.2. Estudios de rt-qPCR	139
4.3.3. Estudios inmunohistoquímicos	140
5. Señales de calcio y receptores P2X7 en el ratón APP/PS1	142
5.1. Receptores P2X7 en el SNC del ratón	142
5.2. Entrada de calcio a través del receptor P2X7	145
5.3. Regulación de la señal de calcio por organelas intracelulares	146
5.4. Comunicación entre organelas intracelulares	148
5.5. Proteínas de fusión mitocondrial	149
DISCUSIÓN	155
Caracterización fenotípica del modelo murino 3xTg-AD	156
Neurotransmisores y EA	159
Alteraciones en la modulación de la exocitosis por ATP	162
Receptores purinérgicos, P2X7 y EA	166
CONCLUSIONES	175
Conclusions	177
BIBLIOGRAFÍA	183
ANEXO	209

Listado de abreviaturas

[Ca²⁺]_c	Concentración de calcio en el citosol
5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
Aβ	Péptido β -amiloide
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
AChEI	Inhibidores de la Acetilcolinesterasa
ADP	Adenosin difosfato
ADR	Adrenalina
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
APP	Proteína precursora amiloide
ATP	Adenosin trifosfato
BBG	Brilliant Blue G
BACE1	β -secretasa 1
CC	Células cromafines
CCR	Células cromafines de ratón
CCDV	Canales de calcio dependientes de voltaje
CDI	Inactivación dependiente de calcio
DA	Dopamina
DBH	Dopamina β -hidroxilasa
DHP	Dihidropiridinas
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAE	Enfermedad de Alzheimer esporádica
EAF	Enfermedad de Alzheimer familiar
EEM	Error estándar de la media
GSK3β	Glucógeno sintasa kinasa 3 β

GTP	Guanosintrifosfato
HCMD	Microdominios con altas concentraciones de Ca ²⁺
HEPES	(N-[2-hidroxietil]-piperaciono-N'-[2-ácido etanosulfónico])
HRP	Peroxidasa de rábano
I	Corriente
IP3	Inositol tri-fosfato
LTP	Potenciación a largo plazo
MAMs	Membranas del RE asociadas a mitocondrias
NA	Noradrenalina
NMDA	Ácido N-metil-D-aspártico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PNMT	Enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa
PSEN	Presenilina
RE	Retículo endoplasmático
RM	Resonancia magnética
ROS	Radicales libres de oxígeno
RyR	Receptor de rianodina
SER	Serotonina
SERCA	Bomba de calcio de la membrana del RE
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema nervioso central
SNS	Sistema nervioso simpático
TBST	Tampón Tris salino con Tween
TST	Test de suspensión por la cola
UDP	Uridin difosfato
UTP	Uridin trifosfato
WT	Control (<i>Wild type</i>)
HCMD	Microdominios con altas concentraciones de Ca ²⁺

HEPES	N-[2-hidroxietil]-piperacino-N ² -[2-ácido etanosulfónico]
HRP	Peroxidasa de rábano
I	Corriente
IP3	Inositol tri-fosfato
LTP	Potenciación a largo plazo
MAMs	Membranas del RE asociadas a mitocondrias
NA	Noradrenalina
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PNMT	Enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa
PSEN	Presenilina
RE	Retículo endoplasmático
RM	Resonancia magnética
ROS	Radicales libres de oxígeno
RyR	Receptor de rianodina
SER	Serotonina
SERCA	Bomba de calcio de la membrana del RE
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema nervioso central
SNS	Sistema nervioso simpático
TBST	Tampón Tris salino con Tween
TST	Test de suspensión por la cola
UDP	Uridin difosfato
UTP	Uridin trifosfato
WT	Control (<i>Wild type</i>)

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia en la actualidad, de hecho, un nuevo caso es diagnosticado cada 4 minutos. Debido al aumento de la población envejecida, por el aumento de la esperanza de vida, se espera que la prevalencia e incidencia de esta enfermedad continúe aumentando. Actualmente no existen tratamientos para frenar o revertir la progresión de la enfermedad, por lo que se hace evidente la necesidad de actuar, tanto en la búsqueda de biomarcadores como de nuevas dianas para ralentizar o prevenir su progreso.

En nuestro laboratorio usamos el modelo murino triple transgénico de la EA (3xTg-AD) y su respectivo control (B6129SG) de 2, 6 y más de 12 meses de edad, siendo estos estadios presintomáticos, comienzo de desarrollo de la enfermedad, y con la enfermedad completamente establecida.

En primer lugar, hemos caracterizado fenotípicamente a este modelo, realizando diversas pruebas de comportamiento como el test de campo abierto, la prueba de reconocimiento de objetos, el laberinto en cruz elevado o el test de suspensión por la cola.

En trabajos previos, utilizando técnicas de amperometría y patch clamp, vimos cómo las alteraciones asociadas a la EA y al envejecimiento afectan a las corrientes iónicas implicadas en la secreción de catecolaminas y la transmisión del impulso nervioso, así como la exocitosis y la excitabilidad celular. En la presente tesis doctoral nos proponemos estudiar en profundidad, en primer lugar, si existen diferencias en las catecolaminas y otras monoaminas liberadas, para su posible uso como biomarcadores de la enfermedad, así como posibles alteraciones en el citoesqueleto de actina, implicado en la exocitosis.

Por otro lado, también pretendemos medir si la actividad o la expresión de los distintos subtipos de canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV), así como su modulación por ATP, a través de los receptores purinérgicos, se altera con el envejecimiento y/o el desarrollo de la enfermedad, para lo cual usamos técnicas de patch-clamp, rt-q-PCR e inmunohistoquímica. Además, hemos estudiado más exhaustivamente el receptor P2X7 por su implicación en la neuroinflamación, factor muy importante en las enfermedades neurodegenerativas, como la EA. Para caracterizar funcionalmente este receptor con la enfermedad, utilizamos astrocitos del modelo de Alzheimer APP/PS1.

Por último, hemos tratado de corroborar si los cambios observados en la célula cromafín de la médula adrenal, se corresponden con lo que ocurre a nivel central, validando así este modelo, y mostrando que la EA se desarrolla tanto a nivel central como periférico.

Tratamos así de esclarecer nuevos mecanismos implicados en la EA, lo que podría resultar útil en la búsqueda y desarrollo de nuevos tratamientos.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia nowadays, in fact, a new case is diagnosed every 4 minutes. Due to the increase in the ageing population, as life expectancy increases, the prevalence and incidence of the disease is expected to continue to rise. There are currently no treatments to slow or reverse the progression of the disease, so there is a clear need for action, both in the search for biomarkers and for new targets to slow or prevent its progression.

In our laboratory, we used the triple transgenic murine model of AD (3xTg-AD) and its respective control (B6129SG) at 2, 6 and over 12 months of age, these being pre-symptomatic stages, the beginning of disease development, and with the disease fully established.

Firstly, we have phenotypically characterised this model, performing various behavioural tests such as the open field test, the novel object recognition test, the elevated plus maze and the tail suspension test.

In previous work, using amperometry and patch clamp techniques, we have seen how the alterations associated with AD and ageing affect the ionic currents involved in catecholamine secretion and nerve impulse transmission, as well as exocytosis and cellular excitability. In this doctoral thesis we propose to study in depth, firstly, whether there are differences in the catecholamines and other monoamines released, for their possible use as biomarkers of the disease, as well as possible alterations in the actin cytoskeleton, involved in exocytosis.

On the other hand, we also intend to measure whether the activity or expression of the different subtypes of voltage-dependent calcium channels (VDCCs), as well as their modulation by ATP, through purinergic receptors, is altered with ageing and/or the development of the disease, for which we use patch-clamp, rt-q-PCR and

immunohistochemistry techniques. In addition, we have studied the P2X7 receptor more extensively for its involvement in neuroinflammation, a very important factor in neurodegenerative diseases such as AD. To functionally characterise this receptor in the disease, we used astrocytes from the APP/PS1 Alzheimer's model.

Finally, we have tried to corroborate whether the changes observed in the chromaffin cell of the adrenal medulla correspond to what occurs at the central level, thus validating this model and showing that AD develops both centrally and peripherally.

We are thus trying to elucidate new mechanisms involved in AD, which could prove useful in the search for and development of new treatments.

Introducción

Un barco en puerto está a salvo, pero no es para eso para lo que se construye un barco.

Grace Hopper.

Alteraciones en el eje simpatoadrenal con
el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

Introducción

En el año 2008, la Organización Mundial de la Salud declaró la demencia como prioridad de acción mundial. La demencia se caracteriza por pérdidas de memoria frecuentes, desorientación en tiempo y espacio, cambios en el humor y comportamiento, lo que sin duda afecta a la vida diaria (WHO, 2021).

Actualmente, la Medicina ha avanzado en muchos aspectos, y eso ha llevado a un aumento de la esperanza de vida de la población, lo cual ha ido de la mano con el desarrollo de las llamadas enfermedades neurodegenerativas. De hecho, a modo de ejemplo, podemos citar que actualmente unos 55 millones de personas en todo el mundo sufren la enfermedad de Alzheimer (EA), y para 2050 se espera que este número ascienda hasta los 150 millones (Brodaty *et al.*, 2011), puesto que el mayor factor de riesgo para padecerla es la edad. Se estima que, en la población de mayores de 85 años, una de cada dos personas sufrirá esta enfermedad, por lo que es probable que en unos años cada uno de nosotros ocupemos uno de estos dos papeles: O padecer la enfermedad, o cuidar de algún ser querido que la padezca. Y es que, aunque la Medicina haya avanzado en muchos campos, poco es lo que se conoce de cómo opera esta enfermedad.

El objetivo de esta Tesis Doctoral es, utilizando como base los modelos murinos de Alzheimer 3xTg-AD y APP/PS1, tratar de esclarecer los posibles mecanismos fisiopatológicos que puedan verse alterados con la enfermedad, lo que nos podría ayudar en la búsqueda de nuevas posibles dianas terapéuticas.

En esta introducción se comentarán distintas las distintas teorías fisiopatológicas existentes actualmente que pretenden explicar la génesis y progresión de la EA, así como los modelos murinos que se utilizan en el estudio de la misma. Se revisará también la estructura y función del eje simpatoadrenal, y por qué la célula cromafín constituye un buen modelo para el estudio de los procesos de exocitosis que ocurren durante la neurotransmisión. Por otro lado, se expondrán las principales características de los canales de calcio dependientes de voltaje y los receptores purinérgicos presentes en estas células, y su posible papel como nuevas dianas farmacológicas de la EA.

1. La enfermedad de Alzheimer

1.1. Neuropatología de la enfermedad

En el año 1901, el neurólogo y psiquiatra Alois Alzheimer recibió en su consulta una paciente llamada Auguste Deter, una mujer de 51 años, que era incapaz de recordar incluso los acontecimientos más importantes de su vida. En aquel momento, el doctor Alzheimer no supo cómo ayudarla, aunque la acompañó hasta que falleció 5 años más tarde. Tras esto, Alois Alzheimer realizó una autopsia del cerebro de Auguste, y describió las principales marcas histopatológicas de la enfermedad: Las **placas seniles** (agregados extracelulares de la proteína β -amiloide ($A\beta$) y los **ovillos neurofibrilares** (agregados intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada) (Figura 1)(Alzheimer *et al.*, 1995)

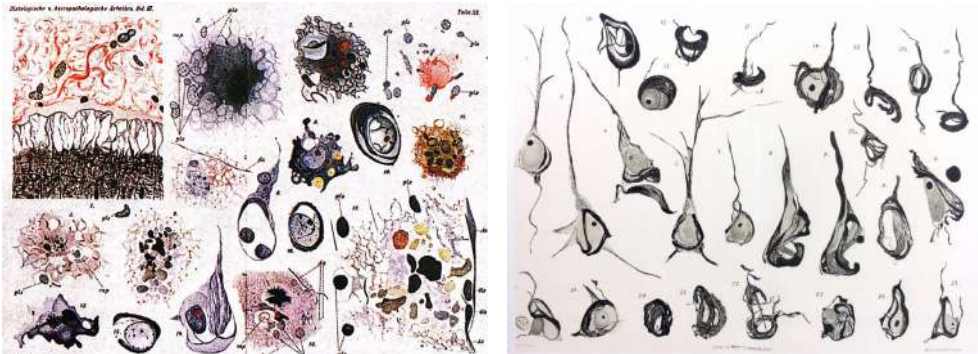


Figura 1. Dibujos originales del Dr. Alois Alzheimer tras la autopsia de Auguste.

A, Placas extracelulares de $A\beta$. B, Ovillos neurofibrilares. Fotografías originales extraídas de Maurer y Maurer, 2002 (Maurer y Maurer, 2002)

A pesar de haber transcurrido ya más de 100 años desde que el Dr. Alois Alzheimer describiese por primera vez la enfermedad, podemos afirmar que ésta sigue siendo aún una gran desconocida para el mundo científico.

Actualmente, la EA es considerada la forma más común de demencia, suponiendo en torno al 60-70% de los casos. El mayor factor de riesgo para su desarrollo es el envejecimiento, y normalmente se presenta de forma esporádica, aunque alrededor del 2-5% de los casos se deben a herencia familiar (EAF). Puede ser debida a mutaciones en diferentes genes. Las que tienen más peso actualmente son mutaciones en los genes PSEN1, PSEN2, APP, SORL1, TREM2 y APOE (Scheltens, 2021)

El cuadro patológico que presentan característicamente lo pacientes de EA

incluye dos tipos de cambios que se evidencian con el progreso de la enfermedad y los síntomas, y que incluyen:

- **Lesiones positivas** (debidas a “acumulación”), que pueden ser observadas a nivel microscópico. En este grupo de lesiones podemos encontrar la acumulación intracelular de ovillos neurofibrilares y/o la acumulación extracelular de A β , pero también la presencia de células de glía activada, el agrandamiento de los endosomas celulares, o la aparición de neuritas distróficas.

- **Lesiones negativas** (debido a “pérdidas”) que estarían representadas principalmente por la pérdida de la homeostasis celular, o la pérdida de neuronas y/o sinapsis, lo que incluye defectos en el transporte axonal, daño mitocondrial, pérdida de espinas dendríticas y distrofia axonal (Breijyeh y Karaman, 2020; Knopman *et al.*, 2021).

En cuanto a los **estadios de la enfermedad**, podemos diferenciar 3 principales (Dubois *et al.*, 2016; Kumar, 2021):

- **Presintomático:** En este estadio los individuos son aparentemente asintomáticos y sólo podrían ser diagnosticados mediante la determinación de biomarcadores específicos, como serían los niveles elevados de Tau en el líquido cefalorraquídeo o por cambios cerebrales detectados mediante resonancia magnética (RM).

- **Deterioro cognitivo leve (MCI):** Los pacientes comienzan a tener síntomas. Presentan déficits de memoria, pequeños problemas en el lenguaje, falta de concentración, desorientación en tiempo y espacio, cambios en el humor y desarrollo de depresión. Este estadio puede durar varios años.

- **Demencia:** En este estadio los pacientes presentan un deterioro completo de la memoria, errores en el lenguaje y disminución en el habla espontánea. Los pacientes no reconocen a sus familiares, y pueden tener dificultades al tragar y trastornos en los ciclos sueño-vigilia.

Con respecto a la posible etiología, la EA se considera una enfermedad multifactorial, y parece estar asociada a diversos factores de riesgo, tales como la edad avanzada, factores genéticos, el sexo, daños externos, enfermedades vasculares y metabólicas (como accidentes cardiovasculares, obesidad y diabetes), y factores ambientales, por lo que no existe actualmente una teoría unificada que pueda explicar las causas y la progresión de la misma. Describiremos a continuación, muy brevemente, las principales hipótesis fisiopatológicas que tratan de explicar el origen y desarrollo de esta enfermedad.

1.2. Hipótesis Fisiopatológicas de la Enfermedad de Alzheimer

1.2.1. Hipótesis colinérgica

Esta hipótesis fue propuesta en 1976 por Davies y Maloney, basándose en los estudios que realizaron midiendo la actividad de diferentes sistemas enzimáticos que resultan clave para la síntesis de los distintos neurotransmisores en 20 regiones de cerebros de pacientes controles y de EA. En estos estudios se observó que la actividad de la enzima colina acetiltransferasa (implicada en la síntesis del neurotransmisor acetilcolina (ACh)) se encontraba muy disminuida en regiones como la amígdala, el hipocampo y el córtex de los cerebros de pacientes con EA, en comparación con los controles (Davies y Maloney, 1976). Se ha visto, además, que en esas zonas las concentraciones de ACh se encontraban muy disminuidas en las sinapsis (Bowen *et al.*, 1976; Francis *et al.*, 1999).

En base a la existencia de este “déficit” en la neurotransmisión colinérgica se desarrollaron los fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE), principal enzima metabolizadora de la ACh, postulándose que al inhibirse la degradación de la ACh ésta permanecería un mayor tiempo en la sinápsis, mejorando la eficacia de la neurotransmisión. Actualmente existen tres fármacos aprobados para tratar la EA que pertenecen a este grupo farmacológico, que son el donepezilo, la rivastigmina y la galantamina (Liu *et al.*, 2019) Sin embargo, de acuerdo con los últimos estudios de metanálisis que evalúan la eficacia de los inhibidores de la AChE (AChEIs), se ha visto que éstos tan solo parecen producir pequeños efectos en la mejora de la demencia de estos pacientes al inicio del tratamiento, pero no de manera continuada, perdiendo eficacia clínica a medida que progresa la EA (Knight *et al.*, 2018).

1.2.2. Hipótesis amiloidogénica

Esta teoría fue propuesta por Hardy y Allsop en 1991, y sostiene que la acumulación a nivel extracelular de A β va a producir alteraciones en distintos neurotransmisores, enzimas y receptores de los mismos. Estos depósitos de A β se producirían por la escisión aberrante de la proteína precursora de A β (APP) por las β y γ -secretasas (Hardy, J. y Allsop, 1991) (Figura 2). Estos autores defienden que los ovillos neurofibrilares, la pérdida celular y el daño vascular se producirían a causa de estos depósitos (Hardy, J. A. y Higgins, 1992). Esta teoría se ve apoyada porque se ha observado que distintas mutaciones en genes como APP, PSEN1 y PSEN2 afectan al metabolismo de A β , lo que produce una acumulación de la misma y la rápida progresión de la enfermedad (Paroni *et al.*, 2019). Sin embargo, hay numerosos

detractores de esta teoría, teniendo en cuenta que algunos modelos murinos que desarrollan patología A β no desarrollan ovillos neurofibrilares de tau (Bryan *et al.*, 2009; Kametani y Hasegawa, 2018) y que en cerebros de pacientes sanos se han encontrado también estos depósitos de A β (Li, Y. *et al.*, 2008; Rodrigue *et al.*, 2009).

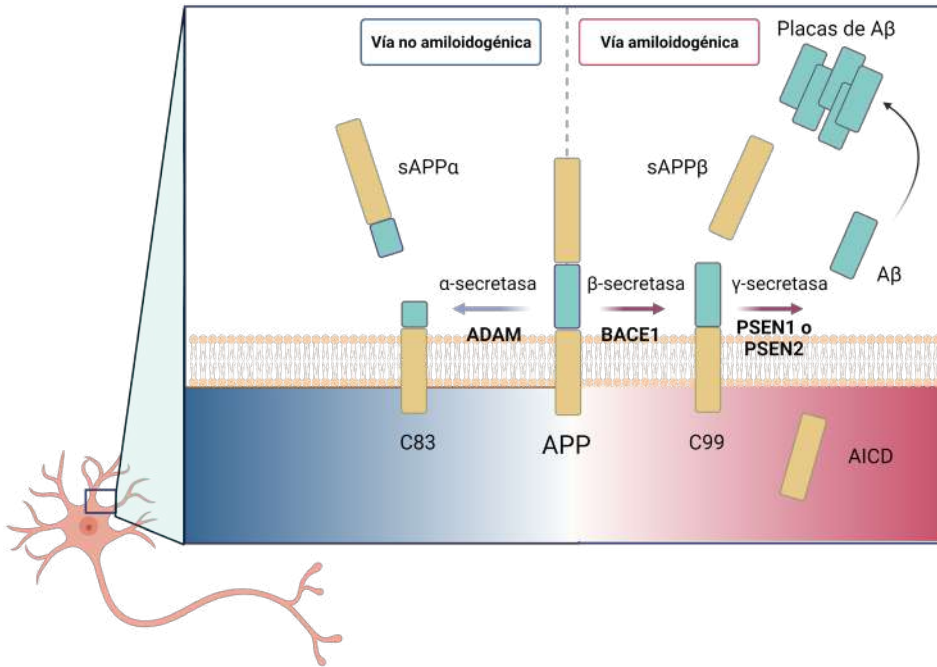


Figura 2. Procesamiento de APP y acumulación de A β . La proteína precursora amiloide (APP) puede seguir dos posibles vías de procesamiento, la vía no amiloidogénica (izquierda) y la vía amiloidogénica (derecha). En la primera, la enzima α -secretasa (ADAM) genera dos fragmentos, sAPP α , que es soluble y C83 que queda insertado en la membrana. En la vía amiloidogénica, sin embargo, en primer lugar, actúa la enzima β -secretasa (BACE1), que genera el fragmento soluble sAPP β y C99 que queda insertado en la membrana. Este fragmento, a su vez, es sustrato de la γ -secretasa (con la presenilina (PSEN) como componente catalítico), que origina el fragmento AICD (del inglés, APP intracelular domain) y el fragmento A β , que va a oligomerizarse hasta formar las placas de A β o placas seniles. Dibujo creado con Biorender.com

1.2.3. Hipótesis de la propagación de Tau

Esta hipótesis defiende que la EA se debe principalmente a la hiperfosforilación de la proteína tau, lo que disminuye su capacidad de unión a los microtúbulos, y, por tanto, el ensamblaje y estabilización de los mismos (Goedert *et al.*, 1992; Braak, H. y Braak, 1996). Esto es particularmente importante en neuronas, ya que los microtúbulos actúan como las vías de transporte de moléculas en dendritas y axones (Frost *et al.*, 2009).

La hiperfosforilación de tau, además, dará lugar a la formación de los famosos ovillos neurofibrilares, que provocarán citotoxicidad y neurodegeneración celular (Figura 3) (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Goedert *et al.*, 1992). La patología tau suele iniciarse en áreas concretas del cerebro y gradualmente irse propagando a distintas áreas (Braak, H. y Braak, 1996; Braak, E. *et al.*, 1999; Frost *et al.*, 2009).

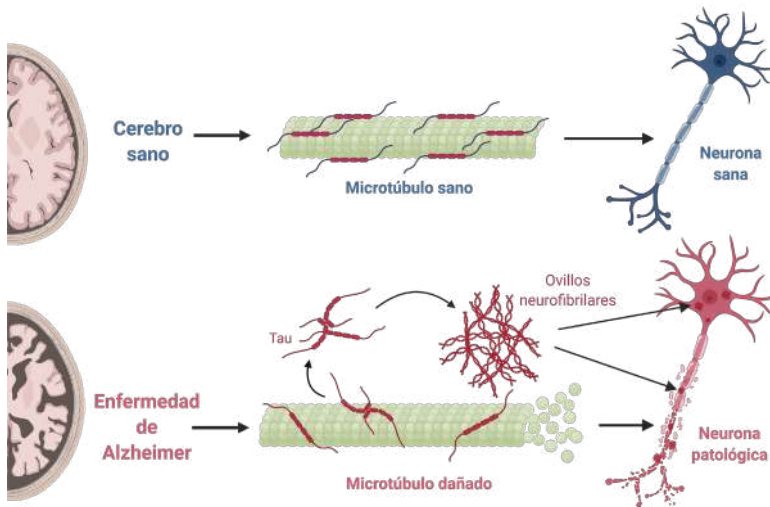


Figura 3. Proteína tau en cerebro sano y en cerebro con EA. En el cerebro sano (parte superior), la proteína tau estabiliza los microtúbulos, permitiendo el funcionamiento correcto del citoesqueleto, manteniendo la estructura celular, y permitiendo el transporte a través del axón. En el caso de la enfermedad de Alzheimer (parte inferior), la proteína tau se hiperfosforila, lo que reduce su unión a los microtúbulos y se separa formando los llamados ovillos neurofibrilares. Así, se produce la inestabilización de los microtúbulos, se degenera el transporte axonal y, además, los ovillos son citotóxicos, causando la muerte neuronal. Dibujo creado con Biorender.com

1.2.4. Hipótesis del calcio

La hipótesis del calcio fue propuesta por primera vez en 1989 por el Dr. Khachaturian, y postula que la homeostasis del calcio se va a ver alterada en la EA (Khachaturian, 1989).

Así, se ha visto que el A β puede activar receptores sensibles a Ca²⁺ y favorecer así la apertura de canales permeables a este ión (Ye *et al.*, 1997). Además, el A β puede facilitar la apertura de receptores ionotrópicos activados por NMDA, kainato y/o AMPA (Domingues *et al.*, 2007; Ferreira y Klein, 2011). También se ha visto que el A β puede favorecer la entrada de Ca²⁺ a través de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) (Silei *et al.*, 1999; Hou *et al.*, 2007).

Por otro lado, se ha visto que las mutaciones en las presenilinas PSEN1 y PSEN2 pueden producir un aumento en la salida de Ca²⁺ del retículo endoplásmico (RE) inducida por inositol-3-fostato (IP3) (Leissring, *et al.*, 1999; Leissring, *et al.*, 2000)

Las concentraciones elevadas de Ca²⁺ en el citosol producen la activación de la calcineurina, una fosfatasa dependiente de Ca²⁺ y calmodulina. Esta activación produce un incremento de los procesos de depresión a largo plazo (LTD), lo que favorece la pérdida de recuerdos recién adquiridos (Berridge, 2010). La calcineurina también produce la activación de la glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK3 β), una de las enzimas responsables de la hiperfosforilación de tau (Reese y Taglialatela, 2011). Además, se ha visto que la calcineurina puede desencadenar la respuesta reactiva/inflamatoria en los astrocitos, los cuales se encuentran además aumentados en la EA (Norris *et al.*, 2005).

1.2.5. Hipótesis neurovascular

Esta hipótesis sugiere que la pérdida de la regulación vascular lleva a la disfunción cerebral y a distintas enfermedades, como la EA (Zlokovic, 2008; Guo, S. y Lo, 2009). Ya en 1994, se demostró que en la EA la microvasculatura vascular está dañada (Buée *et al.*, 1994), y dos años más tarde se observó que el péptido A β puede provocar la vasoconstricción de las arterias cerebrales, con lo que se reduce el flujo de O₂ y nutrientes a las neuronas (Thomas *et al.*, 1996).

Además, mediante técnicas de neuroimagen, se ha demostrado que la disfunción neurovascular precede a la neurodegeneración (Ruitenber *et al.*, 2005; Knopman y Roberts, 2010), lo que indicaría que esta disfunción neurovascular podría estar jugando un importante papel en el desarrollo de la EA.

1.2.6. Hipótesis inflamatoria

Esta teoría defiende que la respuesta inflamatoria de la glía, fundamentalmente microglía y astrocitos, juega un papel importante en el desarrollo de la EA (Rogers *et al.*, 2007; Latta *et al.*, 2015; Latta *et al.*, 2015; Bagyinszky *et al.*, 2017; Bagyinszky *et al.*, 2017).

Se ha visto que el A β favorece la activación de la microglía, actuando como un agente sinérgico junto con las citoquinas (Meda *et al.*, 1995; Meda *et al.*, 1995; Weldon *et al.*, 1998).

A través del complejo CD36-TLR4-TLR6, los oligómeros de A β pueden unirse a la microglía, activar el inflammasoma vía NLRP3 y desencadenar la muerte celular, además de producir la liberación de factores inflamatorios como TNF- α . A su vez se va a producir la liberación de las citoquinas inflamatorias IL-1 β , IL-12 e IL-18, lo que aumenta aún más el daño cerebral de los pacientes (Michaud *et al.*, 2013).

1.2.7. Hipótesis de la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo

Los primeros en postular esta hipótesis fueron Swerdlow y Khan en 2004 (Swerdlow y Khan, 2004), proponiendo que una disfunción mitocondrial podría estar afectando a la expresión y procesamiento de APP, y, por tanto, a la acumulación de A β . Sin embargo, décadas antes ya se habían descrito alteraciones y deficiencias en enzimas participantes en el ciclo de Krebs (Gibson *et al.*, 1988).

Las mitocondria juegan un importante papel en el mantenimiento del equilibrio oxidantes/antioxidantes, cuya alteración va a provocar el conocido como “estrés oxidativo”. Se ha descrito que, en pacientes de EA, las neuronas muestran un menor número de mitocondrias junto con un aumento del daño oxidativo (Uttara *et al.*, 2009). También se ha demostrado que el A β se acumula en las mitocondrias y produce una disminución de la actividad de los complejos III y IV de la cadena respiratoria, lo que lleva no sólo a una disminución en la síntesis de ATP, fundamental para el correcto funcionamiento de las células y la comunicación sináptica, sino también a un mayor estrés oxidativo y una mayor sobrecarga de Ca²⁺, que como ya hemos mencionado anteriormente, puede ser un potente mecanismo citotóxico (Giorgi *et al.*, 2012).

Por otro lado, cada vez es mayor la importancia que están cobrando las alteraciones en las modificaciones epigenéticas para tratar de explicar la EA (Nativio *et al.*, 2018). Los metabolitos mitocondriales son fundamentales para estos procesos, como la acetilación de las histonas o la metilación del ADN (Matilainen *et al.*, 2017),

y se ha visto que en pacientes de EA estas modificaciones se encuentran disminuidas (Zhang, K. *et al.*, 2012; Chouliaras *et al.*, 2013), lo que puede considerarse como un causante del desarrollo de la enfermedad.

1.2.8. Otras hipótesis

Son muchos los autores que señalan que los **biometales** (Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+}) tienen un papel protagonista en el desarrollo de la EA, ya que se encuentran en elevadas concentraciones en las placas de $\text{A}\beta$ (Lovell, 1998). Estos metales pueden interaccionar con el $\text{A}\beta$ y modular tanto su toxicidad como su precipitación, así como el estado redox de la célula (Atwood, 1998; Huang, 1999).

Por otro lado, ya desde 1952 se sospechaba que los **microorganismos** podían jugar un papel importante en el inicio y desarrollo de la enfermedad (Sjogren *et al.*, 1952). Distintos investigadores han propuesto que la EA podría estar causada por un tipo de virus del herpes simple (Middleton *et al.*, 1980; Itzhaki, 2014).

Por último, cabe destacar las investigaciones de los **miARNs**, envueltos en la regulación post-transcripcional. Se ha visto que en pacientes de EA, la expresión de miR29a/b-1 está inversamente correlacionada con la expresión de BACE1, enzima implicada en el procesamiento de APP (Hébert *et al.*, 2008) (figura 2), y que una disminución en miR-107 podría acelerar la progresión de la enfermedad, regulando la expresión de BACE1 (Wang, Wang-Xia *et al.*, 2008).

Como podemos comprobar, no existe una única teoría que permita explicar la fisiopatología de la EA y, de alguna manera, todas ellas pueden estar interrelacionadas. Si bien es cierto que, aunque a día de hoy existe una gran controversia, y de ahí la dificultad para encontrar tratamientos efectivos en pacientes, parece que tanto el péptido $\text{A}\beta$ como la proteína tau hiperfosforilada estarían implicados de una forma u otra en el desarrollo de la enfermedad.

1.3. Modelos animales para el estudio de la Enfermedad de Alzheimer

Los modelos animales se han convertido en una herramienta indispensable para el estudio de diversas enfermedades humanas, entre ellas, las enfermedades neurodegenerativas.

Los ratones suelen ser la especie más utilizada para generar estos modelos debido a que los costes de mantenimiento son relativamente bajos, tienen una esperanza de vida corta (lo que permite el estudio de su envejecimiento), y los procedimientos para su modificación genética están bien establecidos.

El requisito más importante que debe cumplir un modelo animal de enfermedad es que sea capaz de reproducir, de la manera más precisa posible, la fisiopatología tal y cómo acontece en los humanos. Según cómo la fisiopatología sea causada existen 3 tipos de modelos para la EA: espontáneos, intervencionistas y modificados genéticamente o transgénicos (Neha *et al.*, 2014).

Con respecto a la EA, no disponemos de **modelos espontáneos** ya que los ratones no desarrollan esta enfermedad de manera espontánea (Teich *et al.*, 2013). De hecho, sólo se ha descrito EA espontánea con A β y tau hiperfosforilada en primates (Esquerda-Canals *et al.*, 2017), pero debido a las dificultades de manipulación, los grandes costes para el mantenimiento, el pequeño número de descendencia y el largo tiempo de vida, no resultan un buen modelo para el estudio.

Por otro lado, los **modelos intervencionistas**, que consisten en la introducción de sustancias químicas en regiones específicas del cerebro de los animales para inducir lesiones, aunque han sido ampliamente utilizados, no se ha conseguido que reproduzcan de manera veraz la patología de EA humana.

Debido a estas limitaciones, desde que se describieron las distintas mutaciones asociadas a la EA familiar, se han venido desarrollando diversos **modelos transgénicos** para el estudio de la EA, de hecho, actualmente existen más de 200 modelos murinos para la esta enfermedad. La siguiente tabla muestra los modelos más utilizados actualmente (se puede obtener información actualizada de todos ellos en la página web de Alzaforum (Alzaforum, 2022) que se actualiza semanalmente.

Introducción

Modelos transgénicos para:	Modelo	Mutación	Características fisiopatológicas
APP	PDAPP	A β APPInd	Placas de ThS-A β , disfunción sináptica, astrocitosis y microgliosis. Deterioro cognitivo que comienza a los 3 meses.
	Tg2576	A β APPSwe	Aumento de 5 veces de A β 40 y 14 veces A β 42. Numerosas placas de A β en corteza y sistema límbico. Alteraciones de la memoria y del aprendizaje a los 9 meses.
	J20	A β APPSwe,Ind	Elevados niveles de A β 42, placas amiloides, disfunción sináptica.
APP+PS1	APP/PS1	A β APPSwe PS1M146L	Elevados niveles de A β 42, placas amiloides, depósitos de A β fibrilar antes que en Tg2576.
	5xFAD	A β APPSwe,Lnd,Flo PS1 M146L, L286V	Elevados niveles de A β 42 ya a los 1,5 meses. Depósitos de A β extracelular y gliosis que comienza a los 2 meses. Disfunción sináptica, pérdida neuronal y deterioro cognitivo a los 4 meses.
APP+PS1+ tau	3xTg-AD	A β APPSwe PS1M146L TauP301L	Elevados niveles de A β 42 ya a los 1,5 meses. Depósitos de A β extracelular y gliosis que comienza a los 2 meses. Disfunción sináptica, pérdida neuronal y deterioro cognitivo a los 4 meses.
APP+apoE	TgCRND8 x apoEKI	A β APPSwe,Ind apoE4	Aumento de IL-1 β y GFAP. Alteración en los ritmos circadianos.
APP+insulina	APP23 x OM	A β APPSwe Leptina ob/ob	Nula LTP en el hipocampo, comportamiento ansioso. Hiperfosforilación de tau en corteza cerebral.

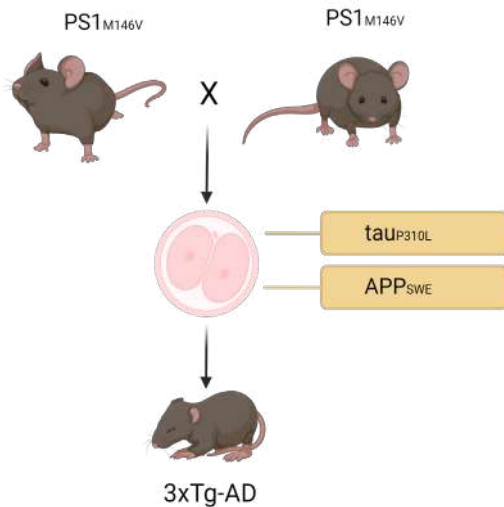
Tabla 1. Principales modelos murinos utilizados para el estudio de la enfermedad de Alzheimer.

1.3.1. El modelo 3xTg-AD

Este modelo se desarrolló en 2003 por Oddo y colaboradores (Oddo *et al.*, 2003a; Oddo *et al.*, 2003b) y presenta, como se describe en la tabla 1, mutaciones para APP, PS1 y Tau.

Para su desarrollo, se introdujeron 2 transgenes humanos para APP y tau en la línea germinal de un ratón mutante para PSEN1, al cual se le había sustituido el gen de la PSEN1 normal por el gen PSEN1 con la mutación humana M146V (sustitución de metionina por valina en el codón 146). Los transgenes introducidos fueron APP^{SWE} (Mutación sueca de APP, sustitución de lisina y metionina a asparragina y leucina en los codones 670 y 671, respectivamente) y la mutación P301L en la proteína tau (sustitución de prolina por leucina en el codón 301) (Figura 4) (Alzaforum; Oddo *et al.*, 2003a; Oddo *et al.*, 2003b).

Figura 4. Generación del modelo 3xTg-AD. Este modelo se elaboró mediante el cruce de dos ratones con la PSEN1 mutada, y la introducción posterior de los transgenes para tau y APP mutados en el oocito resultante, dando lugar así al ratón 3xTg-AD. Dibujo creado con Biorender.com



Con respecto a la progresión temporal de las marcas histopatológicas características de la EA se vio que estos ratones desarrollan inicialmente A β intracelular a los 4 meses de edad en la corteza cerebral, y a los 6 meses en el hipocampo. Las placas de A β extracelular aparecen primero en la corteza, a los 6 meses, y más tarde en el hipocampo, a los 12 meses. La patología tau se desarrolla más tardíamente, apareciendo en el hipocampo a los 12 meses y desplazándose más tarde hacia la corteza (Oddo *et al.*, 2003a; Billings *et al.*, 2005).

Funcionalmente, se ha descrito una reducción en los procesos de LTP, registrando en la región CA1 del hipocampo, a partir de los 6 meses, y alteraciones en la memoria y el aprendizaje, usando el laberinto acuático de Morris y la prueba de evitación inhibitoria, a partir de los 4-6 meses de edad (Oddo *et al.*, 2003b).

Para el desarrollo experimental de la presente Tesis Doctoral se usaron ratones 3xTg-AD de tres edades diferentes correspondientes a la etapa presintomática (2 meses de edad), a cuando comienzan a desarrollar la patología (6 meses de edad) y a cuando la patología ya está establecida (más de 12 meses de edad).

1.3.2. El modelo APP/PS1

Este modelo fue generado en 1998 cruzando la línea mutante para APP Tg2567 (que presenta la mutación sueca para APP) con una línea que expresaba la mutación para PSEN1 (M146L) (Figura 5) (Alzforum; Holcomb, *et al.*, 1998).

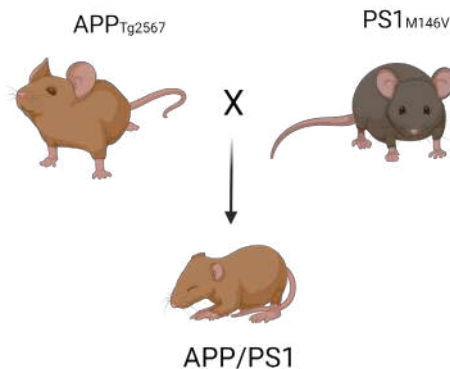


Figura 5. Generación del modelo APP/PS1. Este modelo se elaboró mediante el cruce de un ratón con la PSEN1 mutada, y otro APP mutada, dando lugar a ratones APP/PS1. Esquema creado con Biorender.com

Se ha visto que estos ratones comienzan a desarrollar depósitos extracelulares de A β tanto en la corteza cerebral como en el hipocampo ya a los 6 meses de edad, ocupando grandes áreas de estas regiones a los 16 meses. A esta edad, además, se observa un aumento de astrocitos y microglía asociados a las placas, lo que indica un aumento de la neuroinflamación a los 16 meses de edad, aunque ya a los 12 meses se observa una mayor activación de estas células gliales (Holcomb, *et al.*, 1998; Gordon *et al.*, 2002)

Funcionalmente, se ha visto que estos ratones muestran alteraciones en las pruebas de comportamiento como el laberinto en Y ya a los 3 meses, esto es, previo a la aparición de los depósitos de A β (Holcomb, *et al.*, 1998; Holcomb, *et al.*, 1999). Sin embargo, no es hasta los 15-17 meses cuando empiezan a desarrollar alteraciones en otras pruebas como el laberinto acuático de Morris o el laberinto de brazos radiales (Arendash *et al.*, 2001). Además, se ha descrito pérdida de neuronas en CA1 a los 22 meses (Sadowski *et al.*, 2004).

2. La célula cromafín como modelo neurosecretor

2.1. Características anatómicas e histológicas de la glándula adrenal

Las células cromafines son células neuroendocrinas que se localizan en la médula de las glándulas adrenales. En la especie humana, estas glándulas se encuentran asociadas a la parte superior de los riñones, por lo que también se denominan suprarrenales. En los ratones son ovaladas y pueden encontrarse más separadas de los riñones, unidas con tejido conjuntivo.

Las glándulas adrenales tienen dos partes bien diferenciadas anatómica y funcionalmente: la corteza en la parte externa y la médula en la parte interna, con origen embriológico y funciones muy diferentes. Rodeando a esta estructura se encuentra, además, una cápsula de tejido conjuntivo (Simpson, 1937) (Figura 6).

La **corteza** supone el 70%-80% del peso total de la glándula y se encuentra en la parte más externa. Se origina a partir del mesodermo y su función fisiológica consiste en la síntesis y secreción de una amplia gama de hormonas de naturaleza esteroidea. Histológicamente está formada por columnas de células que se dividen en tres capas denominadas, desde la superficie hacia el interior, zona glomerular (que produce mineralocorticoides (fundamentalmente aldosterona) responsables del volumen circulante y la presión arterial), zona fasciculata (que produce glucocorticoides (principalmente cortisol) relacionados con el metabolismo energético y la inmunosupresión) y la zona reticular (que produce hormonas sexuales (principalmente andrógenos) relacionadas con la aparición de algunos caracteres sexuales).

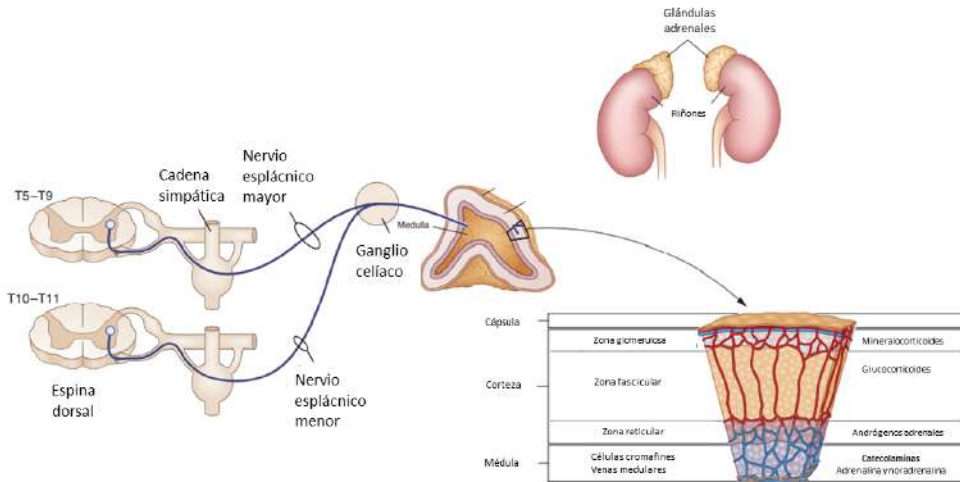


Figura 6. Glándula adrenal. La glándula adrenal se sitúa sobre los riñones, y se compone de la cápsula, la corteza, y la médula, que contiene las células cromafines. La médula adrenal está inervada por los nervios esplácnicos, que liberan el neurotransmisor ACh que actúa como estimulador de la liberación de las catecolaminas. Modificado de Norman, 2015 (Norman, Hormones, 2015).

En la zona más interior de la glándula se encuentra la **médula** adrenal, que representa en torno al 20-30% de la glándula. Su origen embrionario es a partir del neuroectodermo, y está constituida por las células cromafines, cuya función principal es la secreción de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina fundamentalmente), que activarán un estado de alerta en el individuo, preparándolo para una situación de “lucha o huida” ante una amenaza o situación de estrés (Coupland, 1965). Estas células también pueden aparecer en los denominados paraganglios “extra-adrenales”, como son el cuerpo carotídeo y el órgano de Zuckerlandl.

2.2. La célula cromafín adrenomedular

El nombre de células cromafines fue acuñado por Alfred Konh, debido a su capacidad de teñirse con sales de cromo (Huber, 2009). Son células neuroendocrinas, originadas durante el desarrollo embrionario, a partir de la cresta neural, un grupo de células que encontramos entre el tubo neural y el ectodermo, y forman parte de la rama simpática del Sistema Nervioso Autónomo (SNA). De hecho, estas células son consideradas neuronas postganglionares simpáticas modificadas, puesto que no poseen prolongaciones para inervar el órgano diana, sino que vierten sus secreciones

directamente a la sangre, donde actúan como neurohormonas.

Debido a su parecido con las neuronas simpáticas, Bornstein y colaboradores identificaron a las células cromafines de la médula adrenal como el “cerebro periférico”, principalmente por 3 propiedades: 1) Son capaces de recibir estímulos, tanto químicos como eléctricos, 2) Reconocen y descifran estas señales recibidas, 3) Tienen la maquinaria necesaria para generar una respuesta, como la liberación de catecolaminas y otras sustancias (Bornstein *et al.*, 2012). Estas células son ampliamente utilizadas como modelo para el estudio de mecanismos básicos de neurofisiología, secreción regulada y farmacología.

2.2.1. Funciones fisiológicas. El eje simpato-adrenomedular

El eje simpático-adrenomedular está constituido por el sistema nervioso simpático (SNS) y la médula adrenal, y es el sistema encargado de la síntesis, almacenamiento y liberación de catecolaminas, fundamentalmente adrenalina y noradrenalina. Es el responsable de las respuestas de “lucha o huida” del organismo ante un estímulo estresante.

Cuando se produce un estímulo estresante, éste va a ser interpretado en primer lugar por la corteza cerebral y el sistema límbico, y una vez es integrado, pasará a las regiones hipotalámicas posteriores (Roldan *et al.*, 1974), y de ahí a las neuronas preganglionares simpáticas de la médula espinal, activando la rama simpática y paralelamente inactivando la parasimpática. De ahí pasa al nervio esplácnico, y finalmente a las células cromafines de la médula adrenal. Es por eso que, a esta estructura, en la que participa tanto el sistema nervioso simpático como la médula adrenal se le conoce como eje “simpático-adrenomedular”.

Las células cromafines de la médula adrenal reciben las señales de tipo excitatorio a través de los nervios esplácnicos, que liberan mayoritariamente ACh (Feldberg *et al.*, 1934). Tras la estimulación, las células cromafines van a liberar catecolaminas, además de otros componentes que se encuentran en los gránulos secretores como ATP, péptidos opioides o cromograninas, al torrente circulatorio, donde se distribuirán a los distintos órganos diana (Wolf *et al.*, 2016).

En condiciones de reposo, la ACh se libera desde el nervio esplácnico, que dispara potenciales de acción a una frecuencia de aproximadamente 2 Hz, y las células secretan aproximadamente un 80% de adrenalina y 20% de noradrenalina (Figura 7). La frecuencia de disparo de potenciales de acción del nervio esplácnico va a aumentar a 10 Hz como respuesta a un estrés físico, ambiental o psicológico, así como al ejercicio, bajas concentraciones de oxígeno o glucosa, exposición al frío, miedo,...

y en consecuencia, en respuesta a todas estas situaciones aumentará drásticamente la liberación de catecolaminas (Tank y Lee Wong, 2015).

Las catecolaminas liberadas se unen a los receptores α y β adrenérgicos, receptores acoplados a proteínas G que se expresan en los tejidos diana, iniciando así las respuestas de “lucha o huida” (Cannon, 1932). Sus efectos incluyen el aumento de la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca, la distribución de la sangre hacia los músculos esqueléticos y el cerebro, la dilatación de bronquios y pupilas para mejorar la respiración y visión, y la movilización de las reservas energéticas mediante la glucólisis hepática y la lipólisis en los adipocitos (Tank y Lee Wong, 2015).

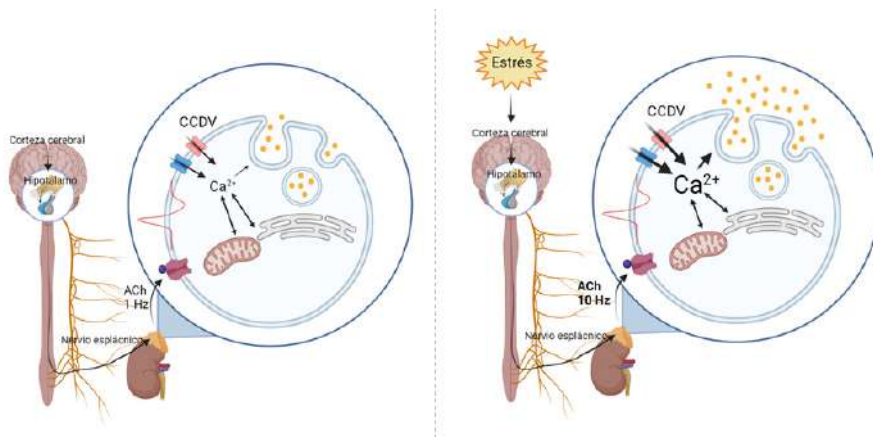


Figura 7. Eje simpático-adrenomedular. Cuando el individuo está en reposo, el nervio espláncnico dispara potenciales de acción que conducen a la liberación de ACh a una frecuencia de 1Hz, lo que sirve para generar una pequeña entrada de calcio y una secreción basal de catecolaminas y así mantener las funciones cardíacas, respiratorias y metabólicas en reposo. Cuando se produce una situación de estrés, la frecuencia de disparo de potenciales de acción a nivel del nervio espláncnico aumenta, lo que provoca la entrada masiva de calcio y la exocitosis.

En los últimos años, se ha venido produciendo una creciente evidencia de que el eje simpático-adrenomedular y la respuesta al estrés sufren alteraciones en las enfermedades neurodegenerativas, ya que, teniendo en cuenta que el proceso estímulo-secreción en las células cromafines está regulado por el SNS, así como la corteza cerebral y el hipotálamo, parece plausible que las alteraciones que se producen en las sinapsis a nivel central con las enfermedades neurodegenerativas, se puedan ver reflejadas también en diferentes partes del eje simpatoadrenal (de Diego, *et al.*, 2020).

2.2.2. Síntesis y almacenamiento de catecolaminas

Con el término catecolaminas denominamos a compuestos que presentan el grupo catecol (anillo de benceno con dos grupos hidroxilo) y una cadena lateral con un grupo amino, y destacan por su importancia fisiológica la adrenalina (ADR), noradrenalina (NA) y dopamina (DA). Mientras que la ADR se sintetiza y almacena únicamente en la médula adrenal, la NA y DA pueden también sintetizarse en los nervios simpáticos periféricos. La ruta biosintética de las catecolaminas comienza con el aminoácido tirosina, que puede derivar de la dieta o de su biosíntesis en el hígado a partir del aminoácido fenilalanina. En la figura 8 vemos detallada la ruta de síntesis.

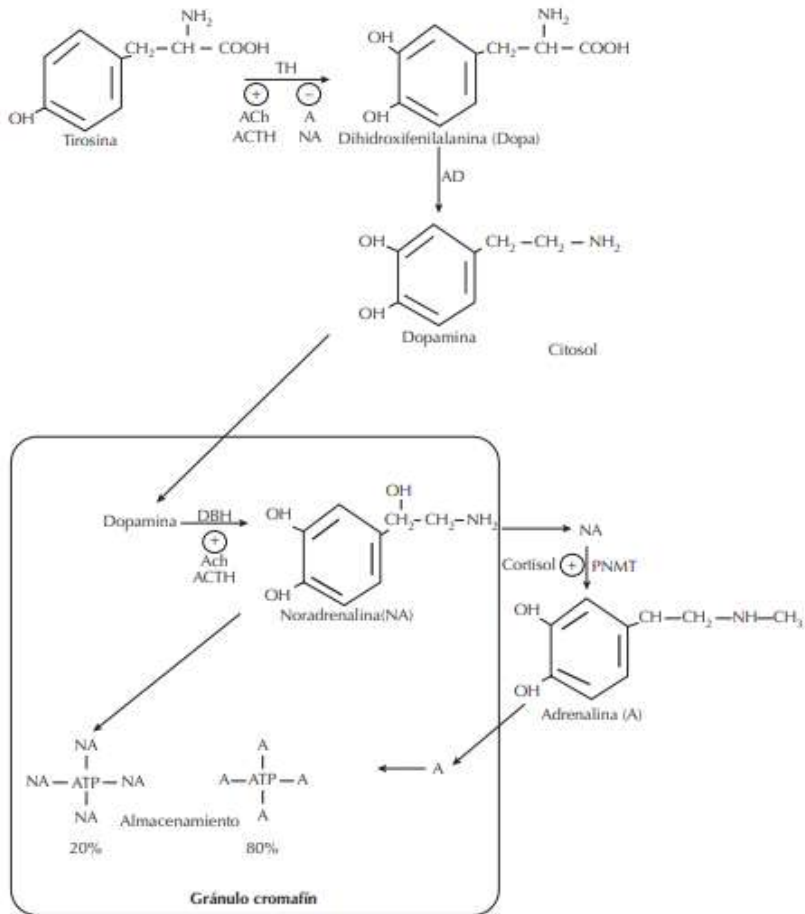


Figura 8. Ruta biosintética de las catecolaminas. Imagen extraída de F Tresguerres, Fisiología Humana, 2005 (F Tresguerres, 2005).

La diferencia entre las células adrenérgicas y las noradrenérgicas es que las primeras poseen en el citoplasma la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT), encargada de la transformación de NA en ADR como último paso de la ruta de síntesis.

2.2.3. Excitabilidad celular y exocitosis de las catecolaminas

William W. Douglas y Ronald P. Rubin describieron la importancia que tiene el ión Ca^{2+} en el proceso excitotóxico de secreción de catecolaminas inducida por ACh en la médula adrenal, lo que llevó a acuñar el término “acoplamiento estímulo-secreción” (Douglas, 1968). En los años siguientes, se describió toda la secuencia de acontecimientos que tiene lugar en la célula cromafín desde que es estimulada por la ACh procedente del nervio esplácnico hasta que se produce la liberación de catecolaminas al torrente circulatorio.

La ACh liberada del nervio esplácnico se va a unir a receptores nicotínicos y muscarínicos presentes en la membrana de la célula cromafín. La proporción de estos receptores varía de una especie a otra, y en mamíferos es predominante la acción de los nicotínicos, que son receptores ionotrópicos, lo que significa que actúan como canales iónicos y que, tras la unión la ACh, se van a abrir permitiendo el paso de cationes al interior celular, principalmente Na^+ , aunque también Ca^{2+} (Douglas, 1967).

La entrada de estos cationes va a producir la despolarización de la célula, que favorece la apertura de los canales de sodio dependientes de voltaje (Ceña, 1983). Esto permite la entrada masiva del Na^+ al interior celular, lo que produce que la despolarización sea aún mayor, lo que lleva a un disparo de potenciales de acción y apertura de los CCDV (García, 1984). Esto permite el paso del Ca^{2+} al interior celular, con el consecuente aumento transitorio de la concentración de Ca^{2+} citosólico y la activación de distintos procesos, entre los que se incluye la activación de la maquinaria excitotóxica y la consiguiente exocitosis.

La exocitosis constituye pues la etapa final del proceso de estimulación-secreción, y consiste en la fusión de la membrana de las vesículas secretoras con la membrana plasmática de la célula, formándose un poro de fusión a través del cual se van a liberar las distintas sustancias almacenadas en la vesícula secretora hacia el exterior celular. La exocitosis dependiente de Ca^{2+} , que sirve como mecanismo de secreción, también se denomina “exocitosis regulada”, para diferenciarla de otro proceso que sucede en todos los tipos celulares, necesario para el reciclado de la membrana plasmática y que se conoce como “exocitosis constitutiva”, que es independiente de Ca^{2+} (De Matteis y

Luini, 2008).

Por lo que respecta a las vesículas secretoras, éstas se forman en el retículo endoplasmático (RE) y se empaquetan en el aparato de Golgi. En su transporte hacia la membrana sufren un proceso de maduración, su interior se acidifica y captan las catecolaminas y otras sustancias entre las que cabe destacar el ATP, diversos péptidos, Ca^{2+} y ácido ascórbico. En este transporte de vesículas el citoesqueleto juega un papel fundamental, principalmente los microtúbulos, las miosinas II y V, y la actina (Giner *et al.*, 2005; González-Jamett *et al.*, 2013; Meunier y Gutiérrez, 2016).

Finalmente, el potencial de membrana retorna al potencial de reposo mediante la salida de K^+ a través de canales de potasio, dependientes tanto de voltaje como de Ca^{2+} (Figura 9).

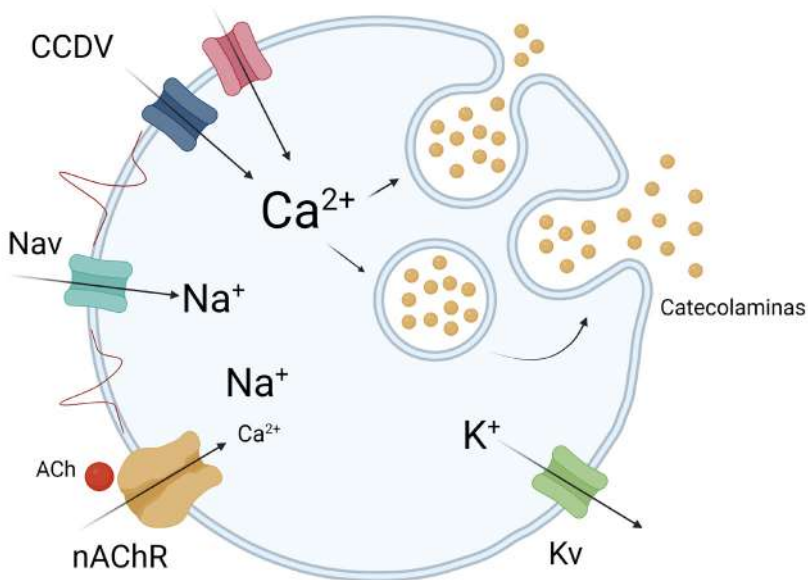


Figura 9. Esquema representativo del acoplamiento estímulo-secreción en la célula cromafín. Dibujo creado con Biorender.com

La exocitosis de catecolaminas inducida por la ACh puede ser regulada a diferentes niveles. Por un lado, la enzima acetilcolinesterasa (AChE), que está en la hendidura sináptica entre el nervio esplácnico y las células cromafines, es la responsable de la degradación de la ACh (Sawyer y Everett, 1947). Por otro lado, se puede producir una desensibilización de los receptores nicotínicos, con lo que disminuyen las corrientes

iónicas a su través (Quick y Lester, 2002). Los canales de Na^+ y los CCDV, también pueden sufrir una inactivación (Artalejo *et al.*, 1987; Aunis, 1998).

La liberación de catecolaminas también está regulada de una manera autocrina/paracrina por el ATP, péptidos opioides y otros componentes de las vesículas secretoras que son liberados junto a las catecolaminas durante el proceso exocitótico. Así, el ATP co-liberado junto a las catecolaminas se une a receptores purinérgicos de tipo metabotrópico, favoreciendo la activación de una proteína G, que se une directamente a los CCDV, produciendo una reducción de la entrada de Ca^{2+} a través de estos canales (Gandia *et al.*, 1993).

Además, el Ca^{2+} , una vez entra en la célula, va a ser tamponado y redistribuido en la célula cromafín por la acción de proteínas quelantes de Ca^{2+} , como la calbindina y en menor medida la parvalbúmina, además del RE y la mitocondria, principales estructuras intracelulares implicadas en el tamponamiento de este ión (García *et al.*, 2006).

2.2.4. El citoesqueleto de actina y su papel en la exocitosis en la célula cromafín

En el transporte de las vesículas secretoras desde el aparato de Golgi hasta los sitios activos de exocitosis el citoesqueleto va a representar un papel esencial, fundamentalmente los microtúbulos, las miosinas II y V, y la actina (Giner *et al.*, 2005; González-Jamett *et al.*, 2013; Meunier y Gutiérrez, 2016).

La actina puede encontrarse en la célula en 2 conformaciones: La F-actina o filamentosa, que es la forma polimerizada y la G-actina o globular, que es el monómero que la forma. Estas dos conformaciones se encuentran en un constante equilibrio dinámico.

Desde hace décadas, se sabe que el citoesqueleto de actina se sitúa en la célula cromafín justo por debajo de la membrana plasmática, formando un anillo o red de F-actina (Burgoyne *et al.*, 1982; Vitale *et al.*, 1995). En un inicio, se pensó que simplemente formaba una barrera entre el contingente de vesículas de reserva y la membrana plasmática, aunque ahora se sabe que tiene un papel más activo en el proceso de exocitosis.

Mediante el uso de la técnica de microscopía de onda evanescente o TIRM se vio que, embebidas en la red de F-actina, se encontraban vesículas que presentaban movilidad (Oheim y Stühmer, 2000; Johns *et al.*, 2001), aunque esta movilidad se reducía a medida que se aproximaban a la membrana plasmática, lo que puede explicarse por dos factores: En primer lugar, por la interacción del complejo SNARE

de las vesículas con el complejo SNARE de la membrana plasmática, y en segundo lugar, por su estancamiento en la red de F-actina, ya que ésta forma una red densa bajo la membrana de manera que los espacios son cada vez menores (Burgoyne *et al.*, 1982; Giner *et al.*, 2005). De hecho, en trabajos en los que se usan disruptores de la F-actina en la línea celular de feocromocitoma PC12, se ha visto que la exocitosis de vesículas aumenta (Ng *et al.*, 2002; Desnos *et al.*, 2003).

Por otro lado, es importante destacar que también hay estudios que hablan de un doble papel de los filamentos de F-actina en la exocitosis de las células neuroendocrinas. Por un lado, tendrían este papel de barrera a los gránulos de exocitosis que se ha comentado previamente, pero por otro es necesaria el paso por esta red de F-actina para que las vesículas terminen de madurar. Además, y una vez se ha desestructurado el citoesqueleto de actina para permitir la exocitosis, es necesaria la polimerización de actina “de novo” para que los gránulos puedan alcanzar la membrana plasmática, en conjunto con otras proteínas como la miosina II, IV, o V (Giner *et al.*, 2005; Malacombe *et al.*, 2006).

2.2.5. La célula cromafín como modelo para el estudio de enfermedades neurodegenerativas

Como ya se ha comentado, debido a sus características como células neuroendocrinas, la célula cromafín se ha considerado como una “ventana abierta al cerebro”, y ha sido utilizada para esclarecer muchas funciones celulares y mecanismos básicos en el campo de la función neuronal y mecanismos de secreción (Burgoyne, 1995; Borges *et al.*, 2018), así como del desarrollo neuronal (Aloe y Levi-Montalcini, 1979).

Las células cromafines presentan gran variedad de receptores y canales iónicos, comparables a los de las neuronas del SNC (Lingle *et al.*, 2018), por lo que se han utilizado ampliamente en el estudio de la electrofisiología de las neuronas, la transmisión sináptica y la actividad de fármacos destinados al SNC. De hecho, un ejemplo de la importancia de este modelo en la neurociencia, es la obtención del Premio Nobel en Medicina en 1991 por Erwin Neher y Bert Sakmann, por la invención de la técnica de patch clamp trabajando con la célula cromafín. También los profesores Rothman, Südfold y Scheckman fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina en 2013, por sus trabajos en el tráfico vesicular y en los que también utilizaron la célula cromafín como modelo.

Además de estos estudios fisiológicos, también hay gran cantidad de trabajos en los que la célula cromafín se utiliza para estudiar patologías en las que pueden

estar implicadas alteraciones a nivel de la médula adrenal, como tumores (para el diagnóstico del feocromocitoma se miden los niveles de catecolaminas en plasma), diabetes (Musial *et al.*, 2017), hipertensión arterial (de Pascual *et al.*, 2013; Bomfim *et al.*, 2017) o el dolor crónico (Arribas-Blázquez *et al.*, 2019).

En los últimos años, y gracias al desarrollo de modelos animales para el estudio de enfermedades neurodegenerativas, también se ha utilizado la célula cromafín para el estudio de la mismas. Y es que, cada vez está más aceptado que el daño que se produce en las neuronas con estas enfermedades también se va a ver reflejado en la célula cromafín. Esto puede ocurrir mediante diferentes vías: 1) Alteraciones en las neuronas corticales, del sistema límbico o hipotalámicas que controlan de manera central el eje simpatoadrenal. 2) La propagación de las proteinopatías de las células centrales a células periféricas, 3) Alteraciones en la respuesta al estrés, debido a las limitaciones de las funciones corporales causadas por la progresión de las enfermedades neurodegenerativas. 4) Las proteínas mutadas se pueden expresar en las células cromafines. 5) Las condiciones de hipoxia derivadas de la patología microvascular asociada a las enfermedades neurodegenerativas puede llevar a grandes cambios en las funciones de la célula cromafín (de Diego, *et al.*, 2020).

Por todo lo descrito anteriormente, es posible que en las enfermedades neurodegenerativas se estén produciendo alteraciones en el eje simpatoadrenal, y concretamente en la célula cromafín, que pueden verse reflejadas como cambios en la excitabilidad, en las corrientes iónicas, en las señales de calcio intracelulares, y en la exocitosis de catecolaminas, que pueden ocurrir tanto en situaciones de reposo como de estrés.

De hecho, en trabajos previos del grupo se han descrito diversas alteraciones tanto en la excitabilidad celular como en el proceso secretor de catecolaminas en distintas enfermedades neurodegenerativas como son la enfermedad de Alzheimer (de Diego, *et al.*, 2012; Nanclares, Tesis Doctoral), la enfermedad de Huntington (Martínez-Ramírez *et al.*, 2018) o la Esclerosis lateral Amiotrófica (Calvo-Gallardo *et al.*, 2015; Méndez-López *et al.*, 2021).

2.2.6. Alteraciones en la exocitosis en el modelo 3xTg-AD de enfermedad de Alzheimer

En el ITH, se ha trabajado previamente con el modelo murino 3xTg-AD de EA, estudiando las corrientes iónicas y la exocitosis, buscando posibles alteraciones que acontecen con la progresión de la patología y/o el envejecimiento de los animales.

Para ello, se utilizaron ratones de 2 y 12 meses de edad, tanto controles (WT) como 3xTg-AD, y se estudió, mediante la técnica de amperometría en célula única, la secreción de catecolaminas en los 4 grupos experimentales, utilizando el estímulo fisiológico ACh y también una solución despolarizante con alto contenido en K⁺.

Se observó que, en los ratones de 2 meses, la exocitosis estaba disminuida en los ratones 3xTg-AD con respecto a los WT. Sin embargo, con el envejecimiento la exocitosis tendía a disminuir en los ratones WT, mientras que aumenta en las células de ratones 3xTg-AD, lo que apoya la hipótesis de que se podría estar produciendo una hiperactividad del eje simpato-adrenomedular para compensar las alteraciones en la adaptación al estrés en los pacientes de EA.

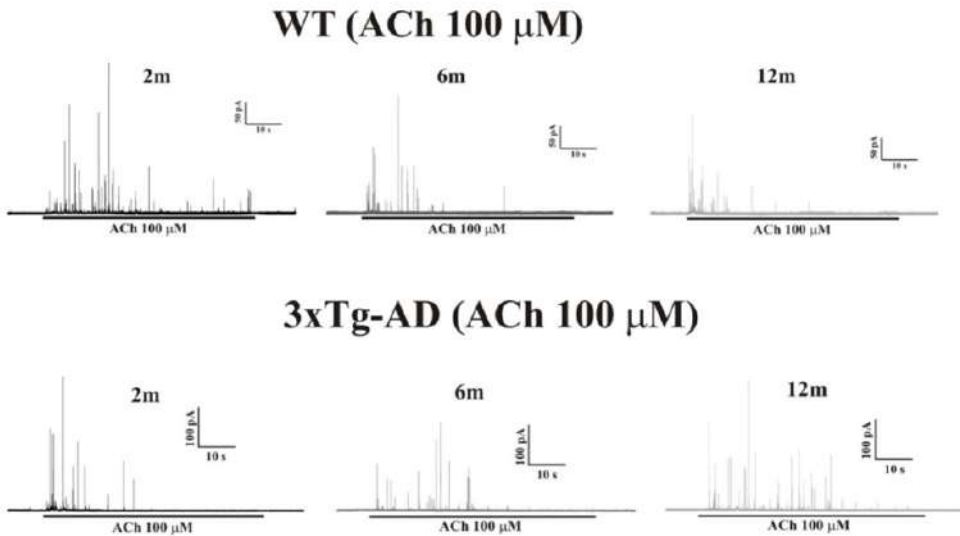


Figura 10. Secreción de catecolaminas en ratones WT y 3xTg-AD con el envejecimiento. Con el envejecimiento fisiológico de los ratones controles (fila superior), se observa una disminución de la secreción de catecolaminas mientras que con la EA (fila inferior), el número de espigas amperométricas, y, por tanto, los eventos de secreción de catecolaminas, aumentan al envejecer el animal. Registros originales obtenidos por Nanclares, 2017, datos sin publicar.

Como se puede ver en la figura 10, el número de espigas de secreción, que se corresponden con cada una de las vesículas secretadas, es significativamente mayor en los ratones 3xTg-AD de 12 meses con respecto a los controles sanos de la misma edad. Además, si estudiamos en profundidad esas espigas, encontramos que tienen una morfología diferente, siendo más rápidas y más cortas en los ratones transgénicos con respecto a los controles.

A la vista de estos resultados previos, nos planteamos como uno de los objetivos de esta tesis estudiar más en profundidad estos acontecimientos, tratando a su vez de encontrar explicación a sus causas.

3. Señales de calcio y excitosis

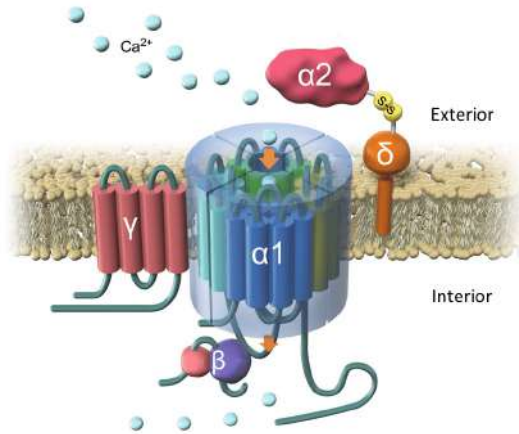
Los cambios en los niveles de Ca^{2+} citosólico regulan diversas e importantes funciones fisiológicas, como son la contracción muscular, la neurotransmisión, la liberación de hormonas, la expresión génica, e incluso la muerte celular por necrosis o apoptosis (García *et al.*, 2006). Esta homeostasia celular del calcio puede estar regulada por la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular a través de los CCDV y por organelas intracelulares como la mitocondria y el retículo endoplásmico que modulan los movimientos citosólicos de este catión.

3.1. Canales de calcio dependientes de voltaje

La principal fuente de entrada de Ca^{2+} al interior celular son los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV), que se encuentran presentes en la membrana de células nerviosas, musculares, endocrinas, cardíacas, β -pancreáticas e inmunológicas.

Son canales transmembrana que están formados por la combinación de cuatro subunidades diferentes ($\alpha 1$, $\alpha 2$ - δ , β y γ), siendo la subunidad $\alpha 1$ la responsable de la formación del poro del canal, y por tanto la que le otorga las propiedades específicas como la permeabilidad iónica, y la subunidad β la encargada de interactuar con segundos mensajeros (Marcantoni *et al.*, 2008). En la figura 11 vemos una representación tridimensional de la estructura de estos canales.

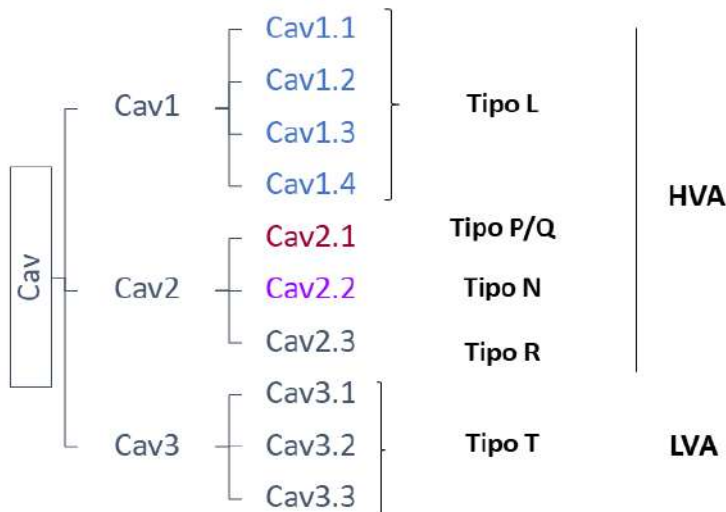
Figura 11. Representación esquemática de un canal de calcio dependiente de voltaje. Los canales de calcio dependientes de voltaje están formados por distintas subunidades, cada una encargada de funciones específicas. Imagen modificada de Ninomiya, 2020 (Ninomiya *et al.*, 2020).



3.1.1. Subtipos de canales de calcio

Los canales de CCDV se suelen clasificar en dos grandes categorías según el rango de voltaje necesario para su activación: Canales de bajo umbral de activación (LVA: low voltage-activated, que incluye a los canales tipo T) y canales de alto umbral de activación (HVA: high voltage-activated, que engloba a los canales L, N, PQ y R).

Aunque clásicamente los CCDV se han venido nombrado con letras como se indica en el párrafo anterior, recientemente la nomenclatura de éstos se ha modificado para unificarla con la de otros tipos de canales iónicos, adoptando el siguiente formato: Cav (canal de calcio dependiente de voltaje) seguido de un número, que viene determinado por la composición de la cadena peptídica de la subunidad $\alpha 1$. La clasificación quedaría como nos encontramos en el siguiente esquema:



Describiremos a continuación brevemente las principales características de los diferentes subtipos de CCDV que podemos encontrar en las células cromafines adrenomedulares, que son los siguientes:

Canales tipo L (Cav1)

Son canales de alto umbral de activación por voltaje (requieren fuertes despolarizaciones), y presentan una inactivación lenta. Farmacológicamente, se caracterizan por ser sensibles a dihidropiridinas (DHP), tanto agonistas (Bay K8644) como antagonistas (nifedipino). Las benzotiazepinas también van a actuar como antagonistas (Catterall, 2000).

En cuanto a sus funciones, van a participar en la secreción hormonal, el desarrollo y diferenciación celular y la apoptosis. Además, son la principal vía de entrada en corazón y músculo esquelético.

Canales tipo N (Cav2.2)

Fueron identificados por primera vez en neuronas, y se caracterizan electrofisiológicamente por necesitar grandes despolarizaciones para su activación, y se inactivan rápidamente, aunque de manera incompleta, a potenciales positivos. Desde el punto de vista farmacológico, son bloqueados de manera irreversible por la ω -conotoxina GVIA (Olivera *et al.*, 1984; Plummer *et al.*, 1989)

Canales tipo P/Q (Cav2.1)

Aunque inicialmente se identificaron como dos canales diferentes, siendo los P descubiertos en las neuronas de Purkinje, de donde adquirieron el nombre (Llinas *et al.*, 1989; Hillman *et al.*, 1991), y los Q gracias a la toxina ω -conotoxina MVIIC (Monje *et al.*, 1993), actualmente se ha llegado al consenso de estudiarlos en conjunto, como canal P/Q (Cav2.1 en la nueva nomenclatura) debido a la dificultad para diferenciar su subunidad $\alpha 1A$, encargada de formar el poro de fusión.

Farmacológicamente, son sensibles a ω -agatoxina IVA (Botana, 2014) y, de manera no específica, a la ω -conotoxina MVIIC (Monje *et al.*, 1993), la ω -conotoxina MVIID y la ω -gramotoxina SVIA (Lampe *et al.*, 1993; Turner *et al.*, 1995).

Además, está descrito que son los canales más ampliamente distribuidos en el SNC de mamíferos, y están muy relacionados con la modulación de la actividad neuronal y la liberación de neurotransmisores (Bertolino y Llinás, 1992). En células cromafines, parecen estar asociados a la secreción de catecolaminas, más concretamente con la liberación de vesículas del contingente inmediatamente liberable (Álvarez *et al.*, 2013).

Canales tipo R (Cav2.3)

Se denominan así al ser los responsables de la corriente de calcio residual que se mantiene al bloquear todos los demás subtipos de CCDV. Presentan una cinética de inactivación rápida, y no se observan al utilizar la configuración de célula entera, pero sí con parche perforado.

En lo que a su presencia y distribución en el SNC se refiere, los canales tipo N y P/Q se encuentran en el hipocampo, facilitando la transmisión sináptica entre las zonas CA1 y CA3. Por otro lado, los canales tipo L se encuentran fundamentalmente en el cuerpo de las neuronas centrales, así como en las dendritas proximales (Tan *et al.*, 2012).

En las células cromafines de ratón se ha descrito la presencia de estos canales en las proporciones que se detallan en la Figura 12:



Figura 12. Proporciones relativas de los distintos subtipos de canales de calcio en células cromafines de ratón. Adaptado de García *et al.*, 2006.

3.1.2. Mecanismos moduladores de los canales de calcio

Como ya hemos descrito previamente, los CCDV juegan un papel fundamental en distintas respuestas celulares, por lo que no es de extrañar que requieran una fina modulación, ya que, de otra manera, podría aumentar de manera excesiva la concentración de calcio intracelular y conducir a la muerte celular.

A continuación describiremos brevemente los distintos modos de modulación de los CCDV, como son el voltaje de la membrana, el propio Ca^{2+} y mecanismos autocrino/paracrinos mediados por proteínas G (García *et al.*, 2006).

Modulación por calcio

En 1964, Hagiwara y Naka, describieron en la fibra muscular del *Balanus nubilus*, que las contracciones musculares en respuesta a una despolarización sólo se producían cuando las concentraciones de Ca^{2+} intracelular estaban disminuidas por agentes quelantes como el EGTA, EDTA o K-citrato (Hagiwara, Susumu y Naka, 1964). Esta modulación de las corrientes se denominó inactivación dependiente de Ca^{2+} de los CCDV (CDI, por las siglas del inglés, calcium-dependent inactivation), y posteriormente se corroboró que este mecanismo de inactivación por Ca^{2+} también ocurre en muchas otras células excitables (Brehm y Eckert, 1978; Tillotson, 1979; Hagiwara, S. y Byerly, 1981).

Las características específicas de la CDI son las siguientes: 1) Presenta una curva con forma de “U”, donde la inactivación es mayor a voltajes intermedios; 2) Otros cationes divalentes, como el Ba^{2+} , son menos efectivos en la inactivación del canal; 3) Se produce tras un aumento del Ca^{2+} , tanto intracelular como extracelular; 4) Puede suceder incluso en ausencia de despolarizaciones si se produce un aumento de Ca^{2+} intracelular de $1 \mu\text{M}$ (Eckert y Chad, 1984).

En cuanto al mecanismo implicado, parece ser que la calmodulina sería el sensor de calcio responsable de esta modulación. Al unir Ca^{2+} , ésta cambia su conformación a una forma de α -hélice, capaz de inactivar sitios de fosforilación en las subunidades α y β del canal (Wahl-Schott *et al.*, 2006). La calmodulina también puede actuar indirectamente a través de la proteína calcineurina (Meuth *et al.*, 2002).

Por otro lado, cabe destacar que esta CDI es ligeramente diferente en los distintos subtipos de CCDV. Así, los canales tipo L del músculo se van a inactivar rápidamente tras un estímulo despolarizante, mientras que los canales N y P/Q van a tener una inactivación más lenta (Yue, D. T. *et al.*, 1990). En la cromafín, sin embargo, ocurre lo contrario, el canal L tiene una CDI más lenta que los canales N y P/Q (Hernández-Guijo *et al.*, 2001).

Modulación por voltaje

Si comparamos la intensidad de la corriente de calcio que entra en la célula tras la aplicación de dos pulsos de voltaje seguidos podemos comprobar que, si el intervalo entre ambos es muy corto, y por tanto no permite una recuperación del canal, en el segundo pulso veremos una corriente significativamente menor, lo que evidencia una inactivación del canal por la aplicación del pulso despolarizante (Gutnick *et al.*, 1989). El mecanismo por el cual los CCDV se inactivan por voltaje es aún un gran desconocido.

Además, está descrito que esta modulación va a afectar de manera diferente a los distintos subtipos de CCDV. Así, en la célula cromafín se vio que los canales N y P/Q son más sensibles que los L a la inactivación por voltaje (Villarroya *et al.*, 1999).

Modulación por proteínas G

Está descrito que la unión de distintos neurotransmisores (por ejemplo ATP o péptidos opioides) a sus receptores en la membrana plasmática puede modular la actividad de los CCDV a través de un mecanismo mediado por proteínas G. Concretamente, las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G se van a unir directamente a la subunidad $\alpha 1$ del CCDV, modulando así su apertura (Ikeda, 1996; Fox *et al.*, 2008).

Un ejemplo de este mecanismo de modulación es la modulación de los CCDV por ATP (Gandía *et al.*, 1993; Ulate *et al.*, 2000). Cuando el ATP se une al receptor purinérgico se activa una proteína G que se une a los CCDV, produciendo así una disminución en la amplitud de la corriente de calcio y un enlentecimiento en la cinética de activación de la misma. Esto es lo que ocurriría en condiciones fisiológicas. Sin embargo, cuando se produce una despolarización de la membrana (como la que sucede con una ráfaga de disparos de potenciales de acción), la proteína G se va a desacoplar del canal, con lo que se produce una “facilitación” de la corriente de entrada de Ca^{2+} (García *et al.*, 2006). Esto se puede remedar experimentalmente con la aplicación de un prepulso despolarizante, como se hizo en el trabajo de Gandía *et al.* (Gandía *et al.*, 1993) (Figura 13).

Se ha visto que también la unión de péptidos opioides, también presentes en las vesículas de secreción de las células cromafines, a los receptores de opioides μ y δ también estaría modulando la corriente de Ca^{2+} a través de un mecanismo mediado por proteínas G (Albillos *et al.*, 1996a), y lo mismo podría ocurrir con otros componentes de los gránulos secretores como las catecolaminas y los neuropéptidos, además de los mencionados ATP y opioides), tratándose de un mecanismo de modulación autocrino/paracrino (Hernández-Guijo *et al.*, 1998; García *et al.*, 2006).

Experimentalmente, se ha demostrado que la diálisis celular con GDP- β -S o el pretratamiento con toxina Pertussis, ambos inhibidores de la actividad de las proteínas G, impiden la inactivación de los CCDV por neurotransmisores. También se ha visto que, si se introduce un análogo no hidrolizable del GTP, el GTP- γ -S, se van a ver inhibidas las corrientes de Ca^{2+} de forma similar a lo que ocurriría con la aplicación de ATP (García *et al.*, 2006). Estos hallazgos experimentales apoyan la hipótesis de que las proteínas G están mediando la modulación de los CCDV por neurotransmisores.

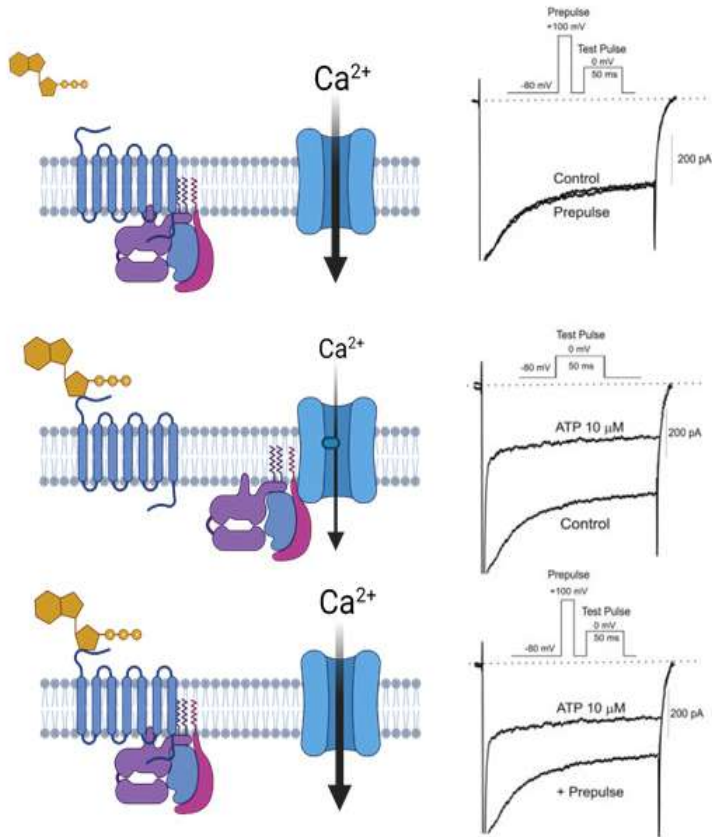


Figura 13. Mecanismo de modulación de la actividad de los CCDV mediado por proteínas G. En condiciones de reposo, las proteínas G no se encuentran ligadas a los CCDV, y cuando el canal se abre, una gran cantidad de calcio pasa al interior celular. Cuando el ATP se une a los receptores purinérgicos, la proteína G se une al canal, modulando así la corriente y disminuyendo el pico de la misma. La aplicación de un prepulso despolarizante desacopla la proteína G del canal, y la corriente recupera amplitudes de situación control. Esquema creado con Biorender.com basado en la representación de (García *et al.*, 2006).

3.2. Mitocondria y retículo endoplásmico

Una vez hemos visto la principal fuente de entrada de calcio en las células, los CCDV, vamos a ver a los otros dos grandes protagonistas de su regulación en el interior celular, la mitocondria y el retículo endoplásmico (RE).

La entrada de Ca^{2+} de los CCDV va a producir la creación de microdominios con altas concentraciones de Ca^{2+} (HCMD, por sus siglas del inglés, High calcium microdomains) cerca de la boca del canal, donde se pueden llegar a alcanzar concentraciones de hasta 10-100 μM de Ca^{2+} . Estos HCMD son muy limitados en tiempo y espacio, ya que el Ca^{2+} se va a difundir rápidamente hacia el citosol. Concretamente, entra a las mitocondrias, cercanas a la membrana plasmática, fundamentalmente a través del uniportador de Ca^{2+} gracias a la fuerza motriz que proporciona el potencial de la membrana mitocondrial. Esto promueve la acumulación de calcio en el interior de la mitocondria a concentraciones entre 5 y 6 veces mayores a las del $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Posteriormente, el calcio sale de la mitocondria principalmente a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, aunque en ocasiones, cuando la mitocondria está muy despolarizada, puede salir a través del uniportador (García *et al.*, 2006).

El Ca^{2+} que se acumula en la mitocondria va a estimular la respiración celular mediante la activación de las deshidrogenasas del ciclo de los ácidos tricarbónicos para producir NADH, activando con ello el complejo I y por tanto la síntesis de ATP. Con esto, se favorece a la recuperación de la homeostasis del calcio celular tras este período de actividad (García *et al.*, 2006; Naia *et al.*, 2017).

Una vez que termina la activación de la célula, el Ca^{2+} acumulado en la mitocondria se va a liberar al citosol (en un periodo que va a durar segundos o minutos). Así, la concentración citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) va a permanecer ligeramente elevada durante un tiempo, lo que favorece la movilización de nuevas vesículas hacia zonas cercanas a la membrana, que quedarán listas para los siguientes procesos de exocitosis (Neher, 1998).

Después, el calcio desaparecería del citosol bien saliendo al exterior celular por bombas (ATP-*asas*) de la membrana plasmática o bien acumulándose en el RE, al cual entra a través de una bomba ATP-*asa* denominada SERCA. Así, el RE se comportaría como un almacén de Ca^{2+} , que puede ser liberado vía IP3R o RyR (Alonso *et al.*, 1999; Inoue *et al.*, 2003).

En base a estos datos, nuestro grupo propuso la existencia de un tridada funcional encargada de regular la exocitosis y estos movimientos de calcio. Ésta estaría formada

últimos, además, se encuentran ligados físicamente a canales de aniones dependientes de voltaje (VDAC, voltaje-dependent anion channels), que se encuentran en la membrana mitocondrial y facilitan la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria (Naia *et al.*, 2017).

Finalmente, cabe destacar que en algunos tipos celulares existe la denominada liberación de calcio inducida por calcio (CICR, del inglés calcium-induced calcium release), mediante la cual el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ producida por la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV va a favorecer la liberación de Ca^{2+} del RE a través de los IP3R o los RyR, a modo de mecanismo amplificador de la señal. Sin embargo, esto no parece ocurrir en células cromafines de ratón, donde el CICR es casi inexistente, y el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]$ cerca del RE va a producir la entrada de Ca^{2+} al mismo.

3.3. Señales de calcio y enfermedad de Alzheimer

La Hipótesis del calcio en la enfermedad de Alzheimer fue propuesta, como hemos comentado en apartados anteriores, en 1989 por el profesor Khachaturian, tras realizar distintos estudios en los que vio que la activación de la vía amiloidogénica podía alterar las vías intracelulares de Ca^{2+} , de las cuales depende el proceso de cognición (Landfield, 1987; Khachaturian, 1989). Posteriormente, se ha visto que estas alteraciones en las señales de calcio se producen tanto en neuronas centrales como periféricas (Querfurth y Selkoe, 1994; Bezprozvanny y Mattson, 2008).

A nivel de la entrada de Ca^{2+} al interior celular, se ha visto que el $\text{A}\beta$ puede favorecer la apertura de los CCDV, así como de los receptores de NMDA, lo que aumentará la entrada de este ión hacia el citosol (Toescu y Verkhratsky, 2007; Evangelisti *et al.*, 2016). Además, esta sobrecarga de calcio es capaz de activar a la enzima β -secretasa, aumentando así la producción de $\text{A}\beta$. Por otro lado, se ha visto también que el propio péptido $\text{A}\beta$ es capaz de generar poros en la membrana permeables para el Ca^{2+} , favoreciendo así la entrada del Ca^{2+} al interior celular (Arispe *et al.*, 1993; Lee, J. *et al.*, 2017).

En cuanto a los depósitos de Ca^{2+} intracelulares, los oligómeros de $\text{A}\beta$ son capaces de interactuar directamente con proteínas del RE, como los RyR o IP3R, favoreciendo la salida de Ca^{2+} al citosol (Ferreiro *et al.*, 2004; Wang, Xingjian y Zheng, 2019). Por otro lado, se ha visto que alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} en el RE van a favorecer la formación de $\text{A}\beta$ y la apoptosis celular (Casella y Cecchi, 2021).

Por otro lado, la mitocondria también se va a sufrir alteraciones con la EA. De hecho, se ha visto que el $\text{A}\beta$ induce la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria, así como la

transferencia de este ión desde el RE (Ferreiro *et al.*, 2008; Sanz-Blasco *et al.*, 2008). Además, cuando se produce un aumento del calcio en el interior mitocondrial, se va a producir una permeabilización de la membrana externa mitocondrial, que favorece la liberación distintos componentes de la mitocondria, entre los que se incluye el citocromo C y otros factores inductores de apoptosis, lo que va a llevar a la muerte celular (Goldstein *et al.*, 2000).

De hecho, tanto en modelos animales, así como en cerebros de pacientes de EA, se han visto alteraciones en las mitocondrias, tanto a nivel funcional, como una disminución en la producción de ATP, como morfológicas y de distribución de las mismas en la célula (Atamna y Frey, 2007; Santos *et al.*, 2010).

4. Receptores purinérgicos

Geoffrey Burnstock postuló, en 1970, que el ATP podría tener la función de neurotransmisor, ya que demostró que éste era liberado por los nervios vagos tras su estimulación eléctrica (Burnstock, G. *et al.*, 1970). Posteriormente, se propuso la existencia de distintos tipos de receptores para nucleótidos y nucleósidos (Burnstock, Geoffrey, 1980), que se dividieron, según uniesen adenosina o ATP y ADP en dos grupos, y se denominaron receptores purinérgicos P1 y P2, respectivamente.

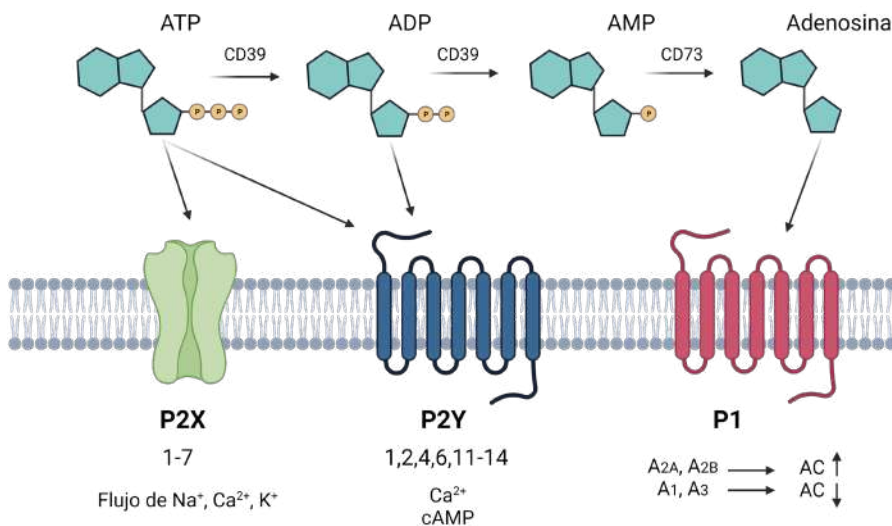


Figura 15. Resumen de los receptores purinérgicos y enzimas implicadas en la señalización purinérgica. Imagen creada con Biorender.com y basada en la representación de Calzaferrri, 2021

Alteraciones en el eje simpatoadrenal con
el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

Unos años más tarde, los receptores del subtipo P2 se subdividieron en 2 grupos, P2X y P2Y, según fueran canales iónicos activados por ligando (ionotrópicos, P2X), o receptores acoplados a proteínas G (metabotrópicos, P2Y) (Burnstock, G. y Kennedy, 1985). Por último, en 2002 se describió un nuevo grupo, los receptores purinérgicos P0, que están acoplados a proteínas G y unen adenina.

4.1. Receptores purinérgicos metabotrópicos P2Y

Estos receptores se activan por ATP, ADP, UTP y UDP, y son receptores metabotrópicos que se encuentran unidos a proteínas G: Los receptores P2Y1, P2Y2, P2Y4 y P2Y6 se encuentran acoplados a proteínas G_q, el receptor P2Y11 a proteínas G_q y G_s, y los receptores P2Y12, P2Y13 y P2Y14 a la proteína G_i (Erb y Weisman, 2012), como se muestra en la figura 15 y se resume en la tabla 2.

P2	P2X	P2X1	ATP	Permeable a Na ⁺ , Ca ²⁺ y K ⁺
		P2X2		
		P2X3		
		P2X4		Permeable a Cl ⁻
		P2X5		
		P2X6		
		P2X7		
	P2Y	P2Y1	ADP	Ligado a proteínas G _q
		P2Y2	UTP, ATP	
		P2Y4	UTP, ATP	
		P2Y6	UDP	
		P2Y11	ATP	Ligado a proteínas G _q y G _s
		P2Y12	ADP	Ligado a proteínas G _i
		P2Y13	ADP	
P2Y14	UDP, UDP-glucosa, UDP-galactosa			

Tabla 2. Resumen de los receptores purinérgicos P2, agonistas endógenos y vía de señalización principal. Adaptada de Calzaferrri, 2021.

Se ha descrito que estos receptores se expresan en el SNC, donde tienen diversas funciones, y que pueden jugar un papel importante en distintas patologías. Así, los receptores P2Y1, P2Y2 y P2Y13 parecen tener un papel neuroprotector (Pérez-Sen *et al.*, 2015; Beamer *et al.*, 2016), y podrían estar implicados en la enfermedad de Alzheimer (Moore, D. *et al.*, 2000; Kittner *et al.*, 2003). Por otro lado, el receptor P2Y11 parece estar implicado en trastornos del sueño (Kornum *et al.*, 2011), y el P2Y14 en el dolor crónico (Mufti *et al.*, 2020).

Además, se ha visto que los receptores P2Y4, P2Y6 y P2Y12 modulan la activación de la microglía (Rafehi *et al.*, 2017; Illes *et al.*, 2020), por lo que se proponen como dianas interesantes para el tratamiento de distintas patologías neurodegenerativas.

Por otro lado, está ampliamente descrito que los receptores metabotrópicos P2Y modulan la secreción de catecolaminas en el SNS, concretamente, la activación de estos receptores inhibe la secreción (Diverse-Pierluissi *et al.*, 1991; Gandia *et al.*, 1993). Además, hay trabajos que proponen esta misma acción en el SNC, donde los receptores P2Y son considerados receptores presinápticos inhibidores (Cunha y Ribeiro, 2000; Zhang, J. *et al.*, 2003).

4.2. Receptores purinérgicos ionotrópicos P2X

Los receptores purinérgicos P2X son receptores de tipo ionotrópico, es decir, que forman canales iónicos. Esta familia de receptores está formada por 7 miembros (P2X1-7) y pueden ser homo o heterotriméricos. Todos estos receptores forman canales iónicos permeables a Na^+ , Ca^{2+} y K^+ , a excepción de P2X5 que es permeable a Cl^- . Algunos, además, pueden formar un poro que permite el paso de moléculas pequeñas (Habermacher *et al.*, 2016).

Los receptores P2X se subclasifican en 3 grandes grupos, según sus cinéticas de activación e inactivación: Los activados en milisegundos y que se desensibilizan rápidamente, como el P2X1 y el P2X3; los que se activan en el rango de segundos y se desensibilizan de manera lenta, como P2X2, P2X4, P2X4/6, P2X2/3 y P2X2/6; y los que no presentan desensibilización, sino que la corriente alcanza una meseta tras la estimulación prolongada, como ocurre con P2X5, P2X7 y P2X1/5 (Jacobson *et al.*, 2002; Coddou *et al.*, 2011).

Está ampliamente descrita la expresión de los receptores P2X en SNC, y se ha estudiado su implicación en diversas patologías. Por ejemplo, en modelos de Parkinson se ha visto que la activación de P2X1 induce la acumulación de α -sinucleína (Gan *et al.*, 2015), y que P2X4 modula la microglía hacia un estado proinflamatorio (Illes *et*

al., 2020). Por otro lado, la activación de P2X2 muestra efectos antidepresivos (Cao *et al.*, 2013), y el P2X3 se ha propuesto como una posible diana para tratar la epilepsia (Zhou *et al.*, 2016). El receptor purinérgico P2X7 se encuentra muy implicado en la neuroinflamación, y lo veremos con más detenimiento en el siguiente apartado.

4.2.1. El receptor P2X7

El receptor purinérgico P2X7 es un canal iónico permeable a Na⁺, Ca²⁺ y K⁺, pero también a moléculas de bajo peso molecular (hasta 900 Da). Normalmente está formado por homotrímeros, aunque algunos estudios apuntan a que puede encontrarse también como heterotrímeros combinado con subunidades P2X4 (Guo, C. *et al.*, 2007).

Comparado con otros receptores P2X, el receptor P2X7 muestra una baja afinidad por ATP, por lo que se requieren altas concentraciones de ATP extracelulares para activarlo. Esto es justo lo que ocurre en situaciones patológicas, como cuando se produce daño celular, por lo que se propone que este receptor puede actuar como “señal de daño celular” (Calzaferri *et al.*, 2020). Su agonista más potente es el BzATP, y es el más usado en los experimentos realizados hasta la fecha (Hibell *et al.*, 2001; Calzaferri *et al.*, 2020).

Este receptor se expresa en diferentes células inmunes, como los linfocitos, las células NK o los mastocitos (Di Virgilio, 2015). En el SNC se expresa mayormente en microglía y células dendríticas, y existe gran controversia sobre su posible expresión y/o funcionalidad en neuronas (Illes, *et al.*, 2017; Miras-Portugal, *et al.*, 2017). Cuando se activa el receptor se va a poner en marcha la respuesta inflamatoria y, vía caspasa 1, se va a producir la liberación de interleucinas, fundamentalmente IL-1 β (Adinolfi *et al.*, 2018).

Por su importante papel en la inflamación, se ha propuesto a este subtipo de receptor como una potencial diana farmacológica y se estudia actualmente su implicación en distintas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Jiang *et al.*, 2015), la enfermedad de Huntington (Ollà *et al.*, 2020), la esclerosis múltiple (Narcisse *et al.*, 2005), la Esclerosis Lateral Amiotrófica (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2020) y la enfermedad de Alzheimer. Esta última la veremos con más detenimiento en el siguiente apartado.

4.3. Receptores purinérgicos y enfermedad de Alzheimer

Aunque aún es un tema bastante inexplorado y con muchas luces y sombras, los receptores purinérgicos han sido propuestos en los últimos años como posibles dianas farmacológicas para tratar las enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la enfermedad de Alzheimer.

En cuanto a los receptores purinérgicos inotrópicos P2X, se ha propuesto que el receptor P2X4 puede contribuir a la neurodegeneración producida en la EA, ya que la supresión de este receptor en neuronas disminuye la muerte celular producida por A β , y la sobreexpresión el receptor aumenta los efectos tóxicos del mismo (Varma *et al.*, 2009). También se ha descrito que el A β induce la sobreexpresión de P2X2 en células PC12 y neuronas de hipocampo (Sáez-Orellana *et al.*, 2018). En cualquier caso, el receptor purinérgico más estudiado en neurodegeneración es el P2X7.

El receptor P2X7 se distribuye ampliamente en SNC en células de glía, y aunque está descrito que también en neuronas, existe cierta controversia al respecto (Illes *et al.*, 2017).

Se ha visto que en muestras de cerebro de paciente de EA, la expresión de P2X7 se encontraba asociada a placas de A β en astrocitos y microglía (Martin *et al.*, 2019), y, además, que este receptor se encuentra aumentado en la glía de los pacientes con respecto a controles sanos (McLarnon *et al.*, 2006). Asimismo, en modelos murinos como el Tg2576 y el APP^{swe}/PS1^{dE9} también se ha visto la colocación del receptor con placas de A β (Lee, *et al.*, 2017; Martin *et al.*, 2019).

Por otro lado, la administración de Brilliant Blue G (BBG), un antagonista del receptor P2X7, muestra efectos neuroprotectores y antiinflamatorios en ratones inyectados con A β (Ryu y McLarnon, 2008). También se ha utilizado BBG en experimentos in vivo, y se ha visto que aumenta la actividad de la α -secretasa, favoreciendo así la vía no amiloidogénica de procesamiento de APP, y disminuyendo por tanto el depósito de placas de A β (Miras-Portugal *et al.*, 2015).

En cuanto a los receptores metabotrópicos P2Y, éstos también se han propuesto como posible diana para el tratamiento de la EA. Así, se ha visto que el receptor P2Y1 se expresa en neuronas y astrocitos reactivos de muestras de pacientes de EA, y que colocaliza con placas de A β y ovillos neurofibrilares (Moore, Darren *et al.*, 2000; Reichenbach *et al.*, 2018). También se ha observado que la activación específica de este receptor induce la proliferación neuronal (Mishra *et al.*, 2006), paso necesario en el proceso de neurogénesis fundamental para la formación de memoria. Sin embargo, el receptor P2Y1 podría estar favoreciendo la hiperreactividad de los astrocitos, lo

que provoca daño neuronal y pérdida de sinapsis (Delekate *et al.*, 2014).

En cuanto al receptor P2Y2, se ha descrito que podría tener un papel neuroprotector ya que su activación promueve la vía no amiloidogénica del procesamiento de APP (Miras-Portugal *et al.*, 2015). Además, la activación de este receptor en microglía favorece la fagocitosis de A β (Kim *et al.*, 2012).

El receptor P2Y4 se expresa en las cortezas parietal y occipital de pacientes de EA, sin embargo, no parece haber diferencias en sus niveles cuando se comparan con muestras de personas sanas (Lai *et al.*, 2008). Por otro lado, en modelos murinos de EA se ha visto que colocaliza con la microglía activada, y que de hecho podría estar regulado al alza durante la activación celular de la microglía (Li, *et al.*, 2013).

Por último, la activación de P2Y13 en neuronas de cerebelo de rata parece activar el factor de transcripción Nrf2 y reducir así la muerte neuronal inducida por radicales libres de oxígeno (ROS) (Espada *et al.*, 2010). Sin embargo, parece tener un papel negativo en la elongación del axón en neuronas hipocámpales de ratón (del Puerto *et al.*, 2012), por lo que hay que tratarlo con cautela.

Hipótesis y Objetivos

*Lo que nos hace humanos es la capacidad
de hacer preguntas.*

Jane Goodall.

Alteraciones en el eje simpatoadrenal con
el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

Hipótesis y Objetivos

La presente Tesis Doctoral se planteó inicialmente como la continuación de la línea de investigación desarrollada en el ITH orientada al estudio de alteraciones en la exocitosis en el modelo 3xTg-AD, en el que se vio que las células cromafines de los ratones 3xTg-AD envejecidos presentaban alteraciones en este proceso exocitótico, concretamente una mayor exocitosis de vesículas con respecto a los ratones WT.

Así, quisimos profundizar en los mecanismos implicados en este proceso, y estudiar si se estaban produciendo diferencias entre los distintos neurotransmisores liberados. Además, nos preguntamos también por qué podría estar alterado el proceso de secreción, para lo cual estudiamos a uno de los principales componentes en su regulación, el citoesqueleto de actina (Oheim y Stühmer, 2000; Giner *et al.*, 2005; Malacombe *et al.*, 2006).

Por otra parte, y dado que el Ca^{2+} es un ión fundamental para la exocitosis (García *et al.*, 2006), quisimos estudiar más en profundidad las señales de calcio, concretamente la modulación de estos canales por uno de los componentes de los gránulos secretores, el ATP, a través de los receptores purinérgicos presentes en la membrana de la célula cromafín (Gandia *et al.*, 1993). Entre estos receptores, nos quisimos centrar en el P2X7, dada la relevancia que ha adquirido este receptor en estos últimos años en distintas patologías neurodegenerativas (Calzaferrri *et al.*, 2020). Igualmente, dado que las células cromafines de ratón presentan diferente proporción de los distintos subtipos de canales de Ca^{2+} , quisimos estudiar si existían diferencias funcionales o de expresión en estos canales con la EA.

Por último, usamos el modelo APP/PS1 para estudiar un poco más en profundidad posibles alteraciones de las señales de Ca^{2+} a través del P2X7R, así como el manejo del mismo por la mitocondria y el RE, principales encargados de su homeostasis en el interior celular, que pudieran relacionarse con la progresión de la EA.

Por ello, nos planteamos la hipótesis de que la enfermedad de Alzheimer es una enfermedad multifactorial, que afecta al eje simpático-adrenomedular y, por tanto, las alteraciones que ocurren en SNC también se van a ver reflejadas en la célula cromafín, en la que **se produce una alteración en los mecanismos reguladores de la secreción de neurotransmisores con el avance de la enfermedad de Alzheimer.**

Alteraciones en el eje simpatoadrenal con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

Para abordar esta hipótesis nos planteamos los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudio comportamental y caracterización fenotípica del modelo 3xTg-AD, comparándolo con ratones controles a los 2, 6 y 12 m de edad.
2. Estudio por HPLC-MS del contenido vesicular de catecolaminas liberado al torrente sanguíneo, así como a nivel central.
3. Estudio del citoesqueleto de actina como componente regulador de la exocitosis.
4. Estudio de posibles alteraciones en la modulación por ATP de los canales de calcio en las células cromafines, así como del sistema purinérgico, implicado en esta modulación.
5. Estudio, a nivel central y periférico, del receptor P2X7, profundamente involucrado en la inflamación.
6. Estudio de posibles alteraciones en los distintos subtipos de canales de calcio, tanto en funcionalidad como en expresión.
7. Estudio, en el modelo de Alzheimer APP/PS1, de posibles alteraciones en la entrada de calcio a través del receptor P2X7, así como de las organelas implicadas en la homeostasis de este ión.

En este contexto, el estudio de la célula cromafín de la médula adrenal en el modelo 3xTg-AD de EA, podría proporcionarnos una valiosa información sobre las posibles alteraciones que acontecen a nivel sináptico en el cerebro de pacientes con esta enfermedad, así como la posible afectación de otros sistemas, como es el caso del eje simpático-adrenal.

Alteraciones en el eje simpatoadrenal con
el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

Material y Métodos

1. Animales utilizados

Todos los animales utilizados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se manejaron de acuerdo con las recomendaciones del Comité de Ética de la Universidad Autónoma de Madrid sobre el uso de animales para la experimentación en laboratorio, siguiendo el código de ética y las directrices establecidas por la Directiva de la Comunidad Europea (2010/63/EU) y la legislación española (RD 1201/2005 y RD 53/2013).

Los animales utilizados se criaron en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, en condiciones controladas de temperatura y humedad, con agua y comida ad libitum, y con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12h. Se realizaron todos los esfuerzos posibles para minimizar el sufrimiento de los animales, y se utilizó el menor número de animales permitido por el protocolo experimental y el poder estadístico de los datos.

1.1. Caracterización genotípica de los ratones

Para los experimentos realizados en esta Tesis, se utilizaron ratones macho triples transgénicos para la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD), que fueron generados inyectando dos transgenes independientes de las proteínas humanas mutadas APPSwe y tauP301L, en un embrión homocigoto para la mutación PS1M146V, y por tanto, mostrarán tanto placas amiloides como ovillos neurofibrilares de la proteína tau (Oddo *et al.*, 2003a).

Dado que estos ratones son homocigotos para los genes PS1, APP y tau, mantuvimos la colonia mediante el cruzamiento y cría de estos ratones mutados. Se utilizaron además sus respectivos controles, los ratones machos 129/Sv/C57BL6 (B6).

Los ratones se usaron en los días postnatales P60, P180 y más de P360, es decir, con 2, 6 y más de 12 meses de edad. Los ratones de 2 meses aún no muestran deterioro cognitivo ni marcas histopatológicas, mientras que los ratones de 6 y 12 meses ya presentan cambios comportamentales y fisiopatológicos característicos de la enfermedad de Alzheimer (Oddo *et al.*, 2003b, Billings *et al.*, 2005, Gimenez-Llort *et al.*, 2007, Halagappa *et al.*, 2007, Pietropaolo *et al.*, 2008, Arsenault *et al.*, 2011).

Alteraciones en el eje simpatoadrenal con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

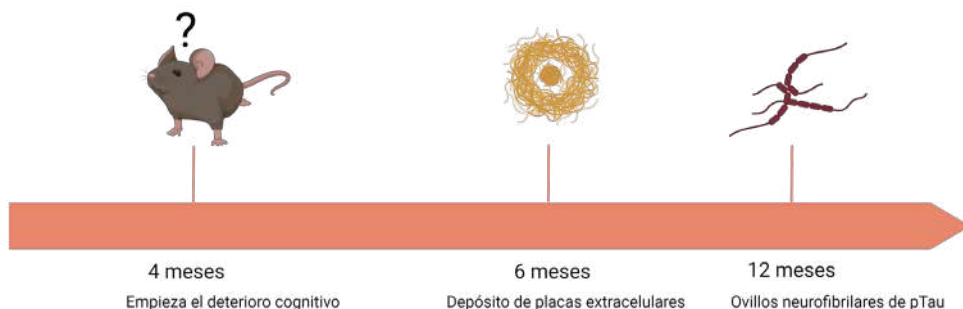


Figura 16. Evolución de la enfermedad en el modelo 3xTg-AD con la edad. Imagen creada con Biorender.com y basada en la representación de Alzaforum.

A pesar de que, como se ha comentado recientemente, la cría de los animales transgénicos se realizó en homocigosis, periódicamente realizamos controles de la colonia mediante la genotipación de los animales. Para ello, obtuvimos material genético de los ratones utilizando el Kit REDExtract-N-Amp Tissue Kit (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y seguimos las instrucciones descritas por el fabricante. Brevemente, Incubamos el tejido del animal en la solución de extracción durante 10 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente lo llevamos a 95°C durante 3 minutos. Añadimos la solución de neutralización y guardamos a 4°C hasta su utilización para realizar la PCR.

Para analizar si el ratón presenta los genes mutados, debemos realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los 3 genes (PS1, APP y tau) por separado.

Para el **gen APP**, utilizamos el siguiente protocolo: 94°C 5 min; (94°C 30 seg, 53°C 30 seg, 72°C 1 min) x 25 ciclos; 72°C 3 min, y utilizando los cebadores 5'-GCTGCACCAGTTCTGGATGG-3' y 5'-GAGGTATTCAGTCATGTGCT-3' (Easy Oligo; Sigma-Aldrich).

Para el **gen tau**, el ciclo es el siguiente: 94°C 5 min; (94°C 30 seg, 52°C 30 seg, 72°C 1 min) x 25 ciclos; 72°C 3 min, usando los cebadores 5'-GAGGTATTCAGTCATGTGCT-3' y 5'-TTCAAAGTTCACCTGATAGT-3'.

Por último, para el **gen PS1**, debemos realizar 2 fases, un primer paso de PCR para amplificar el fragmento de ADN y una posterior digestión del producto obtenido con la enzima Bst EII a 37°C durante toda la noche. Esto se debe a que con la PCR se amplifica tanto el gen humano como el de ratón, pero solo el humano (de nuestro interés) tiene la diana para la enzima de restricción Bst EII, obteniendo 2 bandas en

el genotipado si se encuentra el gen humano mutado en nuestra muestra, y solo una si no se encuentra.

Para la PCR, seguimos el proceso: 95°C 5 min; (95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min) x 25 ciclos; 72°C 7 min, usando los cebadores 5'-AGGCAGGAAGATCACGTGTTCAAGTAC-3' y 5'-CACAGGCACACTCTGACATGCACAAGGC-3'. Una vez amplificado el fragmento, añadimos la enzima de digestión Bst EII.

Por último, se realizó la electroforesis en gel de agarosa (ThermoFisher Scientific, Madrid, España) al 1,5% para separar los distintos fragmentos de ADN con el tampón TAE (40 mM Tris-HCl, 20 mM ácido acético, 1 mM EDT, pH=8). El gel se tiñe GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Sigma-Aldrich) para poder visualizar las diferentes bandas con luz UV

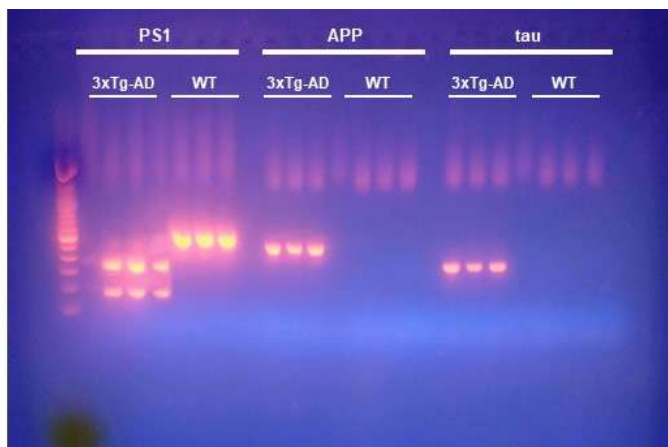


Figura 17. Gel representativo del resultado del genotipado de los ratones.

1.2. Caracterización fenotípica de los ratones

1.2.1. Peso de los ratones

Entre los distintos parámetros que nos planteamos a la hora de realizar la caracterización fenotípica de los animales de experimentación y así poder analizar posibles variaciones relacionadas con la progresión de la enfermedad de Alzheimer nos propusimos pesar a los ratones en las 3 edades del estudio.

Para ello, utilizamos una báscula de precisión (Precisa XB 120A) y procedimos al pesaje del animal justo antes del sacrificio. Pesamos también las glándulas adrenales, una vez estas han sido extraídas y limpiadas.

1.2.2. Pruebas de comportamiento

Test de campo abierto

El test de campo abierto (Hall, 1934) es una prueba muy conocida y utilizada para estudiar tanto la actividad locomotora como estado de ansiedad del animal.

Para el test de campo abierto utilizamos una caja cuadrada de 39 cm x 39 cm x 39 cm con fondo blanco, y dividida en cuadrados de 13 cm x 13 cm en la base. Los ratones fueron colocados en el cuadro inferior central al inicio de la prueba en todos los casos, mirando al centro, observándose el comportamiento del ratón durante 10 minutos (Figura 18). El experimento se graba en video para su posterior análisis.

El análisis se realizó con el programa ImageJ, (parte del programa informático de libre acceso Fiji, (Schindelin *et al.*, 2012)) con el plugin MouBeat (Bello-Arroyo *et al.*, 2018), y se determinaron los siguientes parámetros: Distancia total recorrida, Velocidad media, Distancia recorrida en la zona interior de la caja, Distancia recorrida en la zona exterior de la caja (próxima a las paredes), y Número de entradas en la zona interior.

Entre un animal y el siguiente la caja fue limpiada con etanol al 70% y posteriormente con agua destilada, para evitar el olor como factor de confusión.

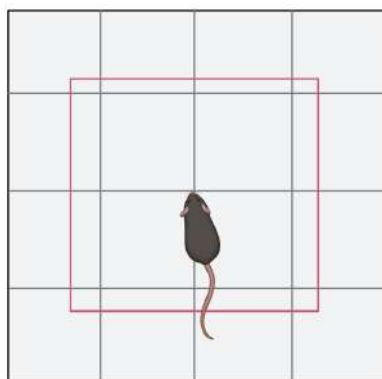


Figura 18. Representación esquemática de la prueba de campo abierto.

Test de reconocimiento de objetos

Este test se realizó siguiendo el protocolo publicado por Leger en Nature protocols (Leger *et al.*, 2013). Realizamos la prueba durante 3 días consecutivos, utilizando para ello la misma caja explicada anteriormente en la prueba de campo abierto.

El primer día (T0), los ratones exploran la caja vacía durante 10 min. El segundo día (T1), se colocaron dos objetos iguales en dos puntos simétricos de la caja, y se dejó al ratón explorar libremente durante 10 minutos. El tercer día (T2), uno de los

objetos fue sustituido por otro diferente en forma, color y textura, y se dejó al ratón explorar libremente ambos objetos durante 10 minutos (Figura 19). Esta prueba se basa en la capacidad y curiosidad exploratoria innata que tienen los roedores. Así, si el animal recuerda que el día anterior había explorado uno de los objetos, pasará más tiempo explorando el objeto nuevo, mientras que, si presenta alteraciones en la memoria, explorará ambos el mismo tiempo, puesto que ambos serán reconocidos como novedosos.

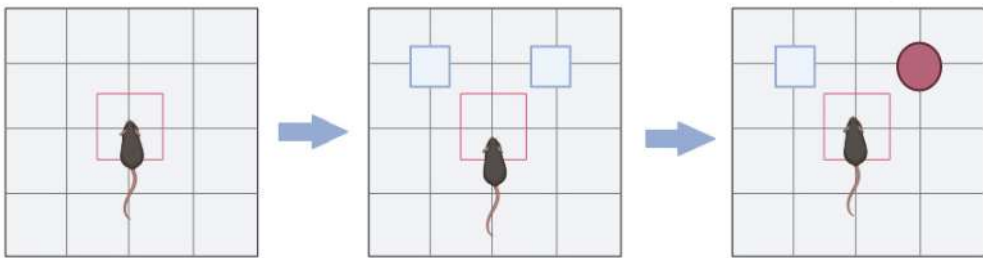


Figura 19. Representación esquemática de la prueba de reconocimiento de objetos.

Todas las fases son grabadas para su posterior análisis, y en éste se contabiliza el tiempo que los ratones pasan explorando el objeto nuevo y el viejo, para después calcular el índice de discriminación con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice Discriminación} = \frac{\text{Tiempo exploración objeto nuevo} - \text{Tiempo exploración objeto viejo}}{\text{Tiempo exploración objeto nuevo} + \text{Tiempo exploración objeto viejo}}$$

Todos aquellos videos en los que el ratón pasa menos del 10% del tiempo total explorando los objetos fueron descartados.

Test de suspensión por la cola

La prueba de suspensión por la cola fue desarrollada por Steru y colaboradores (Steru *et al.*, 1985) como una alternativa al test de natación forzada, para medir comportamientos depresivos en los ratones. La prueba se basa en que, de manera innata, los ratones intentan escapar de esta situación, sin embargo, tras varios intentos fallidos, desesperan y quedan inmóviles. La magnitud de esta inmovilidad está relacionada con el estado depresivo de los animales, siendo mayor cuando la depresión es mayor.

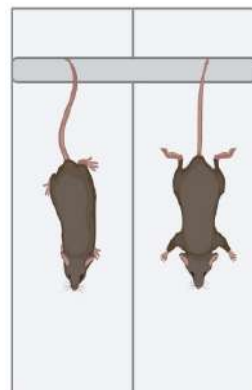


Figura 20. Representación esquemática de la prueba de suspensión por la cola. Imagen creada con Biorender.com

En esta prueba, los ratones son suspendidos por la cola, utilizando para ello cinta de esparadrapo con una longitud de 8 cm colocada en el extremo de la cola de los animales, dejando aproximadamente 3-5 mm de cola libres. La cinta se pega por el otro extremo a una barra metálica, situada a una altura de 30 cm, y los ratones quedan suspendidos durante 5 minutos, duración total de la prueba (Figura 20).

Posteriormente, mediante la visualización de la grabación de la prueba, se contabiliza el tiempo de inmovilidad, y se representa con respecto al tiempo total del test.

Laberinto en cruz elevado

El laberinto en cruz elevado (Rodgers y Dalvi, 1997) se usa comúnmente para explorar comportamientos relacionados con la ansiedad, ya que está basado en dos tendencias innatas contrapuestas de los animales, por un lado, el animal tiende a explorar un lugar que considera nuevo, y por otro, el animal tiende a evitar lugares elevados y abiertos, lo que supone un riesgo a la depredación.

El laberinto consiste en una cruz elevada formada por dos brazos abiertos (estresantes, de dimensiones de 30 x 4,5 cm) y dos cerrados (protectores), de la misma longitud y anchura, pero con una pared de 15 cm de alto (Figura 21). El laberinto se encuentra a una altura de 40 cm del suelo.

Los ratones son colocados en el centro del laberinto y se le permite la libre exploración durante un total de 10 min. Para disminuir las pistas odoríficas, entre una prueba y otra en distintos animales, el laberinto se limpió con etanol al 70%.

Posteriormente se analizaron los siguientes parámetros utilizando el plugin de imageJ (Fiji, (Schindelin *et al.*, 2012)) con el plugin MouBeat (Bello-Arroyo *et al.*, 2018): Tiempo de exploración en el borde, Tiempo en los brazos abiertos y Tiempo en los brazos cerrados.

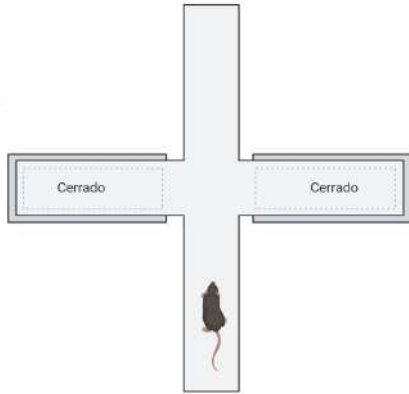


Figura 21. Representación esquemática de la prueba de laberinto en cruz. Imagen creada con Biorender.com

2. Cultivos celulares

2.1. Aislamiento y cultivo primario de células cromafines de ratón

Para el aislamiento y cultivo de las células cromafines de ratón, los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical, e inmediatamente después, se extrajeron las glándulas adrenales, las cuales fueron colocadas en una solución de Locke fría (composición en mM: 154 NaCl; 5,58 KCl; 3,6 NaHCO₃; 10 HEPES; pH=7,35).

Posteriormente, bajo la lupa estereoscópica, se procedió a la disección de las glándulas con la ayuda de pinzas de relojero, microtijeras y bisturí. Esto se realizó sobre papel de filtro humedecido con Locke y sobre una placa Petri con hielo, para mantener el frío. Se retiró la grasa, la cápsula y la corteza que rodean a la médula adrenal, y las médulas de ambas glándulas del animal se colocaron en un tubo Eppendorf con 100 μ L de solución Locke conteniendo 25 U/mL de papaína (Sigma-Aldrich), durante 25-50 min a 37°C, en el incubador, consiguiendo así una primera digestión enzimática del tejido.

Para eliminar la papaína (lavado), esta solución se intercambia por 1 mL de medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) conteniendo alta glucosa (4,4 g/L), un 5% de suero bovino fetal y 50 UI/mL de penicilina-estreptomicina, a pH= 7,35. Tras el lavado de la papaína, se retira este DMEM y se añaden 100 μ L de medio DMEM.

A continuación, con la ayuda de una micropipeta de 1000 μ L y una de 200 μ L se procedió a realizar una fase de digestión "mecánica" del tejido adrenomedular. En primer lugar, se utilizó la pipeta de 1000 μ L con una punta azul, previamente pasada por el mechero para "pulir" la punta y evitar así que las médulas sufran daño,

y un volumen seleccionado de 200 μL y se realizaron unos 30 pases suaves y lentos, evitando la formación de burbujas, asegurando el pase repetido de las médulas por la punta. Después repetimos el mismo proceso, pero en esta ocasión con la pipeta de 200 μL , una punta amarilla y un volumen seleccionado de 60 μL .

Tras la digestión mecánica, se descartaron los restos de médula no digerida, y se procedió al sembrado de las células cromafines de ratón (CCR), colocando 10 μL de la suspensión celular conseguida sobre cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro, colocados en placas de 24 pocillos. Los cubreobjetos fueron previamente preparados, esterilizándolos durante 40 min con lámpara UV y tratados con poli-D-lisina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0,1 mg/mL durante 45 min. Posteriormente, los pocillos fueron lavados con agua destilada estéril tres veces.

Una vez sembradas las células en los cubreobjetos, la placa se colocó en el incubador a 37°C, en una atmósfera con una concentración de CO₂ del 5% y saturada de humedad (95%) durante 1 h aproximadamente, tiempo suficiente para que las células se adhieran al cubreobjetos. Transcurrido este tiempo, se añadieron 500 μL de DMEM a cada pocillo y se guardó la placa en el incubador durante al menos 24 h antes de realizar los experimentos.

2.2. Aislamiento y cultivo primario de neuronas de hipocampo

Las neuronas de hipocampo se aislaron a partir de cerebros de embriones de ratonas APP/PS1 con 17-18 días de gestación.

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical bajo anestesia por isofluorano y se extrajeron los embriones. Las cabezas de los embriones se colocaron en tubos Eppendorf® conteniendo una solución de medio Hanks's balanced Salt solution (HBSS) (H9269, Sigma-Aldrich) fría. Posteriormente, se aspiró el HBSS y se intercambió por una solución de tripsina 2,5% (p/v), y se dejó en el incubador a 37°C durante 3 minutos para la digestión enzimática de los tejidos.

Transcurrido este tiempo, la tripsina se intercambió por HBSS conteniendo inhibidores de tripsina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0,15% (p/v), repitiéndose este proceso de lavado de la tripsina con HBSS un total de 2 veces.

Finalmente, se disgregó también mecánicamente el tejido de hipocampo utilizando en este caso una micropipeta P1000 (punta azul), con cuidado de no formar burbujas, hasta tener una solución homogénea y sin grumos.

El conteo de las células viables en la suspensión celular se realizó con una cámara de Neubauer previa adición de azul tripán, y las células se sembraron en placas de 96

pocillos previamente tratadas con poli-D-lisina a una concentración de $0,05 \times 10^6$ células/pocillo.

Las placas se matuvieron en incubador a 37°C , en una atmósfera saturada de humedad y con un 5% de CO_2 , y 2 h más tarde el medio se sustituyó por medio Neurobasal completo, con B27 y glutamato (GIBCO BRL, Life Technologies), retirando así las células muertas.

Al tercer día de cultivo, se adicionó FDU (5-fluor-2-deoxiuridina) a una concentración de 1:2000. Las células se usaron una semana después del cultivo.

2.3. Aislamiento y cultivo primario de astrocitos corticales

Los cultivos de astrocitos se prepararon utilizando ratones APP/PS1 recién nacidos (P0-P2), de los cuales se extrajo el cerebro y se separó la corteza, que se colocó en tubos Eppendorf® con 500 μL de HBSS en hielo.

Para la digestión enzimática del tejido cerebral se aspiró el HBSS y se añadieron 300 μL de una solución de HBSS conteniendo 0,25% (p/v) de tripsina. Los tubos Eppendorf se dejaron en el incubador durante 3 minutos a 37°C para facilitar la digestión enzimática del tejido. Tras este tiempo, se intercambié la solución de tripsina por DMEM conteniendo 20% de suero bovino fetal (SBF), y se resuspendió con una pipeta de cristal y ayuda de un Pipetboy hasta la completa disgregación del tejido.

La suspensión de células se pasó a un Flask T25 junto con 3 mL de DMDM, y se dejaron en el incubador a 37°C , con una atmósfera saturada de humedad y 5% de CO_2 . El medio de cultivo se cambió por completo cada dos días.

Una semana después del cultivo, los Flasks se agitaron a 200 rpm durante 2 h y a 37°C para retirar la microglía. Tras la agitación, se aspiró por completo el medio y se añadieron 4 ml de medio nuevo, que también se fue cambiando completamente cada dos días hasta la realización de los experimentos.

Cuando las células estaban confluentes (tras 2 semanas de cultivo), se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de $0,05 \times 10^6$ células por pocillo para los experimentos de determinación de niveles citosólicos de calcio, o en placas de 12 pocillos (con cubreobjetos de 25 mm para realizar estudios de inmunocitoquímica o sin cubreobjetos para Western Blot) a una concentración de $0,18 \times 10^6$ células/pocillo.

3. Determinación de neurotransmisores mediante HPLC

3.1. Obtención y preparación de las muestras

Para la obtención y preparación de muestras de plasma, tras la eutanasia de los ratones por dislocación cervical, se extrajo la sangre del animal mediante punción cardíaca, y se colocó ésta en un tubo Eppendorf conteniendo 0,25 mg de EDTA, 2 mg de ácido ascórbico y 25 mg de ácido cítrico. Los tubos Eppendorf fueron centrifugados como máximo en la hora posterior a la extracción a 4°C durante 10 minutos y a 13000xg para separar las células del plasma. El plasma fue guardado a -80°C hasta su utilización.

Para la obtención y preparación de muestras de tejidos cerebrales, los cerebros se extrajeron rápidamente tras la eutanasia de los animales y se colocaron sobre una placa Petri con hielo para mantener en frío. Con la ayuda de pinzas y espátulas se separaron la corteza prefrontal y el hipocampo, y se colocaron éstos en tubos eppendorf que contenían, respectivamente, 20 ó 50 µL de ácido fórmico. Posteriormente estos tejidos se homogeneizaron mediante sonicación y las muestras se guardaron a -80°C hasta su análisis.

3.2. HPLC-MS

Las concentraciones de adrenalina, noradrenalina, dopamina, serotonina y ácido 5-hidroxiindolacético del hipocampo, corteza prefrontal y plasma se midieron usando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masas (HPLC-MS). Como control interno se utilizó la isoprenalina.

Para la extracción de cada analito se utilizó el método de precipitación de proteínas (PPT). Brevemente, las muestras de cerebro se homogeneizaron en ácido fórmico 1,89% en agua, frío y en hielo, a una concentración de 10 mL/g de tejido, y se centrifugaron inmediatamente a 4°C. Se añadió acetonitrilo con 1% de ácido fórmico al sobrenadante en proporción 4:1 (v/v) y así se precipitaron las proteínas.

Posteriormente, las muestras fueron evaporadas y reconstituidas en una fase móvil, que consiste en una combinación de 0,2% de ácido fórmico en agua MilliQ (Merck Millipore, Madrid, España) y acetonitrilo.

Las muestras de plasma siguieron el mismo procedimiento a partir del paso de adición de acetonitrilo con 1% de ácido fórmico.

El cromatograma se realizó bajo condiciones de gradiente a una tasa de flujo de 0,6 mL/min a 25°C a través de una columna de fase reversa ACE C18-PFP (SYM-TA).

El tiempo total de cromatografía fue de 14 minutos, siendo 10 minutos el tiempo total para correr a través de la columna y 4 minutos para el reequilibrio. Se inyectó un volumen de 5 µL de eluyente al equipo de HPLC-MS.

La linealidad de las determinaciones fue confirmada para los rangos de concentración de 0,25-200; 0,5-200; 250-2000; 250-2000; 0,25-20; y ng/mL para AD, NA, DA, 5-HT y 5-HIAA, respectivamente.

Después de la optimización, el método fue validado para determinar su precisión y reproducibilidad, el efecto de la matriz, la recuperación del extracto y la estabilidad basado en los requerimientos de las principales agencias reguladoras (Agencia Europea del Medicamento y U.S. Food and Drug Administration).

4. Registros electrofisiológicos

4.1 Fundamento de la técnica

La técnica de patch-clamp, desarrollada por Erwin Neher y Bert Sackmman (Hamill *et al.*, 1981), se caracteriza por aprovechar las propiedades eléctricas de las células, convirtiendo a las mismas en pequeños circuitos eléctricos. Conectando estas células a un amplificador (en nuestro caso modelo EPC-9, HEKA Elektronik, Alemania), podemos controlar diferentes parámetros del sistema, que deben cumplir la Ley de Ohm:

$$\text{Voltaje (V)} = \text{Intensidad de corriente (I)} \times \text{Resistencia (R)}$$

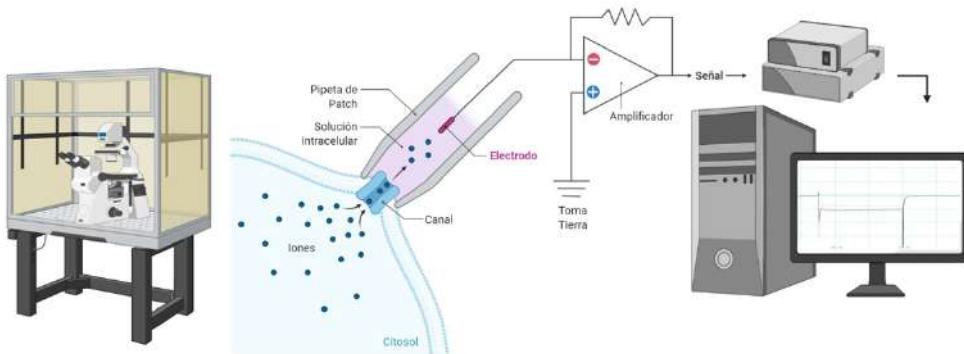


Figura 22. Esquema de un experimento de Patch clamp. Imagen creada con Biorender.com

De este modo, los cambios de voltaje que se produzcan en el circuito eléctrico serán proporcionales al producto de la intensidad de la corriente (movimiento iónico) por la resistencia (canales de membrana) del circuito.

Utilizamos la configuración de “célula entera” (*Whole cell*), que nos permite medir la actividad de la totalidad de los canales iónicos presentes en la membrana celular, y en la modalidad de “fijación de voltaje” (*Voltage clamp*), manteniendo fijo el voltaje de la membrana a -80 mV gracias al amplificador, por lo que cualquier cambio en la resistencia del circuito (ohmios) debidos a la apertura o cierre de los canales iónicos se va a ver reflejado como una alteración en la intensidad de la corriente (amperios).

4.2. Registro de las corrientes a través de los canales de calcio

Para el registro de las corrientes iónicas de entrada a través de los CCDV se utilizaron CCR sembradas en cubreobjetos de vidrio como se ha descrito anteriormente. Los cubreobjetos con las células se colocaron sobre una cámara experimental de metacrilato montada sobre la platina del microscopio (Nikon). La cámara se perfundió continuamente con una solución control Krebs-HEPES (composición, en mM= 145 NaCl; 5,6 KCl; 1,2 MgCl₂, 2 CaCl₂; 10 HEPES; 11 glucosa; pH= 7,35).

Para el registro de las corrientes de entrada a través de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) se utilizó para la perfusión celular la misma solución pero conteniendo 2 mM de Ba²⁺ (en lugar de 2 mM de Ca²⁺) como ión transportador de carga.

Las células se dializaron internamente con una solución denominada “INC” (composición, en mM= 10 NaCl; 100 CsCl; 14 EGTA; 20 TEA-Cl; 20 HEPES; 5 Mg-ATP; 0,3 Na-GTP; pH= 7,2).

El registro de las corrientes se realizó mediante un capilar de vidrio de borosilicato pulido al fuego, quedando con una resistencia de 2-5 MΩ una vez relleno con la solución intracelular INC, adaptado al preamplificador. El preamplificador está a su vez conectado a un amplificador EPC-9 (HEKA Elektronik), el cual permite la compensación de los transientes capacitivos y las resistencias en serie. Los datos se adquirieron a una frecuencia de 20 kHz con el uso del programa Pulse v8.74 (Heka Elektronik).

Para el registro de las corrientes iónicas se fijó el potencial de membrana de las células a -80 mV y se realizó una pequeña curva I-V, aplicando pulsos despolarizantes desde -10 hasta +10 mV, con incrementos de voltaje de 10 mV, en pulsos de 50 ms

de duración. Se seleccionó el voltaje con mayor respuesta y se utilizó éste para dar estímulos sucesivos de 50 ms, a intervalos de 30 s para evitar la pérdida de corriente, hasta alcanzar una corriente estable.

El intercambio de las soluciones extracelulares se realizó a través de una pipeta de perfusión, la cual facilita el intercambio rápido de las soluciones al estar conectada a un controlador de electroválvulas, accionado por un ordenador. La velocidad de perfusión de la solución de lavado de las células se regula por gravedad, siendo el flujo de 0,5-1 mL/min, lo cual permite el intercambio total de solución alrededor de las células en menos de 1 s.

Para la disección farmacológica de los distintos subtipos de los CCDV se utilizaron distintos bloqueantes selectivos de éstos. Para bloquear el subtipo Cav1.3 (L) se usó nifedipino a una concentración de 10 μ M, para el subtipo Cav2.1 (P/Q) ω -agatoxina IVA a 1 μ M y para el Cav2.1 (N) ω -conotoxina GVIA a 1 μ M.

Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (23-26°C).

5. Cuantificación de los niveles de ARNm por rt-qPCR

Para la identificación y cuantificación de los diferentes subtipos de receptores purinérgicos y canales de calcio en médulas adrenales, hipocampo, y corteza prefrontal se usó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa, usando ARN tanto de animales WT como 3xTg-AD y a dos edades diferentes.

5.1. Extracción de ARNm y conversión a ADNc

Se extrajo el ARNm total de hipocampo, corteza prefrontal y médulas adrenales. Las muestras se homogeneizaron con 250 μ L de Trizol TRI Reagent (Sigma-Aldrich), mezclado con 100 μ L de cloroformo y centrifugado a 4°C durante 15 min a 12000xg. Se recogió el sobrenadante y se le añadieron 250 μ L de isopropanol. Esta mezcla fue congelada a -80°C durante 24 h.

Al día siguiente, las muestras fueron descongeladas en hielo y centrifugadas a 4°C durante 15 min y a 12000xg, y se descartó el sobrenadante. Se añadieron 700 μ L de etanol al 80% y se centrifugó a 4°C durante 15 minutos y a 12000xg. Se eliminó el sobrenadante, apurando bien con una pipeta y se dejó secar hasta la completa evaporación de este, durante al menos 30 minutos.

Después, el pellet se resuspendió en agua libre de ARNasas y guardado a -80°C hasta su conversión en ADNc.

5.2. PCR cuantitativa (RT-qPCR)

El RNA total extraído por cada muestra se cuantificó utilizando el NanoDrop™ (ThermoFisher), y 1 µg se convirtió a su respectivo ADN complementario (ADNc) mediante el kit de transcripción inversa PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bio), y usando el siguiente protocolo en el Termociclador: 15 min a 37°C, 5 s a 85°C y mantener a 4°C.

Del ADN resultante se usaron 5 µg para realizar la qPCR. Cada reacción contenía 5 µL de mix qPCR SyGreen Blue Mix (PCR BIP Systems) y los cebadores (*primers*) directo e inverso a una concentración de 50 nM.

Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

P2Y1

Fw 5'-AACCGTGATGTGACCACTGA-3'

Rv 5'-TTCAACTTGTCCGTTCCACA-3'

P2Y2

Fw 5'-TGCTGGGTCTGCTTTTTGCT-3'

Rv 5'-ATCGGAAGGAGTAATAGAGGGT-3'

P2Y4

Fw 5'-TCGATTTGCAAGCCTTCTCT-3'

Rv 5'-CCATAGGAGACCAGGGTGAT-3'

P2Y6

Fw 5'-TGCTGCTACC CCCAGTTTAC-3'

Rv 5'-TGGCATAGAAGAGGAAGCGT-3'

P2Y12

Fw 5'-CTGT TTTTTGCTGGGCTCATC-3'

Rv 5'-GCGGATCTGGAAGAAAATCCT-3'

P2Y13

Fw 5'-GGATGCAGGGCTTCAACAA-3'

Rv 5'-GCAGCTGTGTCATCCGAGTGT-3'

P2Y14

Fw 5'-GGTGGGTTTCGCCTCATGT-3'

Rv 5'-CCTCAGGTGACCGGC ATCT-3'

P2X1

Fw 5'-GAGAGTCGGGCCAGGACTTC-3'

Rv 5'-GCGAATCCCAAACACCTTGA-3'

P2X2

Fw 5'-TCCCTCCCCACCTAGTCAC-3'

Rv 5'-CACCACCTGCTCAGTCAGAGC-3'

P2X3

Fw 5'-CTGCCTAACCTCACCGACAAG-3'

Rv 5'AATACCCAGAACGCCACCC-3'

P2X4

Fw 5'-CCCTTTGCCT GCCCAGATAT-3'

Rv 5'-CCGTACGCCTTGGTGAGTGT-3'

P2X5

Fw 5'-GGATGCCAATGTTGAGGTTGA-3'

Rv 5'-TCCTGACGAACCCTCTCCAGT-3'

P2X6

Fw 5'-CCCAGAGCATCCTTCTGTTCC-3'

Rv 5'-GGCACCAGCTCCAGATCTCA-3'

P2X7

Fw 5'-GGGAGGTGGTTCAGTGGGTAA-3'

Rv 5'-GGATGCTGTGATCCCAACAAA-3'

Cav1.3

Fw 5'-GGGGTCCAGCTGTTCAAGGGGAA-3'

Rv 5'-GCATGATGAGGACGAACATCATG-3'

Cav2.1

Fw 5'-CACCAACCCTGGTCCCGCCT-3'

Rv 5'-CATGGGCTTTGGGCCGTCCT-3'

Cav2.2

Fw 5'-TGAAGACACACATGGACCG-3'

Rv 5'-AGTCCTGTGCATGCCGGTG-3'

Cav2.3

Fw 5'-CCGATGTCTGCTCCCAACATG-3'

Rv 5'-CCTCCGATAAAGGCTGGGGTG-3'

Cav3.2

Fw 5'-AGAGGAAGATTTGATAAGCT-3'

Rv 5'-GGCTGCTTCCTGCTCTGTT-3'

GAPDH

Fw 5'-CATCACTGCCACCCAGAAGACTG-3'

Rv 5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG-3'

Las condiciones de los ciclos del termociclador consistieron en una preincubación de 2 min, a 50°C, la desnaturalización de las muestras a 95°C durante 10 min, 40 ciclos de 15 s cada uno a 95°C y un ciclo final de 1 min a 60°C.

Se usó el método comparativo de $2^{-\Delta\Delta CT}$ para la cuantificación relativa de la expresión génica (Livak y Schmittgen, 2001) usando el control endógeno GAPDH (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) para cada muestra y tejido.

6. Western Blot

La expresión del receptor ionotrópico P2X7 y de los canales de calcio de los subtipos Cav1.3 y Cav2.1 se determinó en el hipocampo, la corteza prefrontal y las médulas adrenales mediante la técnica de Western Blot. Igualmente se utilizó esta metodología para la cuantificación de las proteínas características de cada tipo celular en los cultivos de astrocitos, así como de las proteínas implicadas en la comunicación mitocondria-retículo endoplasmático y en la fusión mitocondrial en astrocitos.

6.1. Extracción de proteínas y preparación de muestras

Para los estudios de la expresión del receptor ionotrópico P2X7 y de los canales de calcio de los subtipos Cav1.3 y Cav2.1 en hipocampo, corteza prefrontal y médula adrenal, las muestras de tejido se homogeneizaron mediante sonicación a 50 A durante 15-30 s en 100 μ L de tampón RIPA (Composición: 150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl, 0,1% (v/v) de Tritón X-100, 0,5% (v/v) de deoxicolato de sodio, 0,1% (v/v) de dodecil sulfato de sodio (SDS) y 0,5% de cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) con pH=8).

Una vez homogeneizadas, las muestras se centrifugaron a 4°C, 15 min a 12000xg. Se guardó el sobrenadante, y se cuantificó la cantidad de proteínas por el método de BCA con el kit Pierce™ BCA protein assay kit (ThermoFisher Scientific), y se diluyeron en agua hasta alcanzar una concentración final de 3 μ g/ μ L. Las muestras se prepararon para WB preparando una disolución 1:1 con Laemli buffer (62,5 mM de Tris-HCl pH 8; 10% (v/v) de glicerol, 2% (v/v) de SDS, 0,02% azul de bromofenol, 0,26 mM β -mercaptoetanol). Después se conservaron a -20°C hasta su uso.

6.2. Electroforesis, transferencia y revelado

Se prepararon geles de agarosa al 8%, que se cargaron con 10 μ L de muestra por cada pocillo. En el primer pocillo se cargaron 4 μ L del marcador de peso molecular. La electroforesis se realizó en una cubeta MiniPROTEAN® Tetra Cell Systems con una fuente de alimentación PowerPac Basic Power Supply (BioRad, Hercules, CA), a 90 V durante los primeros 10 min y después a 120 V durante aproximadamente 2 h (teniendo en cuenta que no se escapase el frente).

Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Merck Millipore) mediante un equipo de transferencia en húmedo (BioRad) durante 1 h 30 min a 20 A.

Una vez hecha la transferencia, se bloquearon las membranas con una solución TTBS (20 mM Tris, 15 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween® 20, pH=7.4) con 5% de leche en polvo a temperatura ambiente, y después se incubaron durante toda la noche, a 4°C y en agitación con los correspondientes anticuerpos primarios.

Para los estudios de la expresión del receptor ionotrópico P2X7 y de los canales de calcio de los subtipos Cav1.3 y Cav2.1 en hipocampo, corteza prefrontal y médula adrenal, se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios (con indicación de la dilución utilizada en cada caso): **anti-P2X7** (1:500; conejo; #APR-004, Alomone Labs, Jerusalén, Israel), **anti-Cav1.3** (1:500; conejo; #ACC-003, Alomone Labs), **anti-Cav2.1** (1:500; conejo; #ACC-001) y **anti- β -actina** (1:50000; #A3854; Sigma-Aldrich) diluidos en TTBS con 3,5% de leche en polvo.

Al día siguiente se lavaron las membranas con TTBS, y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario durante 1 h (1:5000; goat anti rabbit IgG-HRP; #sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), salvo la β -actina al tratarse de un anticuerpo conjugado.

Las membranas se lavaron con TTBS y se incubaron con la solución Clarity Western ECL substrate (#1705061, BioRad), y se revelaron por quimioluminiscencia con el equipo ChemiDoc™ XRS+ (BioRad)

Las bandas se analizaron usando el programa ImageJ (Fiji, (Schindelin *et al.*, 2012)) y la herramienta Gel Analyzer. Cada banda se normalizó a la medida de expresión de β -actina, y los datos se representaron como cociente (proteína/ β -actina).

6.3. WB-cultivos de astrocitos

Describiré en este apartado de forma separada los experimentos realizados para la determinación de distintas proteínas a partir de cultivos de astrocitos ya que estos experimentos se realizaron durante mi estancia formativa en Coimbra y los métodos utilizaron difieren ligeramente a los utilizados en el resto de experimentos. Las principales diferencias metodológicas de este apartado son las siguientes:

Para la cuantificación de proteínas extraídas de los cultivos de astrocitos, se utilizaron las células obtenidas de raspar 2 pocillos de una placa de 12 pocillos, procesándose de forma similar a lo descrito en el apartado anterior para muestras de tejido.

Para los estudios con astrocitos se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios (con indicación de la dilución utilizada): **anti-GFAP** (1:1000; conejo; ab7260, Abcam), **anti-MAP2** (1:200 ratón, Sigma-Aldrich), **anti-Olig2** (1:500; conejo; AB9610 Millipore), y **anti-CD11b** (1:200; rata; MCA711, Biorad), **anti-Mfn2** (1:1000; conejo; M6319 Sigma), **anti-OPA1** (1:500; ratón; 31163 Abcam), y **anti- β -actina** (1:5000; ratón; A5316 Sigma).

En estos experimentos los anticuerpos secundarios utilizados fueron los siguientes: anti-conejo (H+L) conjugado con fosfatasa alcalina (1:10000; cabra; 31340 ThermoFisher Scientific), Anti-ratón (H+L) conjugado con fosfatasa alcalina (1:10000; cabra; 31320 ThermoFisher Scientific).

Posteriormente, la identificación de las proteínas se reveló mediante el método de visualización de la fosfatasa alcalina tras la incubación con el reactivo ECF, visualizándose en el equipo BioRad ChemiDoc Touch Imaging System (BioRad) y cuantificándose con el programa Image Lab Analysis (BioRad).

7. Identificación y cuantificación de proteínas mediante técnicas de imagen

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral hemos utilizado técnicas de imagen para la detección de identificación de proteínas con tres fines distintos, a saber:

1. Identificar la presencia de subtipos de receptores purinérgicos, subtipos de canales de calcio o proteínas relacionadas con la fisiopatología de la EA en distintas zonas cerebrales y/o en la médula adrenal. Estos experimentos se han realizado en cortes de tejido

2. Identificar el comportamiento del citoesqueleto de actina y sus posibles

alteraciones relacionadas con la progresión de la EA. Estos experimentos se han realizado en cultivos de células cromafines.

3. Identificar los subtipos celulares presentes en los cultivos de astrocitos para poder determinar la pureza de los mismos antes de la realización de experimentos.

Describiré a continuación brevemente las principales características de los métodos empleados en cada caso:

7.1. Identificación de proteínas en cortes de tejido

Para la obtención de los diferentes tejidos estudiados se anestesió a los animales con Dolethal (50 mg/kg, intraperitoneal) y se les perfundió a través de la aorta ascendente con una solución salina (0,9% (p/v) NaCl) seguido de paraformaldehído al 4% (PFA) en tampón fosfato 0,1 M (pH= 7,4) (PB). Se extrajeron ambas glándulas adrenales y el cerebro de los ratones, y fueron post-fijados en PFA 4% durante 24 h y después crioprotegidas en sacarosa al 30% en PB 0,1 M.

Las muestras fueron incluidas en agarosa y se hicieron cortes seriados de 40 μ m en un microtomo Leica SM2400 (Leica Biosystems, Nussloch, Alemania).

Para la tinción con los correspondientes anticuerpos específicos, tras varios lavados con PB, se realizó una preincubación en solución de bloqueo (PBS; suero de burro o cabra, en función del animal en el que estuvieran producidos los anticuerpos secundarios; 2% Tritón X-100) durante 1 h. Después se incubaron durante toda la noche, a 4°C y en agitación con los siguientes anticuerpos primarios: **anti-P2X7** (1:200; conejo; #APR-004, Alomone Labs), **anti-Iba1** (1:200; cabra; #019-19741; Fujifilm Wako Chemicals); **anti-Cav1.3** (1:200; conejo; Alomone Labs), **anti-Cav2.1** (1:200; conejo; Alomone Labs); **anti-DBH** (1:200; ratón; MAB208; Sigma-Aldrich); **anti- β -amiloide** (1:200; conejo; Invitrogen, Waltham, MA); **anti-htau** (1:500; ratón; Invitrogen), **anti-MAP2** (1:200; ratón, Sigma-Aldrich).

Al día siguiente se procedió al lavado de las muestras y a la incubación durante 2 h y en oscuridad con los anticuerpos secundarios anti-goat, anti-rabbit, anti-mouse, (1:500; cabra o burro, dependiendo de los primarios; ThermoFisher Scientific) y por último 5 min con el marcador nuclear DAPI 1:500.

Las preparaciones se montaron sobre portaobjetos con 10 μ L de medio de montaje ProLong Gold Antifade (ThermoFisher Scientific) y se dejaron secar una noche en oscuridad. Posteriormente se guardaron a 4°C y en oscuridad hasta su observación en el microscopio.

Se tomaron fotografías en el microscopio confocal espectral Leica TCS SP5 del

Laboratorio de Microscopia Confocal del SidI (UAM). Tomamos imágenes de la médula adrenal o del cerebro (corteza, giro dentado, CA1 y CA3), con 4 capturas secuenciales (una por cada canal) para evitar posibles cruces de fluorescencia. En primer lugar, adquirimos las imágenes con el objetivo 20X, y para el análisis de las distintas áreas utilizamos el objetivo 63X.

Para analizar las imágenes, se utilizó el Software ImageJ, y se aplicó el mismo valor límite (threshold) a todas las imágenes para poder compararlas, y se midió el valor de IntDen, con lo que se obtiene el valor medio de la señal relativa al área de marcaje. Para el estudio de colocalización, se utilizó la herramienta de ImageJ Colocalization Colormap.

7.2. Tinción del citoesqueleto de actina

Estos experimentos se realizaron en células cromafines en cultivo. En primer lugar, se retiró el DMEM y se lavaron los pocillos con una solución de PBS (Composición, en mM= 137 NaCl; 2,7 KCl; 10 Na₂PO₄; pH= 7,4) esterilizada y filtrada, atemperada a 37°C. A continuación se retiró el PBS y se añadieron 500 µL de una solución de paraformaldehído (PFA) al 4%, que se dejó durante 20 minutos. Tras este tiempo, el PFA se descartó y se lavó tres veces con la solución de PBS. Posteriormente, se realizó la permeabilización de las membranas celulares mediante la incubación durante 10 min de los cultivos con una solución de tritón al 0,1% en PBS y después las células se incubaron con Faloidina 546 (Sigma-Aldrich) a una concentración 5:200 en PBS-tritón 0,1% durante 1 h y a temperatura ambiente.

Por último, incubamos con DAPI 1:500 en PBS durante 10 min y a temperatura ambiente y en oscuridad para marcar los núcleos, y lavamos 3 veces con la solución de PBS.

Las preparaciones se montaron sobre portaobjetos con 5 µL de medio de montaje ProLong Gold Antifade (ThermoFisher Scientific) y se dejaron secar una noche en oscuridad. Posteriormente se guardaron a 4°C y en oscuridad hasta su observación en el microscopio.

Para analizar las imágenes, se utilizó el Software ImageJ,(Fiji, (Schindelin *et al.*, 2012)) y se aplicó el mismo valor límite (threshold) a todas las imágenes para poder compararlas, y se midió el valor de IntDen, con lo que obtuvimos el valor medio de la señal relativa al área de marcaje.

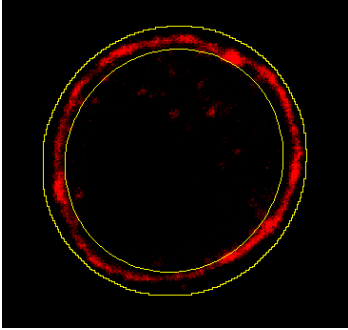


Figura 22. Citoesqueleto en la célula cromafín marcada con el anillo para analizar la faloidina en la zona exterior.

7.3. Caracterización de los cultivos de astrocitos mediante inmunocitoquímica

La caracterización de la pureza celular en los cultivos de astrocitos antes de la realización de experimentos se realizó mediante inmunocitoquímica, con los siguientes anticuerpos primarios (con indicación de la concentración utilizada en cada caso): anti-GFAP (1:1000; conejo; ab7260, Abcam (Cambridge, Reino Unido), anti-MAP2(1:200, ratón, Sigma-Aldrich), anti-Olig2 (1:500; conejo; AB9610 Millipore), y anti-CD11b (1:200; rata; MCA711, Biorad).

Se tomaron fotografías confocales con el objetivo 63X con un microscopio Axio Observer.Z1 (Zeiss), y se realizó el conteo con el programa ImageJ y la función Count Particles.

8. Cuantificación de señales de calcio intracelular en astrocitos

La medida de la entrada de calcio tanto en el citosol como en la mitocondria tras la estimulación del receptor P2X7 se realizó usando las sondas fluorescentes fura 2-acetoximetiléster (fura 2-AM) y rhod-2.

Los astrocitos se lavaron con medio de sodio (composición, en mM= 140 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 glucosa) atemperado, y posteriormente se incubaron con el medio de carga, formado por medio de sodio, 0,2% (v/v) de ácido plurónico, fura 2-AM a una concentración de 5 μ M y rhod-2AM a una concentración de 1 μ M durante 30 min y a 37°C.

Tras la incubación, las células se lavaron con medio de sodio, y se colocaron en el aparato Microplate Reader SpectaMax iD3 (Molecular Devices, San José, CA) para proceder a la medida de las señales fluorescentes a las longitudes de onda correspondientes. Las células se excitaron alternativamente a 340 nm y 380 nm (fura-2) y a 552 nm (rhod-2), y se midieron las longitudes de emisión 510 nm para Fura-2

y 501 nm para rhod-2.

En primer lugar, se realizó una medida de la fluorescencia basal inicial durante un total de 5 minutos para alcanzar la completa estabilización de la fluorescencia emitida, y después se calculó la diferencia tras la estimulación con BzATP a 100 μ M, concentración a la que se activan los receptores ionotrópicos P2X7 y produce la entrada de calcio al interior celular.

Se utilizaron cultivos de astrocitos de 2 semanas, tanto de ratones WT como APP/PS1, y se realizaron las medidas por triplicado para después realizar la media de los 3 pocillos.

La mitad de los pocillos se incubaron previamente durante 10 min con el antagonista de los receptores P2X7 JNJ47965567 (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Bélgica) a una concentración de 1 μ M, para comprobar que el aumento de calcio en citosol y organelas se debía efectivamente a la entrada a través del receptor P2X7.

Los resultados se expresaron como la diferencia entre la intensidad de fluorescencia tras la estimulación y basal, y se expresó como Δ Fura2 o Δ rhod2.

9. Análisis estadístico de los resultados

En primer lugar, se retiraron los datos aislados (outliers) con la herramienta en línea Outlier Online Calculator (Grubb's test) de GraphPad 2021© (GraphPad Software Inc, CA), usando un nivel de significación de 0.05.

Para todos los casos, se realizó primero un test de normalidad de D'Agostino-Pearson para analizar si los datos seguían una distribución normal, y en función del resultado elegimos realizar un test paramétrico o no paramétrico.

Para comparar dos grupos usamos el test de t de Student no pareado cuando los datos seguían la distribución normal y un test U de Mann-Whitney cuando no seguían dicha distribución. Para comparaciones múltiples, usamos el test ANOVA de una vía, seguido del post-hoc de Tukey cuando las muestras seguían una distribución normal, y el test de Kruskal-Wallis con el post-hoc de Dunn cuando se trataba de resultados que no seguían la distribución normal.

Los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism 8. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$, y se muestran como media \pm EEM (error estándar de la media).

Todos los análisis estadísticos cumplen con las recomendaciones de diseño experimental y análisis de datos en farmacología (Curtis *et al.*, 2018).

10. Resumen de soluciones y reactivos empleados

Todas las soluciones utilizadas para la realización de los experimentos, así como su composición, se recogen en la siguiente tabla:

Solución	Composición (en mM)
TAE	40 Tris Base, 20 ácido acético, 1 EDTA (pH 8)
Locke	154 NaCl; 5,58 KCl; 3,6 NaHCO ₃ ; 10 HEPES; (pH=7,35)
Medio de Cultivo (DMEM) con alta glucosa	(4,4 g/L), 5% de suero bovino fetal 50 UI/mL de penicilina-estreptomicina (pH=7,35)
PBS	137 NaCl; 2,7 KCl; 10 Na ₂ PO ₄ ; pH= 7,4
PFA	4 g paraformaldehído en 100 mL PBS
Krebs-HEPES	145 NaCl; 5,6 KCl; 1,2 MgCl ₂ , 2 CaCl ₂ ; 10 HEPES; 11 glucosa (pH= 7,35)
Solución intracelular INC	10 NaCl; 100 CsCl; 14 EGTA; 20 TEA-Cl; 20 HEPES; 5 Mg-ATP; 0,3 Na-GTP; pH= 7,2
RIPA	150 NaCl; 50 Tris-HCl, 0,1% Tritón X-100, 0,5% deoxicolato de sodio, 0,1% de SDS, 0,5% de cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) (pH=8)
TBS	20 Tris y 150 NaCl
TTBS	20 Tris, 150 NaCl y 0,1 % Tween 20
Tris HCl 8,8 y Tris HCl 6,8	1500 Tris-HCl (pH 8,8) ó 500 Tris-HCl (pH 6,8)
SDS	10 % dodecilsulfato de sodio
Tampón de carga	Glicerol, 1% Azul de bromofenol, SDS, β-mercaptoetanol
Solución medio de Na ⁺	140 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl ₂ , 1 MgCl ₂ , 10 HEPES, 10 glucosa

Tabla 3. Soluciones empleadas.

Alteraciones en el eje simpatoadrenal con
el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

Todas las soluciones se diluyeron en agua ultrapura obtenida con el sistema Milli-Q® (Merck Millipore), autoclavada para su esterilización en el caso de las soluciones para cultivos celulares.

Todos los reactivos y productos químicos empleados para realizar los experimentos, junto con su referencia y casa comercial, se recogen en la siguiente tabla:

Técnica	Reactivo	Referencia	Casa Comercial
Genotipado-PCR	REExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit	XNAT-100RXN	Sigma-Aldrich
	Agarosa	1620133	BioRad
	GelRed® Nucleic Acid Gel Stain	41003	Biotium
	Marcador de peso mo- lecular de proteínas	26619	ThermoFisher Scien- tific
Cultivos celulares	DMEM	41965039	Gibco
	Papaína	P4762	Sigma-Aldrich
	Polilisina-D	P1024	Sigma-Aldrich
	Penicilina/ Estreptomi- cina	P0781	Sigma-Aldrich
	Suero Bovino Fetal	F7524	Sigma-Aldrich
Inmunofluorescencia	Albúmina de suero bo- vino (BSA)	A4503	Sigma-Aldrich
	Triton™ X-100	T8787	Sigma-Aldrich
	Paraformaldehído	P6148	Sigma-Aldrich
	Faloidina	A22283	ThermoFisher Scien- tific
	Suero de cabra	G9023	Sigma-Aldrich
	Suero de burro	C06SB	Biorad
	Anti-P2X7	APR-004	Alomone Labs
	Anti-Iba1	019-19741	Fujifilm Wako Chemi- cals
	Anti-Cav1.3	ACC-003	Alomone Labs
Anti-Cav2.1	ACC-001	Alomone Labs	

Material y Métodos

Técnica	Reactivo	Referencia	Casa Comercial
Inmunofluorescencia	Anti-DBH	MAB208	Sigma-Aldrich
	anti- β -amiloide	44-348A	Invitrogen
	anti-htau	MN1020B	Invitrogen
	anti-MAP2	M9942	Sigma-Aldrich
	Anti-GFAP	ab7260	Abcam
	Anti-Olig2	AB9610	Millipore
	Anti-CD11	MCA711	BioRad
	ProLong™ Gold Antifade Mountant	P36930	ThermoFisher scientific
Patch-clamp	ATP	A9187	Sigma-Aldrich
	Nifedipino	PHR1290	Sigma-Aldrich
	ω -agatoxina IVA	4256-s	Peptide Institute
	ω -conotoxina GVIA	4283-v	Peptide Institute
Rt-qPCR	Trizol	T9424	Sigma-Aldrich
	Cloroformo	22711.290	VWR Chemicals
	Isopropanol	I9516	Sigma-Aldrich
WesternBlot	Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay	786-571	G-Biosciences
	Albúmina de suero bovino (BSA)	A4503	Sigma-Aldrich
	Inhibidores de proteasas SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-Free	S8820	Sigma-Aldrich
	Persulfato amónico	A3678	Sigma-Aldrich
	Azul de bromofenol	B0126	Sigma-Aldrich
	Acrilamida 40%	1610148	BioRad
	TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	T9281	Sigma-Aldrich

Alteraciones en el eje simpatoadrenal con
el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

Técnica	Reactivo	Referencia	Casa Comercial
WesternBlot	β -mercaptoetanol	M3148	Sigma-Aldrich
	Dodecilsulfato de sodio (SDS)	L3771	Sigma-Aldrich
	Trizma® Base	T1503	Sigma-Aldrich
	Clarity Western ECL substrate	1705061	BioRad
Medida de calcio por fluorescencia	Fura-2AM	47988	Sigma-Aldrich
	Rhod-2AM	R1245MP	Invitrogen

Tabla 4. Reactivos utilizados para los procedimientos experimentales.

Alteraciones en el eje simpatoadrenal con
el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

Resultados

1. Caracterización fenotípica del ratón 3xTg-AD, modelo de EA

1.1. Peso corporal de los animales 3xTg-AD

Los diversos estudios experimentales que constituyen la presente Tesis Doctoral se han realizado utilizando ratones WT y 3xTg-AD de tres edades diferentes, a saber: 1) animales de 2 meses de edad (estado presintomático), 2) 6 meses de edad (periodo en que empiezan a aparecer características fisiopatológicas de la EA); y 3) mayores de 12 meses de edad (cuando la patología característica se encuentra plenamente establecida).

La necesidad de disponer de animales de estas diferentes edades experimentales nos obliga a llevar un estricto control y seguimiento de las camadas de animales y durante este proceso de seguimiento observamos que los ratones 3xTg-AD de edades avanzadas parecían presentar un menor peso en comparación con los correspondientes controles WT, por lo que decidimos incluir entre los parámetros a evaluar en la caracterización fenotípica de los animales el peso corporal en el momento del sacrificio de los animales.

Como se puede observar en la figura 24, los ratones de ambas cepas van ganando peso con la edad hasta los 6 meses, no apreciándose diferencias en la ganancia de peso corporal entre ambos tipos de ratones. Curiosamente, una vez alcanzado ese punto, los ratones WT se siguen desarrollando de una manera normal, mientras que los ratones 3xTg-AD sufren un estancamiento y apenas ganan peso durante los siguientes 6 meses, alcanzándose un peso final significativamente menor en los ratones transgénicos de 12m en comparación con los animales controles a la misma edad. Esta diferencia es de aproximadamente un 11% del peso total del ratón.

Ante esta curiosa observación, quisimos estudiar si las diferencias de peso de los animales se pudieran corresponder con cambios en el peso de los órganos internos, interesándonos particularmente el peso de las glándulas adrenales al ser éste el órgano principal implicado en nuestros estudios. Para ello, tras la eutanasia de los animales extrajimos y pesamos las glándulas adrenales, encontrando que, ya desde los 2m de edad, las glándulas adrenales de los ratones transgénicos presentan un mayor peso que las de los animales WT de la misma edad (Figura 25). Estas diferencias son significativas y se mantienen en las 3 edades del estudio, siendo el peso medio de las

glándulas de los controles de alrededor de 1,5 mg de media, y aproximadamente 2,2 mg en los 3xTg-AD.

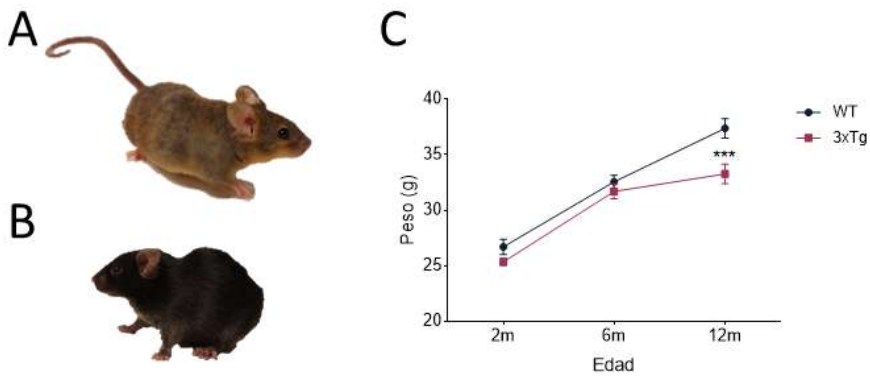


Figura 24. Ratones utilizados y peso corporal de los ratones WT y 3xTg-AD a los 2, 6 y más de 12 meses de edad.

A, ratón WT de 12m. B, Ratón 3xTg-AD de 12m. C, Variación en el peso corporal de los distintos grupos experimentales estudiados. Cada uno de los puntos representa la media del peso en gramos (g) \pm el error estándar de la media (EEM); N= 15 ratones por cada grupo. El análisis estadístico se realizó mediante t de student para cada una de las edades comparando la condición de 3xTg-AD con su respectivo control de la misma edad. Se encontraron diferencias estadísticamente muy significativas ($p < 0.001$) a los 12m de edad.

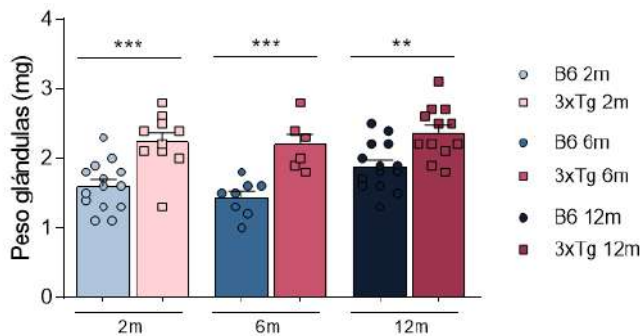


Figura 25. Peso de las glándulas adrenales de los ratones WT y 3xTg-AD a los 2, 6 y más de 12 meses de edad.

Variación en el peso de las glándulas una vez extraídas y limpias de grasa de los distintos grupos experimentales estudiados. Cada uno de los puntos representa un animal, y las barras la media del peso en miligramos (mg) \pm el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA para analizar cambios con el envejecimiento y t de student para cada una de las edades comparando la condición de 3xTg-AD con su respectivo control de la misma edad. Se encontraron diferencias estadísticamente muy significativas a los 2 y 6m ($p < 0.001$) y 12m ($p < 0.01$) de edad.

1.2. Alteraciones cognitivas en la prueba de reconocimiento de objetos

Para comprobar que nuestros ratones presentan déficits en la memoria y aprendizaje según lo descrito en la literatura (Leger *et al.*, 2013), realizamos la prueba de reconocimiento de objetos (NOR, por sus siglas del inglés “Novel object recognition”) en ratones WT y 3xTg-AD a los 2, 6 y más de 12 meses de edad, utilizando el protocolo experimentan en 3 fases (Figura 26A), descrito en el apartado de Materiales y Métodos. Los datos obtenidos en esta serie de experimentos están representados en la figura 26.

En la figura 26B podemos ver el tiempo que pasan los ratones WT explorando el objeto nuevo y el viejo, y calculado como el % sobre el tiempo total de exploración. Como se puede observar, en las 3 edades de estudio los ratones WT pasan más tiempo explorando el objeto nuevo, lo que indica que no sufren ningún tipo de déficit cognitivo. Sin embargo, en los experimentos realizados con ratones 3xTg-AD (Figura 26C) se aprecia que los animales de 2 meses de edad sí que pasan un mayor tiempo explorando el objeto nuevo, mientras que los animales de 6 y 12 meses exploran ambos objetos por igual, sin mostrar ningún tipo de predilección por el objeto nuevo, lo que sugiere que estos animales han sufrido una pérdida de memoria (ya no recuerda lo explorado el día anterior y se muestra incapaz de reconocer el objeto nuevo).

Si nos fijamos en el índice de discriminación (Figura 26D), calculado con la fórmula:

$$\frac{\text{Tiempo objeto nuevo} - \text{Tiempo objeto viejo}}{\text{Tiempo objeto nuevo} + \text{Tiempo objeto viejo}}$$

y con el cual podemos comparar ambas cepas a las 3 edades, vemos que a los 2 meses de edad no existen diferencias entre los ratones WT y 3xTg-AD, mientras que este índice de discriminación es significativamente menor (y próximo a 0) en los ratones 3xTg-AD tanto a los 6 como a los 12 meses con respecto a sus respectivos controles, lo que indica que ya en estadios de inicio de la enfermedad (6m) los ratones 3xTg-AD muestran un deterioro cognitivo notable con respecto a los controles, diferencias que se mantienen a los 12 meses.

Alteraciones en el eje simpatoadrenal con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

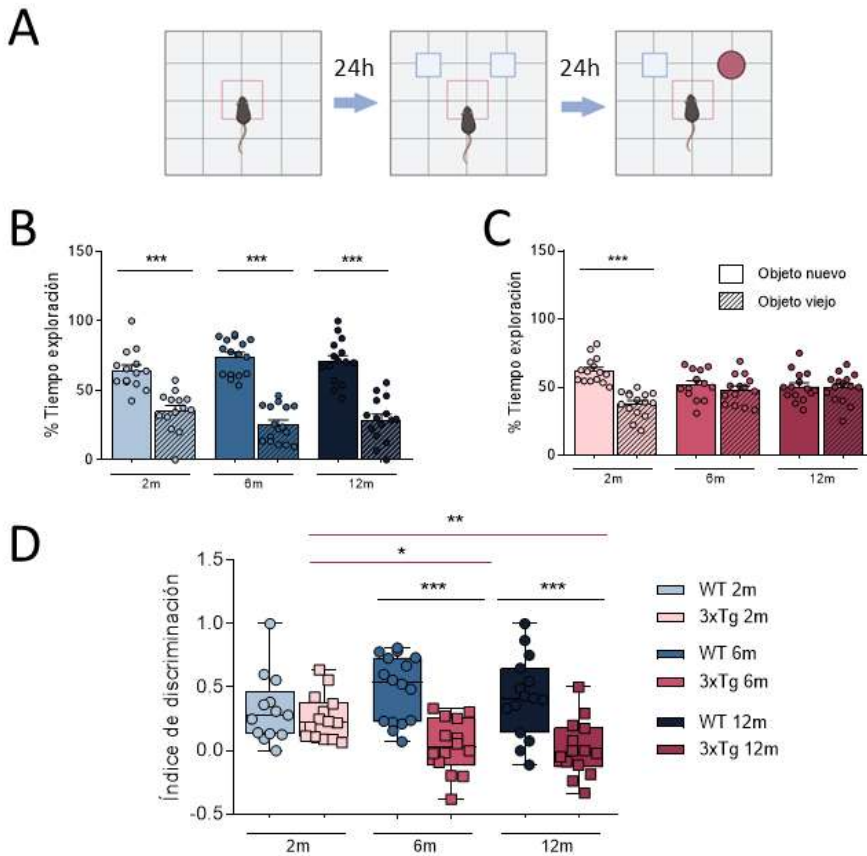


Figura 26. Análisis del déficit cognitivo de los ratones WT y 3xTg-AD a los 2, 6 y más de 12 meses de edad.

A, Esquema del protocolo experimental realizado. B y C, Tiempo de exploración del objeto nuevo (sin patrón) y viejo (patrón de rayas) en los ratones WT (B) y 3xTg-AD (C) a los 2, 6 y 12 m de edad. Cada uno de los puntos representa un animal, y las barras la media del tiempo de exploración de cada uno de los objetos \pm el error estándar de la media (EEM). El porcentaje de tiempo explorando cada uno de los objetos se ha calculado sobre el tiempo total de exploración durante el experimento. D, Índice de discriminación en la exploración del objeto nuevo frente al viejo en todos los grupos estudiados. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA para analizar cambios con el envejecimiento y t de student para cada una de las edades comparando la condición de 3xTg-AD con su respectivo control de la misma edad. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

1.3. Alteraciones locomotoras en la prueba de campo abierto

El test de campo abierto (Hall, 1934) nos permite analizar una gran variedad de parámetros de comportamiento en ratones al introducirlos en una caja que se considera novedosa para ellos y que por tanto tienden a explorar. En nuestro caso, vamos a utilizar esta prueba para evaluar los niveles de movilidad (actividad locomotora) y de ansiedad de los animales WT y 3xTg-AD a las 3 edades de estudio.

Como puede apreciarse en el panel A de la figura 27, el análisis de la distancia total recorrida por los ratones durante la prueba muestra que ésta va disminuyendo conforme los ratones envejecen, y aunque estas diferencias sólo sean estadísticamente significativas en los animales 3xTg-AD de 12 meses cuando los comparamos con los jóvenes (2m) ($p < 0.001$), la tendencia a la reducción de la actividad locomotora se observa en todas las edades.

Por otro lado, en la figura 27B, podemos ver que la velocidad media de los animales durante esta actividad exploratoria es similar entre ambas cepas de animales a los 2 meses de edad, y superior en los ratones transgénicos a los 6 meses de edad, tendencia que se mantiene a los 12 meses aunque pierde la significancia estadística debido a la dispersión de resultados obtenidos con algunos animales.

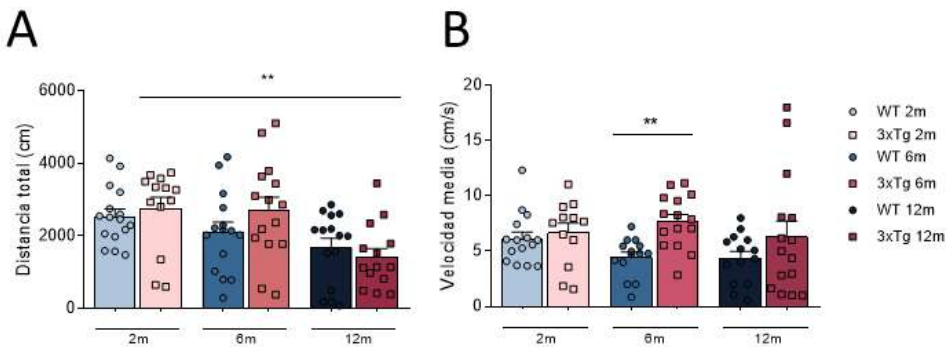


Figura 27. Análisis de la actividad locomotora de los ratones WT y 3xTg-AD a los 2, 6 y más de 12 meses de edad.

A distancia total recorrida (cm) y **B** Velocidad media (cm/s) a lo largo de los 10 minutos de duración del experimento, por los ratones WT y 3xTg-AD a los 2, 6 y 12m de edad. Cada uno de los puntos representa un animal, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA para analizar cambios con el envejecimiento y t de student para cada una de las edades comparando la condición de 3xTg-AD con su respectivo control de la misma edad. ** $p < 0.01$.

1.4. Alteraciones en el estado de ansiedad de los animales

Con la prueba de campo abierto también podemos evaluar el nivel de ansiedad de los ratones de ambas cepas. Para ello, se va a medir el tiempo que los animales dedican a explorar en la zona más cercana a la pared de la caja (comportamiento innato de tigmotaxis), en comparación con el tiempo que pasan en la zona del interior de la caja, donde no tienen ningún tipo de contacto con la pared de la caja.

Como puede observarse en la figura 28, este comportamiento de los animales relacionado con la ansiedad parece estar alterado en el modelo transgénico 3xTg-AD, incluso desde antes de empezar a desarrollar la patología de deterioro cognitivo. Así, los ratones 3xTg-AD recorren una significativamente mayor distancia en la zona interior de la caja (Figura 28B) ya desde los dos meses de edad, manteniéndose estos resultados en los 3 periodos de edad estudiados ($p < 0.0001$). Estos animales también pasan un mayor tiempo en la zona interior de la caja (Figura 28C) por lo que podemos pensar que el comportamiento esperado de tigmotaxis se encuentra alterado en estos animales. Como es previsible, el número de entradas de los animales a la zona interior de la caja también es superior en los ratones 3xTg-AD en las 3 edades (Figura 28C).

Para corroborar los resultados con respecto a las alteraciones en el comportamiento ansioso de los ratones transgénicos observados en la prueba anterior, realizamos adicionalmente la prueba del laberinto en cruz elevado (Rodgers y Dalvi, 1997), según lo descrito en el apartado de Material y Métodos.

Al realizar esta prueba, observamos que los ratones 3xTg-AD, a partir de los 6 meses de edad, pasan más tiempo que los animales controles en los brazos abiertos del laberinto (Figura 29C). Lamentablemente, por problemas en la reproducción de la colonia, no disponemos de un número de datos consistente a los 12 meses de edad, cuando la patología está plenamente establecida (Figura 29B). Con este test podemos evaluar, además, el tiempo que pasan los ratones explorando en el borde del brazo del laberinto (Figura 29C), siendo éste mayor en los ratones 3xTg-AD que en los controles a los 12 meses de edad.

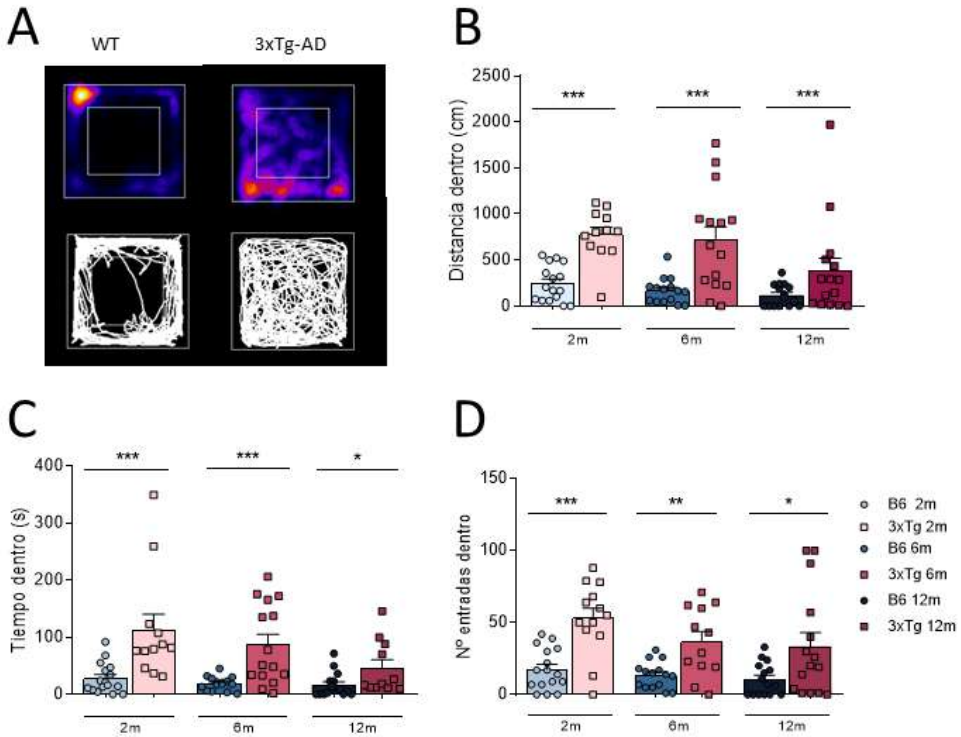


Figura 28. Análisis de parámetros de ansiedad en campo abierto en los ratones WT y 3xTg-AD a los 2, 6 y más de 12 meses de edad.

A, Mapas de calor (parte superior) y de líneas (parte inferior) del movimiento de los ratones durante la prueba. B, distancia recorrida en la zona interior de la caja, C, Tiempo pasado en la zona interior de la caja y D, número de entradas a la zona interior a lo largo de los 10 minutos de duración del experimento, por los ratones WT y 3xTg-AD a los 2, 6 y 12m de edad. Cada uno de los puntos representa un animal, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA para analizar cambios con el envejecimiento y t de student para cada una de las edades comparando la condición de 3xTg-AD con su respectivo control de la misma edad. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

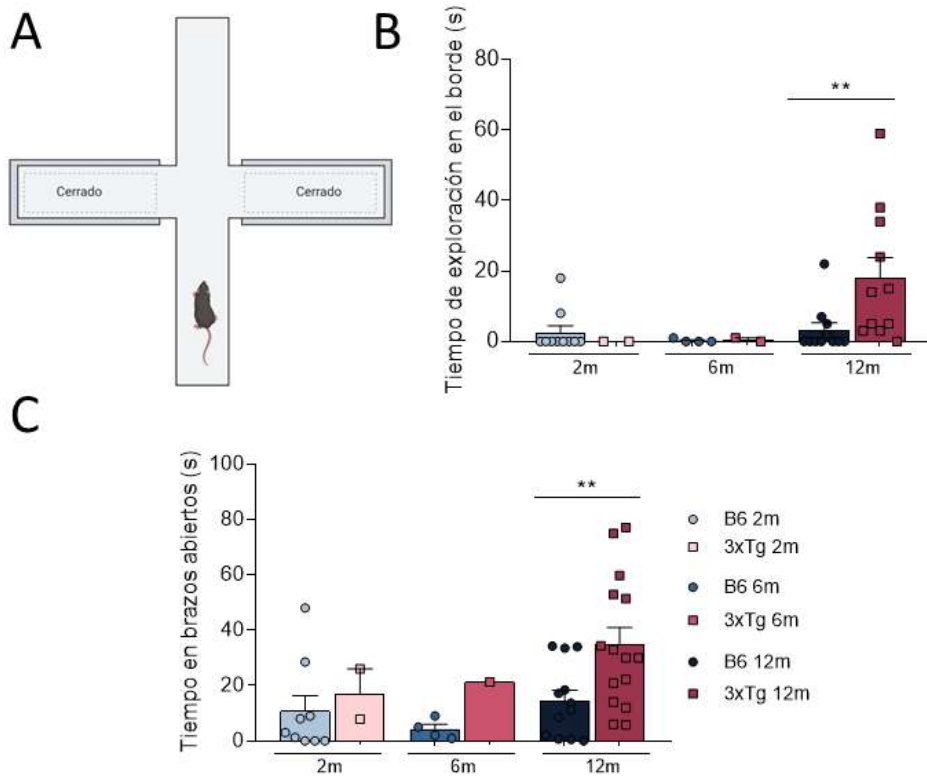


Figura 29. Análisis de parámetros de ansiedad en el laberinto en cruz elevado en los ratones WT y 3xTg-AD a los 2, 6 y más de 12 meses de edad.

A, Esquema del laberinto. B, Tiempo pasado explorando en el borde del laberinto (s), y C Tiempo en los brazos abiertos (s) a lo largo de los 10 minutos de duración del experimento, por los ratones WT y 3xTg-AD a los 2, 6 y 12m de edad. Cada uno de los puntos representa un animal, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA para analizar cambios con el envejecimiento y t de student para cada una de las edades comparando la condición de 3xTg-AD con su respectivo control de la misma edad. ** $p < 0.01$.

1.5. Alteraciones en el test de suspensión de la cola

Para evaluar posibles comportamientos depresivos relacionados con la progresión de la patología de Alzheimer utilizamos el test de suspensión de la cola (TST), según el protocolo descrito en el apartado de Material y Métodos.

Como se puede ver en la figura 30, los ratones 3xTg-AD, a partir de los 6 meses de edad, muestran un mayor porcentaje de tiempo de inmovilidad en este test, aproximadamente el doble que sus respectivos controles, lo que indica que los ratones con EA ya desde los 6 meses presentan comportamientos depresivos que no se observan en los ratones WT ($p < 0.0001$ en 6m y $p < 0.001$ en 12m).

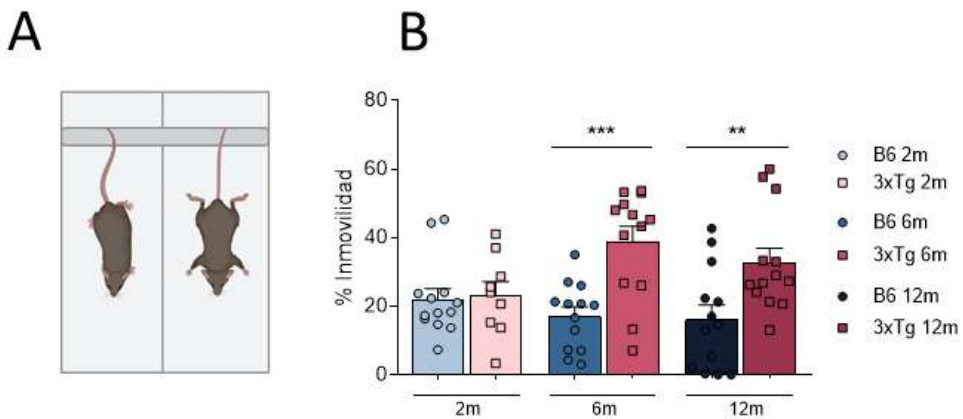


Figura 30. Análisis de parámetros de depresión en los ratones WT y 3xTg-AD a los 2, 6 y más de 12 meses de edad.

A, Esquema de la prueba realizada. **B**, Tiempo de inmovilidad con respecto al tiempo total de la prueba (5 min), de los ratones WT y 3xTg-AD a los 2, 6 y 12m de edad. Cada uno de los puntos representa un animal, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA para analizar cambios con el envejecimiento y t de student para cada una de las edades comparando la condición de 3xTg-AD con su respectivo control de la misma edad. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

1.6. Marcadores histopatológicos en el hipocampo

Para comprobar que nuestros ratones presentaban las marcas histopatológicas características de la enfermedad, realizamos análisis inmunohistoquímicos en cortes de cerebro utilizando anticuerpos frente a $A\beta$ y frente a la proteína Tau hiperfosforilada (anti-pTau). Las figuras 31 y 32 muestran los datos representativos de los resultados obtenidos en esta serie de experimentos.

Como muestra la figura 31, en todas las zonas del cerebro analizadas (giro dentado, CA1, CA3 y corteza cerebral), se observan presentaban placas de $A\beta$ en los tejidos procedentes de ratones 3xTg-AD de 12 m, mientras que no se observan dichas placas al analizar las mismas áreas cerebrales de los ratones WT de la misma edad (Figura 31).

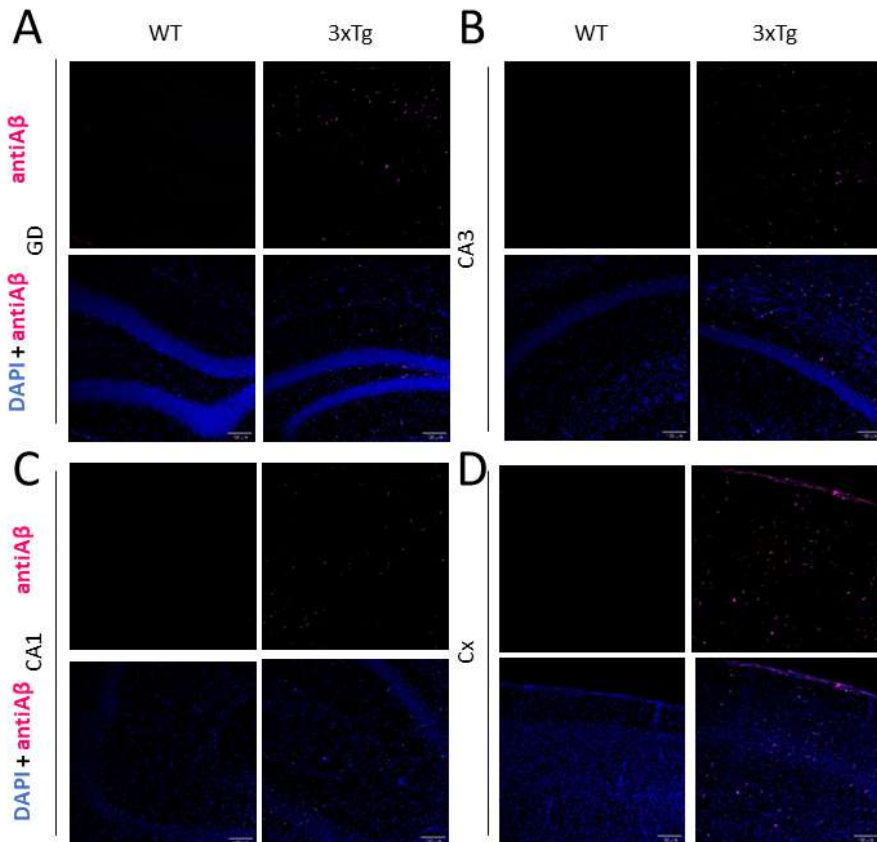


Figura 31. Imágenes originales de inmunohistoquímica en cortes de cerebros de ratones de 12 m WT y 3xTg-AD La figura muestra imágenes confocales de distintas zonas del cerebro (A, giro dentado; B, CA1; C, CA3 y D, corteza) marcadas con anti- $A\beta$ (magenta) y DAPI para los núcleos (azul). N= 4 ratones.

Resultados

Por otro lado, se obtuvieron resultados similares al analizar los niveles de pTau, observándose niveles muy elevados de esta proteína fosforilada en todas las zonas cerebrales estudiadas en el caso de los ratones 3xTg-AD de 12 m, mientras que en los animales WT tan solo se aprecia una pequeña expresión de pTau, siendo sus niveles muy inferiores a los observados en los animales transgénicos (Figura 32).

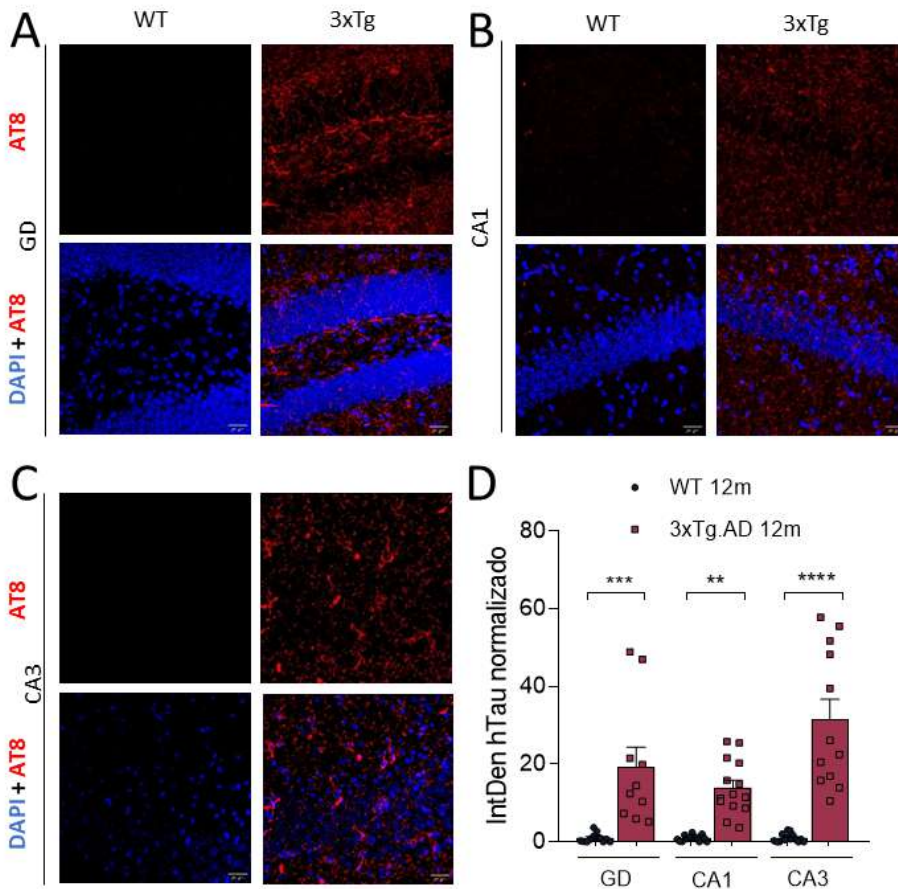


Figura 32. Expresión de pTau en cortes de cerebros de ratones de 12 m WT y 3xTg-AD

A, B, C, Imágenes originales tomadas con microscopía confocal de cortes de cerebro WT y 3xTg-AD y expresión de pTau (AT8, rojo) en giro dentado (A) CA1 (B) y CA3 (C). D, Cuantificación de fluorescencia normalizada de pTau en ratones WT (azul) y 3xTg-AD (naranja) de 12m en las distintas zonas del hipocampo. Cada uno de los puntos representa una imagen, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA y test LSD de Fisher. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. N=4 ratones/grupo.

1.8. Marcadores histopatológicos en la médula adrenal

Finalmente, quisimos ver si nuestros ratones expresaban también estas marcas histopatológicas características de la EA en nuestro modelo de estudio, la médula adrenal, por lo que realizamos este tipo de estudios inmunohistoquímicos en rodajas de médula adrenal (Figura 33).

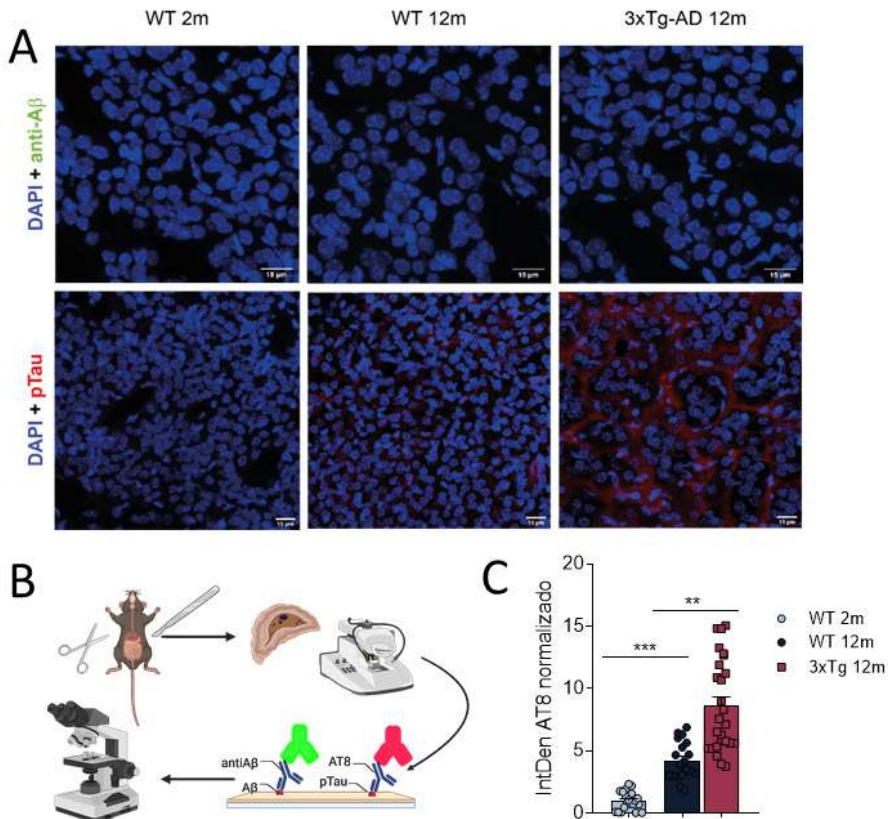


Figura 33. Análisis por inmunohistoquímica de la expresión de las principales marcas histopatológicas de la EA en médula adrenal de los ratones WT con 2 y 12 m y 3xTg-AD con 12 m.

A superior, imágenes representativas de rodajas de médula adrenal marcadas con anti-A β (verde) y DAPI para los núcleos celulares (azul). **A inferior**, imágenes representativas de rodajas de médula adrenal marcadas con anti-pTau (rojo) y DAPI para los núcleos celulares (azul). **B**, Esquema del proceso empleado. **C**, niveles normalizados de expresión de la proteína pTau en el conjunto de rodajas de médula adrenal. Cada uno de los puntos representa una imagen analizada de la médula de los ratones, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA con LSD de Fisher. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

En esta serie de experimentos encontramos que, al contrario de lo que ocurre en cerebro, en ninguno de nuestros grupos experimentales se detectó la presencia de placas de A β en la médula adrenal. Sin embargo, sí que detectamos la presencia de la proteína tau hiperfosforilada en los ratones controles viejos, en los que los niveles de esta proteína son de unas cuatro veces superiores a los observados en animales jóvenes ($1,000 \pm 0,1665$ en WT 2m vs $4,217 \pm 0,3498$ en WT 12m), incrementándose más los niveles de pTau en ratones 3xTg-AD viejos, situación en la que incluso se cuadruplican los valores obtenidos con respecto a los controles de la misma edad ($4,217 \pm 0,3498$ en WT 12m vs $8,610 \pm 0,7275$ en 3xTg-AD de 12m). El resumen de estos datos está representado en la figura 33C.

2. Niveles de neurotransmisores en la EA

Debido al aumento en la liberación de catecolaminas que habíamos observado en los ratones 3xTg-AD con la progresión de la EA, nos preguntamos si este incremento afectaba por igual a liberación de las distintas catecolaminas y/o a la liberación de otros neurotransmisores. Para intentar dar respuesta a esta pregunta, medimos los niveles de adrenalina (ADR), noradrenalina (NA), dopamina (DA), serotonina (SER) y el principal metabolito de la degradación de serotonina, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en ratones WT y 3xTg-AD a los 2, 6 y 12 meses de edad y en 3 localizaciones hipocampo, corteza cerebral y plasma.

2.1. Niveles de neurotransmisores en el plasma

En la Figura 34 se muestran los niveles de los diferentes neurotransmisores (principalmente las catecolaminas) medidos en plasma de ratones WT y 3xTg-AD y la evolución de éstos con el envejecimiento de los animales y con la progresión de la EA.

Cabe destacar el aumento significativo de los niveles de noradrenalina (NA) (Figura 34B) en los ratones 3xTg-AD a los 12 meses ($p < 0.001$). Este aumento ya parece producirse a los 6 meses, sin embargo, la dispersión de datos obtenidos en estos animales no permiten alcanzar una significación estadística en las diferencias observadas.

Con respecto a los niveles de dopamina (DA), puede observarse que ya desde los 6 meses existen diferencias significativas entre los valores de DA plasmática obtenidos en animales WT y los obtenidos de animales 3xTg-AD, siendo menores los niveles de DA en estos últimos a los 6 y 12 meses ($p < 0.01$).

Alteraciones en el eje simpatoadrenal con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

También existen diferencias en los niveles de serotonina (SER) en estas dos edades, siendo éstos menores en los animales 3xTg-AD en comparación con los valores obtenidos en animales WT, siendo las diferencias observadas significativas tanto en animales de 6 meses ($p < 0.01$), como en animales de más de 12 meses ($p < 0.05$).

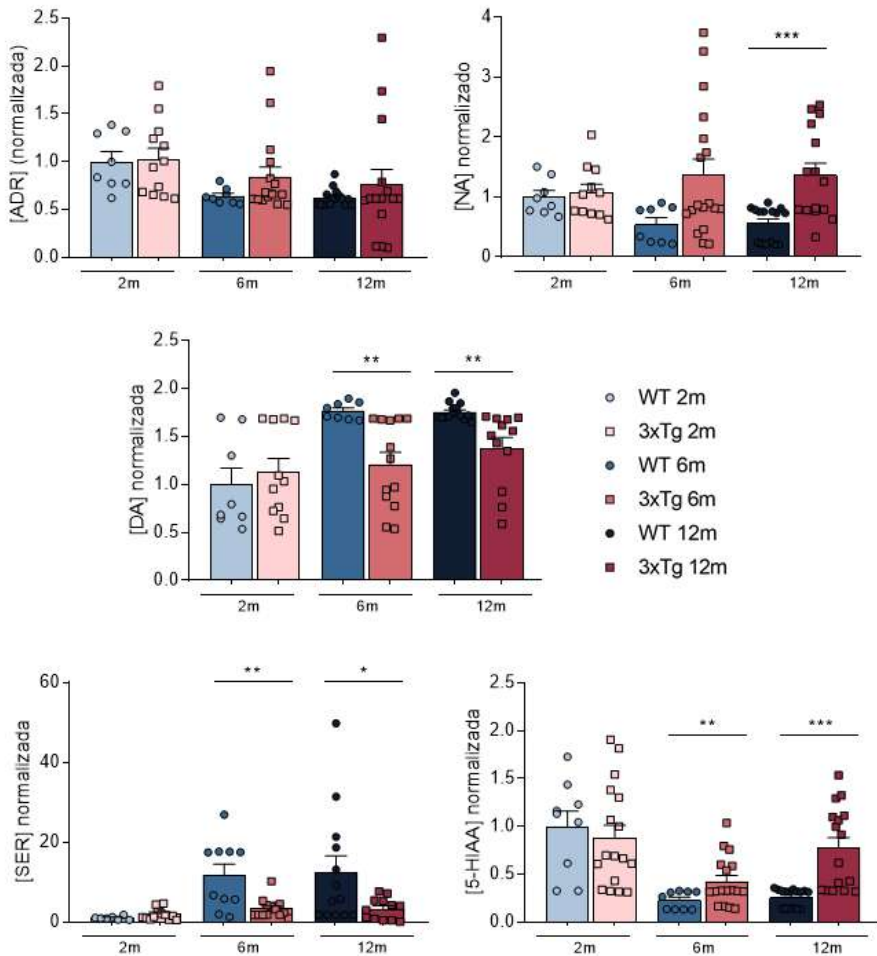


Figura 34. Análisis de los niveles de catecolaminas, serotonina y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en plasma de ratones WT y 3xTg-AD a los 2, 6 y más de 12 meses de edad.

La figura representa los datos de concentración de las distintas catecolaminas en plasma de los ratones WT y 3xTg-AD a los 2, 6 y 12m de edad. Cada uno de los puntos representa un animal, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA para analizar cambios con el envejecimiento y t de student para cada una de las edades comparando la condición de 3xTg-AD con su respectivo control de la misma edad. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Finalmente, cabe destacar que los niveles plasmáticos de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), son mayores a los 6 y 12 meses en los ratones 3xTg-AD ($p<0.01$ y $p<0.001$, respectivamente), lo que podría corresponder a que la serotonina se está metabolizando rápidamente hacia 5-HIAA en el plasma de estos animales.

2.2. Niveles de neurotransmisores a nivel del SNC

Además de en el plasma, los niveles de los distintos neurotransmisores se midieron en tejido cerebral de todos los grupos experimentales, concretamente a nivel de hipocampo (Figura 35) y de corteza prefrontal (Figura 36).

La figura 35 muestra los datos de los niveles normalizados de los distintos neurotransmisores medidos en tejido de hipocampo. Como puede apreciarse, se produce un aumento significativo en los niveles de NA en los ratones transgénicos tanto a los 6 ($p<0,05$), como a los 12 meses ($p<0,001$). Los niveles de DA son también mayores en los ratones de 12 m ($p<0,001$) 3xTg-AD con respecto a los controles. Por otro lado, y como ya ocurría en plasma, los niveles de SER en hipocampo son menores en ratones 3xTg-AD de 6 ($p<0.05$) y 12 m ($p<0.001$).

En corteza prefrontal (Figura 36), encontramos valores muy similares a los observados en el hipocampo, siendo mayores los de niveles de NA en animales 3xTg-AD de 6 y 12 m ($p<0,001$) y de DA en 12 m ($p<0,01$) y significativamente menores los de SER con valores de $p<0,01$ en 3xTg-AD de 6m y $p<0,001$ en 3xTg-AD de 12 m, en comparación con los obtenidos en animales WT.

Cabe destacar, finalmente, que no encontramos diferencias en ninguna de las dos zonas del cerebro, en todos los grupos estudiados, al analizar los niveles de ADR.

Alteraciones en el eje simpatoadrenal con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

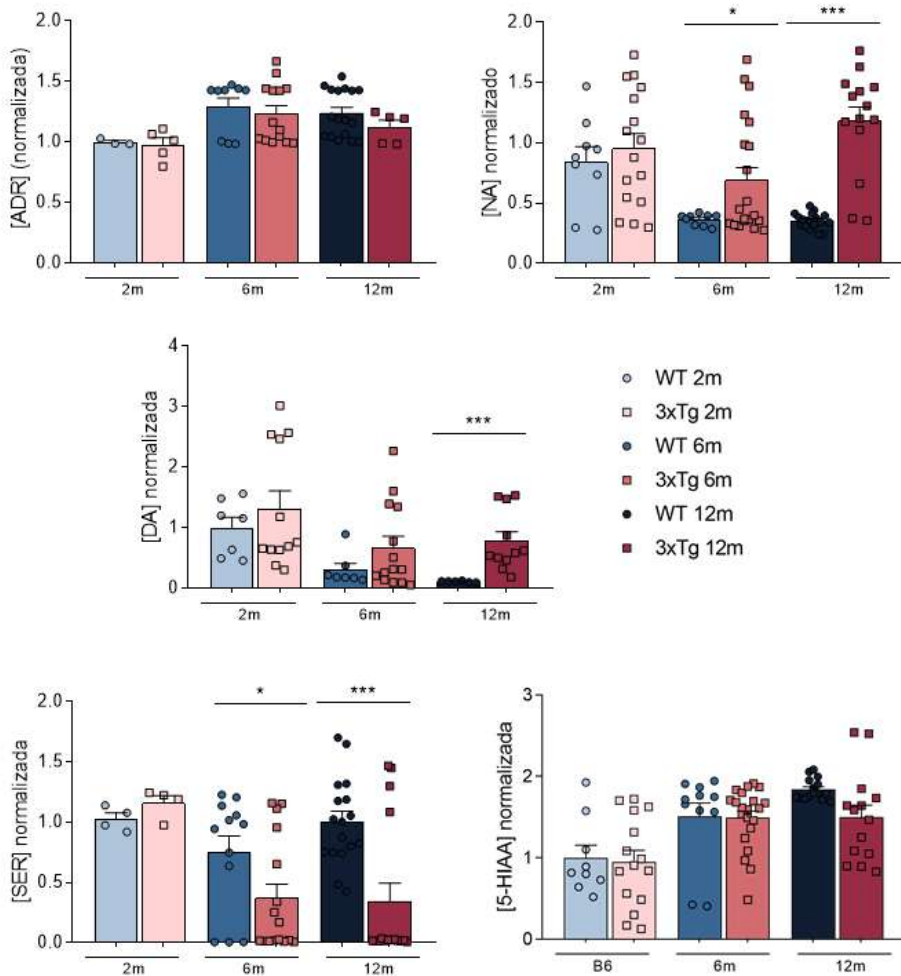


Figura 35. Análisis de los niveles de catecolaminas, serotonina y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en hipocampo de los ratones WT y 3xTg-AD a los 2, 6 y más de 12 meses de edad.

La figura representa los datos de concentración de las distintas catecolaminas en hipocampo de los ratones WT y 3xTg-AD a los 2, 6 y 12m de edad. Cada uno de los puntos representa un animal, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA para analizar cambios con el envejecimiento y t de student para cada una de las edades comparando la condición de 3xTg-AD con su respectivo control de la misma edad. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Resultados

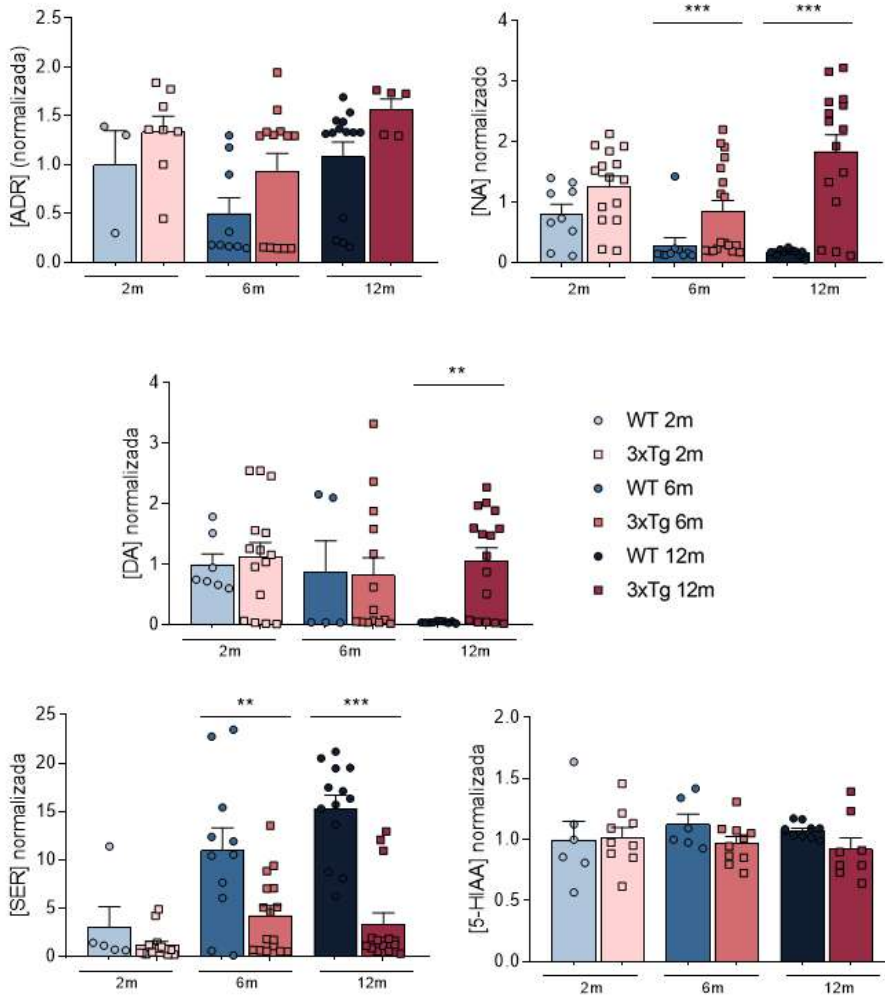


Figura 36. Análisis de los niveles de catecolaminas, serotonina y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en corteza prefrontal de los ratones WT y 3xTg-AD a los 2, 6 y más de 12 meses de edad.

La figura representa los datos de concentración de las distintas catecolaminas en corteza de los ratones WT y 3xTg-AD a los 2, 6 y 12m de edad. Cada uno de los puntos representa un animal, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA para analizar cambios con el envejecimiento y t de student para cada una de las edades comparando la condición de 3xTg-AD con su respectivo control de la misma edad. **p < 0.01, ***p < 0.001.

3. Alteraciones en el citoesqueleto de actina en células cromafines

Dado que el citoesqueleto de actina tiene un importante papel en la regulación de la exocitosis (Oheim y Stühmer, 2000; Villanueva *et al.*, 2016), decidimos estudiar si las alteraciones en la exocitosis observadas en los ratones 3xTg-AD pudieran relacionadas con alteraciones la densidad o la funcionalidad del citoesqueleto de actina en las CCRs.

Para ello, se realizó un estudio mediante inmunofluorescencia en cultivos de células cromafines de ratones WT y 3xTg-AD de 2, 6 y 12 meses de edad, y se marcaron éstas con faloidina (que se une al citoesqueleto de F-actina, en rojo) y DAPI (que va a marcar el núcleo de la célula, en azul), y se adquirieron imágenes con microscopía confocal. Las células cromafines se caracterizan por la expresión de la F-actina formando un anillo bajo la membrana celular.

3.1. Alteraciones en la densidad del citoesqueleto de actina

Para analizar las posibles alteraciones en la densidad del citoesqueleto de actina de las células cromafines que pudieran producirse con envejecimiento y/o con la progresión de la EA analizamos la intensidad del marcaje de la faloidina con el software ImageJ, y comparamos ésta entre los distintos grupos estudiados.

En la figura 37 vemos el marcaje del citoesqueleto de actina (en rojo) de una célula control de un ratón de 12 meses (Fig. 37A, panel superior) y de una célula de un ratón 3xTg-AD de la misma edad (Fig. 37A panel inferior).

Como podemos observar en la Figura 37B, que recoge los valores medios de todas las células estudiadas de cada grupo experimental, en los ratones WT la intensidad del citoesqueleto se mantiene a las 3 edades estudiadas, sin embargo, no ocurre lo mismo con los ratones 3xTg-AD. Estos últimos, a partir de los 6 meses, se observa una reducción de la intensidad del marcaje del citoesqueleto de actina con respecto a sus controles de la misma edad ($p < 0.01$). Lo mismo ocurre con los ratones transgénicos de 12 meses ($p < 0.001$).

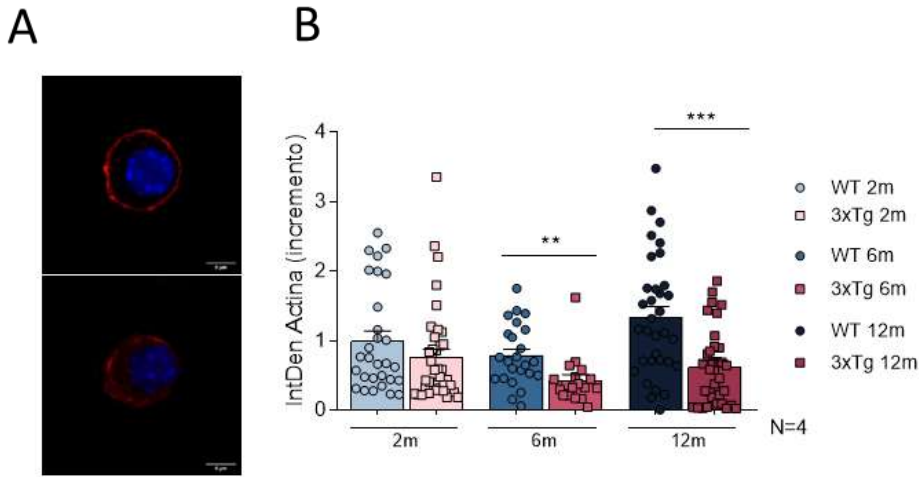


Figura 37. Expresión del citoesqueleto de actina en células cromafines de ratones WT y 3xTg-AD en las 3 edades estudiadas.

A, células cromafines marcadas con faloidina (para ver el citoesqueleto de F-actina; rojo) y DAPI (azul). En la parte superior se muestra una célula de un animal WT de 12 m, y en la imagen inferior vemos una célula de ratón 3xTg-AD. B, La figura representa la intensidad (IntDen) del citoesqueleto de actina en células cromafines de ratones WT y 3xTg-AD a los 2, 6 y 12m de edad. Cada uno de los puntos representa una célula, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). El número total de animales es de 4 por cada grupo experimental. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA para analizar cambios con el envejecimiento y t de student para cada una de las edades comparando la condición de 3xTg-AD con su respectivo control de la misma edad. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. N= 4 ratones/grupo.

3.2. Alteraciones en la distribución del citoesqueleto de actina

Por otro lado, además de la intensidad, estudiamos la distribución del citoesqueleto de actina en estas células cromafines. Para ello, establecimos un anillo de 1,5 μm de anchura en la zona exterior de la célula y analizamos la intensidad del marcaje con faloidina dentro del anillo (próximo a la membrana) y fuera (en la zona del interior del citosol).

En esta serie de experimentos observamos que, si bien en los ratones WT la faloidina se distribuía en forma de anillo exterior en todas las edades, en los ratones 3xTg-AD esta distribución cambiaba en los animales de 12 meses. La figura 38A muestra una representación tridimensional de las células marcadas, en la cual la

Alteraciones en el eje simpatoadrenal con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

intensidad de fluorescencia se muestra como picos, que son mayores en las zonas con mayor intensidad de marcaje de F-actina. Se puede ver como en la figura correspondiente a la célula del ratón WT de 12 m la faloidina está distribuida mayormente en el exterior (Figura 38A, panel izquierdo) mientras que en la correspondiente al ratón 3xTg-AD de 12 m la distribución es mucho más homogénea a lo largo de toda la célula (Figura 38A, panel derecho).

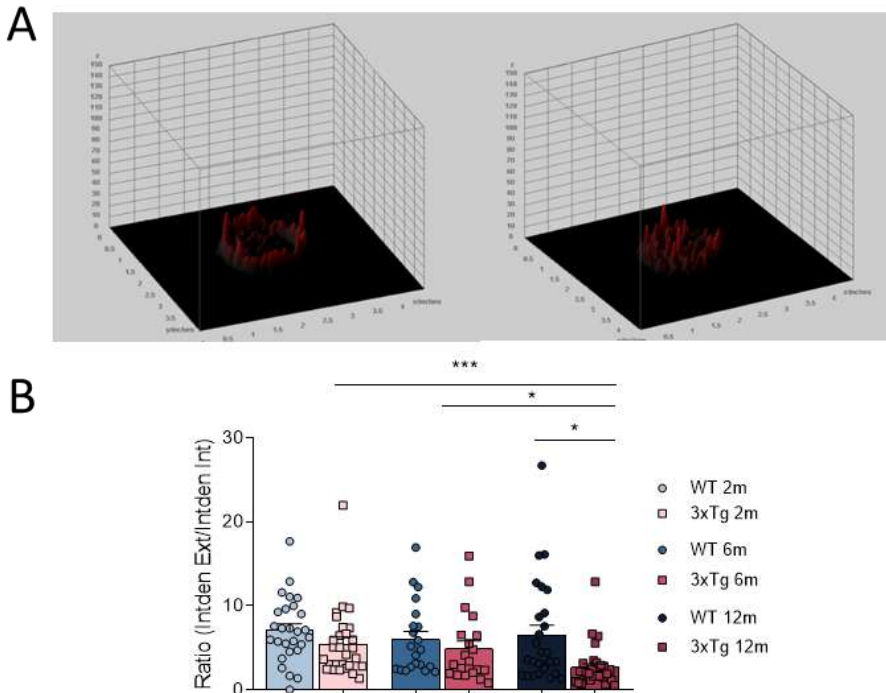


Figura 38. Análisis de la distribución del citoesqueleto de actina en los ratones WT y 3xTg-AD a los 2, 6 y más de 12 meses de edad.

A, Distribución del citoesqueleto de actina en las células cromafines de ratones WT (izquierda) y 3xTg-AD (derecha) de más de 12 meses de edad. La intensidad de fluorescencia se representa con picos, más altos cuanto mayor es la intensidad. Figura creada con el plugin interactivo 3D Surface plot del programa imageJ. **B,** La figura representa el ratio intensidad (IntDen) del citoesqueleto de actina en la parte submembrana (anillo de 1.5 μm de grosor) y en el interior del citosol en células cromafines de ratones WT y 3xTg-AD a los 2, 6 y 12m de edad. Cada uno de los puntos representa el ratio de una célula, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). El número total de animales es de 4 por cada grupo experimental. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA para analizar cambios con el envejecimiento y t de student para cada una de las edades comparando la condición de 3xTg-AD con su respectivo control de la misma edad. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Como se ha indicado en el apartado de Materiales y Métodos, para analizar cuantitativamente las posibles diferencias en la distribución de la actina en la célula (en la zona cortical o citosólica), se realizó un anillo con la herramienta de ImageJ *Make Band*, de una anchura de 1.5 μM , y se midió la intensidad de la señal en el interior del anillo y en la zona del citosol, y posteriormente se calculó el ratio IntDen cortical/IntDen citosol. Los datos cuantitativos de esta serie de experimentos se muestran en la figura 38B. Como puede apreciarse, el ratio entre la intensidad de faloidina en el anillo y el citoplasma disminuía significativamente ($p < 0.05$) en los ratones 3xTg-AD de 12 meses, en comparación a lo observado en los ratones WT de la misma edad. También se observaron diferencias significativas al comparar los ratones viejos 3xTg-AD con la misma cepa en edades más jóvenes, tanto de 2 ($p < 0.001$) como de 6 meses ($p < 0.05$).

4. Alteraciones en la modulación por ATP de las corrientes de calcio

Como se ha comentado en la Introducción, trabajos previos del grupo han demostrado que la aplicación extracelular de ATP produce una reducción de la amplitud y un enlentecimiento de la activación de las corrientes de entrada a través de los CCDV en células cromafines (Gandia *et al.*, 1993). El ATP, que se co-liberaría junto a las catecolaminas durante el proceso exocitótico, va a ejercer una modulación de carácter autocrino-paracrino sobre los CCDV, a través de mecanismos acoplados a proteínas G. Este mecanismo de modulación es compartido por otros componentes de las vesículas secretoras y parece estar alterado en algunos procesos patológicos que cursan con un incremento de la liberación de catecolaminas (p.ej. en el feocromocitoma o en la hipertensión arterial).

Por ello, quisimos estudiar si el incremento de la secreción de catecolaminas observado previamente en ratones 3xTg-AD pudiera estar relacionado con alteraciones en este mecanismo autorregulador de la secreción de catecolaminas y para ello realizamos una serie de experimentos orientados a caracterizar si el ATP pudiera modular de manera diferente las corrientes de entrada a través de los CCDV (I_{Ba}) en células cromafines con el envejecimiento y/o con la progresión de la EA, para lo cual utilizamos células de ratones de 2 y 12 m WT y 3xTg-AD.

4.1. Efectos del ATP sobre las corrientes a través de los CCDV

Para estudiar las corrientes de bario a través de canales de calcio, se aplicaron estímulos despolarizantes de 50 ms de duración a 0 ó +10 mV (en función del potencial de membrana al que se hubiese observado la máxima corriente) desde un potencial de fijación de -80 mV, como se muestra en el protocolo representado en parte superior de figura 39A, que muestra dos registros originales de corriente obtenidos de células cromafines de ratones 3xTg-AD (panel izquierdo) y WT (panel derecho) de más de 12 meses de edad. Una vez estabilizada la IBA, se perfundieron las células con una solución conteniendo 10 μ M de ATP. Como puede apreciarse en la figura, la superfusión con ATP produjo una marcada reducción (aproximadamente un 50%) de la amplitud de la IBA máxima en el caso del 3xTg. En un experimento similar realizado en una CC de ratón WT el efecto bloqueante inducido por ATP fue menor (aproximadamente un 30%).

En este punto nos pareció oportuno realizar en primer lugar una curva concentración-respuesta con distintas concentraciones de ATP (0,1 a 1000 μ M) para conocer la concentración óptima de ATP a utilizar. La figura 38B muestra las curvas de concentración-respuesta para el bloqueo de la IBA inducido por ATP en los cuatro grupos experimentales. Se observó una dependencia de concentración similar para el bloqueo por ATP en CCs de animales de 2 meses. En CC aisladas de animales de 12 m, el bloqueo inducido por ATP aumentó desde un 28% en células WT a un 48% en células 3xTg. Este mayor bloqueo en células 3xTg-AD se observó también a mayores concentraciones de ATP, sugiriendo una mayor sensibilidad al bloqueo por ATP en estas células. Puesto que con 10 μ M de ATP ya se observaban diferencias significativas en el bloqueo de la IBA en el grupo de 3xTg-AD de 12 m, seleccionamos esta concentración para la realización de los siguientes experimentos.

En la figura 39C se muestran los datos normalizados de la modulación de la IBA inducida por ATP en un total de 42 células de ratón WT y 55 células de 3xTg de más de 12 meses, respectivamente. Como puede apreciarse, en estas células el ATP (10 μ M), produce un bloqueo de la IBA de un 28% en células WT (panel izquierdo), frente a un bloqueo de 48% que se observa en células aisladas de animales 3xTg (panel derecho). En ambos casos, la aplicación de un breve prepulso despolarizante a +100 mV revirtió significativamente el bloqueo de la corriente inducido por el ATP (Fig. 39C), como se esperaba al tratarse de un efecto modulador mediado por proteínas G.

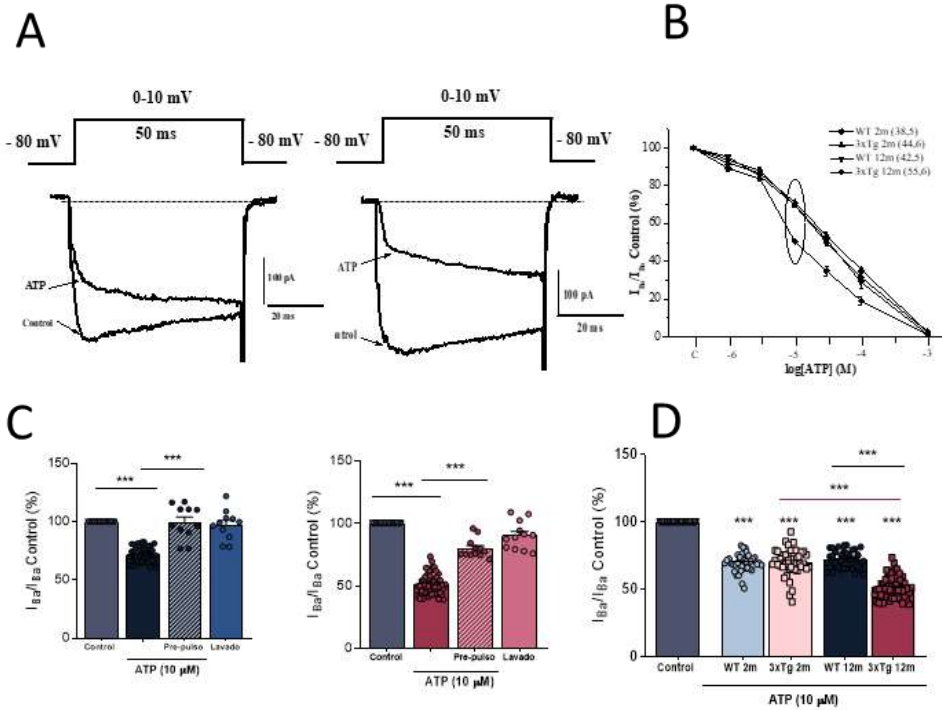


Figura 39. Modulación por ATP de la IBa en células cromafines de ratones WT y 3xTg-AD con más de 12 meses de edad.

A, Registro original de la IBa en una célula cromafin de ratón WT de más de 12 meses de edad (derecha) y 3xTg-AD (izquierda). Se muestra el registro control y el registro tras la superfusión con ATP 10 μ M. B, curva dosis-respuesta del bloqueo de IBa inducido por ATP en los distintos grupos experimentales. C, Pico de la corriente control, tras la adición ATP 10 μ M, después de dar un prepulso despolarizante de 50 ms a +100 mV, y lavado en células cromafines de ratones de WT (izquierda) y 3xTg-AD (derecha) de 12 m con respecto a la corriente control (sin ATP). Cada uno de los puntos representa pico de la corriente en una célula, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). D, Pico de la corriente control y tras la adición ATP 10 μ M en células cromafines de ratones de todos los grupos experimentales con respecto a la corriente control (sin ATP). Cada uno de los puntos representa pico de la corriente en una célula tras la adición del ATP 10 μ M, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía. *** $p < 0.001$. N= 5 ratones/grupo.

En este punto decidimos caracterizar si esta mayor sensibilidad al bloqueo por ATP observado en las células 3xTg-AD pudiera estar relacionada con diferencias en la expresión de los receptores purinérgicos que median los efectos moduladores de ATP y/o en la población de VDCC que están siendo modulados por ATP.

4.2. Expresión de receptores purinérgicos

Con el objetivo de caracterizar si la diferente modulación de la I_{Ba} que se produce en ratones 3xTg descrita en el apartado anterior es debida a un cambio en la actividad de los receptores purinérgicos implicados en la modulación por ATP o a alteraciones en la expresión de los mismos, medimos los niveles de ARNm que codifican la expresión de los distintos subtipos de receptores purinérgicos, tanto metabotrópicos como ionotrópicos, con la técnica de RT-qPCR en la médula adrenal de ratones WT y 3xTg.AD de 12m. En otra serie de experimentos, para ver si en el SNC está ocurriendo lo mismo que en la médula adrenal, medimos los transcritos de estos receptores a nivel del hipocampo de todos los grupos experimentales estudiados.

4.2.1. Receptores purinérgicos en médula adrenal

La figura 40A muestra los resultados de obtenidos al determinar la cantidad de ARNm que codifica los receptores purinérgicos metabotrópicos P2Y en la médula adrenal. Como puede observarse, se produce un aumento significativo en los niveles de ARNm de los receptores de los subtipos P2Y13 ($p < 0.01$) en los ratones 3xTg-AD de 12m con respecto a los controles WT de la misma edad. Del mismo modo, los niveles relativos de ARNm del receptor P2Y4 también aumentaron significativamente en ratones 3xTg en comparación con ratones WT.

Realizamos también rt-qPCR en médula adrenal de los receptores purinérgicos ionotrópicos P2X. En este caso, encontramos un aumento significativo en los niveles de ARNm de los receptores P2X4 (6,5 veces; $p < 0.001$) y P2X7 (4 veces; $p < 0.01$) en 3xTg-AD con respecto a los controles WT (Figura 40B).

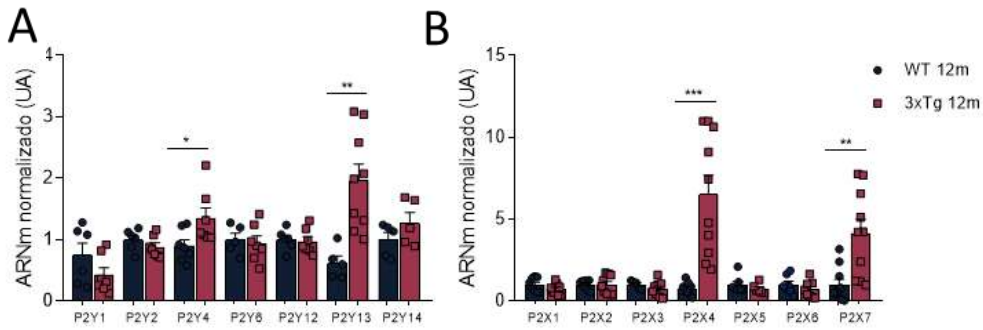


Figura 40. Análisis de los niveles de ARNm de los distintos subtipos de receptores purinérgicos en médula adrenal de los ratones WT y 3xTg-AD con más de 12 meses de edad.

La figura representa la cantidad de ARNm normalizado en médula adrenal de ratones WT y 3xTg-AD con más de 12 m de edad. **A**, niveles normalizados de ARNm de los receptores purinérgicos metabotrópicos. **B**, niveles normalizados de ARNm de los niveles purinérgicos ionotrópicos.

Cada uno de los puntos representa el resultado obtenido con ambas médulas de un ratón, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó mediante t de student para cada uno de los receptores comparando la condición de 3xTg-AD con su respectivo control de la misma edad. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.2.2. Receptores purinérgicos en hipocampo

Una vez analizados los niveles de ARNm en médula adrenal, y a la vista de los resultados obtenidos, nos preguntamos si los subtipos de receptores purinérgicos que se encontraban alterados en médula también se encontrarían alterados en hipocampo, para lo cual realizamos experimentos similares con muestras aisladas de hipocampo de ratones WT y 3xTg-AD de 12 m.

Como se puede ver en la figura 41A, los niveles de ARNm del receptor P2Y13 también se encontraban significativamente aumentados en el hipocampo de los ratones 3xTg-AD de 12m ($p < 0.05$). Lo mismo ocurre con los receptores purinérgicos ionotrópicos P2X4 y P2X7 ($p < 0.01$) (Figura 41B).

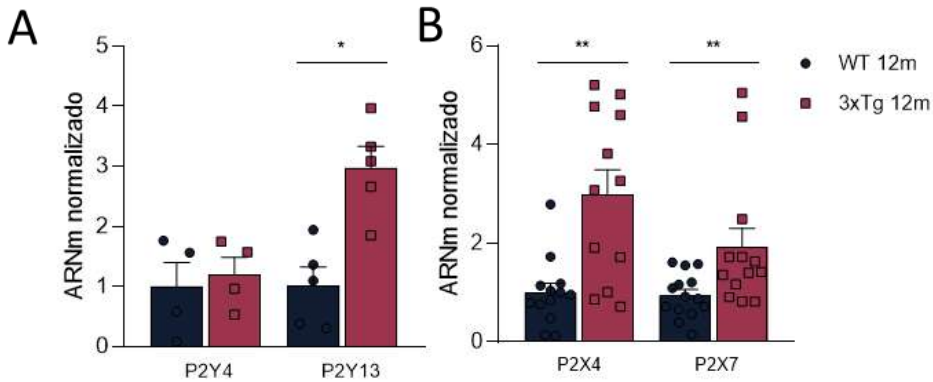


Figura 41. Análisis de los niveles de ARNm de distintos receptores purinérgicos en el hipocampo de los ratones WT y 3xTg-AD con más de 12 meses de edad.

La figura representa la cantidad de ARNm normalizado en médula adrenal de ratones WT y 3xTg-AD con más de 12 m de edad. **A**, niveles normalizados de ARNm de los receptores purinérgicos metabotrópicos P2Y4 y P2Y13. **B**, niveles normalizados de ARNm de los niveles purinérgicos ionotrópicos P2X4 y P2X7.

Cada uno de los puntos representa el resultado obtenido el hipocampo de un ratón, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó mediante t de student para cada uno de los receptores comparando la condición de 3xTg-AD con su respectivo control de la misma edad. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.2.3. Receptor purinérgico P2X7

Dada la particular implicación del receptor purinérgico ionotrópico P2X7 en diversas enfermedades neurodegenerativas por su importante papel en la inflamación, así como por la entrada de calcio a la célula que se produce a través del mismo, decidimos estudiar mediante inmunohistoquímica y WesternBlot los niveles de expresión de este receptor en la médula adrenal de los ratones objeto de nuestro estudio, para tratar de dilucidar si el envejecimiento y/o la progresión de la EA pudiera modificar su expresión. Para ello, utilizamos médulas de ratones WT de 2 y 12 m, y 3xTg-AD de 12 m.

En primer lugar, realizamos un estudio inmunohistoquímico en rodajas de glándula adrenal de ratones WT de 2 y 12 m (para ver evolución con el envejecimiento sano) y 3xTg-AD de 12 m (para evaluar posibles alteraciones con la patología).

Como se puede ver en la figura 42, la expresión del receptor P2X7 es similar en ratones WT a los 2 meses y los 12 meses de edad. Sin embargo, en ratones 3xTg-AD de 12 meses, esta expresión aumenta significativamente, llegando prácticamente a duplicar (Figura 42B) los resultados obtenidos en los ratones WT de la misma edad.

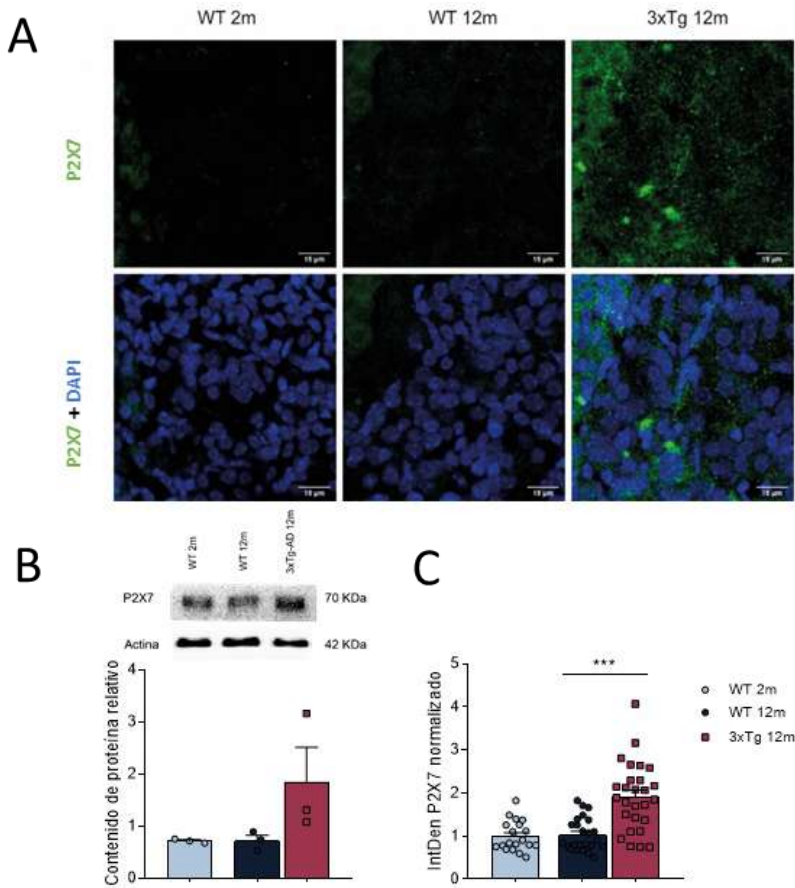


Figura 42. Análisis de la expresión de P2X7 en médula adrenal de los ratones WT con 2 y 12 m y 3xTg-AD con 12 m.

A, imágenes representativas de rodajas de médula adrenal marcadas con anti-P2X7 (verde) y DAPI para los núcleos celulares (azul). Se observa un aumento en la expresión del receptor con la patología. **B superior** imágenes representativas las membranas marcadas con anti-P2X7R y anti- β -actina en muestras de médula adrenal de ratón. **B inferior** niveles normalizados de expresión del receptor purinérgico P2X7 en el conjunto membranas.

Cada uno de los puntos representa la cuantificación de un ratón, normalizado con respecto a la β -actina, de cada muestra y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). **C**, niveles normalizados de expresión del receptor purinérgico P2X7 en el conjunto de rodajas de médula adrenal.

Cada uno de los puntos representa una imagen analizada de la médula de los ratones, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó mediante t de student comparando en primer lugar los controles de ambas edades y posteriormente el grupo de 3xTg-AD con su respectivo control de la misma edad. *** $p < 0.001$. N = 4 ratones /grupo.

También cuantificamos los niveles de proteína P2X7 mediante Western Blot en médula adrenal (Figura 42, B), relativizando los valores obtenidos al contenido de actina presente en las muestras. En esta serie de experimentos, de forma similar a lo observado en los experimentos de inmunohistoquímica, obtuvimos un aumento en la expresión de P2X7 en los ratones 3xTg-AD de 12 meses, aunque en este caso lamentablemente la variabilidad entre animales fue mayor y no pudimos obtener una significación estadística al no poder disponer de un mayor número de animales.

Receptores P2X7 en células cromafines

Los datos obtenidos tanto mediante la técnica de rt-qPCR como mediante los estudios inmunohistoquímicos y de WB, indican la existencia de receptores metabotrópicos P2X7 en médula adrenal de ratón y su sobreexpresión con la progresión de la EA.

En este punto, quisimos caracterizar en qué tipo de células se encontraba este receptor. Para ello, realizamos una serie de estudios inmunohistoquímicos en rodajas de glándula adrenal, y marcamos simultáneamente con anticuerpos anti-P2X7, anti-Iba1 (marcador de macrófagos) y anti-DBH (marcador de células cromafines).

Como se puede observar en la figura 43, el receptor P2X7 se expresa tanto en células que expresaban Iba1 como en células que expresan DBH, lo que indica que tanto macrófagos como células cromafines presentan este receptor en su membrana.

Cuando analizamos los índices de colocalización del receptor P2X7 con ambos tipos celulares observamos que, aunque el P2X7 se colocaliza con ambos marcadores celulares (índice de colocalización nMDP es mayor que 0 en los dos casos), la colocalización parece ser mayor con Iba1 que con DBH, lo que sugiere que la expresión de este receptor es mayor en macrófagos que en células cromafines (Figura 43).

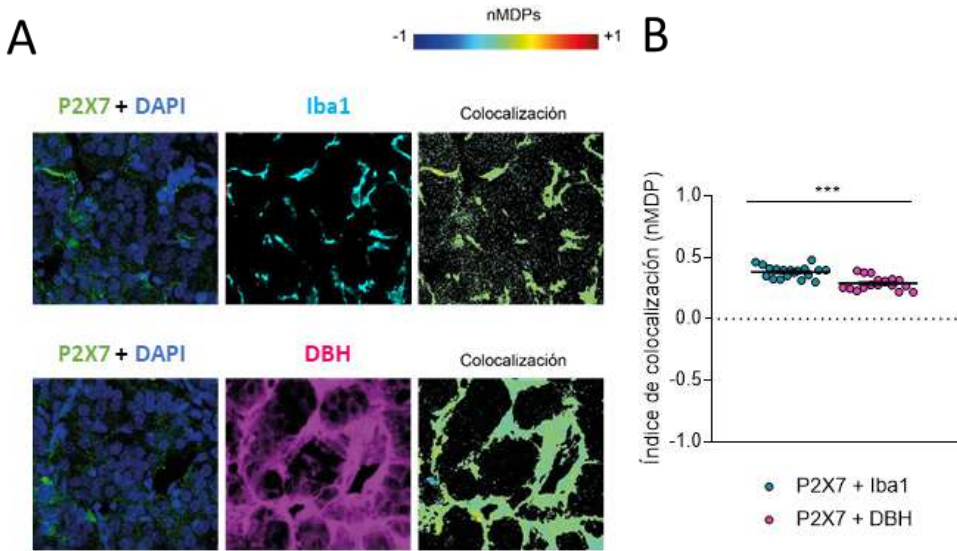


Figura 43. Análisis por inmunohistoquímica de la colocalización de P2X7 en con macrófagos y células cromafines en médula adrenal de los ratones WT con 2 y 12 m y 3xTg-AD con 12 m.

A, imágenes representativas de rodajas de médula adrenal marcadas con anti-P2X7R (verde), anti-Iba1 (cyan) y anti-DBH (rosa). Se utilizó el software ImageJ con el plugin colocalization colormap para calcular el índice de colocalización entre P2X7 e Iba1 y entre P2X7 y DBH. La escala indica el grado de colocalización y va de azul (-1, nula) a rojo (+1, máxima colocalización). B, Índice de colocalización (nMDP) calculado en distintas imágenes de médula adrenal en de distintos grupos experimentales.

Cada uno de los puntos representa una imagen analizada de la médula de los ratones, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó mediante t de student comparando la colocalización con Iba1 y DBH. *** $p < 0.001$. N= 4 ratones/grupo.

Receptores P2X7 en el hipocampo

Dado que habíamos visto un aumento de expresión de P2X7 en médula adrenal de ratones 3xTg-AD con respecto a los controles, decidimos realizar una serie de experimentos de inmunofluorescencia en rodajas de cerebro para ver si estaba sucediendo lo mismo a nivel central.

Como se ve en la figura 44, en las 3 zonas de hipocampo estudiadas (giro dentado, CA1 y CA3), los niveles de expresión de P2X7 (en verde) son significativamente mayores en los ratones 3xTg-AD de 12 m que en los controles WT de la misma edad (Figura 44D).

Dada la controversia existente sobre la expresión y funcionalidad del receptor P2X7 en cerebro, realizamos estudios inmunohistoquímicos marcando simultáneamente el receptor P2X7 junto a marcadores de neuronas (anti-MAP2) y células de glía (anti-Iba1) para caracterizar la posible colocalización de este receptor e identificar en qué tipo de células se estaba expresando.

Como muestra la figura 45, el receptor P2X7 parece colocalizar tanto con neuronas como con glía, ya que el índice de colocalización para ambas es mayor de 0. Sin embargo, es significativamente mayor en glía que en neuronas, tanto en ratones WT como en ratones 3xTg-AD.

Una vez vista la expresión y colocalización del receptor P2X7 con los distintos tipos celulares, y dada la descrita microgliosis que acontece en distintas enfermedades neurodegenerativas, decidimos estudiar si nuestro modelo presentaba también una mayor expresión de Iba1, marcador de microglía activada, con la progresión de la EA. Para ello, medimos la expresión de esta proteína en las distintas zonas del hipocampo estudiadas, GD, CA1 y CA3 en los dos tipos de animales a la edad de 12 meses (figura 46).

Vimos que, en las 3 zonas los niveles de Iba1 eran mayores en los ratones 3xTg-AD que en los ratones controles (Fig46D). Además, dentro del grupo de los transgénicos, los niveles de expresión de Iba1 en CA1 también fueron mayores de manera estadísticamente significativa con respecto a lo observado en GD.

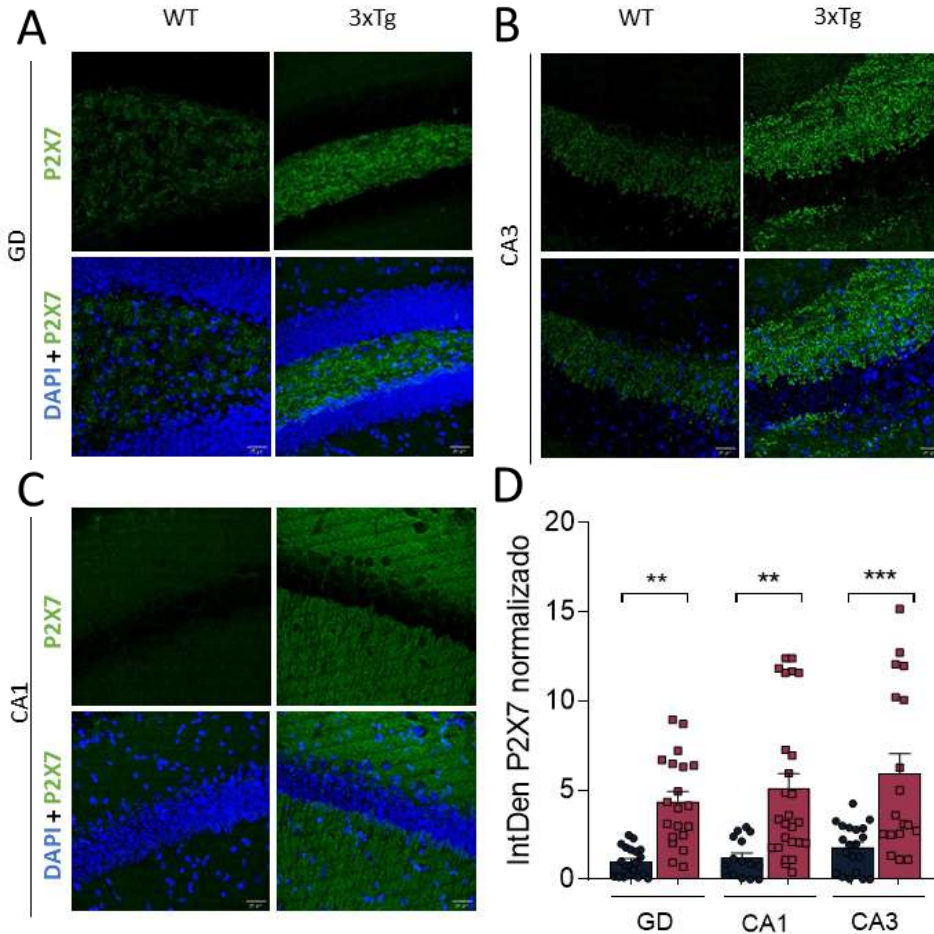


Figura 44. Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de P2X7 en hipocampo de los ratones WT y 3xTg-AD con 12 m.

A-C, imágenes representativas de rodajas de cerebro marcadas con anti-P2X7 (verde) y DAPI para los núcleos celulares (azul) en giro dentado (A), CA1 (B) y CA3 (C). Se observa un aumento en la expresión del receptor con la patología. D, niveles normalizados de expresión del receptor purinérgico P2X7 en las distintas áreas del hipocampo analizadas.

Cada uno de los puntos representa una imagen analizada de cada una de las zonas del hipocampo de los ratones, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). Los datos están normalizados con respecto a GD WT para explorar posibles diferencias de expresión entre zonas. El análisis estadístico se realizó ANOVA de una vía y LSD Fisher. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. N= 4 ratones /grupo.

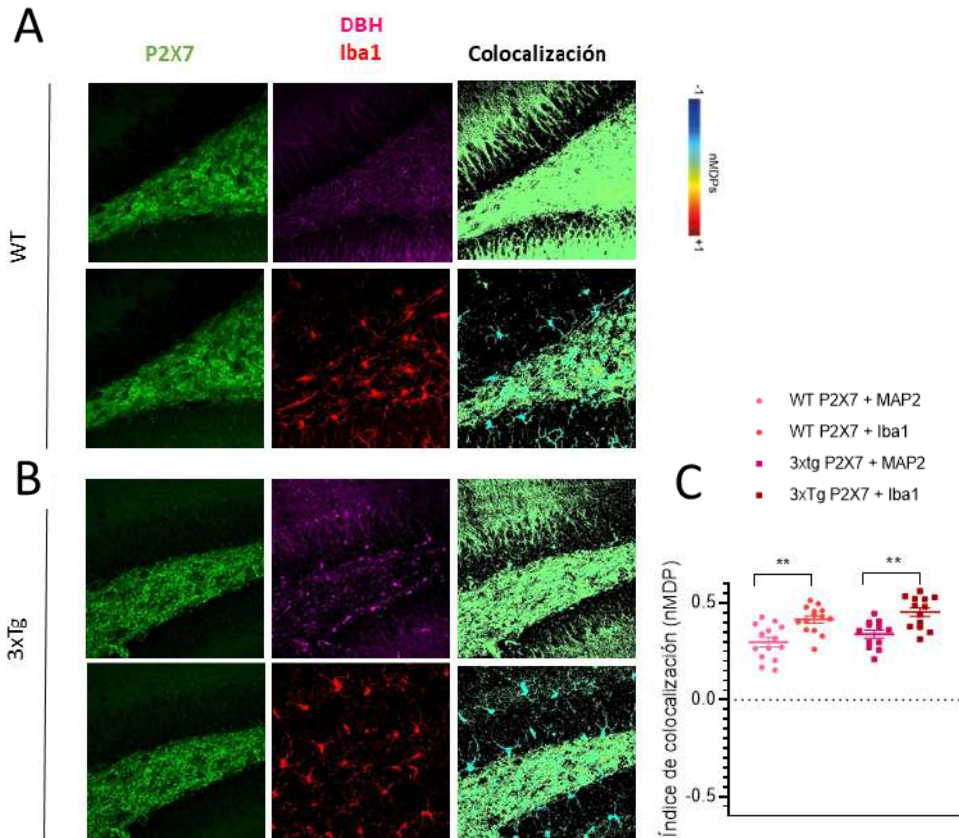


Figura 45. Análisis por inmunofluorescencia de la colocalización de P2X7 en con neuronas y microglía en el hipocampo de los ratones WT y 3xTg-AD de 12 m.

A-B, imágenes representativas de rodajas de médula adrenal marcadas con anti-P2X7 (verde), anti-Iba1 (rojo) y anti-MAP2 (magenta) en ratones WT (A) y 3xTg-AD (B) de 12 m. Se utilizó el software ImageJ con el *plugin colocalization colormap* para calcular el índice de colocalización entre P2X7 y MAP2 y entre P2X7 e Iba1. La escala indica el grado de colocalización y va de azul (-1, nula) a rojo (+1, máxima colocalización). C, Índice de colocalización (nMDP) calculado en imágenes de cerebro en los distintos grupos experimentales.

Cada uno de los puntos representa una imagen analizada de las rodajas de cerebro de los ratones, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó mediante t de student comparando la colocalización con MAP2 e Iba1. *** $p < 0.001$. N= 4 ratones/grupo.

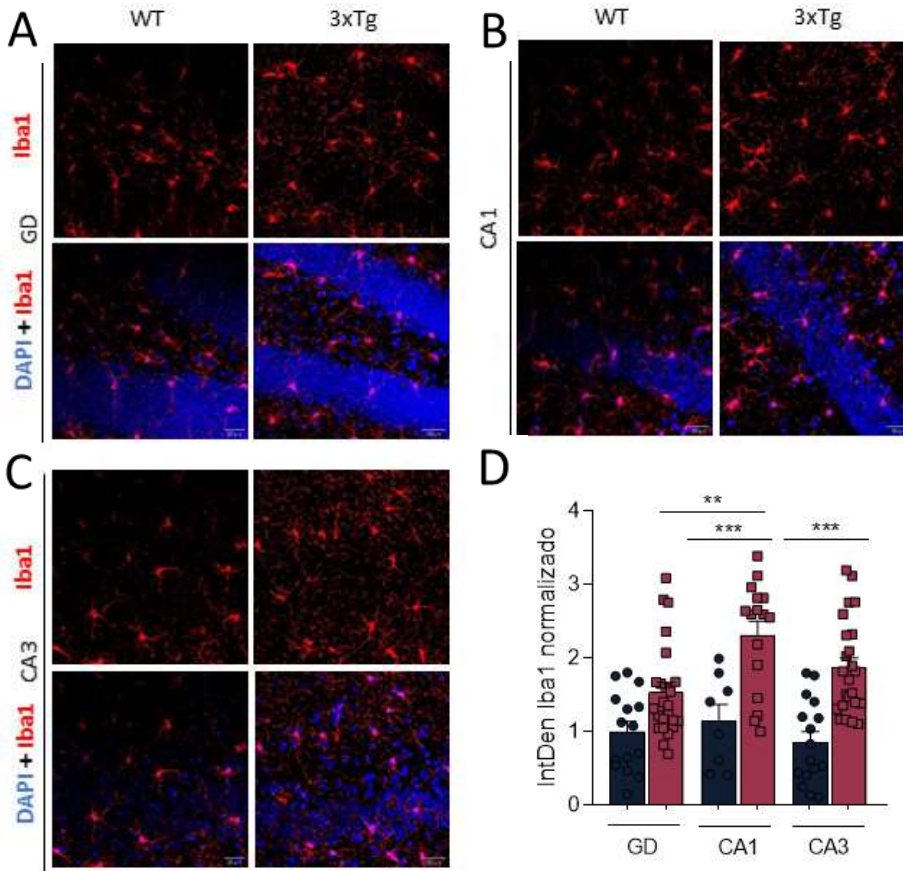


Figura 46. Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de Iba1 en hipocampo de los ratones WT y 3xTg-AD de 12 m.

A-C, imágenes representativas de rodajas de cerebro marcadas con anti-Iba1 (rojo) y DAPI para marcar los núcleos celulares (azul) en giro dentado (A), CA1 (B) y CA3 (C). Se observa un aumento en la expresión de esta proteína con la patología. D, niveles normalizados de expresión Iba1 en el conjunto de rodajas de cerebro.

Cada uno de los puntos representa una imagen analizada de cada una de las zonas del hipocampo de los ratones, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). Los datos están normalizados con respecto a GD WT para explorar posibles diferencias de expresión entre zonas. El análisis estadístico se realizó ANOVA de una vía y LSD Fisher. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. N= 4 ratones /grupo.

4.3. Expresión de canales de calcio

A la hora de caracterizar el posible mecanismo por el que estaría alterada la modulación de las corrientes de calcio por ATP debemos plantear también la posibilidad de que sean los canales de calcio (su expresión y/o su funcionalidad) lo que pudiera estar alterado. Para estudiar esta posibilidad, realizamos experimentos orientados a identificar las subpoblaciones de canales de calcio presentes en las células cromafines de ratón y sus posibles variaciones a lo largo de la edad y/o con la progresión de la EA.

4.3.1. Estudios electrofisiológicos

En las células cromafines de ratón se ha descrito la existencia de distintos subtipos de canales de VDCC de alto umbral, incluidos los canales Cav1 (tipo L) y Cav2 (tipo P/Q, N y R). De hecho, los canales de tipo L representan el 40% de la corriente de calcio total (ICa) y los de tipo no-L (60%) consisten en aproximadamente un 25% de tipo N y un 35% de tipo P/Q (Hernández-Guijo *et al.*, 1998).

Para identificar las distintas poblaciones de CCDV presentes en las células cromafines de ratones WT y ratones 3xTg-AD utilizamos concentraciones supramáximas de bloqueantes específicos de los distintos subtipos de canales como son el nifedipino (10 μM ; para bloquear el subtipo L), ω -Agatoxina IVA (1 μM ; para bloquear el subtipo P/Q) y ω -conotoxina GVIA (1 μM ; para bloquear el subtipo N).

En esta serie de experimentos electrofisiológicos aplicamos inicialmente una serie de pulsos despolarizantes de 50 ms a +10 mV, hasta que se estabilizó la corriente, y a continuación superfundimos los diferentes bloqueantes para cuantificar el grado de bloqueo inducido por cada uno de ellos. La Figura 47A muestra registros originales representativos de la I_{Ba} obtenida en una célula cromafín de ratón WT CC y su bloqueo por cada uno de los bloqueantes selectivos de los CCDV. Las figuras 47B-D muestran el grado de bloqueo inducido por los diferentes bloqueantes utilizados y sus variaciones con la edad y/o la progresión de la EA.

Como puede apreciarse, en los ratones 3xTg-AD de 12 meses se produce un significativamente menor bloqueo por nifedipino, en comparación tanto con los animales WT de la misma edad, como en comparación con los animales WT y 3xTg-AD de 2 meses de edad. Por el contrario, al analizar la población de canales P/Q (bloqueo por Aga-IVA) se observa un significativamente mayor bloqueo en los ratones 3xTg-AD de 12 meses en comparación tanto con los animales WT de la misma edad, como con los animales de 2 meses de edad. No se observaron diferencias

en el grado de bloqueo inducido por la GVIA (canales N) en ninguno de los grupos experimentales.

Estos datos sugieren que con la progresión de la EA se estaría produciendo una reducción de la población de canales L y un incremento de la población de canales P/Q.

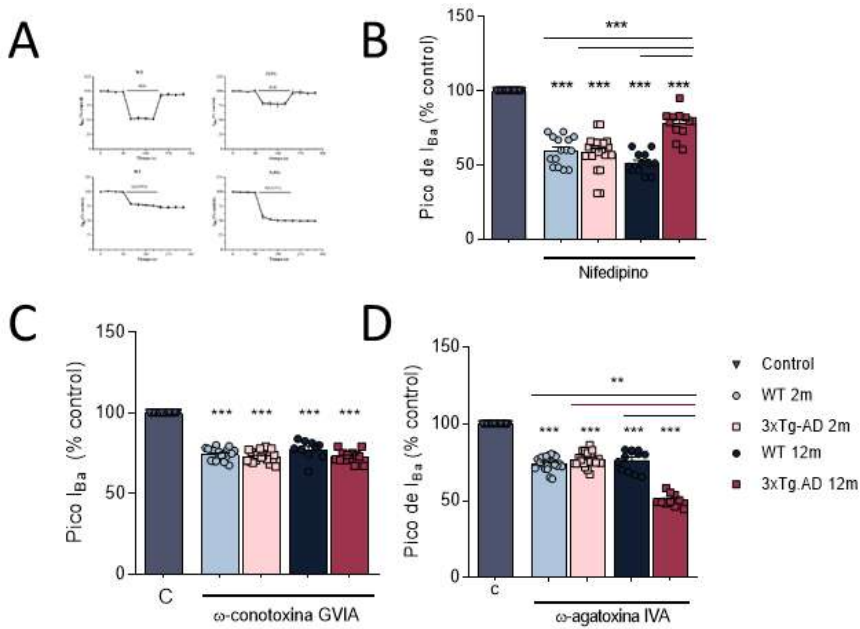


Figura 47. Pico de la I_{Ba} tras la adición de los bloqueantes específicos células cromafines de ratones WT y 3xTg-AD con 2 y más de 12 meses de edad.

A, Cursos temporales de la I_{Ba} y su bloqueo tras la adición de nifedipino (paneles superiores) o AGA IVA (paneles inferiores) aplicados de manera aislada en una célula de un ratón WT (izquierda) o 3xTg-AD (derecha) de 12m. **B-D**, Bloqueo de la corriente tras la adición de nifedipino (tipo L) (**B**), GVIA (tipo N) (**C**), y AGA IVA (tipo P/Q) (**D**) en células cromafines de ratones de todos los grupos experimentales, con respecto a la corriente control. Cada uno de los puntos representa pico de la corriente en una célula tras la adición del bloqueante, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía y test LSD de Fisher. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. N= 5 ratones/ grupo.

En otra serie de experimentos se estudió el efecto de la aplicación secuencial de todos los bloqueantes de canales de calcio. La Figura 48A muestra una serie de registros originales de I_{Ba} obtenidos en una célula de ratón WT (panel izquierdo) o de una célula de ratón 3xTg (panel derecho), en ausencia y en presencia de los diferentes bloqueantes de los CCDV, como se indica. La Figura 48B muestra el curso temporal de la I_{Ba} y su bloqueo por la adición acumulativa de los diferentes antes en los dos tipos celulares estudiados. Como puede apreciarse, tras el lavado de los bloqueantes, solo se recuperó el componente L de la I_{Ba} (sensible a NIFE). Estos experimentos sugieren que los CCDV de los subtipos L-, N- y P/Q de VDCCs están presentes en CC aisladas de ratones WT y 3xTg, pero se observaron algunas diferencias.

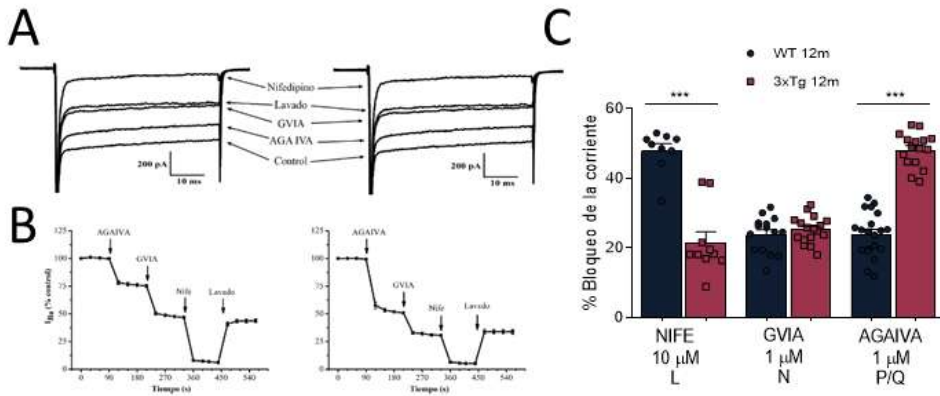


Figura 48. Disección farmacológica de los distintos componentes de la I_{Ba} , ligados a los distintos CCDV y bloqueo de los mismos en células cromafines de ratones WT y 3xTg-AD con más de 12 meses de edad.

A, Registros originales de la I_{Ba} en ratones WT (izquierda) y 3xTg-AD (derecha) de más de 12 meses de edad. Se muestra el registro control y los registros tras la adición de los distintos bloqueantes específicos, así como el lavado. **B,** Curso temporal de la amplitud de la I_{Ba} en condiciones control y tras la adición de los distintos bloqueantes en una célula WT (izquierda) y 3xTg-AD (derecha) de 12m. Los distintos compuestos se fueron añadiendo en la célula de manera secuencial, tal y como se indica en la figura. **C,** Datos normalizados de bloqueo de la corriente producido por los distintos bloqueantes de CCDV en células cromafines de ratón de 12 m de edad.

Cada uno de los puntos representa el bloqueo de la corriente en una célula tras la adición del bloqueante, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó mediante t de student comparando los ratones 3xTg-AD con los WT para cada subtipo de canal. *** $p < 0.001$. N= 5 ratones por grupo

En la figura 48C se representa la media de los resultados de bloqueo obtenidos. Como puede observarse, el bloqueo por GVIA (canal tipo N) es similar en los dos tipos celulares. Sin embargo, encontramos diferencias significativas en los componentes L y P/Q. El nifedipino produjo un bloqueo de I_{Ba} de un 47% en células de ratones WT, y de tan solo un 21% en células de ratones 3xTg-AD de 12m. Por el contrario, la AGAIVA (canales P/Q) produjo un bloqueo de un 23% en WT, incrementándose éste hasta el 48% en 3xTg-AD. Estos datos sugieren que en células de animales 3xTg se produce una reducción de la corriente tipo L que parece estar compensada con una mayor fracción de corriente P/Q.

4.3.2. Estudios de rt-qPCR

Dados los resultados que obtuvimos con patch clamp, quisimos ver si las diferencias observadas en la proporción de los diferentes subtipos de CCDV se debían a cambios en la actividad de los canales o a alteraciones en la expresión de los mismos, para lo cual determinamos los niveles de ARNm de los 3 subtipos de canales de calcio mediante rt-qPCR en la médula adrenal de ratones WT y 3xTg-AD de 12m.

La Figura 49 muestra datos promediados de niveles normalizados de ARNm para los diferentes CCDV encontrados en médula adrenal de ratones 3xTg-AD con respecto a los WT.

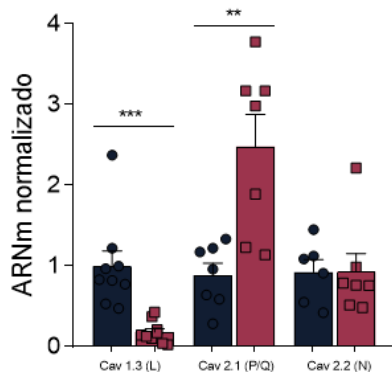


Figura 49. Análisis de los niveles de ARNm de los distintos subtipos de canales de calcio en médula adrenal de ratones WT y 3xTg-AD con más de 12 meses de edad.

La figura representa los niveles normalizados de ARNm de los distintos subtipos de canales de calcio.

Cada uno de los puntos representa el resultado obtenido con ambas médulas de un ratón, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó mediante t de student para cada uno de los receptores comparando la condición de 3xTg-AD con su respectivo control de la misma edad. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Como puede observarse, la expresión relativa del CCDV del subtipo L disminuyó significativamente en ratones de 3xTg-AD de 12 m en comparación con los WT de la misma edad. Lo contrario se observó para los CCDV del subtipo P/Q, que mostró un aumento de casi 3 veces de los niveles de ARNm en médula adrenal de ratones 3xTg con respecto a WT.

Con el objetivo de comparar lo observado en médula adrenal con lo que ocurre a nivel de SNC, realizamos experimentos similares de rt-qPCR de los distintos CCDV en hipocampo de ratones WT y 3xTg-AD de 12 m. En esta serie de experimentos observamos que en hipocampo de los ratones 3xTg-AD de 12 m también muestran una disminución significativa de los niveles de ARNm para el CCDV del subtipo L y un aumento significativo de los P/Q, de aproximadamente 2.5 veces con respecto a lo observado en ratones controles de la misma edad (Figura 50).

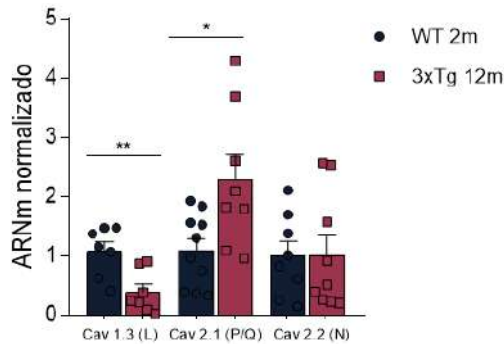


Figura 50. Análisis de los niveles de ARNm de los distintos subtipos de canales de calcio en hipocampo de los ratones WT y 3xTg-AD de más de 12 meses de edad.

La figura representa los niveles normalizados de ARNm de los distintos subtipos de canales de calcio.

Cada uno de los puntos representa el resultado obtenido con ambos hipocampos de un mismo ratón, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó mediante t de student para cada uno de los receptores comparando la condición de 3xTg-AD con su respectivo control de la misma edad. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.3.3. Estudios inmunohistoquímicos

Finalmente, para intentar correlacionar estos resultados obtenidos en la medición del ARNm con la expresión a nivel de la membrana celular de los diferentes subtipos de CCDV, se llevaron a cabo experimentos de inmunohistoquímica en rodajas de glándula adrenal.

En estos experimentos, utilizando anticuerpos específicos para los subtipos

L y P/Q de CCDV, encontramos una disminución significativa de la expresión de CCDV tipo L en la médula adrenal de ratones 3xTg-AD, y una mayor expresión de CCDV de tipo P/Q. La Figura 51 muestra cortes de médula adrenal representativos incubados con anticuerpos de tipo L (panel superior) y P/Q (panel inferior). La Figura 51C muestra los datos promediados del análisis IntDen de la expresión de tipo L (panel superior) y tipo P/Q (panel inferior) obtenidos de un total de 5 animales de cada grupo experimental. Estos datos sugieren que las alteraciones observadas en la actividad de los CCDV en ratones 3xTg-AD se correlacionarían con cambios en la expresión de estos canales en la membrana de los CC en relación con el desarrollo de la patología de EA.

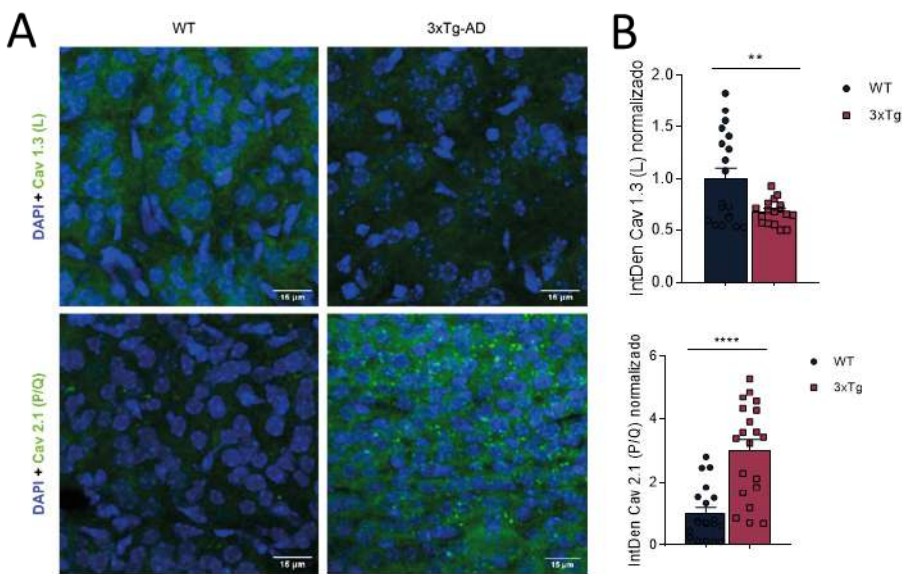


Figura 51. Análisis por inmunofluorescencia de la expresión los canales de calcio en médula adrenal de los ratones WT y 3xTg-AD con 12 m.

A, panel superior, imágenes representativas de rodajas de médula adrenal marcadas con anti-Cav1.3 (verde) y DAPI para los núcleos celulares (azul). Se observa una disminución en la expresión del canal L con la patología. **A, panel inferior**, imágenes representativas de rodajas de médula adrenal marcadas con anti-Cav2.1 (verde) y DAPI para los núcleos celulares (azul). Se ve un aumento en la expresión del canal P/Q con la enfermedad. **B**, niveles normalizados de expresión del canal L en el conjunto de rodajas de médula adrenal (superior) y niveles normalizados de expresión del canal P/Q en el conjunto de rodajas de médula adrenal (inferior). Cada uno de los puntos representa una imagen analizada de la médula de los ratones, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó mediante t de student comparando el grupo de 3xTg-AD con el grupo control. ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

5. Señales de calcio y receptores P2X7 en el ratón APP/PS1

Como se ha comentado anteriormente, durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral he tenido ocasión de realizar una estancia formativa en el *Centre for Neuroscience and Cell Biology*, en Coimbra, bajo la supervisión de la Dra. Ana Cristina Rego, experta en el estudio de las señales de calcio y la dinámica mitocondrial. En este periodo realizamos una serie de experimentos orientados a la caracterización funcional del receptor P2X7 y/o su vinculación con posibles alteraciones mitocondriales, utilizando para ello el modelo murino APP/PS1 de enfermedad de Alzheimer, en el que trabaja habitualmente este grupo investigador. Describiré en esta sección los principales hallazgos experimentales obtenidos durante esta breve estancia de investigación.

5.1. Receptores P2X7 en el SNC del ratón

En primer lugar, y dada la controversia que existe acerca de la presencia y/o funcionalidad del receptor P2X7 en neuronas (Miras-Portugal *et al.*, 2017), realizamos una serie de experimentos funcionales midiendo señales intracelulares de calcio inducidas por la estimulación del receptor P2X7 en cultivos de neuronas de ratones APP/PS1 y sus respectivos controles.

En estos experimentos, las neuronas se incubaron con la sonda fluorescente fura 2-AM durante media hora, y después se midió la entrada de calcio a través del receptor P2X7, estimulando este receptor con el agonista específico BzATP (100 μ M).

Como se puede observar en la figura 52, al estimular las neuronas mediante la aplicación de una solución conteniendo 100 μ M de BzATP, no se observó ninguna variación en los niveles de calcio citosólico en las neuronas ni en los ratones WT ni en los APP/PS1. Estos resultados parecen sugerir que no existiría un receptor P2X7 funcional en las neuronas de ratón.

Tras estos resultados, decidimos explorar la presencia y/o la funcionalidad de este receptor a nivel de la glía, más concretamente en astrocitos, para lo cual fue necesario en primer lugar caracterizar el cultivo de estas células en nuestro modelo, particularmente en lo que se refiere a la pureza de dicho cultivo. Para ello, realizamos una serie de experimentos de marcaje con anticuerpos con anti-GFAP (marcador de astrocitos), anti-MAP2 (marcador de neuronas), anti-CD11 (marcador de microglía), anti-Olig2 (marcador de oligodendroglía) y Hoescht para marcar los núcleos celulares.

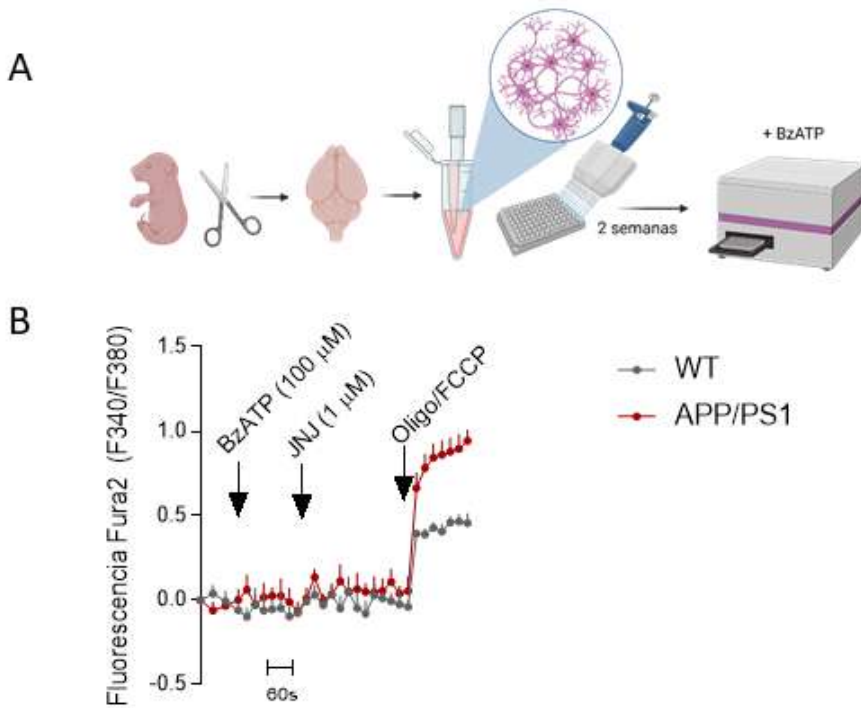


Figura 52. Entrada de calcio en neuronas de ratones WT y APP/PS1 en respuesta a la estimulación del receptor P2X7.

A, Esquema del procedimiento utilizado. Las células se incubaron con Fura 2-AM y se estimularon con 100 μM de BzATP. Al final del experimento se aplicó Oligo/FCCP para comprobar la viabilidad de estas células. **B,** Curso temporal de la medida de fluorescencia normalizada en neuronas de ratones WT (gris) y APP/PS1 (granate).

Como se puede observar en la figura 53, nuestro cultivo presentaba entre un 85% (en el caso del ratón APP/PS1) y un 92% (en el caso de los ratones WT) de astrocitos. Estos datos fueron confirmados mediante experimentos de Western Blot (Figura 53C) que nos confirmaron la presencia de una mayor proporción de astrocitos, no existiendo neuronas en el cultivo, aunque sí encontramos cierto marcaje de oligodendrocitos. En base a estos resultados consideramos estos cultivos como lo suficientemente puros como para continuar nuestros experimentos.

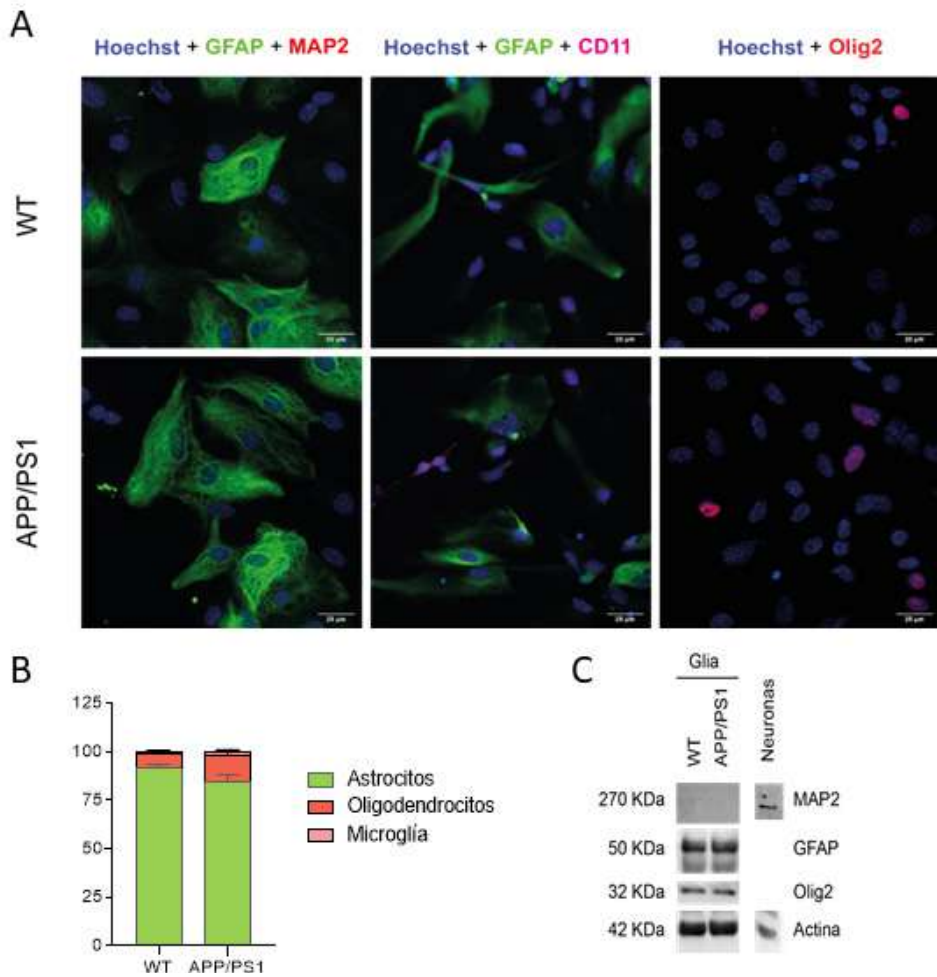


Figura 53. Análisis por inmunocitoquímica de la expresión distintos marcadores celulares del SNC.

A imágenes representativas de cultivos de glía (astrocitos) de ratón WT (superior) y APP/PS1 (inferior) marcados con anti-GFAP (verde), anti-MAP2 (rojo), anti-CD11 (magenta), anti-Olig2 (rojo) y Hoescht para los núcleos celulares (azul). B, porcentaje de células del total del cultivo que expresaban cada una de las proteínas mencionadas. Las barras representan la media del conjunto de datos (en porcentaje) \pm el error estándar de la media (EEM). C, Western blot en el que comprobamos que no hay contaminación de neuronas, aunque sí una pequeña parte de oligodendrocitos.

5.2. Entrada de calcio a través del receptor P2X7

Una vez caracterizado el cultivo, realizamos experimentos de registros de señales de calcio citosólico utilizando la sonda fluorescente Fura 2-AM, así como el agonista BzATP para estimular la entrada de calcio a través del P2X7R.

En estos experimentos observamos que la entrada de calcio que se produce tras estimular el receptor P2X7 es significativamente mayor en los astrocitos aislados de ratones APP/PS1 con respecto a las señales de calcio obtenidas en cultivos de ratones (Figura 54B).

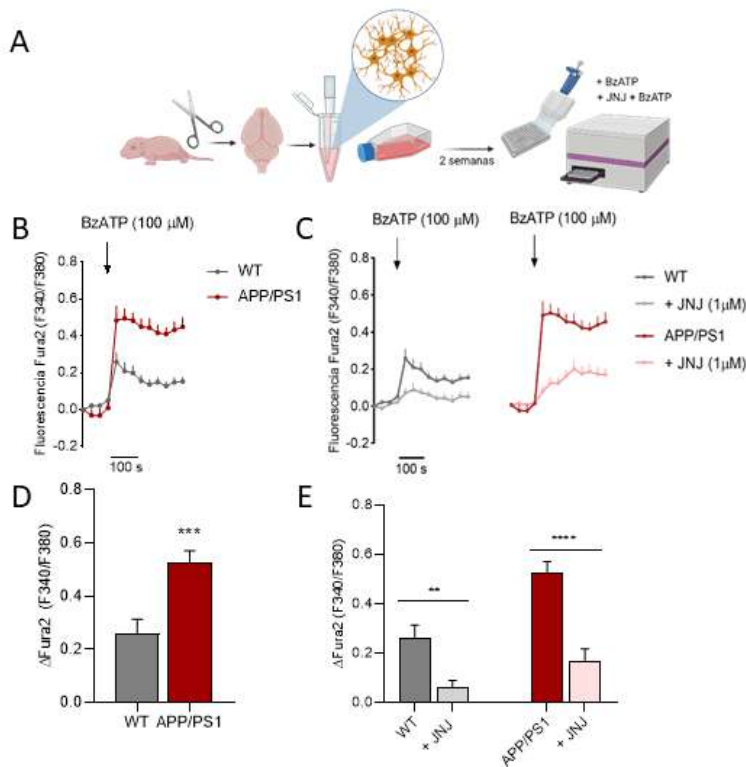


Figura 54. Cambios en la entrada de calcio en astrocitos de ratones WT y APP/PS1.

A, Esquema del proceso. Las células se incubaron con Fura 2-AM y se estimularon con 100 μ M de BzATP. B, Señales de calcio citosólico tras la estimulación con BzATP en astrocitos de ratones APP/PS1 y WT. C, Señales de calcio citosólico tras la estimulación con BzATP tras la aplicación, durante 10 min, del bloqueante de receptores P2X7 JNJ (1 μ M) en astrocitos de ratones APP/PS1 y WT. D y E, Valores medios del incremento de la fluorescencia de Fura 2 en ambos grupos experimentales, sin y con pre-incubación de JNJ. Las barras representan la media del conjunto de datos (en porcentaje) \pm el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó mediante t de student comparando APP/PS1 y posteriormente datos con y sin incubación con JNJ. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

En estos experimentos, al adicionar el bloqueante específico del receptor P2X7 JNJ47965567 (JNJ), observamos que la señal de calcio se reduce considerablemente, lo que indica que ésta se debe mayormente a la entrada del catión a través del receptor P2X7 y no de otro receptor (Figura 54C).

Las figuras 54D y 54E muestran los valores medios de incremento de la señal citosólica de calcio tras la estimulación con el agonista BzATP en los distintos grupos experimentales. También podemos ver el bloqueo parcial de la señal tras la estimulación en células que previamente habían sido incubadas con el antagonista JNJ.

5.3. Regulación de la señal de calcio por organelas intracelulares

Ya que habíamos observado diferencias en las señales de calcio generadas por la activación del receptor P2X7 con el desarrollo de la patología en los ratones APP/PS1, decidimos caracterizar la posible implicación de organelas implicadas en la regulación de la señal de calcio, particularmente de la mitocondria, la principal organela, junto con el retículo endoplasmático, encargada de tamponar el calcio que entra al interior celular.

Para ello utilizamos la sonda fluorescente Rhod-2, que se une al calcio del interior mitocondrial, y repetimos el protocolo de estimulación con BzATP, en ausencia o presencia del antagonista JNJ. Como se muestra en la figura 55, la estimulación del receptor P2X7 induce la entrada de calcio al interior de la mitocondria, si bien en este caso no se observan diferencias significativas entre las señales obtenidas en astrocitos de ratones WT y de ratones APP/PS1.

Las figuras 55C y 55D muestran la media del incremento de Rhod2 tras la adición del agonista BzATP en los distintos grupos experimentales. También podemos ver el efecto sobre la señal de calcio mitocondrial en células que previamente habían sido incubadas con el antagonista JNJ. Se observa que el JNJ en este caso sólo reduce parcialmente la movilización de calcio a la mitocondria tras estimular con BzATP.

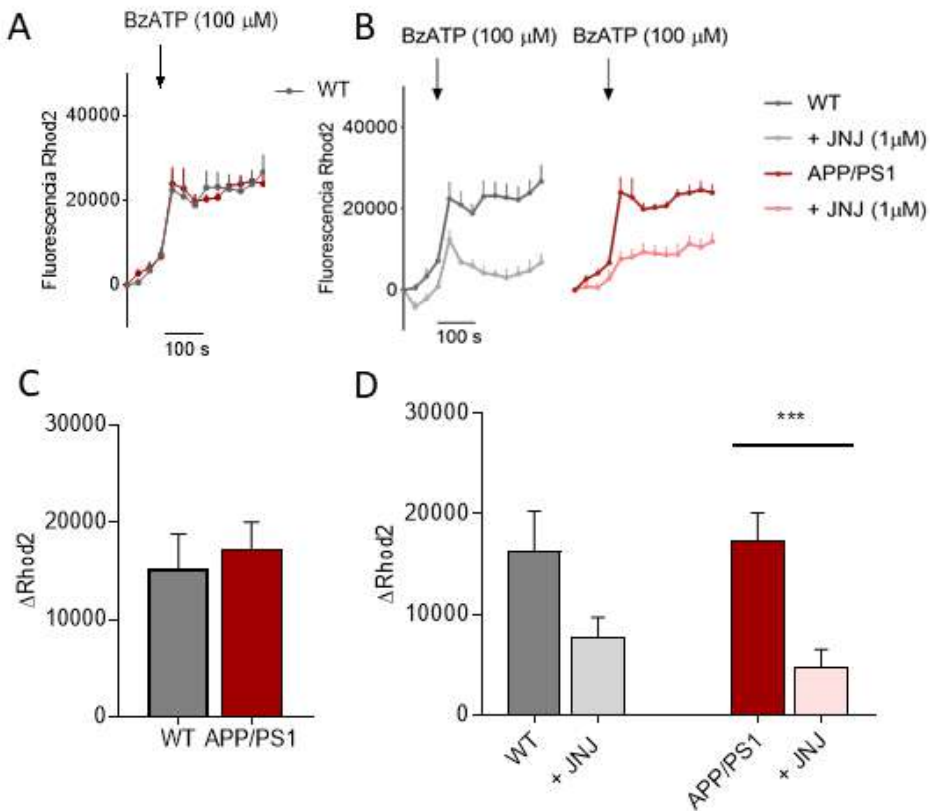


Figura 55. Cambios en los niveles de calcio mitocondrial en astrocitos de ratones WT y APP/PS1.

Las células se incubaron con Rhod2 y se estimularon con 100 μM de BzATP. **A**, Señales de calcio mitocondrial tras la estimulación con BzATP en astrocitos de ratones WT y APP/PS1. **B**, Señales de calcio mitocondrial tras la estimulación con BzATP en astrocitos de ratones WT y APP/PS1 previamente tratados con JNJ (1 μM, 10 min). **C** y **D**, Valores medios del incremento de la fluorescencia de Rhod2 en ambos grupos experimentales, sin y con pre-incubación con JNJ. Las barras representan la media del conjunto de datos (en porcentaje) ± el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó mediante t de student comparando APP/PS1 y posteriormente datos con y sin incubación con JNJ. *** $p < 0.001$.

5.4. Comunicación entre organelas intracelulares

Puesto que la mitocondria y el RE son las principales organelas implicadas en la homeostasis del calcio celular, quisimos ver si la comunicación entre ellas se encontraba alterada de alguna manera en los astrocitos con el desarrollo de la patología de EA. Para ello, medimos diferentes proteínas implicadas en esta comunicación inter-organelas mediante Western Blot, utilizando para ello astrocitos aislados tanto de ratones WT como APP/PS1, realizándose el marcaje con anticuerpos anti-IP3R, anti-VDAC1, anti-sigma1 (Figura 56).

Los datos cuantitativos obtenidos en esta serie de experimentos se muestran en la figura 57. Como puede apreciarse, no se observaron diferencias significativas en la expresión de ninguna de las proteínas que participan en la comunicación mitocondria-RE.

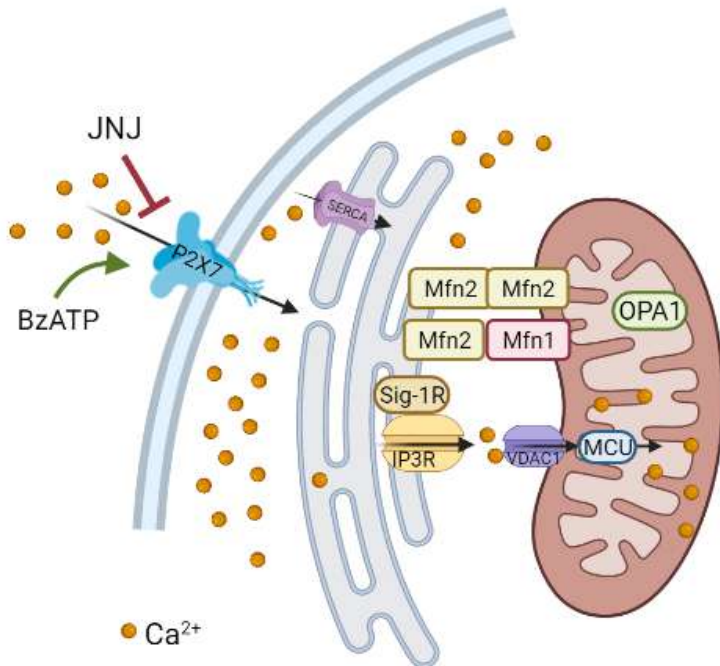


Figura 56. Esquema representativo de la entrada de calcio a través del receptor P2X7, y de proteínas implicadas en la comunicación mitocondria-RE.

Creado con Biorender.com

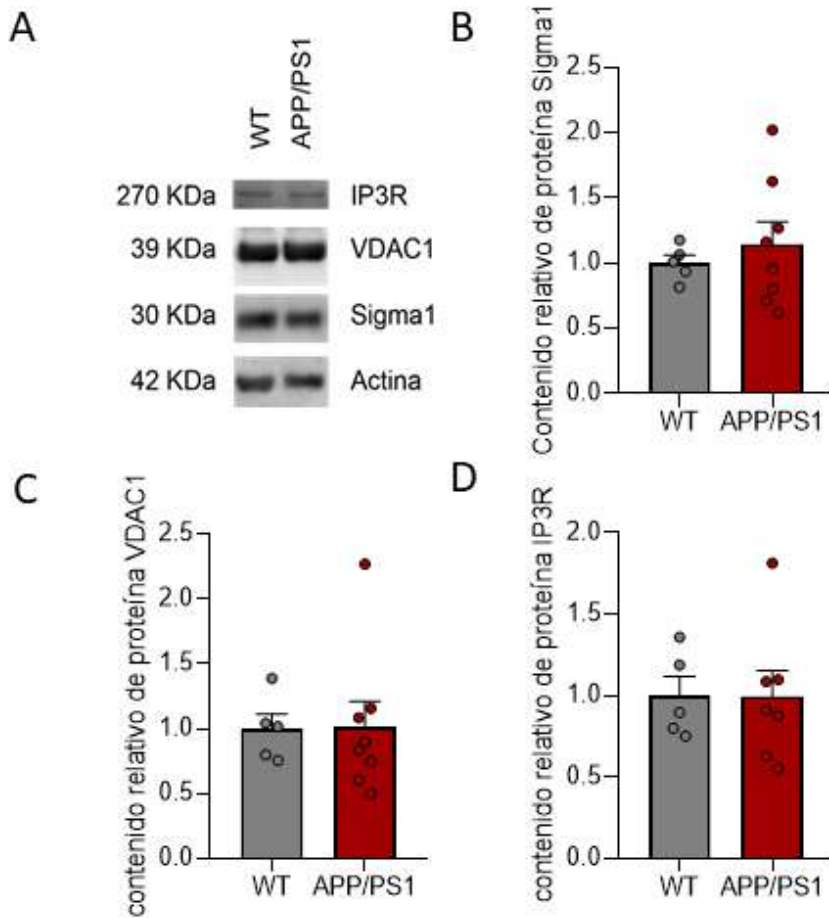


Figura 57. Análisis cuantitativo por Western Blot de la expresión de proteínas implicadas en la comunicación mitocondria-RE en astrocitos de ratones WT y APP/PS1

A, imágenes representativas de membranas marcadas con anti-IP3R, anti-VDAC1, anti-sigma1 y anti β -actina en cultivo de astrocitos de ratón. **B-D**, niveles normalizados de expresión de las proteínas estudiadas con respecto al control endógeno (β -actina).

Cada uno de los puntos representa la cuantificación de un cultivo, normalizado con la β -actina de cada muestra y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM).

5.5. Proteínas de fusión mitocondrial

Finalmente, y dado que en varias enfermedades degenerativas se ha visto que los ciclos de fusión-fisión de las mitocondrias pueden estar alterados, quisimos estudiar las proteínas implicadas en la fusión mitocondrial en los astrocitos aislados de nuestros dos grupos experimentales. Para ello, realizamos experimentos de Western

blot para determinar cuantitativamente la expresión de proteínas implicadas en la fusión mitocondrial como la mitofusina1, mitofusina2 y OPA1.

En estos experimentos observamos que los niveles de mitofusina1, mitofusina2 y OPA1 se encontraban significativamente aumentados en los astrocitos de ratones APP/PS1 en comparación con lo observado en los astrocitos de ratones WT (figura 58).

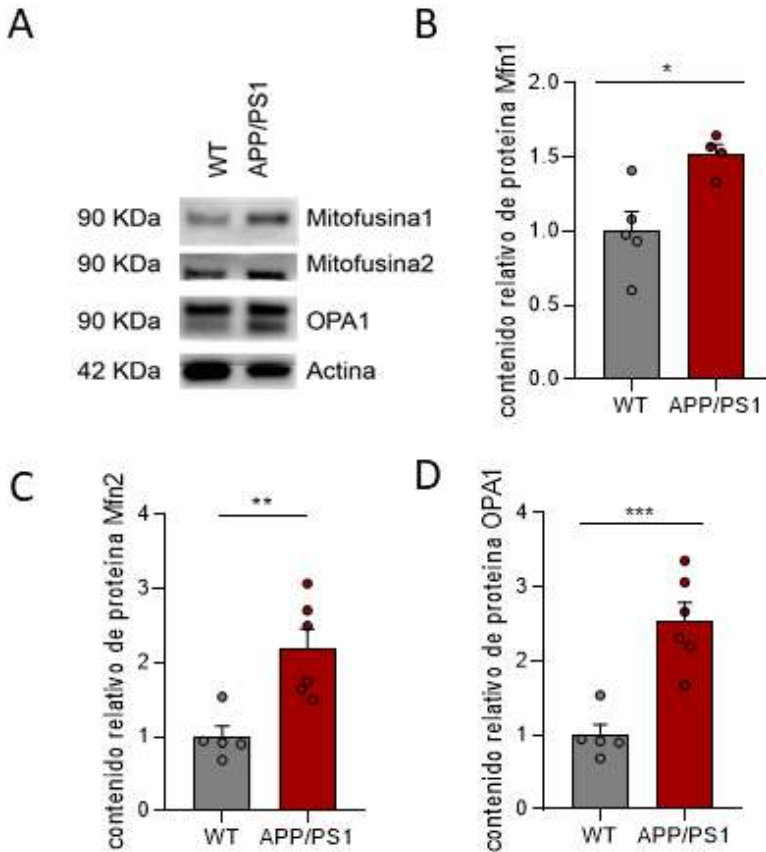


Figura 58. Análisis por Western Blot de la expresión de las proteínas implicadas en la fusión mitocondrial en astrocitos de los ratones WT y APP/PS1

A, imágenes representativas de WB en membranas preparadas a partir de cultivo de astrocitos de ratón, marcadas con anti-mitofusina1, anti-mitofusina2, anti-OPA1 y anti β -actina. B-D, niveles normalizados de la expresión de las tres proteínas estudiadas con respecto al control endógeno de β -actina.

Cada uno de los puntos representa la cuantificación de un cultivo, normalizado con la β -actina de cada muestra, y las barras la media del conjunto de datos \pm el error estándar de la media (EEM). *p<0.05; **p<0.01. ***p<0.001.

Discusión

*Defiende tu derecho a pensar, porque
incluso pensar de manera errónea es mejor
que no pensar.*

Hipatia de Alejandria.

Alteraciones en el eje simpatoadrenal con
el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

Discusión

La enfermedad de Alzheimer constituye una prioridad de acción mundial, ya que el mayor riesgo de padecerla es la edad, y la esperanza de vida en la población se está viendo aumentada en los últimos años. Sin embargo, a pesar de que la medicina ha avanzado mucho en muchos campos desde que se describió por primera vez esta patología, es muy poco lo que conocemos de la EA, de sus causas y de los mecanismos fisiopatológicos implicados en su aparición y su progresión, por lo que aún somos incapaces, no sólo de curarla o evitar su aparición, sino siquiera de detener el avance de la misma.

En la presente Tesis Doctoral, partiendo de la hipótesis de que esta patología es una enfermedad multisistémica que afecta no sólo al SNC, sino también al SN periférico, hemos estudiado posibles alteraciones en el eje simpato-adrenomedular, que pudieran estar participando en el desarrollo y/o progresión de la EA. Así, en ratones 3xTg-AD, modelo de Alzheimer, hemos visto alteraciones en el proceso de exocitosis de catecolaminas y en el citoesqueleto de actina que regula la secreción en las CCs (Vitale *et al.*, 1995; Malacombe *et al.*, 2006; Meunier y Gutiérrez, 2016; Villanueva *et al.*, 2016), y en la modulación que el ATP, co-liberado con las catecolaminas en las vesículas secretoras, ejerce sobre las corrientes de calcio, y en última instancia, sobre la exocitosis. También hemos observado alteraciones en el sistema purinérgico, y especialmente, una mayor expresión y actividad del receptor P2X7 con la patología. Hemos visto, además, diferencias en la actividad y expresión de los distintos subtipos de CCDV expresados en la CC de ratón.

Para nuestros estudios hemos utilizado principalmente la célula cromafín adrenomedular, ya que cada vez son mayores las evidencias que, con las enfermedades neurodegenerativas, el eje simpático-adrenomedular y la respuesta al estrés van a verse alterados (de Diego *et al.*, 2020). Esto no parece extraño puesto que, al estar las células cromafines reguladas por el SNS, el hipotálamo y la corteza cerebral, tiene sentido que las alteraciones que se producen en cerebro de los pacientes que sufren EA se vean también reflejadas en los distintos elementos del eje simpatoadrenal, y más concretamente, en la célula cromafín.

Caracterización fenotípica del modelo murino 3xTg-AD

En este estudio comenzamos en primer lugar con la caracterización fenotípica del modelo murino 3xTg-AD (Oddo *et al.*, 2003a), utilizando para ello distintas pruebas de comportamiento ampliamente usadas en investigación, así como pruebas de inmunofluorescencia para realizar la caracterización histológica de las lesiones cerebrales.

Pesamos a los ratones antes del sacrificio, y observamos que los ratones 3xTg-AD, aunque hasta los 6 m evolucionan del mismo modo que el grupo de los WT, a partir de esta edad comienzan a aumentar menos de peso, lo que se traduce en que a los 12 m pesan en torno a un 10,97% menos que los controles. Esto, teniendo en cuenta que los ratones pesan de media cerca de 35 g a esa edad, es alrededor de 5g.

Esta pérdida de peso que hemos observado, también se ha descrito en otros modelos de EA, así como en pacientes que sufren EA, y puede deberse a diversos factores. En primer lugar, con la EA se producen cambios a nivel olfativo, lo que puede hacer que la comida resulte menos apetitosa, y además también se ven afectadas regiones que regulan el apetito, lo que también puede tener impacto en la ingesta (Tamura *et al.*, 2007; Sergi *et al.*, 2013). Por otro lado, también puede estar causada por un aumento en la actividad física (Sergi *et al.*, 2013), ya que con la enfermedad se desarrollan alteraciones motoras, con incremento de la locomoción, lo cual también se ha visto en nuestro modelo (Figura 28). Sin embargo, cuando pesamos las glándulas adrenales de estos ratones una vez extraídas, ya desde los 2 m éstas presentaban un mayor peso en los ratones 3xTg-AD con respecto a las de los ratones WT de la misma edad, lo que podría estar relacionado con los mayores niveles de estrés y ansiedad, así como de locomoción observados en estos ratones, al estar las hormonas adrenales, tanto medulares como corticales, implicadas en la respuesta de lucha o huida.

En cuanto a la prueba de reconocimiento de objetos, en la que evaluamos la memoria de los ratones, vemos que ya desde los 6 meses los ratones 3xTg-AD obtienen peores resultados que los WT (Figura 26), lo que confirma que estos ratones muestran un deterioro cognitivo que se empieza a hacer manifiesto a esta edad (Oddo *et al.*, 2003a).

Por otro lado, en lo que a la actividad locomotora se refiere, observamos que se produce una disminución de la distancia total recorrida por los animales durante la prueba a medida que los ratones envejecen, que se produce de forma similar en ambas cepas, si bien a los 6 meses, que es cuando la enfermedad está comenzando

a desarrollarse, los ratones 3xTg-AD presentan movimientos más rápidos que los animales WT. Esta hiperactividad locomotora podría estar relacionada, al menos en parte, con mutaciones en las presenilinas, ya que tanto en el modelo murino APP/PS1 (PS1 mutada) como en el Tg2576 (PS2 mutada) se han descrito resultados similares (Filali *et al.*, 2011; Toda *et al.*, 2011).

Con la prueba de campo abierto también podemos evaluar comportamientos de los animales relacionados con la ansiedad, y así vemos que los ratones 3xTg-AD presentan alteraciones significativas ya desde los 2 meses de edad. El comportamiento “normal” de los ratones sería moverse principalmente en las zonas de la caja próximas a la pared, ya que mediante la tigmotaxis o contacto con las mismas se sienten más seguros, y esto lo alternarían con algún movimiento de exploración hacia la zona central, dada también la curiosidad innata de estos animales. De hecho, esto es lo que observamos en los ratones WT en todas las edades. Sin embargo, los ratones 3xTg-AD, antes incluso de empezar a desarrollar la patología histológica, ya entran más veces y recorren más tiempo en el interior de la caja (figura 28). Esto concuerda con lo que hemos observado en la prueba de laberinto en cruz elevado, donde los ratones 3xTg-AD pasan más tiempo explorado los brazos abiertos, así como en el borde del laberinto (Figura 29), comportamiento que también se ha descrito en otros modelos de EA (Lalonde *et al.*, 2003; Shruster y Offen, 2014), y podría ser comparable al comportamiento “deshinibido” que ha sido descrito en pacientes de EA, con comportamientos poco aceptados socialmente o un cierto grado de euforia no motivada (Chung y Cummings, 2000). Aunque la literatura resulta controvertida en relación a este tema, y hay diversos estudios que muestran un aumento en los comportamientos ansiosos de estos ratones, es cierto que los controles utilizados son importantes, y la mayoría de estos estudios utilizan como control los ratones más accesibles comercialmente, de la cepa C57, por lo que consideramos que, al usar nosotros los controles con el mismo fondo genético, los resultados presentados en este estudio resultan bastante más fiables.

Por último, hemos estudiado el posible comportamiento depresivo de los animales utilizando para ello el test de suspensión por la cola. En estos estudios observamos que, ya a partir de los 6 meses de edad, los ratones 3xTg-AD muestran mayores tiempos de inmovilidad, y, por tanto, un mayor comportamiento depresivo que los ratones WT de la misma edad (Figura 30). Esto concuerda con otros estudios en los que se ha visto una mayor depresión, así como anhedonia, en ratones modelo de EA, tanto los que presentan mutaciones relacionadas con el A β como en modelos con

taupatías (Romano *et al.*, 2014; Kosel *et al.*, 2020), y con el mayor índice de depresión que se ha visto en los pacientes con EA (Chung y Cummings, 2000).

Además de caracterizar fenotípicamente a nuestro modelo experimental, quisimos confirmar que éste también presentaba las marcas histopatológicas características de la EA, como son los depósitos de β -amiloide y la proteína tau hiperfosforilada, para lo cual realizamos estudios con técnicas de inmunofluorescencia. Así, confirmamos que, efectivamente, a la edad de 12 m los ratones 3xTg-AD muestran depósitos de $A\beta$ en distintas áreas cerebrales, fundamentalmente en giro dentado y corteza cerebral (Figura 31) mientras que no se observan estas marcas patológicas en los ratones WT de la misma edad. Del mismo modo, en las 3 áreas del hipocampo estudiadas (giro dentado, CA1 y CA3), los niveles de pTau eran superiores en los ratones 3xTg-AD en comparación con lo observado en ratones WT, y en nuestro caso, de manera más notable en el área CA3 (Figura 32).

Ya que nuestro propósito es estudiar posibles alteraciones en el eje simpatoadrenal, usando para ello como modelo la célula cromafín, realizamos igualmente estudios de inmunofluorescencia en rodajas de glándula adrenal, para ver si estas proteínas mutadas se veían también en esa zona. Vimos que, si bien no se encuentran depósitos de β -amiloide en la médula adrenal de nuestros ratones 3xTg-AD, sí encontramos la proteína tau hiperfosforilada. De hecho, también en ratones WT de 12 m se ve cierta cantidad de proteína tau hiperfosforilada (Figura 33) con respecto a los animales WT de 2 m, pero esta cantidad de pTau es aún mayor en las rodajas de adrenal de ratones 3xTg-AD de 12 m, del orden de unas 10 veces superior. Esto lo podemos considerar un dato relevante puesto que, según estos resultados, todas las alteraciones observadas a nivel de la médula adrenal, y que pasaremos a discutir a continuación, no parecen estar relacionadas con la patología $A\beta$, lo cual nos inclinaría a pensar que los depósitos de $A\beta$ podrían ser más una consecuencia que una causa de la enfermedad.

Debido al aumento en la secreción de catecolaminas encontrado en trabajos previos del grupo en estos ratones con 12 m, quisimos explorar si se trataba de alguna catecolamina en concreto la que se estaba liberando en mayor cantidad, para lo cual utilizamos la técnica de HPLC-MS con muestras de plasma (al ser las catecolaminas de la médula adrenal neurohormonas que se liberan directamente al torrente sanguíneo), así como en corteza e hipocampo, zonas ampliamente estudiadas por sufrir alteraciones con la EA.

Neurotransmisores y EA

Aquí, los resultados más llamativos son que, con la progresión de la EA, hemos visto alteraciones en los niveles de noradrenalina (NA), dopamina (DA) y serotonina (5-HT) cuando comparamos los resultados obtenidos en ratones 3xTg-AD con los de ratones controles (Figuras 34-36). En primer lugar, llama la atención que, tanto en plasma como a nivel central, ya desde los 6 m encontramos elevados niveles de NA en los ratones 3xTg-AD comparados con los controles. Este resultado, en principio puede resultar extraño, puesto que está descrito que con la EA se produce una pérdida de neuronas noradrenérgicas en el *Locus Coeruleus* (LC), la mayor fuente de proyecciones noradrenérgicas del cerebro (Chan-Palay y Asan, 1989; Szot *et al.*, 2006; McMillan *et al.*, 2011). Sin embargo, en muestras de líquido cefalorraquídeo, así como en muestras de plasma de pacientes de EA, se han encontrado niveles más elevados de NA que en adultos de la misma edad sin deterioro cognitivo (Raskind *et al.*, 1984; Elrod *et al.*, 1997). La explicación a este hallazgo es que las neuronas noradrenérgicas restantes compensan la falta de este neurotransmisor mediante su hiperactividad, no sólo en LC, sino en otras regiones del cerebro y ganglios simpáticos (Mather, 2021). De hecho, la administración en ratas de 6-hidroxidopamina para destruir en torno al 80-90% de las neuronas noradrenérgicas llevó a que las neuronas restantes aumentasen su tasa de disparo a cuatro veces más de lo que ocurre en condiciones normales (Chiodo *et al.*, 1983). Además, este aumento de NA, junto con alteraciones en niveles de dopamina (DA) y serotonina (SER) puede estar relacionado con los comportamientos depresivos que se observan con la progresión de la enfermedad (Chandley y Ordway, 2012; Szot, 2016). Por otro lado, estos altos niveles de NA podrían estar favoreciendo la disminución en la actividad del recientemente descrito sistema “glimfático” (Iloff *et al.*, 2012; Simon y Illoff, 2016), análogo al sistema linfático, pero a nivel cerebral, lo que favorecería los depósitos cerebrales de placas de A β y hTau, que no podrían ser retirados (Szot, 2016).

En cuanto a las diferencias encontradas en los niveles de DA, se ha descrito que con la EA existe una pérdida de neuronas dopaminérgicas en el área tegmental ventral (ATV) (Nobili *et al.*, 2017), lo que resultaría en una disminución de la liberación de DA. Nosotros hemos visto que, si bien los niveles de DA en plasma son menores con la EA, no ocurre lo mismo cuando medimos a nivel de corteza cerebral e hipocampo, lo que podría interpretarse como un mecanismo compensatorio de las neuronas restantes para tratar de paliar los efectos de esta pérdida de neuronas dopaminérgicas. Por otro lado, y dado que la dopamina β -hidroxilasa es la enzima

encargada de metabolizar la DA a NA (Figura 8), y que la expresión que hemos visto de DBH es significativamente mayor en los ratones 3xTg-AD (Figura 44), no parece de extrañar que los niveles de DA se vean disminuidos mientras que se observa el ya comentado aumento de NA. En cualquier caso, esta disminución en los niveles de DA que observamos en plasma va a resultar en disfunciones en los procesos de memoria y dificultades en la toma de decisiones, así como en el desarrollo de comportamientos depresivos (Ito y Hayen, 2011) relacionados con la EA.

La SER actúa como neurotransmisor y neuromodulador tanto a nivel central como periférico (Fidalgo *et al.*, 2013) y está implicada en una gran variedad de procesos fisiológicos, como la cognición y la memoria, la atención, la visión espacial y la toma de decisiones. No parece sorprendente, por tanto, que alteraciones en el sistema serotoninérgico se hayan relacionado con gran variedad de los síntomas que encontramos en la EA (Chakraborty *et al.*, 2019). En nuestro estudio, hemos observado que los niveles de SER se encuentran significativamente disminuidos tanto a nivel central como periférico en plasma desde los 6 m (Figuras 34-36), lo que parece tener clara relación con los niveles de apatía y depresión (Figura 30), así como pérdida de memoria (Figura 26) observadas en nuestro modelo desde los en esa misma edad. En un estudio realizado con pacientes, se observaron niveles inferiores de SER en plasma con respecto a controles sanos (Chakraborty *et al.*, 2019). Nosotros, además, hemos visto que en plasma los niveles de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), principal metabolito de la degradación de serotonina, son superiores en los animales 3xTg-AD de 6 y 12 m de edad, lo que parece sugerir que, a nivel plasmático, se está produciendo una mayor degradación de SER con la EA.

Estos resultados, en conjunto, ponen de manifiesto la importancia de estudiar estos sistemas como potenciales dianas terapéuticas para la enfermedad, al menos, para paliar los síntomas asociados a la misma. Por otro lado, y dado que las alteraciones son observadas en el plasma desde estados tempranos de la EA, sugieren el uso de los mismos como posibles biomarcadores de diagnóstico para la EA.

El citoesqueleto de actina en la EA

Tras realizar un estudio de las catecolaminas liberadas, tanto a nivel central como periférico, quisimos ahondar un poco más en el mecanismo por el cuál habíamos observado previamente una mayor liberación de catecolaminas con la EA, ya que se estudiaron las proteínas implicadas en la exocitosis mediante Western Blot y no se encontraron diferencias significativas. Por ello, nos propusimos estudiar la estructura y el comportamiento del citoesqueleto de actina.

En las células neuroendocrinas, la red cortical de actina se reorganiza durante la exocitosis, proceso en el cual va a regular la formación del poro de fusión (Meunier y Gutiérrez, 2016). Existen estudios previos que postulan que en distintas enfermedades neurodegenerativas, como en la enfermedad de Parkinson o en el Huntington, el citoesqueleto de actina se encuentra alterado (Leadsham *et al.*, 2010), por lo que parece razonable que también puedan existir alteraciones de éste en la EA. De hecho, en células PC12 incubadas con A β se vio que se producía neurotoxicidad y desorganización del citoesqueleto de actina (Wang, Lucy Y. *et al.*, 2018). En las células cromafines, el citoesqueleto de actina se organiza como un anillo a nivel de la submembrana de las mismas (Burgoyne *et al.*, 1982; Vitale *et al.*, 1995), y se postula que éste actúa como una barrera para los procesos de exocitosis, aunque últimamente se ha visto que tiene un papel activo en la misma, incluyendo la polimerización de la actina para que los gránulos puedan alcanzar la membrana plasmática (Giner *et al.*, 2005; Malacombe *et al.*, 2006; Meunier y Gutiérrez, 2016).

Nosotros hemos visto que en ratones 3xTg-AD, ya desde los 6 m, la intensidad del citoesqueleto de actina es menor que la observada en los ratones WT, lo que sugiere que se estaría produciendo una desestructuración del mismo (Figura 37), lo que podría explicar que, al estar esa barrera alterada, las vesículas no encuentren ese freno fisiológico y se liberen en mayor medida. Por otro lado, también vimos que no sólo existían diferencias en la intensidad del mismo, sino en cómo éste se organizaba dentro de la célula (Figura 38). Así, en las células de animales WT se encuentra formando un anillo bajo la membrana plasmática, al igual que se observa en células de animales 3xTg-AD de 2 y 6 m. Sin embargo, a los 12 m, mientras que los ratones WT siguen mostrando un claro anillo en la submembrana, en los ratones 3xTg-AD la faloidina se distribuye de manera uniforme por todo el citoplasma celular (Figuras 38 y 59). En nuestro caso, no podemos achacar estas variaciones al daño producido por A β , ya que en nuestras rodajas de médula adrenal no hemos encontrado expresión de esta proteína, aunque sí de hTau, por lo que habría que investigar más como esta proteína podría estar afectando al ensamblaje del citoesqueleto de actina, así como otros posibles mecanismos implicados.

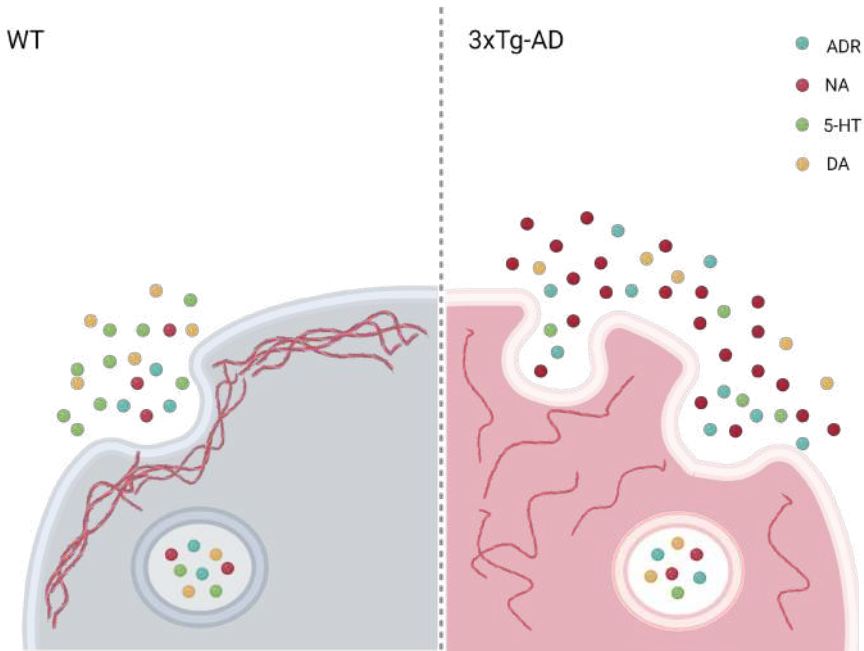


Figura 59. Representación esquemática de los cambios en el citoesqueleto de actina y su implicación en la exocitosis Creado con Biorender.com

Alteraciones en la modulación de la exocitosis por ATP

Como hemos mencionado en numerosas ocasiones, el calcio tiene un papel fundamental en la señalización celular, y es esencial para que se pueda llevar a cabo el proceso de exocitosis. La entrada de calcio al interior de la célula está modulada por diversos mecanismos, como se explica en la introducción, y uno de ellos es a través de receptores purinérgicos acoplados a proteínas G. En trabajos previos, ya se había descrito que el ATP, así como otros neurotransmisores y moduladores que se co-almacenan aminoras en los gránulos cromafines y se liberan junto con las catecolaminas durante el proceso de exocitosis, ejercen una modulación de tipo autocrino-paracrino, dependiente de voltaje, de los CCDV en CC aisladas (Gandia *et al.*, 1993; Albillos *et al.*, 1996a; García *et al.*, 2006). Este mecanismo, que está mediado por proteínas G y supone un enlentecimiento en la cinética de apertura de los CCDV, se puede revertir mediante la aplicación de una fuerte despolarización o por la aplicación de despolarizaciones breves y repetidas a alta frecuencia, como ocurriría en una situación de estrés con el disparo de “trenes” de potenciales de acción a elevada frecuencia. Desde un punto de vista fisiológico, parece que esta regulación autocrino-paracrino de los CCDV podría estar actuando como mecanismo para regular la

cantidad de catecolaminas liberadas en condiciones de reposo. Sin embargo, cuando se produce una situación estresante ante la que el organismo necesita liberar una gran cantidad de catecolaminas, el aumento de la frecuencia de disparo de potenciales de acción eliminar esa inhibición parcial de la actividad de los CCDV, facilitando así bruscamente un aumento de la entrada de calcio en la célula y, por consiguiente, de la exocitosis de catecolaminas (García *et al.*, 2006; Carbone *et al.*, 2011).

Por otro lado, se ha descrito que esta regulación autocrino-paracrina se puede encontrar alterada en ciertos procesos patológicos, como ocurre en el feocromocitoma, un tumor que surge en las células cromafines y en los ganglios simpáticos y con capacidad de sintetizar y secretar catecolaminas (Amar *et al.*, 2005). Un estudio realizado en feocromocitoma humano (Hernández-Guijo *et al.*, 2000) describió que las células cromafines tumorales expresan CCDV de los subtipos L, N, y P/Q en densidad y proporciones similares a lo observado en células cromafines humanas no tumorales (Gandía *et al.*, 1998). Sin embargo, la modulación que ejercían el ATP y los opioides sobre las corrientes de calcio era muy distinta en estas células. De hecho, se ha visto la coexistencia de CCs normales y CCs patológicas, las cuales se escapan de la modulación autocrino-paracrina y, por tanto, producen señales de calcio anormales y una hipersecreción de catecolaminas.

Estas alteraciones en la modulación de la secreción de catecolaminas también se han visto en la hipertensión. En un estudio realizado en ratas hipertensas (SHR, por sus siglas en inglés, *spontaneous hypertensive rats*), se observó una mayor modulación de las corrientes de bario mediada por ATP, comparada con la observada en ratas controles (de Pascual *et al.*, 2013). Además, también se observó que las CCs de ratas SHR mostraban una menor densidad de CCDV tipo L, que se compensa con una mayor densidad de los canales tipo P/Q, lo cual es similar a lo que hemos encontrado nosotros que ocurre en los ratones 3xTg-AD de 12 m comparado con los controles (Figura 52).

El esperado aumento de liberación de catecolaminas bajo situaciones de estrés en la EA como consecuencia de la reversión de la modulación de los CCDV que hemos visto podría explicar algunos de los síntomas no cognitivos que se producen con esta enfermedad como hemos comentado previamente, debido al aumento en la liberación de ciertas catecolaminas, como la noradrenalina, implicada en comportamientos de agitación y agresión observada en muchos modelos de EA (Kosel *et al.*, 2020), así como en pacientes de la enfermedad (Herrmann *et al.*, 2004). Por otro lado, la mayor entrada de calcio a través de los canales podría estar contribuyendo a la citotoxicidad

y muerte celular por apoptosis que encontramos con la EA (Cascella y Cecchi, 2021). Del mismo modo, puede producirse una mayor entrada de calcio a la mitocondria, lo que como hemos visto, puede producir daños irreparables como la permeabilización de la membrana externa, por lo que se van a liberar al citosol distintos componentes mitocondriales, como el citocromo C y otros factores de apoptosis, lo que va a llevar en última instancia a la muerte celular (Goldstein *et al.*, 2000)

Para tratar de profundizar e identificar el mecanismo implicado en este aumento de la modulación observada en los ratones 3xTg-AD de 12 m, decidimos estudiar los dos elementos principales implicados en la modulación por ATP, es decir, los receptores purinérgicos y los CCDV.

En primer lugar, estudiamos por rt-qPCR los niveles de ARNm de los distintos receptores purinérgicos P2X y P2Y (Figura 40), ya que está descrito que en la modulación de la liberación de catecolaminas mediado por ATP están implicados los receptores P2Y (Gandia *et al.*, 1993). Así, observamos que con la EA aumentan de manera muy significativa los niveles de ARNm del receptor P2Y13 comparados con los encontrados en los ratones WT en médula adrenal. Desafortunadamente, no existe ningún agonista o antagonista farmacológicamente selectivo para estos receptores lo que hace imposible su caracterización más específica mediante el uso de herramientas farmacológicas. Cabe destacar, además, que los niveles de ARNm de este receptor se encuentran también elevados a nivel central, en hipocampo (Figura 41). Se ha descrito que el receptor P2Y13 presenta una actividad citoprotectora mediada por un aumento de la actividad de la hemo-oxigenasa y por el aumento del factor de transcripción Nrf2, que previene la muerte neuronal producida por estrés oxidativo (Espada *et al.*, 2010; Cieślak y Wojtczak, 2018). Por ello, este aumento en los niveles de ARNm del receptor P2Y13 podría interpretarse como un mecanismo compensatorio y en un intento de neuroprotección durante el desarrollo de la EA (Pérez-Sen *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha visto que el receptor P2Y4, que nosotros hemos encontrado aumentado en médula adrenal, podría tener un papel importante en la modulación de la microglía (Mufti *et al.*, 2020), por lo que se ha propuesto como una interesante posible diana farmacológica. Sin embargo, es muy poco lo que se conoce aún de estos receptores, pero los datos apuntan a que merece la pena continuar su estudio e implicación en las distintas enfermedades neurodegenerativas.

En lo relativo a posibles modificaciones en la expresión de los distintos subtipos de CCDV con el desarrollo de la EA en los ratones 3xTg-AD, encontramos que, así como se producía una disminución en la actividad de los CCDV subtipo L, los niveles

de ARNm de este canal, así como de expresión medida por inmunofluorescencia también son menores (Figuras 50 y 51), y esto se compensa con un aumento de la actividad y expresión de los CCDV tipo P/Q (Figura 60). Cabe destacar, además, que la modulación por ATP y otros neurotransmisores afecta a los CCDV tipo no L, y, mayormente, a los P/Q (Albillos *et al.*, 1996a; A; García *et al.*, 2006), lo que está en concordancia con la mayor modulación por ATP que hemos observado en los ratones 3xTg-AD de 12 m. Como hemos comentado, cambios similares en lo relativo a la expresión y funcionalidad de los distintos subtipos de CCDV se ha observado previamente en otras patologías, como la hipertensión (de Pascual *et al.*, 2013), donde se han observado también alteraciones en la regulación del eje simpato-adrenomedular.

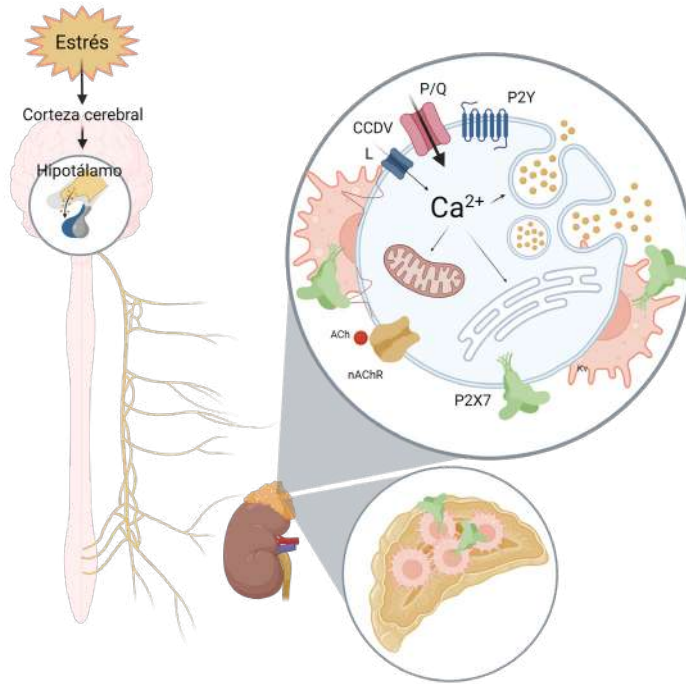


Figura 60. Esquema resumen de cómo la enfermedad de Alzheimer estaría afectando al eje simpatoadrenal en nuestro modelo. Creado con Biorender.com

Receptores purinérgicos, P2X7 y EA

Además de estudiar los receptores purinérgicos metabotrópicos P2Y y aunque los receptores purinérgicos P2X no parecen estar implicados en la modulación de los CCDV, decidimos caracterizar también posibles cambios en la expresión de estos receptores relacionados con la progresión de la EA. Así, encontramos que los ratones 3xTg-AD de 12 m presentaban mayores niveles de ARNm de los receptores P2X4 y P2X7 tanto a nivel de médula adrenal como en SNC (Figuras 40 y 41). Estos dos receptores están implicados en la inflamación, modulando la microglía hacia un estado proinflamatorio, y se han visto que su expresión está aumentada en distintas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Illes *et al.*, 2020), por lo que han sido propuestos como potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de las mismas. Así, decidimos estudiar el receptor P2X7 en nuestro modelo, tanto a nivel de médula adrenal como en el SNC.

En primer lugar, en médula adrenal vimos, tanto mediante técnicas de inmunofluorescencia como mediante western blot, que la expresión del receptor P2X7 se encontraba incrementada en los ratones 3xTg-AD de 12 m con respecto a los animales WT. Quisimos comprobar entonces en qué células de la médula se estaba expresando, para lo cual marcamos las células cromafines con anticuerpo anti-DBH, enzima encargada de metabolizar la dopamina y que se encuentra en las vesículas adrenales. Así, vimos que el receptor P2X7 se expresa tanto en células cromafines como en macrófagos, aunque en estos últimos en una mayor proporción (Figura 44). Por otro, también observamos que, tanto con el envejecimiento “fisiológico” como con la EA, aumentan los niveles de expresión de DBH. Al ser esta enzima la encargada de metabolizar la dopamina a noradrenalina, este hallazgo concuerda con que se hayan encontrado mayores niveles de NA a nivel plasmático con la patología.

Por otro lado, también vimos una mayor expresión de Iba 1, una proteína que se sobreexpresa con la inflamación. Por tanto, podemos decir que el envejecimiento, pero sobre todo el desarrollo de la EA, van acompañados de un aumento de la inflamación, no sólo a nivel central, sino que ésta también es patente a nivel periférico.

Si nos vamos a nivel central, también hemos encontrado mayores niveles de expresión de P2X7 en las 3 zonas del hipocampo estudiadas: Giro dentado (GD), CA1 y CA3 (Figura 45). Esto se corresponde con lo observado en cerebros de pacientes, en los que se ha visto que este receptor se encuentra aumentado, y, además, que su expresión se encontraba relacionada con la formación de placas de A β (Martin *et al.*, 2019). Este receptor, además, está implicado en la neuroinflamación, de tal

manera que es altamente probable que este aumento en la expresión del mismo esté favoreciendo aún más el mantenimiento del estado inflamatorio con la enfermedad. Cuando el receptor P2X7 se activa, se va a producir la liberación de interleucinas y citocinas proinflamatorias vía caspasa 1 (Adinolfi *et al.*, 2018). En pacientes de EA, este receptor también ha sido estudiado, y se ha visto que se encontraba aumentado en la glía de pacientes con respecto a los controles sanos (McLarnon *et al.*, 2006).

Existe actualmente una gran controversia sobre dónde se expresa este receptor en las células del SNC, ya que si bien es claro y está ampliamente descrito que se expresa y es funcional en las células de glía, no ocurre lo mismo en las neuronas, donde mientras algunos autores apoyan su expresión y funcionalidad, otros no lo tienen tan claro (Miras-Portugal *et al.*, 2017). Por esto, quisimos explorar en nuestro modelo, en qué células se estaba expresando el receptor, para lo cual realizamos estudios de colocalización de P2X7 con neuronas y glía, usando para ello marcadores específicos de estas células en SNC como son MAP2 e Iba1. Nosotros vimos que, en hipocampo, tanto en ratones WT como 3xTg-AD de 12 m, el receptor P2X7 se encontraba en ambos tipos celulares, neuronas y glía (Figura 47). Sin embargo, cabe destacar que esta colocalización era mayor con las células de glía que con las neuronas. Podemos decir, por tanto, que en nuestro modelo este receptor se está expresando en ambos tipos celulares del SNC, aunque sería interesante realizar estudios de actividad para estudiar su funcionalidad.

Cuando realizamos estos estudios de inmunofluorescencia, quisimos comprobar si en nuestro modelo existía este estado de hipergliosis que se ha descrito en otros modelos de la EA (Bates *et al.*, 2002). En nuestro caso, observamos que en los ratones 3xTg-AD de 12 m había un aumento en la expresión de Iba1, y, por tanto, de glía activada, en las 3 zonas del hipocampo estudiadas (Figura 48).

Hay autores que también han descrito que la expresión de P2X7 se encontraba asociada a placas de A β en modelos murinos de la enfermedad, como el Tg2476 y APP/PS1 (Lee, H. G. *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2019; Martin *et al.*, 2019), por lo que nos preguntamos si en nuestro modelo ocurría lo mismo. Así, estudiamos la expresión del receptor P2X7 alrededor de los depósitos de A β , en zonas de exactamente el mismo tamaño, y lo comparamos con la expresión en la misma rodaja en zonas sin A β en cerebro de ratones 3xTg-AD de 12 m. Lo que vimos fue que, a diferencia de lo anteriormente descrito por otros autores, en ninguna de las zonas estudiadas encontrábamos niveles superiores de expresión de P2X7 alrededor de las placas de A β cuando lo comparábamos con zonas sin A β , lo que nos inclina a pensar

que no existiría una relación directa entre las placas de A β y la expresión de este receptor en las zonas adyacentes.

Aun así, es indudable que la expresión del receptor en el cerebro de los animales 3xTg-AD es mayor que en los controles, y por tanto deberíamos verlo como una posible diana farmacológica para tratar la enfermedad. De hecho, síntomas no cognitivos que se presentan en la EA parecen estar mediados por este receptor, y diversos estudios indican que podría tener un papel esencial en la regulación del estrés, como la sufrida por los pacientes a lo largo del desarrollo de la enfermedad. En un estudio que utilizó ratas a las que se expuso durante 3 semanas a estrés crónico y se trataron con agonistas o con antagonistas del receptor P2X7 evaluando sus comportamientos de estrés y ansiedad (Yue, N. *et al.*, 2017), se observó que los antagonistas del receptor P2X7, como el Brilliant Blue (BBG), prevenían los síntomas de depresión o ansiedad que mostraban los ratones sometidos a estrés, en comparación con los animales que no habían sido tratados. Sin embargo, el tratamiento crónico con agonistas, como el ATP o el BzATP, podrían inducir comportamientos depresivos. De hecho, experimentos similares han sido realizados por Zhao y colaboradores (Zhao *et al.*, 2022) en ratones, y han mostrado la importancia del receptor P2X7 en los comportamientos depresivos, así como la participación de la microglía y los astrocitos. Por otro lado, la administración del antagonista BBG en ratas inyectadas con A β en el hipocampo, mostró efectos neuroprotectores y antiinflamatorios (Ryu y McLarnon, 2008). Además, redujo los niveles de expresión de P2X7, atenuó la gliosis y disminuyó la fragilidad y fugas de la barrera hematoencefálica.

Una vez visto, en nuestro modelo de EA, este aumento en la expresión de P2X7, tanto a nivel central como periférico, quisimos profundizar aún más en el estudio de este receptor en la EA, pero ahora desde un punto de vista más funcional. Para ello, trabajamos con el modelo APP/PS1. Estos experimentos se llevaron a cabo en el *Centre for Neuroscience and Cell Biology*, asociado a la Universidad de Coimbra.

En primer lugar, y a la vista de los resultados obtenidos de que el receptor P2X7 estaba expresado en neuronas, decidimos realizar un cultivo primario de neuronas para comprobar la funcionalidad del mismo, tratando de aportar así un poco de luz a la controversia existente en este tema. Así, estimulamos las neuronas de hipocampo con un agonista para el receptor P2X7, el BzATP, y registramos la señal de entrada de calcio al interior celular. Tras la estimulación con este agonista vimos que, tanto en neuronas aisladas de animales controles como de animales APP/PS1, no se producía una entrada de calcio al interior celular. Sin embargo, al dar un estímulo

con Oligomicina/FCCP, para comprobar que las células eran funcionales y estaban vivas, sí se observaba un aumento en la señal de calcio. En base a estos resultados podemos decir que nosotros, aunque sí que hemos encontramos expresión del receptor P2X7 en neuronas, no vimos que estos fueran funcionales en las mismas. Esto contradice a los resultados observados por Díaz-Hernández y colaboradores en 2008, que sí encontraron actividad de P2X7 con Bz-ATP en un cultivo primario de neuronas primarias, donde vieron además que la inactivación del P2X7 facilita el crecimiento del axón (Díaz-Hernandez *et al.*, 2008). Esto quizá pueda deberse a que ellos utilizaron un cultivo puro de neuronas, sembradas a baja densidad, para realizar experimentos en célula única, mientras nosotros sembramos las células de manera confluyente, y realizamos los experimentos de medida de calcio en el conjunto de la población de neuronas. Por otro lado, años más tarde, estos resultados no pudieron ser reproducidos utilizando neuronas hipocampales de rata (Rubini *et al.*, 2014). Por otro lado, es posible que existan diferentes subtipos de receptor P2X7, con distinta funcionalidad (Illes *et al.*, 2017).

En cualquier caso, es necesario profundizar más en este tema y realizar un estudio escrupuloso de la funcionalidad del receptor P2X7 en neuronas. Ahora, con el desarrollo de nuevos modelos genéticos KO para el receptor P2X7, así como ratones que expresan en receptor P2X7 junto con el marcador EGFP, este estudio resultará más sencillo, y no tardaremos en tener más información sobre esta compleja cuestión.

En nuestro caso, tras ver que no obteníamos respuesta en neuronas, decidimos continuar trabajando con astrocitos, y tras caracterizar el cultivo de los mismos y obtener una pureza del 85-95%, hicimos experimentos de medida de entrada de calcio a través del receptor, así como un estudio preliminar sobre la gestión del calcio por la mitocondria, y las proteínas mitocondriales implicadas en la unión al RE, y en la fusión mitocondrial.

Observamos que, tras estimular los astrocitos con BzATP, se producía la entrada de calcio en ambas cepas, tanto WT como APP/PS1. Sin embargo, esta entrada era mucho mayor en los astrocitos de los ratones transgénicos. Cuando incubamos con el antagonista específico JNJ-47965567 durante 10 minutos antes de realizar el experimento, vimos que la señal quedaba considerablemente disminuida. El remanente observado en la señal pueda deberse, quizá, a que el Bz-ATP esté estimulando a otros receptores P2X, como puede ser el P2X4.

El papel del P2X7 en las enfermedades neurodegenerativas es aún controvertido, puesto que, aunque su papel en la inflamación es claro, también se ha visto que

contribuye a la vía no amiloidogénica del procesamiento de APP a través de la α -secretasa, favoreciendo así la liberación del ectodominio soluble de APP, que parece tener un papel neuroprotector, en lugar de los acúmulos insolubles de A β . Esto se vio utilizando cultivos primarios de astrocitos de ratón, y células de neuroblastoma humano (Delarasse *et al.*, 2011). Sin embargo, puesto que la administración in vivo de antagonistas para P2X7 ha mostrado un retraso en la aparición de los síntomas de la enfermedad, así como los depósitos de placas de A β (Diaz-Hernandez *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2015), es posible que el papel del P2X7 en astrocitos y microglía sea diferente, pero más dominante el papel del P2X7 microglial.

Posteriormente, quisimos ver si el receptor P2X7 estaba induciendo la entrada de Ca²⁺ en la mitocondria, y observamos que efectivamente, tras estimular con BzATP, las señales de Ca²⁺ mitocondriales aumentaban, aunque no encontramos diferencias entre los animales WT y transgénicos. Sería interesante, por tanto, estudiar qué acontece con el Ca²⁺ del RE, la otra organela implicada en el tamponamiento celular de este ión (García *et al.*, 2006).

Debido a la estrecha relación que existe entre la mitocondria y el RE, mediante las MAMs o “membranas de asociación mitocondria-RE”, decidimos estudiar si estas proteínas se encontraban alteradas en la EA. Para ello, estudiamos mediante Western Blot la expresión del receptor de IP3, de Sigma1 y de VDAC1 (Figura 59). En ninguno de los tres casos, encontramos diferencias en la expresión de estas proteínas en astrocitos aislados de ratones WT y APP/PS1. Esto nos hace pensar que, si bien la funcionalidad de las MAMs puede encontrarse alterada con la progresión de la EA (Area-Gomez y Schon, 2016), esto no se ve reflejado en un aumento de las proteínas que participan en las mismas, al menos, en nuestro modelo de estudio.

Por último, quisimos estudiar las proteínas mitocondriales implicadas en la dinámica mitocondrial. Como hemos visto, la mitocondria tiene un papel fundamental en la homeostasis del calcio, así como siendo la máquina de energía de las células por excelencia y sin las cuales las células no podrían sobrevivir. Para el correcto funcionamiento de la mitocondria, es fundamental un correcto funcionamiento de su dinámica, que incluye movimientos de fusión, fisión y transporte, para colocarse donde son necesarias en cada momento determinado (Flannery y Trushina, 2019). Aunque la mayoría de estudios apuntan a que durante la EA se produce una disminución en la expresión de las proteínas de fusión mitocondrial OPA1 y las mitofusinas 1 y 2 (Mfn1 y 2) (Wang, Xinglong *et al.*, 2008; Flannery y Trushina, 2019), también hay autores que han encontrado mitocondrias

más grandes con la progresión de la enfermedad, lo que estaría dificultando su funcionamiento, así como su transporte en el axón (Zhu *et al.*, 2013). Por otro lado, estudios realizados con fibroblastos de pacientes de EA esporádica mostraron que las mitocondrias se encontraban agrandadas y formando una densa red (Wang, Xinglong *et al.*, 2008).

Nosotros hemos encontrado que tanto los niveles de OPA1, como los de las mitofusinas 1 y 2 se encontraban aumentados en estas células en la EA (Figuras 58 y 63). Para completar esta información, sería necesario realizar estudios de microscopia para comprobar si efectivamente el aumento de estas proteínas está llevando a un aumento de fusión mitocondrial, o si por el contrario se produce un aumento de expresión como mecanismo compensatorio debida al aumento de fisión y fragmentación descrita en distintas enfermedades neurodegenerativas, entre ellas, la EA.

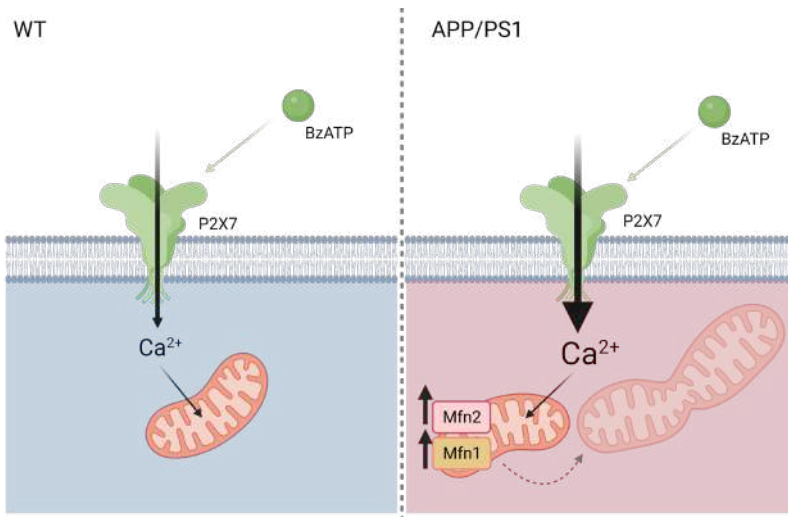


Figura 63. Esquema resumen de los principales resultados en astrocitos del modelo APP/PS1. Creado con Biorender.com.

En cualquier caso, y aunque aún sea necesaria una mayor investigación para poder considerar estas proteínas como una nueva diana farmacológica para la enfermedad, sí que parece claro que para el correcto funcionamiento de las células es necesario que el equilibrio fusión/fisión de las mitocondrias se encuentre finamente regulado, ya que la inclinación hacia cualquiera de los dos lados podría llevar al incorrecto funcionamiento de las mitocondrias y, por tanto, a la muerte celular.

Alteraciones en el eje simpatoadrenal con
el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

Conclusiones

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral ha sido caracterizar las alteraciones que se producen a nivel comportamental, así como en la liberación de catecolaminas y en la modulación de la entrada de calcio al interior celular con el envejecimiento “fisiológico” y con la progresión de la EA, usando para ello los modelos murinos 3xTg-AD y APP/PS1, así como sus correspondientes controles.

Las principales conclusiones que podemos extraer de los datos obtenidos en este estudio experimental son las siguientes:

1. En el modelo murino 3xTg-AD de enfermedad de Alzheimer se produce, ya a partir de los 6 meses, un deterioro cognitivo y alteraciones en los comportamientos de ansiedad y depresión.
2. El modelo 3xTg-AD de EA muestra las principales marcas histopatológicas de la enfermedad, las placas de A β y la proteína Tau hiperfosforilada en cerebro. En médula adrenal, sin embargo, no presenta depósitos de A β , aunque sí proteína Tau hiperfosforilada.
3. En el modelo 3xTg-AD de EA se produce un aumento en los niveles de noradrenalina, así como una disminución en los niveles de dopamina y serotonina, ya desde los 6 meses de edad.
4. En las células cromafines de los ratones 3xTg-AD se produce, ya desde los 6 meses, una desestructuración del citoesqueleto de actina. Además, en los 12 meses es muy clara la diferencia en la distribución, teniendo forma de anillo submembrana en los ratones controles y estando dispersa por el citoplasma en los ratones transgénicos.
5. Los ratones 3xTg-AD de 12 meses muestran una mayor sensibilidad a la modulación por ATP de la entrada de calcio a través de los CCDV, que puede deberse a un aumento de la expresión del receptor P2Y₁₃, y del subtipo de canal de calcio P/Q, así como a una disminución del L.
6. Los ratones 3xTg-AD de 12 meses muestra un aumento en la expresión del receptor P2X₇, tanto en médula adrenal como en el hipocampo. Además, este

receptor colocaliza en mayor medida con células del sistema inmune, como son los macrófagos en médula adrenal y la microglía en el SNC, aunque también con células cromafines en médula adrenal y con neuronas en el SNC.

7. Los ratones 3xTg-AD de 12 meses presentan un aumento en la expresión de Iba1, marcador de inflamación, tanto en SNC como en médula adrenal.

8. El modelo APP/PS1 presenta un aumento en la entrada de calcio en los astrocitos a través del receptor P2X7 con respecto a los controles. Este calcio, además, se moviliza hacia la mitocondria.

9. Existe un aumento en las proteínas de fusión mitocondrial OPA1, mitofusina 1 y mitofusina 2 en los astrocitos del modelo APP/PS1 con respecto a los ratones controles.

Estos hallazgos, en su conjunto, sugieren que, a medida que la enfermedad de Alzheimer se instaura y progresa en los ratones 3xTg-AD, se producen alteraciones a nivel de modulación de los canales de calcio, lo cual lleva ineludiblemente a una alteración en la secreción de catecolaminas, que se va a ver reflejada en síntomas cognitivos y no cognitivos de la enfermedad.

Las alteraciones vistas a nivel de célula cromafín se corresponden con lo que se observa a nivel central, lo que sugiere que la célula cromafín adrenomedular puede constituir un buen modelo para el estudio de esta compleja enfermedad.

Todas estas alteraciones observadas van a afectar al eje simpatoadrenal, y van a tener una repercusión en el comportamiento del organismo y cómo el mismo responde a situaciones de estrés.

Conclusions

The main objective of this Doctoral Thesis has been to characterise the alterations that occur at the behavioural level, as well as in the release of catecholamines and in the modulation of calcium entry into the cellular interior with “physiological” ageing and with the progression of AD, using the murine models 3xTg-AD and APP/PS1, as well as their corresponding controls.

The main conclusions that can be drawn from the data obtained in this experimental study are the following:

1. In the 3xTg-AD murine model of Alzheimer’s disease, cognitive impairment and alterations in anxiety and depressive behaviour are produced from 6 months onwards.

2. The 3xTg-AD model of AD shows the main histopathological hallmarks of the disease, namely disease, the A β plaques and hyperphosphorylated Tau protein in the brain. In the adrenal medulla, however, it does not show deposits of A β , although it does have hyperphosphorylated Tau protein.

3. In the 3xTg-AD model of AD, there is an increase in noradrenaline levels, as well as a decrease in dopamine and serotonin levels, as early as 6 months of age.

4. In the chromaffin cells of 3xTg-AD mice, a destructuring of the actin cytoskeleton occurs as early as 6 months of age. In addition, at 12 months of age, the difference in distribution is very clear, having the shape of a submembrane ring in the control mice and being dispersed throughout the cytoplasm in the transgenic mice.

5. The 12-month-old 3xTg-AD mice show an increased sensitivity to ATP modulation of calcium entry through VDCCs, which may be due to an increased expression of the P2Y₁₃ receptor, and of the P/Q calcium channel subtype, as well as a decrease in L.

6. The 12-month-old 3xTg-AD mice show increased expression of the P2X₇ receptor in both adrenal medulla and hippocampus. Furthermore, this receptor colocalises to a greater extent with cells of the immune system, such as macrophages

in the adrenal medulla and microglia in the CNS, but also with chromaffin cells in the adrenal medulla and with neurons in the CNS.

7. The 3xTg mice-AD mice aged 12 months show an increase in the expression of Iba1, marker of inflammation marker, both in the CNS and adrenal medulla.

8. The APP/PS1 model shows an increase in calcium entry into astrocytes via the P2X7 receptor compared to controls. This calcium is also mobilised to the mitochondria.

9. There is an increase in the mitochondrial fusion proteins OPA1, mitofusin 1 and mitofusin 2 in astrocytes of the APP/PS1 model compared to control mice.

Taken together, these findings suggest that, as Alzheimer's disease develops and progresses in the 3xTg - AD mice, alterations occur at the modulation of calcium channels, which inevitably leads to an alteration in the secretion of catecholamines, which will be reflected in cognitive and non-cognitive symptoms of the disease.

The alterations seen at the level of the chromaffin cell correspond to what is observed at the central level. This suggests that the adrenomedullary chromaffin cell may constitute a good model for the study of this complex disease.

All these observed alterations will affect the sympathoadrenal axis, and will have an impact on the body's behaviour and how it responds to stressful situations.

Bibliografía

*No hay peor agonía que llevar con nosotros
una historia que no ha sido contada.*

Maya Angelou.

Alteraciones en el eje simpatoadrenal con
el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

Bibliografía

- (2016). A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled; Phase 1b, Safety, Tolerability, and Pharmacokinetic Study of Multiple Ascending Doses of GC021109 in Subjects With Mild to Moderate Alzheimer's Disease. (February 1,) [consulta: Jan 27, 2022]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02386306>.
- (2021). *El mundo no está abordando el reto de la demencia*. 2 de septiembre de, Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/02-09-2021-world-failing-to-address-dementia-challenge> [consulta: 29/12/2021].
- (2022). *Alzforum*. Disponible en: <https://www.alzforum.org/research-models/alzheimers-disease> [consulta: 03/01/2022].
- Adinolfi, E., Giuliani, A.L., De Marchi, E., Pegoraro, A., Orioli, E. y Di Virgilio, F. (2018). The P2X7 receptor: A main player in inflammation. *Biochemical Pharmacology*, 151: 234-244. doi: 10.1016/j.bcp.2017.12.021.
- Albillos, A., Carbone, E., Gandia, L., Garcia, A.G. y Polio, A. (1996). Opioid inhibition of Ca₂ channel subtypes in bovine chromaffin cells: selectivity of action and voltage-dependence. *European Journal of Neuroscience*, 8(8): 1561-1570.
- Albillos, A., Gandia, L., Michelena, P., Gilabert, J., del Valle, M., Carbone, E. y García, A.G. (1996). The mechanism of calcium channel facilitation in bovine chromaffin cells. *The Journal of Physiology*, 494(3): 687-695.
- Aloe, L. y Levi-Montalcini, R. (1979). Nerve growth factor-induced transformation of immature chromaffin cells in vivo into sympathetic neurons: effect of antiserum to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(3): 1246-1250.
- Alonso, M.T., Barrero, M.J., Michelena, P., Carnicero, E., Cuchillo, I., García, A.G., García-Sancho, J., Montero, M. y Alvarez, J. (1999). Ca²⁺-induced Ca²⁺ Release in Chromaffin Cells Seen from inside the ER with Targeted Aequorin. *Journal of Cell Biology*, 144(2): 241-254. doi: 10.1083/jcb.144.2.241.
- Álvarez, Y.D., Belingheri, A.V., Perez Bay, A.E., Jarvis, S.E., Tedford, H.W., Zamponi, G. y Marengo, F.D. (2013). The immediately releasable pool of mouse chromaffin cell vesicles is coupled to P/Q-type calcium channels via the synaptic protein interaction site. *PloS One*, 8(1): e54846. doi: 10.1371/journal.pone.0054846.
- Alzheimer, A., Stelzmann, R.A., Schnitzlein, H.N. y Murtagh, F.R. (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". *Clinical Anatomy (New York, N.Y.)*, 8(6): 429-431. doi: 10.1002/ca.980080612.

- Amar, L., Servais, A., Gimenez-Roqueplo, A., Zinzindohoue, F., Chatellier, G. y Plouin, P. (2005). Year of diagnosis, features at presentation, and risk of recurrence in patients with pheochromocytoma or secreting paraganglioma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(4): 2110-2116.
- Area-Gomez, E. y Schon, E.A. (2016). Mitochondria-associated ER membranes and Alzheimer Disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 38: 90-96. doi: 10.1016/j.gde.2016.04.006.
- Arendash, G.W., King, D.L., Gordon, M.N., Morgan, D., Hatcher, J.M., Hope, C.E. y Diamond, D.M. (2001). Progressive, age-related behavioral impairments in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenes. *Brain Research*, 891(1-2): 42-53. doi: 10.1016/s0006-8993(00)03186-3.
- Arispe, N., Rojas, E. y Pollard, H.B. (1993). Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(2): 567-571.
- Arribas-Blázquez, M., Olivos-Oré, L.A., Barahona, M.V., Sánchez de la Muela, Mercedes, Solar, V., Jiménez, E., Gualix, J., McIntosh, J.M., Ferrer-Montiel, A. y Miras-Portugal, M.T. (2019). Overexpression of P2X3 and P2X7 receptors and TRPV1 channels in adrenomedullary chromaffin cells in a rat model of neuropathic pain. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1): 155.
- Artalejo, C.R., Garcia, A.G. y Aunis, D. (1987). Chromaffin cell calcium channel kinetics measured isotopically through fast calcium, strontium, and barium fluxes. *Journal of Biological Chemistry*, 262(2): 915-926.
- Atamna, H. y Frey, W.H. (2007). Mechanisms of mitochondrial dysfunction and energy deficiency in Alzheimer's disease. *Mitochondrion*, 7(5): 297-310. doi: 10.1016/j.mito.2007.06.001.
- Aunis, D. (1998). Exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *International Review of Cytology*, 181: 213-320.
- Bagyinszky, E., Giau, V.V., Shim, K., Suk, K., An, S.S.A. y Kim, S. (2017). Role of inflammatory molecules in the Alzheimer's disease progression and diagnosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 376: 242-254. doi: 10.1016/j.jns.2017.03.031.
- Bates, K.A., Fonte, J., Robertson, T.A., Martins, R.N. y Harvey, A.R. (2002). Chronic gliosis triggers Alzheimer's disease-like processing of amyloid precursor protein. *Neuroscience*, 113(4): 785-796. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00230-0.
- Beamer, E., Göloncsér, F., Horváth, G., Bekő, K., Otrókoci, L., Koványi, B. y Sperlágh, B. (2016). Purinergic mechanisms in neuroinflammation: an update from molecules to behavior. *Neuropharmacology*, 104: 94-104.

- Bello-Arroyo, E., Roque, H., Marcos, A., Orihuel, J., Higuera-Matas, A., Desco, M., Caiola, V.R., Ambrosio, E., Lara-Pezzi, E. y Gómez-Gaviro, M.V. (2018). MouBeAT: A New and Open Toolbox for Guided Analysis of Behavioral Tests in Mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 0 doi: 10.3389/fnbeh.2018.00201.
- Berridge, M.J. (2010). Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 459(3): 441-449. doi: 10.1007/s00424-009-0736-1.
- Bertolino, M. y Llinás, R.R. (1992). The central role of voltage-activated and receptor-operated calcium channels in neuronal cells. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 32: 399-421. doi: 10.1146/annurev.pa.32.040192.002151.
- Bezprozvanny, I. y Mattson, M.P. (2008). Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences*, 31(9): 454-463. doi: 10.1016/j.tins.2008.06.005.
- Billings, L.M., Oddo, S., Green, K.N., McGaugh, J.L. y LaFerla, F.M. (2005). Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*, 45(5): 675-688. doi: 10.1016/j.neuron.2005.01.040.
- Bomfim, G.H.S., Méndez-López, I., Fernández-Morales, J.C., Padín, J.F., Jurkiewicz, A., Jurkiewicz, N.H. y García, A.G. (2017). Electrophysiological properties and augmented catecholamine release from chromaffin cells of WKY and SHR rats contributing to the hypertension development elicited by chronic EtOH consumption. *European Journal of Pharmacology*, 803: 65-77.
- Borges, R., Borges, R., Gandía, L., Gandía, L., Carbone, E. y Carbone, E. (2018). Old and emerging concepts on adrenal chromaffin cell stimulus-secretion coupling. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 470(1): 1-6. doi: 10.1007/s00424-017-2082-z.
- Bornstein, S.r., Ehrhart-Bornstein, M., Levi-Montalcini, R., Androutsellis-Theotokis, A., Eisenhofer, G., Vukicevic, V., Licinio, J., Wong, M.L., Calissano, P., Nistico, G. Y Preziosi, P. (2012). Chromaffin cells: the peripheral brain. *Molecular Psychiatry*, 17(4): 354-358. doi: 10.1038/mp.2011.176.
- Botana, L.M. (2014). *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*. Crc Press, .
- Bowen, D.M., Smith, C.B., White, P. y Davison, A.N. (1976). Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain: A Journal of Neurology*, 99(3): 459-496. doi: 10.1093/brain/99.3.459.
- Braak, E., Griffing, K., Arai, K., Bohl, J., Bratzke, H. y Braak, H. (1999). Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since A. Alzheimer?. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 249 Suppl 3: 14-22. doi: 10.1007/pl00014168.

- Braak, H. y Braak, E. (1996). Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica. Supplementum*, 165: 3-12. doi: 10.1111/j.1600-0404.1996.tb05866.x.
- Brehm, P. y Eckert, R. (1978). Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in Paramecium. *Science*, 202(4373): 1203-1206.
- Breijyeh, Z. y Karaman, R. (2020). Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(24): 5789. doi: 10.3390/molecules25245789.
- Brodaty, H., Breteler, M.M.B., Dekosky, S.T., Dorenlot, P., Fratiglioni, L., Hock, C., Kenigsberg, P., Scheltens, P. y De Strooper, B. (2011). The world of dementia beyond 2020. *Journal of the American Geriatrics Society*, 59(5): 923-927. doi: 10.1111/j.1532-5415.2011.03365.x.
- Bryan, K.J. (2009). Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: Behavioral Testing and Considerations. En: Buccafusco, J.J. (Ed.), *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd ed. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL).
- Buée, L., Hof, P.R., Bouras, C., Delacourte, A., Perl, D.P., Morrison, J.H. y Fillit, H.M. (1994). Pathological alterations of the cerebral microvasculature in Alzheimer's disease and related dementing disorders. *Acta Neuropathologica*, 87(5): 469-480. doi: 10.1007/BF00294173.
- Burgoyne, R.D. (1995). Mechanisms of catecholamine secretion from chromaffin cells. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 46(3).
- Burgoyne, R.D., Geisow, M.J., Barron, J. y Gray, E.G. (1982). Dissection of stages in exocytosis in the adrenal chromaffin cell with use of trifluoperazine. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 216(1202): 111-115. doi: 10.1098/rspb.1982.0064.
- Burnstock, G., Campbell, G., Satchell, D. y Smythe, A. (1970). Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *British Journal of Pharmacology*, 40(4): 668-688.
- Burnstock, G. y Kennedy, C. (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor?. *General Pharmacology: The Vascular System*, 16(5): 433-440.
- Burnstock, G. (1980). Do some nerve cells release more than one transmitter?. *Commentaries in the Neurosciences*: 151-160.
- Calvo-Gallardo, E., Pascual, R.d., Fernández-Morales, J., Arranz-Tagarro, J., Maroto, M., Nanclares, C., Gandía, L., de Diego, A.M., Padín, J. y García, A.G. (2015). Depressed excitability and ion currents linked to slow exocytotic fusion pore in chromaffin cells of the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 308(1): C1-C19.

- Calzaferrri, F., Ruiz-Ruiz, C., de Diego, Antonio M. G., de Pascual, R., Méndez-López, I., Cano-Abad, M.F., Maneu, V., de Los Ríos, C., Gandía, L. y García, A.G. (2020). The purinergic P2X7 receptor as a potential drug target to combat neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Medicinal Research Reviews*, 40(6): 2427-2465. doi: 10.1002/med.21710.
- Calzaferrri, F., Narros-Fernández, P., de Pascual, R., de Diego, Antonio M. G., Nicke, A., Egea, J., García, A.G. y de Los Ríos, C. (2021). Synthesis and Pharmacological Evaluation of Novel Non-nucleotide Purine Derivatives as P2X7 Antagonists for the Treatment of Neuroinflammation. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(4): 2272-2290. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c02145.
- Cannon, W.B. (1932). *The Wisdom of the Body* WW Norton & Company. New York.
- Cao, X., Li, L., Wang, Q., Wu, Q., Hu, H., Zhang, M., Fang, Y., Zhang, J., Li, S., Xiong, W., Yan, H., Gao, Y., Liu, J., Li, X., Sun, L., Zeng, Y., Zhu, X. y Gao, T. (2013). Astrocyte-derived ATP modulates depressive-like behaviors. *Nature Medicine*, 19(6): 773-777. doi: 10.1038/nm.3162.
- Carbone, E., Borges, R., Eiden, L.E., García, A.G. y Hernández-Cruz, A. (2011). Chromaffin cells of the adrenal medulla: physiology, pharmacology, and disease. *Comprehensive Physiology*, 9(4): 1443-1502.
- Cascella, R. y Cecchi, C. (2021). Calcium Dyshomeostasis in Alzheimer's Disease Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9): 4914. doi: 10.3390/ijms22094914.
- Catterall, W.A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca² channels. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16(1): 521-555.
- Chakraborty, S., Lennon, J.C., Malkaram, S.A., Zeng, Y., Fisher, D.W. y Dong, H. (2019). Serotonergic system, cognition, and BPSD in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 704: 36-44. doi: 10.1016/j.neulet.2019.03.050.
- Chandley, M.J. y Ordway, G.A. (2012). Noradrenergic Dysfunction in Depression and Suicide. En: Dwivedi, Y. (Ed.), *The Neurobiological Basis of Suicide*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL).
- Chan-Palay, V. y Asan, E. (1989). Alterations in catecholamine neurons of the locus coeruleus in senile dementia of the Alzheimer type and in Parkinson's disease with and without dementia and depression. *Journal of Comparative Neurology*, 287(3): 373-392. doi: 10.1002/cne.902870308.
- Chiodo, L.A., Acheson, A.L., Zigmond, M.J. y Stricker, E.M. (1983). Subtotal destruction of central noradrenergic projections increases the firing rate of locus coeruleus cells. *Brain Research*, 264(1): 123-126.

- Chouliaras, L., Mastroeni, D., Delvaux, E., Grover, A., Kenis, G., Hof, P.R., Steinbusch, H.W.M., Coleman, P.D., Rutten, B.P.F. y van den Hove, Daniel L. A. (2013). Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Neurobiology of Aging*, 34(9): 2091-2099. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.02.021.
- Chung, J.A. y Cummings, J.L. (2000). Neurobehavioral and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: characteristics and treatment. *Neurologic Clinics*, 18(4): 829-846. doi: 10.1016/s0733-8619(05)70228-0.
- Cieślak, M. y Wojtczak, A. (2018). Role of purinergic receptors in the Alzheimer's disease. *Purinergic Signalling*, 14(4): 331-344.
- Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J.P. y Stojilkovic, S.S. (2011). Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacological Reviews*, 63(3): 641-683. doi: 10.1124/pr.110.003129.
- Cunha, R.A. y Ribeiro, J.A. (2000). ATP as a presynaptic modulator. *Life Sciences*, 68(2): 119-137. doi: 10.1016/s0024-3205(00)00923-1.
- Curtis, M.J., Alexander, S., Cirino, G., Docherty, J.R., George, C.H., Giembycz, M.A., Hoyer, D., Insel, P.A., Izzo, A.A., Ji, Y., MacEwan, D.J., Sobey, C.G., Stanford, S.C., Teixeira, M.M., Wonnacott, S. y Ahluwalia, A. (2018). Experimental design and analysis and their reporting II: updated and simplified guidance for authors and peer reviewers. *British Journal of Pharmacology*, 175(7): 987-993. doi: 10.1111/bph.14153.
- Davies, P. y Maloney, A.J. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, 2(8000): 1403. doi: 10.1016/s0140-6736(76)91936-x.
- de Diego, Antonio M. G., Llorio, S., Calvo-Gallardo, E. y García, A.G. (2012). Smaller quantal size and faster kinetics of single exocytotic events in chromaffin cells from the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 428(4): 482-486. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.082.
- de Diego, A.M., Ortega-Cruz, D. y García, A.G. (2020). Disruption of Exocytosis in Sympathoadrenal Chromaffin Cells from Mouse Models of Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6): 1946.
- De Matteis, M.A. y Luini, A. (2008). Exiting the Golgi complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(4): 273-284.
- de Pascual, R., Miranda-Ferreira, R., Galvão, K.M., Lameu, C., Ulrich, H., Smaili, S.S., Jurkiewicz, A., García, A.G. y Gandía, L. (2013). Lower density of L-type and higher density of P/Q-type of calcium channels in chromaffin cells of hypertensive, compared with normotensive rats. *European Journal of Pharmacology*, 706(1-3): 25-35. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.02.046.

- del Puerto, A., Díaz-Hernández, J., Tapia, M., Gomez-Villafuertes, R., Benitez, M.J., Zhang, J., Miras-Portugal, M.T., Wandosell, F., Díaz-Hernández, M. y Garrido, J.J. (2012). Adenylate cyclase 5 coordinates the action of ADP, P2Y1, P2Y13 and ATP-gated P2X7 receptors on axonal elongation. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 1): 176-188. doi: 10.1242/jcs.091736.
- Delarasse, C., Auger, R., Gonnord, P., Fontaine, B. y Kanellopoulos, J.M. (2011). The purinergic receptor P2X7 triggers alpha-secretase-dependent processing of the amyloid precursor protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(4): 2596-2606. doi: 10.1074/jbc.M110.200618.
- Delekaté, A., Füchtmeier, M., Schumacher, T., Ulbrich, C., Foddiss, M. y Petzold, G.C. (2014). Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model. *Nature Communications*, 5(1): 5422. doi: 10.1038/ncomms6422.
- Desnos, C., Schonn, J., Huet, S., Tran, V.S., El-Amraoui, A., Raposo, G., Fanget, I., Chapuis, C., Ménasché, G., de Saint Basile, G., Petit, C., Cribier, S., Henry, J. y Darchen, F. (2003). Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites. *Journal of Cell Biology*, 163(3): 559-570. doi: 10.1083/jcb.200302157.
- Di Virgilio, F. (2015). P2X receptors and inflammation. *Current Medicinal Chemistry*, 22(7): 866-877. doi: 10.2174/0929867322666141210155311.
- Díaz-Hernandez, J.I., Gomez-Villafuertes, R., León-Otegui, M., Hontecillas-Prieto, L., Del Puerto, A., Trejo, J.L., Lucas, J.J., Garrido, J.J., Gualix, J., Miras-Portugal, M.T. y Díaz-Hernandez, M. (2012). In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3 β and secretases. *Neurobiology of Aging*, 33(8): 1816-1828. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.09.040.
- Díaz-Hernandez, M., del Puerto, A., Díaz-Hernandez, J.I., Díez-Zaera, M., Lucas, J.J., Garrido, J.J. y Miras-Portugal, M.T. (2008). Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 22): 3717-3728. doi: 10.1242/jcs.034082.
- Diverse-Pierluissi, M., Dunlap, K. y Westhead, E.W. (1991). Multiple actions of extracellular ATP on calcium currents in cultured bovine chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(4): 1261-1265.
- Domingues, A., Almeida, S., da Cruz e Silva, E. F., Oliveira, C.R. y Rego, A.C. (2007). Toxicity of beta-amyloid in HEK293 cells expressing NR1/NR2A or NR1/NR2B N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *Neurochemistry International*, 50(6): 872-880. doi: 10.1016/j.neuint.2007.03.001.
- Douglas, W.W. (1968). Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *British Journal of Pharmacology*, 34(3): 453-474.

- Dubois, B., Hampel, H., Feldman, H.H., Scheltens, P., Aisen, P., Andrieu, S., Bakardjian, H., Benali, H., Bertram, L., Blennow, K., Broich, K., Cavedo, E., Crutch, S., Dartigues, J., Duyckaerts, C., Epelbaum, S., Frisoni, G.B., Gauthier, S., Genthon, R., Gouw, A.A., Habert, M., Holtzman, D.M., Kivipelto, M., Lista, S., Molinuevo, J., O'Bryant, S.E., Rabinovici, G.D., Rowe, C., Salloway, S., Schneider, L.S., Sperling, R., Teichmann, M., Carrillo, M.C., Cummings, J. y Jack, C.R. (2016). Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 12(3): 292-323. doi: 10.1016/j.jalz.2016.02.002.
- Eckert, R. y Chad, J.E. (1984). Inactivation of Ca channels. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 44(3): 215-267.
- Elrod, R., Peskind, E.R., DiGiacomo, L., Brodtkin, K.I., Veith, R.C. y Raskind, M.A. (1997). Effects of Alzheimer's disease severity on cerebrospinal fluid norepinephrine concentration. *The American Journal of Psychiatry*, 154(1): 25-30.
- Erb, L. y Weisman, G.A. (2012). Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, 1(6): 789-803.
- Espada, S., Ortega, F., Molina-Jijón, E., Rojo, A.I., Pérez-Sen, R., Pedraza-Chaverri, J., Miras-Portugal, M.T. y Cuadrado, A. (2010). The purinergic P2Y₁₃ receptor activates the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced neuronal death. *Free Radical Biology & Medicine*, 49(3): 416-426. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.031.
- Esquerda-Canals, G., Montoliu-Gaya, L., Güell-Bosch, J. y Villegas, S. (2017). Mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(4): 1171-1183.
- Evangelisti, E., Cascella, R., Becatti, M., Marrazza, G., Dobson, C.M., Chiti, F., Stefani, M. y Cecchi, C. (2016). Binding affinity of amyloid oligomers to cellular membranes is a generic indicator of cellular dysfunction in protein misfolding diseases. *Scientific Reports*, 6: 32721. doi: 10.1038/srep32721.
- F Tresguerres, J.A. (2005). Fisiología humana. En: *Fisiología humana*, pp. 1178.
- Feldberg, W., Minz, B. y Tsudzimura, H. (1934). The mechanism of the nervous discharge of adrenaline. *The Journal of Physiology*, 81(3): 286-304. doi: 10.1113/jphysiol.1934.sp003136.
- Ferreira, S.T. y Klein, W.L. (2011). The A β oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Learning and Memory*, 96(4): 529-543. doi: 10.1016/j.nlm.2011.08.003.
- Ferreiro, E., Oliveira, C.R. y Pereira, C. (2004). Involvement of endoplasmic reticulum Ca²⁺ release through ryanodine and inositol 1,4,5-triphosphate receptors in the neurotoxic effects induced by the amyloid-beta peptide. *Journal of Neuroscience Research*, 76(6): 872-880. doi: 10.1002/jnr.20135.

- Ferreiro, E., Oliveira, C.R. y Pereira, C.M.F. (2008). The release of calcium from the endoplasmic reticulum induced by amyloid-beta and prion peptides activates the mitochondrial apoptotic pathway. *Neurobiology of Disease*, 30(3): 331-342. doi: 10.1016/j.nbd.2008.02.003.
- Fidalgo, S., Ivanov, D.K. y Wood, S.H. (2013). Serotonin: from top to bottom. *Biogerontology*, 14(1): 21-45.
- Filali, M., Lalonde, R. y Rivest, S. (2011). Anomalies in social behaviors and exploratory activities in an APPswe/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Physiology & Behavior*, 104(5): 880-885. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.05.023.
- Flannery, P.J. y Trushina, E. (2019). Mitochondrial dynamics and transport in Alzheimer's disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 98: 109-120. doi: 10.1016/j.mcn.2019.06.009.
- Fox, A.P., Cahill, A.L., Currie, K., Grabner, C., Harkins, A.B., Herring, B., Hurley, J.H. y Xie, Z. (2008). N- and P/Q-type Ca₂ channels in adrenal chromaffin cells. *Acta Physiologica*, 192(2): 247-261.
- Francis, P.T., Palmer, A.M., Snape, M. y Wilcock, G.K. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 66(2): 137-147. doi: 10.1136/jnnp.66.2.137.
- Frost, B., Jacks, R.L. y Diamond, M.I. (2009). Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(19): 12845-12852. doi: 10.1074/jbc.M808759200.
- Gan, M., Moussaud, S., Jiang, P. y McLean, P.J. (2015). Extracellular ATP induces intracellular alpha-synuclein accumulation via P2X₁ receptor-mediated lysosomal dysfunction. *Neurobiology of Aging*, 36(2): 1209-1220.
- Gandía, L., García, A.G. y Morad, M. (1993). ATP modulation of calcium channels in chromaffin cells. *The Journal of Physiology*, 470(1): 55-72.
- Gandía, L., Mayorgas, I., Michelena, P., Cuchillo, I., de Pascual, R., Abad, F., Novalbos, J.M., Larrañaga, E. y García, A.G. (1998). Human adrenal chromaffin cell calcium channels: drastic current facilitation in cell clusters, but not in isolated cells. *Pflügers Archiv*, 436(5): 696-704.
- García, A.G., García-De-Diego, A.M., Gandía, L., Borges, R. y García-Sancho, J. (2006). Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiological Reviews*, 86(4): 1093-1131. doi: 10.1152/physrev.00039.2005.
- Gibson, G.E., Sheu, K.F., Blass, J.P., Baker, A., Carlson, K.C., Harding, B. y Perrino, P. (1988). Reduced activities of thiamine-dependent enzymes in the brains and peripheral tissues of patients with Alzheimer's disease. *Archives of Neurology*, 45(8): 836-840. doi: 10.1001/archneur.1988.00520320022009.

- Giner, D., Ñeco, P., Francés, M.d.M., López, I., Viniegra, S. y Gutiérrez, L.M. (2005). Real-time dynamics of the F-actin cytoskeleton during secretion from chromaffin cells. *Journal of Cell Science*, 118(13): 2871-2880. doi: 10.1242/jcs.02419.
- Giorgi, C., De Stefani, D., Bononi, A., Rizzuto, R. y Pinton, P. (2009). Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(10): 1817-1827. doi: 10.1016/j.biocel.2009.04.010.
- Giorgi, C., Agnoletto, C., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., Marchi, S., Missiroli, S., Patergnani, S., Poletti, F., Rimessi, A., Suski, J.M., Wieckowski, M.R. y Pinton, P. (2012). Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine. *Mitochondrion*, 12(1): 77-85. doi: 10.1016/j.mito.2011.07.004.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Cairns, N.J. y Crowther, R.A. (1992). Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron*, 8(1): 159-168. doi: 10.1016/0896-6273(92)90117-v.
- Goldstein, J.C., Waterhouse, N.J., Juin, P., Evan, G.I. y Green, D.R. (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nature Cell Biology*, 2(3): 156-162. doi: 10.1038/35004029.
- González-Jamett, A.M., Momboisse, F., Guerra, M.J., Ory, S., Báez-Matus, X., Barraza, N., Calco, V., Houy, S., Couve, E., Neely, A., Martínez, A.D., Gasman, S. y Cárdenas, A.M. (2013). Dynamin-2 Regulates Fusion Pore Expansion and Quantal Release through a Mechanism that Involves Actin Dynamics in Neuroendocrine Chromaffin Cells. *PLoS One*, 8(8): e70638. doi: 10.1371/journal.pone.0070638.
- Gordon, M.N., Holcomb, L.A., Jantzen, P.T., DiCarlo, G., Wilcock, D., Boyett, K.W., Connor, K., Melachrinou, J., O'Callaghan, J.P. y Morgan, D. (2002). Time course of the development of Alzheimer-like pathology in the doubly transgenic PS1+APP mouse. *Experimental Neurology*, 173(2): 183-195. doi: 10.1006/exnr.2001.7754.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M. y Binder, L.I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(13): 4913-4917. doi: 10.1073/pnas.83.13.4913.
- Guo, C., Masin, M., Qureshi, O.S. y Murrell-Lagnado, R.D. (2007). Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Molecular Pharmacology*, 72(6): 1447-1456. doi: 10.1124/mol.107.035980.
- Guo, S. y Lo, E.H. (2009). Dysfunctional cell-cell signaling in the neurovascular unit as a paradigm for central nervous system disease. *Stroke*, 40(3 Suppl): 4. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.534388.
- Gutnick, M.J., Lux, H.D., Swandulla, D. y Zucker, H. (1989). Voltage-dependent and calcium-dependent inactivation of calcium channel current in identified snail neurons. *The Journal of Physiology*, 412(1): 197-220.

- Habermacher, C., Dunning, K., Chataigneau, T. y Grutter, T. (2016). Molecular structure and function of P2X receptors. *Neuropharmacology*, 104: 18-30.
- Hagiwara, S. y Byerly, L. (1981). Calcium channel. *Annual Review of Neuroscience*, 4: 69-125. doi: 10.1146/annurev.ne.04.030181.000441.
- Hagiwara, S. y Naka, K. (1964). The initiation of spike potential in barnacle muscle fibers under low intracellular Ca. *The Journal of General Physiology*, 48(1): 141-162.
- Hall, C.S. (1934). Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, 18(3): 385.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. y Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv*, 391(2): 85-100.
- Hardy, J. y Allsop, D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12(10): 383-388. doi: 10.1016/0165-6147(91)90609-v.
- Hardy, J.A. y Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5054): 184-185. doi: 10.1126/science.1566067.
- Hébert, S.S., Horré, K., Nicolai, L., Papadopoulou, A.S., Mandemakers, W., Silaharoglu, A.N., Kauppinen, S., Delacourte, A. y De Strooper, B. (2008). Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(17): 6415-6420. doi: 10.1073/pnas.0710263105.
- Hernández-Guijo, J.M., de Pascual, R., García, A.G. y Gandía, L. (1998). Separation of calcium channel current components in mouse chromaffin cells superfused with low- and high-barium solutions. *Pflügers Archiv*, 436(1): 75-82.
- Hernández-Guijo, J.M., Gandía, L., Cuchillo-Ibáñez, I., Albillos, A., Novalbos, J., Gilsanz, F., Larrañaga, E., de Pascual, R., Abad, F. y García, A.G. (2000). Altered regulation of calcium channels and exocytosis in single human pheochromocytoma cells. *Pflügers Archiv*, 440(2): 253-263.
- Hernández-Guijo, J.M., Maneu-Flores, V.E., Ruiz-Nuño, A., Villarroya, M., García, A.G. y Gandía, L. (2001). Calcium-dependent inhibition of L, N, and P/Q Ca₂ channels in chromaffin cells: role of mitochondria. *Journal of Neuroscience*, 21(8): 2553-2560.
- Herrmann, N., Lanctôt, K.L. y Khan, L.R. (2004). The role of norepinephrine in the behavioral and psychological symptoms of dementia. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 16(3): 261-276.

- Hibell, A., Thompson, K., Simon, J., Xing, M., Humphrey, P. y Michel, A. (2001). Species- and agonist-dependent differences in the deactivation-kinetics of P2X7 receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 363(6): 639-648.
- Hillman, D., Chen, S., Aung, T.T., Cherksey, B., Sugimori, M. y Llinas, R.R. (1991). Localization of P-type calcium channels in the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(16): 7076-7080.
- Holcomb, L., Gordon, M.N., McGowan, E., Yu, X., Benkovic, S., Jantzen, P., Wright, K., Saad, I., Mueller, R., Morgan, D., Sanders, S., Zehr, C., O'Campo, K., Hardy, J., Prada, C.M., Eckman, C., Younkin, S., Hsiao, K. y Duff, K. (1998). Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nature Medicine*, 4(1): 97-100. doi: 10.1038/nm0198-097.
- Holcomb, L.A., Gordon, M.N., Jantzen, P., Hsiao, K., Duff, K. y Morgan, D. (1999). Behavioral changes in transgenic mice expressing both amyloid precursor protein and presenilin-1 mutations: lack of association with amyloid deposits. *Behavior Genetics*, 29(3): 177-185. doi: 10.1023/a:1021691918517.
- Hou, X., Parkington, H.C., Coleman, H.A., Mechler, A., Martin, L.L., Aguilar, M. y Small, D.H. (2007). Transthyretin oligomers induce calcium influx via voltage-gated calcium channels. *Journal of Neurochemistry*, 100(2): 446-457. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04210.x.
- Ikeda, S.R. (1996). Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein β γ subunits. *Nature*, 380(6571): 255-258.
- Illiff, J.J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B.A., Peng, W., Gundersen, G.A., Benveniste, H., Vates, G.E., Deane, R., Goldman, S.A., Nagelhus, E.A. y Nedergaard, M. (2012). A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid β . *Science Translational Medicine* doi: 10.1126/scitranslmed.3003748.
- Illes, P., Khan, T.M. y Rubini, P. (2017). Neuronal P2X7 Receptors Revisited: Do They Really Exist?. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 37(30): 7049-7062. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3103-16.2017.
- Illes, P., Rubini, P., Ulrich, H., Zhao, Y. y Tang, Y. (2020). Regulation of microglial functions by purinergic mechanisms in the healthy and diseased CNS. *Cells*, 9(5): 1108.
- Inoue, M., Sakamoto, Y., Fujishiro, N., Imanaga, I., Ozaki, S., Prestwich, G.D. y Warashina, A. (2003). Homogeneous Ca²⁺ stores in rat adrenal chromaffin cells. *Cell Calcium*, 33(1): 19-26. doi: 10.1016/s0143-4160(02)00178-1.
- Ito, R. y Hayen, A. (2011). Opposing roles of nucleus accumbens core and shell dopamine in the modulation of limbic information processing. *Journal of Neuroscience*, 31(16): 6001-6007.

- Itzhaki, R.F. (2014). Herpes simplex virus type 1 and Alzheimer's disease: increasing evidence for a major role of the virus. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6: 202. doi: 10.3389/fnagi.2014.00202.
- Jacobson, K.A., Jarvis, M.F. y Williams, M. (2002). Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(19): 4057-4093.
- Jiang, T., Hoekstra, J., Heng, X., Kang, W., Ding, J., Liu, J., Chen, S. y Zhang, J. (2015). P2X7 receptor is critical in α -synuclein--mediated microglial NADPH oxidase activation. *Neurobiology of Aging*, 36(7): 2304-2318. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.015.
- Johns, L.M., Levitan, E.S., Shelden, E.A., Holz, R.W. y Axelrod, D. (2001). Restriction of Secretory Granule Motion near the Plasma Membrane of Chromaffin Cells. *Journal of Cell Biology*, 153(1): 177-190. doi: 10.1083/jcb.153.1.177.
- Kametani, F. y Hasegawa, M. (2018). Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 0 doi: 10.3389/fnins.2018.00025.
- Khachaturian, Z.S. (1989). Calcium, membranes, aging, and Alzheimer's disease. Introduction and overview. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 568: 1-4. doi: 10.1111/j.1749-6632.1989.tb12485.x.
- Kim, H.J., Ajit, D., Peterson, T.S., Wang, Y., Camden, J.M., Wood, W.G., Sun, G.Y., Erb, L., Petris, M. y Weisman, G.A. (2012). Nucleotides released from A β 1-42-treated microglial cells increase cell migration and A β 1-42 uptake through P2Y2 receptor activation. *Journal of Neurochemistry*, 121(2): 228-238. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07700.x.
- Kittner, H., Franke, H., Fischer, W., Schultheis, N., Krügel, U. y Illes, P. (2003). Stimulation of P2Y1 receptors causes anxiolytic-like effects in the rat elevated plus-maze: implications for the involvement of P2Y1 receptor-mediated nitric oxide production. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 28(3): 435-444. doi: 10.1038/sj.npp.1300043.
- Knight, R., Khondoker, M., Magill, N., Stewart, R. y Landau, S. (2018). A Systematic Review and Meta-Analysis of the Effectiveness of Acetylcholinesterase Inhibitors and Memantine in Treating the Cognitive Symptoms of Dementia. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 45(3-4): 131-151. doi: 10.1159/000486546.
- Knopman, D.s., Amieva, H., Petersen, R.c., Chételat, G., Holtzman, D.m., Hyman, B.t., Nixon, R.a.y Jones, D.t. (2021). *Pathophysiology of Alzheimer Disease*. Decker Medicine, (-03-11) doi: 10.2310/im.1335.
- Knopman, D.S. y Roberts, R. (2010). Vascular risk factors: imaging and neuropathologic correlates. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 20(3): 699-709. doi: 10.3233/JAD-2010-091555.

- Kornum, B.R., Kawashima, M., Faraco, J., Lin, L., Rico, T.J., Hesselson, S., Axtell, R.C., Kuipers, H., Weiner, K. y Hamacher, A. (2011). Common variants in P2RY11 are associated with narcolepsy. *Nature Genetics*, 43(1): 66-71.
- Kosel, F., Pelley, J.M.S. y Franklin, T.B. (2020). Behavioural and psychological symptoms of dementia in mouse models of Alzheimer's disease-related pathology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 112: 634-647. doi: 10.1016/j.neubiorev.2020.02.012.
- Kumar, A. (2021). Alzheimer Disease. En: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Lai, M.K.P., Tan, M.G.K., Kirvell, S., Hobbs, C., Lee, J., Esiri, M.M., Chen, C.P. y Francis, P.T. (2008). Selective loss of P2Y2 nucleotide receptor immunoreactivity is associated with Alzheimer's disease neuropathology. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 115(8): 1165-1172. doi: 10.1007/s00702-008-0067-y.
- Lalonde, R., Lewis, T.L., Strazielle, C., Kim, H. y Fukuchi, K. (2003). Transgenic mice expressing the β APP695SWE mutation: effects on exploratory activity, anxiety, and motor coordination. *Brain Research*, 977(1): 38-45.
- Lampe, R.A., Defeo, P.A., Davison, M.D., Young, J., Herman, J.L., Spreen, R.C., Horn, M.B., Mangano, T.J. y Keith, R.A. (1993). Isolation and pharmacological characterization of omega-grammotoxin SIA, a novel peptide inhibitor of neuronal voltage-sensitive calcium channel responses. *Molecular Pharmacology*, 44(2): 451-460.
- Landfield, P.W. (1987). 'Increased calcium-current' hypothesis of brain aging. *Neurobiology of Aging*, 8(4): 346-347. doi: 10.1016/0197-4580(87)90074-1.
- Latta, C.H., Brothers, H.M. y Wilcock, D.M. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease; A source of heterogeneity and target for personalized therapy. *Neuroscience*, 302: 103-111. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.09.061.
- Leadsham, J.E., Kotiadis, V.N., Tarrant, D.J. y Gourlay, C.W. (2010). Apoptosis and the yeast actin cytoskeleton. *Cell Death and Differentiation*, 17(5): 754-762. doi: 10.1038/cdd.2009.196.
- Lee, H.G., Won, S.M., Gwag, B.J. y Lee, Y.B. (2011). Microglial P2X₇ receptor expression is accompanied by neuronal damage in the cerebral cortex of the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease. *Experimental & Molecular Medicine*, 43(1): 7-14. doi: 10.3858/emm.2011.43.1.001.
- Lee, J., Kim, Y.H., T Arce, F., Gillman, A.L., Jang, H., Kagan, B.L., Nussinov, R., Yang, J. y Lal, R. (2017). Amyloid β Ion Channels in a Membrane Comprising Brain Total Lipid Extracts. *ACS Chemical Neuroscience*, 8(6): 1348-1357. doi: 10.1021/acscemneuro.7b00006.
- Leger, M., Quiedeville, A., Bouet, V., Haelewyn, B., Boulouard, M., Schumann-Bard, P. y Freret, T. (2013). Object recognition test in mice. *Nature Protocols*, 8(12): 2531-2537. doi: 10.1038/nprot.2013.155.

Bibliografía

- Leissring, M.A., Parker, I. y LaFerla, F.M. (1999). Presenilin-2 mutations modulate amplitude and kinetics of inositol 1, 4,5-trisphosphate-mediated calcium signals. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(46): 32535-32538. doi: 10.1074/jbc.274.46.32535.
- Leissring, M.A., Akbari, Y., Fanger, C.M., Cahalan, M.D., Mattson, M.P. y LaFerla, F.M. (2000). Capacitative Calcium Entry Deficits and Elevated Luminal Calcium Content in Mutant Presenilin-1 Knockin Mice. *The Journal of Cell Biology*, 149(4): 793-798.
- Li, H., Chen, C., Dou, Y., Wu, H., Liu, Y., Lou, H., Zhang, J., Li, X., Wang, H. y Duan, S. (2013). P2Y4 Receptor-Mediated Pinocytosis Contributes to Amyloid Beta-Induced Self-Uptake by Microglia. *Molecular and Cellular Biology*, 33(21): 4282-4293. doi: 10.1128/MCB.00544-13.
- Li, Y., Rinne, J.O., Mosconi, L., Pirraglia, E., Rusinek, H., DeSanti, S., Kemppainen, N., Någren, K., Kim, B., Tsui, W. y de Leon, M.J. (2008). Regional analysis of FDG and PIB-PET images in normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 35(12): 2169-2181. doi: 10.1007/s00259-008-0833-y.
- Lingle, C.J., Martinez-Espinosa, P.L., Guarina, L. y Carbone, E. (2018). Roles of Na⁺, Ca²⁺, and K channels in the generation of repetitive firing and rhythmic bursting in adrenal chromaffin cells. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 470(1): 39-52.
- Liu, P., Xie, Y., Meng, X. y Kang, J. (2019). History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4(1): 29-22. doi: 10.1038/s41392-019-0063-8.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4): 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Llinas, R., Sugimori, M., Lin, J.W. y Cherksey, B. (1989). Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(5): 1689-1693.
- Malacombe, M., Bader, M. y Gasman, S. (2006). Exocytosis in neuroendocrine cells: New tasks for actin. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(11): 1175-1183. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.09.004.
- Marcantoni, A., Carabelli, V., Comunanza, V., Hoddah, H. y Carbone, E. (2008). Calcium channels in chromaffin cells: focus on L and T types. *Acta Physiologica*, 192(2): 233-246.

- Martin, E., Amar, M., Dalle, C., Youssef, I., Boucher, C., Le Duigou, C., Brückner, M., Prigent, A., Sazdovitch, V., Halle, A., Kanellopoulos, J.M., Fontaine, B., Delatour, B. y Delarasse, C. (2019). New role of P2X7 receptor in an Alzheimer's disease mouse model. *Molecular Psychiatry*, 24(1): 108-125. doi: 10.1038/s41380-018-0108-3.
- Martínez-Ramírez, C., Baraibar, A.M., Nanclares, C., Méndez-López, I., Gómez, A., Muñoz, M.P., de Diego, A.M., Gandía, L., Casarejos, M.J. y García, A.G. (2018). Altered excitability and exocytosis in chromaffin cells from the R6/1 mouse model of Huntington's disease is linked to over-expression of mutated huntingtin. *Journal of Neurochemistry*, 147(4): 454-476.
- Mather, M. (2021). Noradrenaline in the aging brain: Promoting cognitive reserve or accelerating Alzheimer's disease? *En: Seminars in Cell & Developmental Biology*, pp. 108-124.
- Matilainen, O., Quirós, P.M. y Auwerx, J. (2017). Mitochondria and Epigenetics - Crosstalk in Homeostasis and Stress. *Trends in Cell Biology*, 27(6): 453-463. doi: 10.1016/j.tcb.2017.02.004.
- Maurer K, Maurer U. Alois Alzheimer, 1864-1915: Leben und Werk in Wort und Bild = His life and work with text and photographs. Marburg: Pre Press Print; 2002.
- McLarnon, J.G., Ryu, J.K., Walker, D.G. y Choi, H.B. (2006). Upregulated Expression of Purinergic P2X7 Receptor in Alzheimer Disease and Amyloid- β Peptide-Treated Microglia and in Peptide-Injected Rat Hippocampus. *Journal of Neuro-pathology & Experimental Neurology*, 65(11): 1090-1097. doi: 10.1097/01.jnen.0000240470.97295.d3.
- McMillan, P.J., White, S.S., Franklin, A., Greenup, J.L., Leverenz, J.B., Raskind, M.A. y Szot, P. (2011). Differential response of the central noradrenergic nervous system to the loss of locus coeruleus neurons in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Brain Research*, 1373: 240-252. doi: 10.1016/j.brainres.2010.12.015.
- Meda, L., Cassatella, M.A., Szendrei, G.I., Otvos, L., Baron, P., Villalba, M., Ferrari, D. y Rossi, F. (1995). Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature*, 374(6523): 647-650. doi: 10.1038/374647a0.
- Méndez-López, I., Sancho-Bielsa, F.J., Engel, T., García, A.G. y Padín, J.F. (2021). Progressive Mitochondrial SOD1G93A Accumulation Causes Severe Structural, Metabolic and Functional Aberrations through OPA1 Down-Regulation in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15) doi: 10.3390/ijms22158194.
- Meunier, F.A. y Gutiérrez, L.M. (2016). Captivating New Roles of F-Actin Cortex in Exocytosis and Bulk Endocytosis in Neurosecretory Cells. *Trends in Neurosciences*, 39(9): 605-613. doi: 10.1016/j.tins.2016.07.003.

Bibliografía

- Meuth, S., Pape, H. y Budde, T. (2002). Modulation of Ca²⁺ currents in rat thalamocortical relay neurons by activity and phosphorylation. *European Journal of Neuroscience*, 15(10): 1603-1614.
- Michaud, M., Balardy, L., Moulis, G., Gaudin, C., Peyrot, C., Vellas, B., Cesari, M. y Nourhashemi, F. (2013). Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. *Journal of the American Medical Directors Association*, 14(12): 877-882. doi: 10.1016/j.jamda.2013.05.009.
- Middleton, P.J., Petric, M., Kozak, M., Rewcastle, N.B. y McLachlan, D.R. (1980). Herpes-simplex viral genome and senile and presenile dementias of Alzheimer and Pick. *Lancet (London, England)*, 1(8176): 1038. doi: 10.1016/s0140-6736(80)91490-7.
- Miranda-Ferreira, R., de Pascual, R., Caricati-Neto, A., Gandía, L., Jurkiewicz, A. y García, A.G. (2009). Role of the endoplasmic reticulum and mitochondria on quantal catecholamine release from chromaffin cells of control and hypertensive rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 329(1): 231-240.
- Miranda-Ferreira, R., de Pascual, R., Smaili, S.S., Caricati-Neto, A., Gandía, L., García, A.G. y Jurkiewicz, A. (2010). Greater cytosolic and mitochondrial calcium transients in adrenal medullary slices of hypertensive, compared with normotensive rats. *European Journal of Pharmacology*, 636(1-3): 126-136.
- Miras-Portugal, M.T., Sebastián-Serrano, Á, de Diego García, L. y Díaz-Hernández, M. (2017). Neuronal P2X7 receptor: involvement in neuronal physiology and pathology. *Journal of Neuroscience*, 37(30): 7063-7072.
- Miras-Portugal, M.T., Diaz-Hernandez, J.I., Gomez-Villafuertes, R., Diaz-Hernandez, M., Artalejo, A.R. y Gualix, J. (2015). Role of P2X7 and P2Y2 receptors on α -secretase-dependent APP processing: Control of amyloid plaques formation “in vivo” by P2X7 receptor. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13: 176-181. doi: 10.1016/j.csbj.2015.02.005.
- Mishra, S.K., Braun, N., Shukla, V., Füllgrabe, M., Schomerus, C., Korf, H., Gachet, C., Ikehara, Y., Sévigny, J., Robson, S.C. y Zimmermann, H. (2006). Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. *Development (Cambridge, England)*, 133(4): 675-684. doi: 10.1242/dev.02233.
- Monje, V.D., Haack, J.A., Naisbitt, S.R., Miljanich, G., Ramachandran, J., Nasdasdi, L., Olivera, B.M., Hillyard, D.R. y Gray, W.R. (1993). A new Conus peptide ligand for Ca channel subtypes. *Neuropharmacology*, 32(11): 1141-1149.
- Moore, D., Iritani, S., Chambers, J. y Emson, P. (2000). Immunohistochemical localization of the P2Y1 purinergic receptor in Alzheimer's disease. *Neuroreport*, 11(17): 3799-3803. doi: 10.1097/00001756-200011270-00041.

- Moore, D., Chambers, J., Waldvogel, H., Faull, R. y Emson, P. (2000). Regional and cellular distribution of the P2Y₁ purinergic receptor in the human brain: striking neuronal localisation. *Journal of Comparative Neurology*, 421(3): 374-384.
- Mufti, F., Jung, Y., Giacotti, L.A., Yu, J., Chen, Z., Phung, N.B., Jacobson, K.A. y Salvemini, D. (2020). P2Y₁₄ receptor antagonists reverse chronic neuropathic pain in a mouse model. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 11(6): 1281-1286.
- Musial, D.C., Bomfim, G.H., Arranz-Tagarro, J.A., Méndez-López, I., Miranda-Ferreira, R., Jurkiewicz, A., Jurkiewicz, N.H., García, A.G. y Padín, J.F. (2017). Altered mitochondrial function, calcium signaling, and catecholamine release in chromaffin cells of diabetic and SHR rats. *European Journal of Pharmacology*, 815: 416-426.
- Naia, L., Ferreira, I.L., Ferreira, E. y Rego, A.C. (2017). Mitochondrial Ca²⁺ handling in Huntington's and Alzheimer's diseases – Role of ER-mitochondria crosstalk. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483(4): 1069-1077. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.122.
- Narcisse, L., Scemes, E., Zhao, Y., Lee, S.C. y Brosnan, C.F. (2005). The cytokine IL-1 β transiently enhances P2X₇ receptor expression and function in human astrocytes. *Glia*, 49(2): 245-258. doi: 10.1002/glia.20110.
- Nativio, R., Donahue, G., Berson, A., Lan, Y., Amlie-Wolf, A., Tuzer, F., Toledo, J.B., Gosai, S.J., Gregory, B.D., Torres, C., Trojanowski, J.Q., Wang, L., Johnson, F.B., Bonini, N.M. y Berger, S.L. (2018). Dysregulation of the epigenetic landscape of normal aging in Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, 21(4): 497-505. doi: 10.1038/s41593-018-0101-9.
- Neha, n., Sodhi, R.K., Jaggi, A.S. y Singh, N. (2014). Animal models of dementia and cognitive dysfunction. *Life Sciences*, 109(2): 73-86. doi: 10.1016/j.lfs.2014.05.017.
- Neher, E. (1998). Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron*, 20(3): 389-399. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80983-6.
- Ng, Y., Lu, X. y Levitan, E.S. (2002). Physical mobilization of secretory vesicles facilitates neuropeptide release by nerve growth factor-differentiated PC12 Cells. *The Journal of Physiology*, 542(2): 395-402. doi: 10.1113/jphysiol.2002.021733.
- Ninomiya, W., Mizobuchi, K., Hayashi, T., Okude, S., Katagiri, S., Kubo, A., Masuhara, N. y Nakano, T. (2020). Electroretinographic abnormalities associated with pregabalin: a case report. *Documenta Ophthalmologica. Advances in Ophthalmology*, 140(3): 279-287. doi: 10.1007/s10633-019-09743-1.
- Nobili, A., Latagliata, E.C., Viscomi, M.T., Cavallucci, V., Cutuli, D., Giacobuzzo, G., Krashia, P., Rizzo, F.R., Marino, R. y Federici, M. (2017). Dopamine neuronal loss contributes to memory and reward dysfunction in a model of Alzheimer's disease. *Nature Communications*, 8(1): 1-14.

Bibliografía

- Norris, C.M., Kadish, I., Blalock, E.M., Chen, K., Thibault, V., Porter, N.M., Landfield, P.W. y Kraner, S.D. (2005). Calcineurin Triggers Reactive/Inflammatory Processes in Astrocytes and Is Upregulated in Aging and Alzheimer's Models. *The Journal of Neuroscience*, 25(18): 4649-4658. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0365-05.2005.
- Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B.P. y LaFerla, F.M. (2003). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 24(8): 1063-1070. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2003.08.012.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y. y LaFerla, F.M. (2003a). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3): 409-421. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00434-3.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y. y LaFerla, F.M. (2003b). Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A β and Synaptic Dysfunction. *Neuron*, 39(3): 409-421. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00434-3.
- Oheim, M. y Stühmer, W. (2000). Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex. *European Biophysics Journal: EBJ*, 29(2): 67-89. doi: 10.1007/s002490050253.
- Olivera, B.M., McIntosh, J.M., Curz, L.J., Luque, F.A. y Gray, W.R. (1984). Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *Conus geographus* venom. *Biochemistry*, 23(22): 5087-5090.
- Ollà, I., Santos-Galindo, M., Elorza, A. y Lucas, J.J. (2020). P2X7 Receptor Upregulation in Huntington's Disease Brains. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13: 567430. doi: 10.3389/fnmol.2020.567430.
- Paroni, G., Bisceglia, P. y Seripa, D. (2019). Understanding the Amyloid Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 68(2): 493-510. doi: 10.3233/JAD-180802.
- Pérez-Sen, R., Queipo, M.J., Morente, V., Ortega, F., Delicado, E.G. y Miras-Portugal, M.T. (2015). Neuroprotection mediated by P2Y13 nucleotide receptors in neurons. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13: 160-168.
- Plummer, M.R., Logothetis, D.E. y Hess, P. (1989). Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron*, 2(5): 1453-1463.
- Querfurth, H.W. y Selkoe, D.J. (1994). Calcium ionophore increases amyloid beta peptide production by cultured cells. *Biochemistry*, 33(15): 4550-4561. doi: 10.1021/bi00181a016.

- Quick, M.W. y Lester, R.A. (2002). Desensitization of neuronal nicotinic receptors J Neurobiol 53: 457-478. *Find this Article Online.*
- Rafehi, M., Malik, E.M., Neumann, A., Abdelrahman, A., Hanck, T., Namasivayam, V., Müller, C.E. y Baqi, Y. (2017). Development of potent and selective antagonists for the UTP-activated P2Y4 receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(7): 3020-3038.
- Raskind, M.A., Peskind, E.R., Halter, J.B. y Jimerson, D.C. (1984). Norepinephrine and MHPG levels in CSF and plasma in Alzheimer's disease. *Archives of General Psychiatry*, 41(4): 343-346.
- Reese, L.C. y Tagliatalata, G. (2011). A role for calcineurin in Alzheimer's disease. *Current Neuropharmacology*, 9(4): 685-692. doi: 10.2174/157015911798376316.
- Reichenbach, N., Delekate, A., Breithausen, B., Keppler, K., Poll, S., Schulte, T., Peter, J., Plescher, M., Hansen, J.N., Blank, N., Keller, A., Fuhrmann, M., Henneberger, C., Halle, A. y Petzold, G.C. (2018). P2Y1 receptor blockade normalizes network dysfunction and cognition in an Alzheimer's disease model. *The Journal of Experimental Medicine*, 215(6): 1649-1663. doi: 10.1084/jem.20171487.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A. y Pozzan, T. (1998). Close Contacts with the Endoplasmic Reticulum as Determinants of Mitochondrial Ca²⁺ Responses. *Science* doi: 10.1126/science.280.5370.1763.
- Rodgers, R.J. y Dalvi, A. (1997). Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21(6): 801-810. doi: 10.1016/s0149-7634(96)00058-9.
- Rodrigue, K.M., Kennedy, K.M. y Park, D.C. (2009). Beta-Amyloid Deposition and the Aging Brain. *Neuropsychology Review*, 19(4): 436-450. doi: 10.1007/s11065-009-9118-x.
- Rodrigues, R.J., Tomé, A.R. y Cunha, R.A. (2015). ATP as a multi-target danger signal in the brain. *Frontiers in Neuroscience*, 9: 148. doi: 10.3389/fnins.2015.00148.
- Rogers, J., Mastroeni, D., Leonard, B., Joyce, J. y Grover, A. (2007). Neuroinflammation in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: are microglia pathogenic in either disorder?. *International Review of Neurobiology*, 82: 235-246. doi: 10.1016/S0074-7742(07)82012-5.
- Roldan, E., Alvarez-Pelaez, R. y de Molina, A.F. (1974). Electrographic study of the amygdaloid defense response. *Physiology & Behavior*, 13(6): 779-787.
- Romano, A., Pace, L., Tempesta, B., Lavecchia, A.M., Macheda, T., Bedse, G., Petrella, A., Cifani, C., Serviddio, G., Vendemiale, G., Gaetani, S. y Cassano, T. (2014). Depressive-like behavior is paired to monoaminergic alteration in a murine model of Alzheimer's disease. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(4) doi: 10.1093/ijnp/pyu020.

Bibliografía

- Rubini, P., Pagel, G., Mehri, S., Marquardt, P., Riedel, T. y Illes, P. (2014). Functional P2X7 receptors at cultured hippocampal astrocytes but not neurons. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 387(10): 943-954.
- Ruitenbergh, A., den Heijer, T., Bakker, S.L.M., van Swieten, J.C., Koudstaal, P.J., Hofman, A. y Breteler, M.M.B. (2005). Cerebral hypoperfusion and clinical onset of dementia: the Rotterdam Study. *Annals of Neurology*, 57(6): 789-794. doi: 10.1002/ana.20493.
- Ruiz-Ruiz, C., Calzaferrri, F. y García, A.G. (2020). P2X7 Receptor Antagonism as a Potential Therapy in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13: 93. doi: 10.3389/fnmol.2020.00093.
- Ruiz-Ruiz, C., García-Magro, N., Negredo, P., Avendaño, C., Bhattacharya, A., Ceusters, M. y García, A.G. (2020). Chronic administration of P2X7 receptor antagonist JNJ-47965567 delays disease onset and progression, and improves motor performance in ALS SOD1G93A female mice. *Disease Models & Mechanisms*, 13(10) doi: 10.1242/dmm.045732.
- Ryu, J.K. y McLarnon, J.G. (2008). Block of purinergic P2X(7) receptor is neuroprotective in an animal model of Alzheimer's disease. *Neuroreport*, 19(17): 1715-1719. doi: 10.1097/WNR.0b013e3283179333.
- Sadowski, M., Pankiewicz, J., Scholtzova, H., Ji, Y., Quartermain, D., Jensen, C.H., Duff, K., Nixon, R.A., Gruen, R.J. y Wisniewski, T. (2004). Amyloid-beta deposition is associated with decreased hippocampal glucose metabolism and spatial memory impairment in APP/PS1 mice. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 63(5): 418-428. doi: 10.1093/jnen/63.5.418.
- Sáez-Orellana, F., Fuentes-Fuentes, M.C., Godoy, P.A., Silva-Grecchi, T., Panes, J.D., Guzmán, L., Yébenes, G.E., Gavilán, J., Egan, T.M., Aguayo, L.G. y 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. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.10.027.
- Santos, R.X., Correia, S.C., Wang, X., Perry, G., Smith, M.A., Moreira, P.I. y Zhu, X. (2010). A synergistic dysfunction of mitochondrial fission/fusion dynamics and mitophagy in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 20 Suppl 2: 401. doi: 10.3233/JAD-2010-100666.
- Sanz-Blasco, S., Valero, R.A., Rodríguez-Crespo, I., Villalobos, C. y Núñez, L. (2008). Mitochondrial Ca²⁺ overload underlies Abeta oligomers neurotoxicity providing an unexpected mechanism of neuroprotection by NSAIDs. *PLoS One*, 3(7): e2718. doi: 10.1371/journal.pone.0002718.

Alteraciones en el eje simpatoadrenal con
el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

- Sawyer, C.H. y Everett, J.W. (1947). Cholinesterases in rat tissues and the site of serum non-specific cholinesterase production. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 148(3): 675-683.
- Scheltens, P. (2021). De toekomst van Alzheimer. *Zorgvisie*, 46(13): 47.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. y Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7): 676-682. doi: 10.1038/nmeth.2019.
- Sergi, G., De Rui, M., Coin, A., Inelmen, E.M. y Manzato, E. (2013). Weight loss and Alzheimer's disease: temporal and aetiologic connections. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 72(1): 160-165. doi: 10.1017/S0029665112002753.
- Shruster, A. y Offen, D. (2014). Targeting neurogenesis ameliorates danger assessment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 261: 193-201. doi: 10.1016/j.bbr.2013.12.028.
- Silei, V., Fabrizi, C., Venturini, G., Salmona, M., Bugiani, O., Tagliavini, F. y Lauro, G.M. (1999). Activation of microglial cells by PrP and beta-amyloid fragments raises intracellular calcium through L-type voltage sensitive calcium channels. *Brain Research*, 818(1): 168-170. doi: 10.1016/s0006-8993(98)01272-4.
- Simon, M.J. y Iliff, J.J. (2016). Regulation of cerebrospinal fluid (CSF) flow in neurodegenerative, neurovascular and neuroinflammatory disease. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1862(3): 442-451. doi: 10.1016/j.bba-dis.2015.10.014.
- Sjogren, T., Sjogren, H. y Lindgren, A.G. (1952). Morbus Alzheimer and morbus Pick; a genetic, clinical and patho-anatomical study. *Acta Psychiatrica Et Neurologica Scandinavica. Supplementum*, 82: 1-152.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B. y Simon, P. (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85(3): 367-370. doi: 10.1007/BF00428203.
- Swerdlow, R.H. y Khan, S.M. (2004). A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. *Medical Hypotheses*, 63(1): 8-20. doi: 10.1016/j.mehy.2003.12.045.
- Szot, P., White, S.S., Greenup, J.L., Leverenz, J.B., Peskind, E.R. y Raskind, M.A. (2006). Compensatory changes in the noradrenergic nervous system in the locus ceruleus and hippocampus of postmortem subjects with Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(2): 467-478. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4265-05.2006.
- Szot, P. (2016). Elevated Cerebrospinal Fluid Norepinephrine in the Elderly can Link Depression and A Reduced Glymphatic System as Risk Factors for Alzheimer's Disease. *Journal of Aging Science*.

Bibliografía

- Tamura, B.K., Masaki, K.H. y Blanchette, P. (2007). Weight loss in patients with Alzheimer's disease. *Journal of Nutrition for the Elderly*, 26(3-4): 21-38. doi: 10.1300/j052v26n03_02.
- Tan, Y., Deng, Y. y Qing, H. (2012). Calcium channel blockers and Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*, 7(2): 137-140. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2012.02.010.
- Tank, A.W. y Lee Wong, D. (2015). Peripheral and central effects of circulating catecholamines. *Comprehensive Physiology*, 5(1): 1-15. doi: 10.1002/cphy.c140007.
- Teich, A.F., Patel, M. y Arancio, O. (2013). A reliable way to detect endogenous murine β -amyloid. *PloS One*, 8(2): e55647. doi: 10.1371/journal.pone.0055647.
- Thomas, T., Thomas, G., McLendon, C., Sutton, T. y Mullan, M. (1996). beta-Amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. *Nature*, 380(6570): 168-171. doi: 10.1038/380168a0.
- Tillotson, D. (1979). Inactivation of Ca conductance dependent on entry of Ca ions in molluscan neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(3): 1497-1500.
- Toda, T., Noda, Y., Ito, G., Maeda, M. y Shimizu, T. (2011). Presenilin-2 mutation causes early amyloid accumulation and memory impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011: 617974. doi: 10.1155/2011/617974.
- Toescu, E.C. y Verkhatsky, A. (2007). The importance of being subtle: small changes in calcium homeostasis control cognitive decline in normal aging. *Aging Cell*, 6(3): 267-273. doi: 10.1111/j.1474-9726.2007.00296.x.
- Turner, T.J., Lampe, R.A. y Dunlap, K. (1995). Characterization of presynaptic calcium channels with omega-conotoxin MVIIC and omega-granmotxin SIA: role for a resistant calcium channel type in neurosecretion. *Molecular Pharmacology*, 47(2): 348-353.
- Ulate, G., Scott, S.R., González, J., Gilabert, J.A. y Artalejo, A.R. (2000). Extracellular ATP regulates exocytosis by inhibiting multiple Ca²⁺ channel types in bovine chromaffin cells. *Pflügers Archiv*, 439(3): 304-314.
- Uttara, B., Singh, A.V., Zamboni, P. y Mahajan, R.T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 7(1): 65-74. doi: 10.2174/157015909787602823.
- Varma, R., Chai, Y., Troncoso, J., Gu, J., Xing, H., Stojilkovic, S., Mattson, M.P. y Haughey, N.J. (2009). Amyloid- β Induces a Caspase-Mediated Cleavage of P2X₄ to Promote Purinotoxicity. *Neuromolecular Medicine*, 11(2): 63-75. doi: 10.1007/s12017-009-8073-2.




- Villanueva, J., Gimenez-Molina, Y., Viniegra, S. y Gutiérrez, L.M. (2016). F-actin cytoskeleton and the fate of organelles in chromaffin cells. *Journal of Neurochemistry*, 137(6): 860-866. doi: 10.1111/jnc.13560.
- Villarroya, M., Olivares, R., Ruíz, A., Cano-Abad, M.F., de Pascual, R., Lomax, R.B., López, M.G., Mayorgas, I., Gandía, L. y García, A.G. (1999). Voltage inactivation of Ca₂ entry and secretion associated with N- and P/Q-type but not L-type Ca₂ channels of bovine chromaffin cells. *The Journal of Physiology*, 516(2): 421-432.
- Vitale, M.L., Seward, E.P. y Trifaró, J.M. (1995). Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron*, 14(2): 353-363. doi: 10.1016/0896-6273(95)90291-0.
- Wahl-Schott, C., Baumann, L., Cuny, H., Eckert, C., Griessmeier, K. y Biel, M. (2006). Switching off calcium-dependent inactivation in L-type calcium channels by an autoinhibitory domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42): 15657-15662.
- Wang, L.Y., Raskind, M.A., Wilkinson, C.W., Shofer, J.B., Sikkema, C., Szot, P., Quinn, J.F., Galasko, D.R. y Peskind, E.R. (2018). Associations between CSF cortisol and CSF norepinephrine in cognitively normal controls and patients with amnesic MCI and AD dementia. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 33(5): 763-768. doi: 10.1002/gps.4856.
- Wang, W., Rajeev, B.W., Stromberg, A.J., Ren, N., Tang, G., Huang, Q., Rigoutsos, I. y Nelson, P.T. (2008). The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(5): 1213-1223. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5065-07.2008.
- Wang, X. y Zheng, W. (2019). Ca₂₊ homeostasis dysregulation in Alzheimer's disease: a focus on plasma membrane and cell organelles. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(6): 6697-6712. doi: 10.1096/fj.201801751R.
- Wang, X., Su, B., Fujioka, H. y Zhu, X. (2008). Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *The American Journal of Pathology*, 173(2): 470-482. doi: 10.2353/ajpath.2008.071208.
- Weldon, D.T., Rogers, S.D., Ghilardi, J.R., Finke, M.P., Cleary, J.P., O'Hare, E., Esler, W.P., Maggio, J.E. y Mantyh, P.W. (1998). Fibrillar β -Amyloid Induces Microglial Phagocytosis, Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase, and Loss of a Select Population of Neurons in the Rat CNS In Vivo. *The Journal of Neuroscience*, 18(6): 2161-2173. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-06-02161.1998.
- White, T.D. (1984). Characteristics of neuronal release of ATP. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 8(4-6): 487-493.

- Wojnicz, A., Avendaño-Ortiz, J., de Pascual, R., Ruiz-Pascual, L., García, A.G. y Ruiz-Nuño, A. (2016). Simultaneous monitoring of monoamines, amino acids, nucleotides and neuropeptides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to neurosecretion in bovine chromaffin cells. *Journal of Mass Spectrometry*, 51(8): 651-664.
- Wolf, K., Zarkua, G., Chan, S., Sridhar, A. y Smith, C. (2016). Spatial and activity-dependent catecholamine release in rat adrenal medulla under native neuronal stimulation. *Physiological Reports*, 4(17) doi: 10.14814/phy2.12898.
- Ye, C., Ho-Pao, C.L., Kanazirska, M., Quinn, S., Rogers, K., Seidman, C.E., Seidman, J.G., Brown, E.M. y Vassilev, P.M. (1997). Amyloid-beta proteins activate Ca(2+)-permeable channels through calcium-sensing receptors. *Journal of Neuroscience Research*, 47(5): 547-554. doi: 10.1002/(sici)1097-4547(19970301)47:53.0.co;2-v.
- Yue, D.T., Backx, P.H. y Imredy, J.P. (1990). Calcium-sensitive inactivation in the gating of single calcium channels. *Science*, 250(4988): 1735-1738.
- Yue, N., Huang, H., Zhu, X., Han, Q., Wang, Y., Li, B., Liu, Q., Wu, G., Zhang, Y. y Yu, J. (2017). Activation of P2X7 receptor and NLRP3 inflammasome assembly in hippocampal glial cells mediates chronic stress-induced depressive-like behaviors. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1): 102. doi: 10.1186/s12974-017-0865-y.
- Zhang, J., Wang, H., Ye, C., Ge, W., Chen, Y., Jiang, Z., Wu, C., Poo, M. y Duan, S. (2003). ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron*, 40(5): 971-982. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00717-7.
- Zhang, K., Schrag, M., Crofton, A., Trivedi, R., Vinters, H. y Kirsch, W. (2012). Targeted proteomics for quantification of histone acetylation in Alzheimer's disease. *Proteomics*, 12(8): 1261-1268. doi: 10.1002/pmic.201200010.
- Zhao, Y., Ren, W., Zhang, Y., He, J., Yin, H., Liao, Y., Rubini, P., Deussing, J.M., Verkhratsky, A. y Yuan, Z. (2022). High, in Contrast to Low Levels of Acute Stress Induce Depressive-like Behavior by Involving Astrocytic, in Addition to Microglial P2X7 Receptors in the Rodent Hippocampus. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3): 1904.
- Zhou, X., Ma, L., Xiong, Y., Huang, H., Yuan, J., Li, R., Li, J. y Chen, Y. (2016). Upregulated P2X3 receptor expression in patients with intractable temporal lobe epilepsy and in a rat model of epilepsy. *Neurochemical Research*, 41(6): 1263-1273.
- Zhu, X., Perry, G., Smith, M.A. y Wang, X. (2013). Abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 33 Suppl 1: 253. doi: 10.3233/JAD-2012-129005.
- Zlokovic, B.V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57(2): 178-201. doi: 10.1016/j.neuron.2008.01.003.

Anexo

Article

Alterations of the Sympathoadrenal Axis Related to the Development of Alzheimer's Disease in the 3xTg Mouse Model

Alicia Muñoz-Montero, Ricardo de Pascual , Anabel Sáez-Mas , Inés Colmena and Luis Gandía * 

Instituto Teófilo Hernando and Departamento de Farmacología y Terapéutica, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Arzobispo Morcillo, 4, 28029 Madrid, Spain; alicia.munnoz@uam.es (A.M.-M.); ricardo.pascual@uam.es (R.d.P.); ansama96@gmail.com (A.S.-M.); ines.colmena@uam.es (I.C.)

* Correspondence: luis.gandia@uam.es

Simple Summary: Alzheimer's disease (AD), the most common form of dementia, is becoming a global health problem and public health priority. In the advanced stages of AD, besides the initial cognitive symptoms, behavioral problems, particularly agitation and aggressiveness, become prevalent in AD patients. These non-cognitive symptoms could be related to alterations in the regulatory mechanism of the sympathetic nervous system. In this study, we used chromaffin cells (CCs) isolated from the adrenal gland of 3xTg (an AD mouse model) mice to characterize potential alterations in the regulation of the responses to stress mediated by the secretion of catecholamines. We compared these regulatory mechanisms in mice at two different ages: in 2-month-old mice, where no AD symptoms were observed, and in mice over 12 months of age, when AD-related cognitive impairment related was fully established. We found that the modulation of neurotransmitter release was stronger in CCs isolated from the adrenal medulla of 3xTg mice older than 12 months of age, an effect likely related to disease progression as it was not observed in CCs from age-matched wild-type (WT) mice. This enhanced modulation leads to an increased catecholamine release in response to stressful situations, which may explain the non-cognitive behavioral problems found in AD patients.



Citation: Muñoz-Montero, A.; de Pascual, R.; Sáez-Mas, A.; Colmena, I.; Gandía, L. Alterations of the Sympathoadrenal Axis Related to the Development of Alzheimer's Disease in the 3xTg Mouse Model. *Biology* **2022**, *11*, 511. <https://doi.org/10.3390/biology11040511>

Academic Editor: Janelle Pakan

Received: 15 February 2022

Accepted: 23 March 2022

Published: 26 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Alzheimer's disease (AD), the most common form of dementia, is becoming a global health problem and public health priority. In the advanced stages of AD, besides the initial cognitive symptoms, behavioral problems, particularly agitation and aggressiveness, become prevalent in AD patients. These non-cognitive symptoms could be related to a noradrenergic overactivation. In this study, we used chromaffin cells (CCs) isolated from the adrenal gland of 3xTg AD model mice to characterize potential alterations in the autocrine-paracrine modulation of voltage-dependent calcium channels (VDCCs), which in turn serve to regulate the release of catecholamines. We used mice at the presymptomatic stage (2 months) and mice over 12 months of age, when AD-related cognitive impairment was fully established. We found that the modulation of inward currents through VDCCs induced by extracellular ATP was stronger in CCs isolated from the adrenal medulla of 3xTg mice older than 12 months of age, an effect likely related to disease progression as it was not observed in CCs from age-matched WT mice. This enhanced modulation leads to increased catecholamine release in response to stressful situations, which may explain the non-cognitive behavioral problems found in AD patients.

Keywords: Alzheimer's disease; 3xTg mouse model; sympathoadrenal axis; chromaffin cell; autocrine-paracrine modulation; voltage-dependent calcium channels

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia; aging is the main variable linked to the development of this disease, which is becoming a global health problem and a public health priority, given that world's elderly population is constantly growing.

The main pathogenic hallmarks of AD are the formation of senile plaques, due to the deposition of amyloid-beta ($A\beta$), and the formation of neurofibrillary tangles as a result of the hyperphosphorylation of the tau protein [1]. This results in synaptic deficits and synaptic loss, which seem to be correlated with the progression and severity of AD-associated memory loss and atrophy of the cerebral cortex [2]. The initial AD symptoms (i.e., cognitive impairment, memory loss, and learning deficits) appear to be related to the loss of cholinergic innervation in the cerebral cortex, leading to the formulation of the “Cholinergic Hypothesis of AD” [3,4] and the development of cholinesterase inhibitor-based therapies. However, as AD progresses, changes in the cholinergic, serotonergic, noradrenergic, dopaminergic, GABAergic, and somatostatinergic neurons are observed. Studies with transgenic mouse models of AD have revealed that although cholinergic neurotransmission appears to be the most vulnerable in the early stages of the disease, as AD progresses, glutamatergic terminals and finally the somewhat more resilient GABAergic terminals will be also affected [5]. Thus, the alteration of several neurotransmitter systems has been reported in advanced AD, which could be correlated with changes in the synthesis, storage or release of these neurotransmitters.

In patients suffering from AD, the progression of the disease and the subsequent increase in neurological limitations generates a stressful situation that makes them more vulnerable. During the last few years, different studies have suggested that the sympathoadrenal axis is also affected as AD progresses; therefore, there is a growing interest in studying the responses of this axis in these patients as well as in the transgenic models of AD. Peripheral sympathoadrenal axis activity is finely controlled at specific sites in the brain cortex and hypothalamus, and alterations in the release of exocytotic neurotransmitters may also occur at peripheral sympathetic neurons and adrenal medullary chromaffin cells (CCs). The CCs are integrated into the sympathoadrenal axis, which helps to maintain the body homeostasis during both routine life and acute stress conditions [6]. These cells are widely used to explore neurotransmitter release and synaptic transmission, and are considered to be the amplifying arm of the sympathetic nervous system: the sudden and fast exocytotic release of their catecholamines—stored in noradrenergic and adrenergic cells—plays a fundamental role in the fight-or-flight response to stress [6]. More recently, CCs have also been used to determine the role of some neurodegenerative disease-related proteins in the regulation of cell excitability, ion channel currents, bulk exocytosis, and the fine kinetics of single-vesicle exocytotic events [7–11]. This has also been the case for some mouse models of neurodegenerative diseases (NDDs) [12–15] and autism [16]. Our studies in different mouse models carrying mutations linked to AD and other NDDs have provided results consistent with the hypothesis that the central alterations that occur in various NDDs are also manifested at the peripheral sympathoadrenal axis, impairing the fight-or-flight stress response in patients suffering from these diseases [17].

It should be noted that the physiological function of CCs in the sympathoadrenal axis is for the massive exocytotic release of the catecholamines epinephrine and norepinephrine into the circulation in response to stress [18]. To facilitate this massive and sudden release of catecholamines, CCs use an autocrine-paracrine mechanism to regulate exocytosis [19,20]. Catecholamines and other co-exocytosed vesicular components, such as ATP [21] or opioid peptides [22], modulate the activity of voltage-dependent calcium channels (VDCCs), i.e., a membrane delimited G protein-mediated inhibition of calcium channels that is relieved by voltage. Thus, for instance, when ATP binds to its purinergic receptor, the G protein couples to the channel, slowing down the current activation and decreasing its peak amplitude. The application of a strong positive depolarizing pre-pulse uncouples the G protein from the channel, and the current recovers its control profile [20,21], thus increasing Ca^{2+} influx to trigger massive catecholamine exocytosis.

In order to understand the pathogenesis of AD and, hence, search for new therapies, the mouse model of AD, 3xTg, has been widely used as a relevant experimental model. It has three mutations—APP^{Swe}, PSEN1 with human M146V mutation, and the P301L mutation of tau—showing the typical hallmarks of the disease [23].

In the present study, we used CCs isolated from the adrenal glands of this mouse model to characterize possible alterations in the sympathoadrenal axis that could appear with the progression of AD. To this aim, we compared the modulatory effects exerted by extracellular ATP on inward currents through VDCCs in voltage-clamped CCs from wild-type (WT) and 3xTg mice at the presymptomatic (2 months) and symptomatic (>12 months) stages. In order to identify the possible mechanisms involved in the observed differences, the expression of the different VDCC subtypes and the levels of transcription of different purinergic receptors (P2Y and P2X) expressed in CCs were also characterized.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

All procedures involving animals in this study were performed in accordance with the recommendations of the Ethics Committee from Universidad Autónoma de Madrid on the use of animals for laboratory experimentation, and following the ethical code and established guidelines from the European Union Directive (2010/63/EU) and Spanish legislation (RD 1201/2005 and 53/2013). Mice were housed under controlled conditions of temperature and light (12:12 h), and food and water were provided ad libitum.

Male 3xTg (129/C57BL6 background) mice were kindly donated by Dr. Javier García Sancho (Universidad de Valladolid, Spain), and contained the PS1M146V mutation (substitution of methionine and valine at codon 146), the “Swedish” mutation of the amyloid precursor protein (APPSwe), and the P301L tau mutation (substitution of proline by leucine at codon 301) under the transcriptional control of the Thy1.2 expression cassette [23]. The controls, male B6129SF2J mice (WT), were generously provided by Dr. Miguel Ángel del Pozo (CNIC, Madrid).

3xTg mice model develop cognitive impairment, starting at 6 months of age (Supplementary Materials Figure S1). Therefore, in this study, the mice were used at a presymptomatic stage (2 months, hereinafter referred to as 2 m) and at over 12 months of age (hereinafter referred to as 12 m), when the cognitive impairment related to AD was completely established.

All efforts were made to avoid animal suffering, and we used the minimum number of mice in search of significant differences between experimental groups. All work was performed under blinded conditions.

2.2. Genotype Determinations

Genomic DNA was extracted from mouse ear using the REDEExtract-N-Amp Tissue Kit (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Briefly, the tissue was incubated in extraction solution for 10 min at room temperature and then at 95 °C for 3 min. After this, neutralizing solution was added.

For polymerase chain reaction (PCR), the following specific primers were used: APP Fw 5'-GCTGCACCAGTTCTGGATGG-3', Rv 5'-GAGGTATTCAGTCATGTGCT-3'; tau Fw 5'-GAGGTATTCAGTCATGTGCT-3', Rv 5'-TTCAAAGTTCACCTGATAGT-3'; PS1 Fw 5'-AGGCAGGAGATCACGTGTTCAAGTAC-3, Rv 5'-CACAGGCACACTCTG ACATGCACA AGGC-3'. PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1.8% agarose gel stained with REDTaq (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) to visualize the DNA bands.

2.3. Primary Cultures of Mouse Chromaffin Cells

Adrenal glands from WT and 3xTg mice were isolated and rapidly placed in ice-cold Locke solution ((in mM) 154 NaCl, 5.5 KCl, 3.6 NaHCO₃, 10 Hepes, and 5.5 glucose (pH = 7.4)) after their sacrifice by cervical dislocation. The glands were fat trimmed, and the medullae of both glands were isolated from the capsule and the cortex and placed in a 1.5 mL tube containing 200 µL of Locke's solution and papain (25 U/mL, Sigma-Aldrich) for tissue digestion at 37 °C for 26 min. This solution was exchanged with 1 mL of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; D6546, Sigma-Aldrich), repeating the exchange three times and finally leaving 120 µL of DMEM. Then, the medullae were mechanically digested

by mincing them first with a 1 mL and then with a 200 μ L micropipette tip. Finally, the residual medulla fragments were discarded and 10 μ L drops of DMEM containing the cells were placed on poly-D-lysine-coated coverslips in 24-well plates. After a 1 h incubation (37°C, water saturated, and 5% CO₂ atmosphere), 500 μ L of DMEM supplemented with 5% fetal bovine serum, 50 IU/mL penicillin, and 50 μ g/mL streptomycin was added to each well. Experiments were conducted within the following 3 days.

2.4. RNA Extraction and Quantitative Reverse Transcription PCR (RT-qPCR)

The samples were homogenized by vortexing and pipetting with 250 μ L of TRIzol reagent (Sigma-Aldrich). The homogenate was then mixed with 100 μ L of chloroform and centrifuged for 15 min at 12,000 rpm in 4 °C conditions. The supernatant was recovered, mixed with 250 μ L of isopropanol, and frozen overnight at –80 °C. The samples were centrifuged for 15 min at 12,000 rpm in 4 °C condition, and the supernatant was discarded. After complete supernatant evaporation, the pellet was resuspended with RNase free water and stored at –80 °C.

The total RNA extracted from the different tissues was quantified using a NanoDrop™ spectrophotometer (ThermoFisher Scientific; Waltham, MA, USA), and 1 μ g of each sample was converted into complementary DNA using a PrimeScript™ RT Reagent reverse transcription kit (Takara Bio Europe SAS; Saint-Gemain-en-Laye, France; Cat. No. RR037B).

From the resulting cDNA, 5 μ g were used for qPCR quantification in a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems by Life Technologies, Darmstadt, Germany). Thermal cycling was carried out according to the manufacturer's recommendations, and the relative expression levels were calculated using the comparative $\Delta\Delta$ Ct method. Each reaction contained 5 μ L of qPCRBIO SyGreen Blue Mix (PCR Biosystems, London, UK.; Cat. No. P820.15-05) and 50 nM of both forward and reverse primers.

The following primers, obtained from Sigma-Aldrich, were used: P2X1 Fw 5'-GAGAGTCGGGCCAGGACTTC-3', Rv 5'-GCGAATCCCAAACACCTTGA-3'; P2X2 Fw 5'-TCCCTCCCCACCTAGTCAC-3', Rv 5'-CACCACCTGCTCAGTCAGAGC-3'; P2X3 Fw 5'-CTGCCTAACCTACCGACAAG-3', Rv 5'-AATACCCAGAACGCCACCC-3'; P2X4 Fw 5'-CCCTTTGCTGCCAGATAT-3', Rv 5'-CCGTACGCCTGGTGAGTGT-3'; P2X5 Fw 5'-GGATGCCAATGTTGAGGTTGA-3', Rv 5'-TCCTGACGAACCCTCTCCAGT-3'; P2X6 Fw 5'-CCCAGAGCATCCTTCTGTTCC-3', Rv 5'-GGCACCAGCTCCAGATCTCA-3'; P2X7 Fw 5'-GGGAGGTGGTTCAGTGGGTAA-3', Rv 5'-GGATGCTGTGATCCCAACAAA-3'; P2Y1 Fw 5'-AACCGTGATGTGACCACTGA-3', Rv 5'-TTCAACTTGTCCGTTCCACA-3'; P2Y2 Fw 5'-TGCTGGGTCTGCTTTTTGCT-3', Rv 5'-ATCGGAAGGAGTAATAGAGGGT-3'; P2Y4 Fw 5'-TCGATTTGCAAGCCTTCTCT-3', Rv 5'-CCATAGGAGACCAGGGTGAT-3'; P2Y6 Fw 5'-TGCTGCTACC CCCAGTTTAC-3', Rv 5'-TGGCATAGAAGAGGAAGCGT-3'; P2Y12 Fw 5'-CTGTTTTTTGCTGGGCTCATC-3', Rv 5'-GCGGATCTGGAAGAAAATCCT3-3'; P2Y13 Fw 5'-GGATGCAGGGCTTCAACAA-3', Rv 5'-GCAGCTGTGTCATCCGAGTGT-3'; P2Y14 Fw 5'-GGTGGGTTTCGCCTCATGT-3', Rv 5'-CCTCAGGTGACCGGCATCT-3'; GAPDH Fw 5'-CATCACTGCCACCCAGAAGACTG-3'; Rv 5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCC TTCAG-3'.

2.5. Recording of Ca²⁺ Channel Currents

The membrane currents through voltage-activated Ca²⁺ channels were measured as previously described [24] using the whole-cell configuration of the patch clamp technique [25]. For current recordings, 2 mM Ba²⁺ (instead of 2 mM Ca²⁺) was used as a charge carrier. The cells were clamped at a –80 mV holding potential and were step depolarized to 0 or +10 mV from this holding potential for 50 ms applied at 30 s intervals to minimize current rundown [26].

Data were acquired at a sample frequency of 20 kHz using the PULSE 8.74 software (Heka Elektronik). The linear leakage and capacitive components were subtracted using a P/4 protocol, and series resistance was 80% compensated. The data analysis was performed using the Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA) and PULSE programs (Heka

Elektronik). All electrophysiological experiments were performed at room temperature (22 ± 2 °C).

2.6. Immunohistochemistry of Adrenal Glands

The adrenal glands were fixed with 4% PFA and, after 2 days, were cryoprotected in 30% sucrose solution. Then, they were cut with a slicing microtome into 20 μm slices. After the generous washing of the tissues with PBS and the blocking of the tissues with goat serum, the slices were incubated overnight with primary antibodies—antiCav1.3 (1:200; ACC-003; Alomone Labs; Jerusalem, Israel) and antiCav2.1 (1:200; ACC-001; Alomone labs)—and then with secondary antibodies (1:500). Finally, nuclei were stained with DAPI (1:500), and sections were mounted using ProLong Diamond (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Images were acquired using a confocal microscope (TCS SP5, Leica), and stacks were made with a step size of 3 μm and a 63X immersion oil objective. The expression of both VDCC subtypes was determined using IntDen with the Fiji ImageJ software.

2.7. Data Representation and Statistical Analysis

All data are represented as mean \pm SEM. Outlier identification was performed using the GraphPad Prism online tool Grubb's test (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA). The normality of the data was assessed using a Kolmogorov–Smirnov test. Depending on whether the data followed a normal distribution or not, the differences between the WT and 3xTg groups were evaluated with a t-student or Mann–Whitney U test, respectively, using GraphPad Prism 5. The results were considered significantly different if the p value was lower than 0.05.

3. Results

3.1. The Modulation of I_{Ba} by ATP in Chromaffin Cells Is Greater in 3xTg than in WT Mice

As described in the introduction, the ATP co-released with catecholamines during exocytosis exerts an autocrine-paracrine modulation of VDCC via G protein coupled receptors in CCs [20,21]. Since this modulation is altered in human pathological processes, such as pheochromocytoma [27], we examined whether ATP could differentially modulate I_{Ba} in CCs with aging and AD pathology. For this purpose, we used WT and 3xTg mice at 2 months (2m) and over 12 months age (>12 m).

In these experiments, I_{Ba} currents were elicited by 10 ms depolarizing pulses to 0 or +10 mV from a holding potential of -80 mV, as indicated in the protocol shown at the top of Figure 1A (below). Figure 1A shows a representative current trace obtained in a CC from a >12 m WT mice. The superfusion of the cell with a solution containing 10 μM of ATP decreased the amplitude of the current peak by approximately 30%. In a similar experiment conducted in 3xTg-AD age-paired CCs, the reduction in the current amplitude was greater (about 50%; Figure 1C).

Figure 1B,D show the normalized data for ATP-induced I_{Ba} modulation in a total of 42 WT and 55 3xTg CCs, respectively. ATP (10 μM) produced a current blockade of $28.11 \pm 1.01\%$ in the WT (Figure 1B) and $48.46 \pm 1.11\%$ in the 3xTg animals (Figure 1D). In both cases, the application of a short depolarizing pre-pulse to +100 mV preceding the test pulse significantly removed the ATP-induced current blockade (Figure 1B,D), as expected due to the G-protein mediated effect of ATP-induced modulation [21].

Figure 1E shows the concentration–response curves for ATP-induced I_{Ba} blockade obtained in the four experimental groups. A similar concentration dependence for ATP blockade was observed in 2 m animals, with I_{Ba} blockades of $30.35 \pm 1.01\%$ (WT) and $29.9 \pm 1.51\%$ (3xTg), upon superfusion of the cells with 10 μM ATP (Figure 1F). In CCs from 12m animals, the ATP-induced blockade increased from $28.11 \pm 1.10\%$ in WT cells to $48.45 \pm 1.10\%$ in 3xTg cells (Figure 1F), indicating a stronger modulatory effect in the second group of animals. At this point, we decided to further characterize whether this vari-

ation could be related to differences in the purinergic receptors that mediate the modulatory effects of ATP and/or in the population of VDCCs that are modulated by ATP.

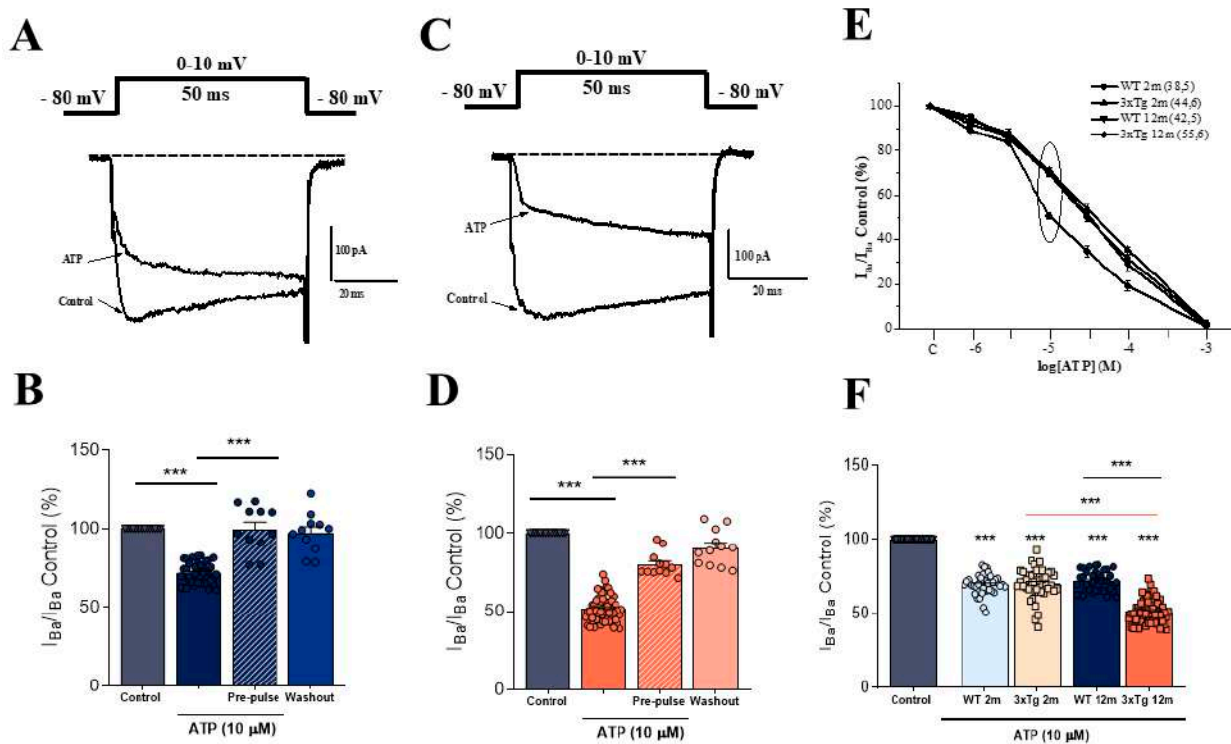


Figure 1. Modulation of I_{Ba} by ATP in wild-type (WT) and 3xTg chromaffin cells. Whole-cell I_{Ba} currents were elicited by 50 ms depolarizing test pulses to 0–+10 mV applied at 30 s intervals from a holding potential of –80 mV. (A,C) Representative I_{Ba} traces obtained in the absence (control) and the presence of 10 μ M ATP obtained from a WT (A) and 3xTg (C) CC. (B,D) Averaged pooled results obtained in these series of experiments in the 12 m WT group. Each dot corresponds to a single WT (B) and 3xTg (D) cell. Data (ordinate) were normalized as percent of control I_{Ba} (100% in the absence of ATP) with the exception of ATP cell. Bars represent mean \pm SEM. (E) Concentration–response curves for the ATP-induced blockade of the ATP-induced blockade of parabrachial group 1 (PBG) I_{Ba} blockade. (F) Averaged data ATP in each blockade-induced group (each dot corresponds to a single group). A one-way ANOVA statistical analysis with multiple comparisons was conducted to evaluate differences among all experimental groups. *** $p < 0.001$.

3.2. Effects of the Differential Expression of Purinergic Receptors on ATP-Induced I_{Ba} Modulation in a total of 48 WT and 55 3xTg GCs, respectively, ATP (10 μ M) produced a current blockade of 28.11 \pm 1.01% in the WT (Figure 1B) and 48.46 \pm 1.11% in the 3xTg cells (Figure 1D). In both cases, the application of a short depolarizing test pulse to 0–+10 mV preceding the test pulse significantly removed the ATP-induced current from WT and 3xTg (Figure 1B,D) as expected due to the hyperpolarization of the membrane potential (P2X) receptors. Figure 1E shows the concentration–response curves for ATP-induced I_{Ba} blockade obtained in the four groups. A similar increase in the relative expression of P2X₁ and P2X₂ (as observed) in comparative experiments on blockades of 30.95 \pm 1.01% (WT) and 29.9 \pm 1.5164 (3xTg) ATP. Similarly, the relative blockades with P2X₁ and P2X₂ (Figure 1E) in a 100% control animals as then ATP-induced (1.35) blockade (100%) was compared to 28.11 \pm 1.01% (WT) and 48.45 \pm 1.10% in 3xTg cells (Figure 1F), indicating a stronger modulatory effect in the second group of animals. At this point, we decided to further characterize whether this variation could be related to differences in the purinergic receptors that mediate the modulatory effects of ATP and/or in the population of VDCCs that are modulated by ATP.

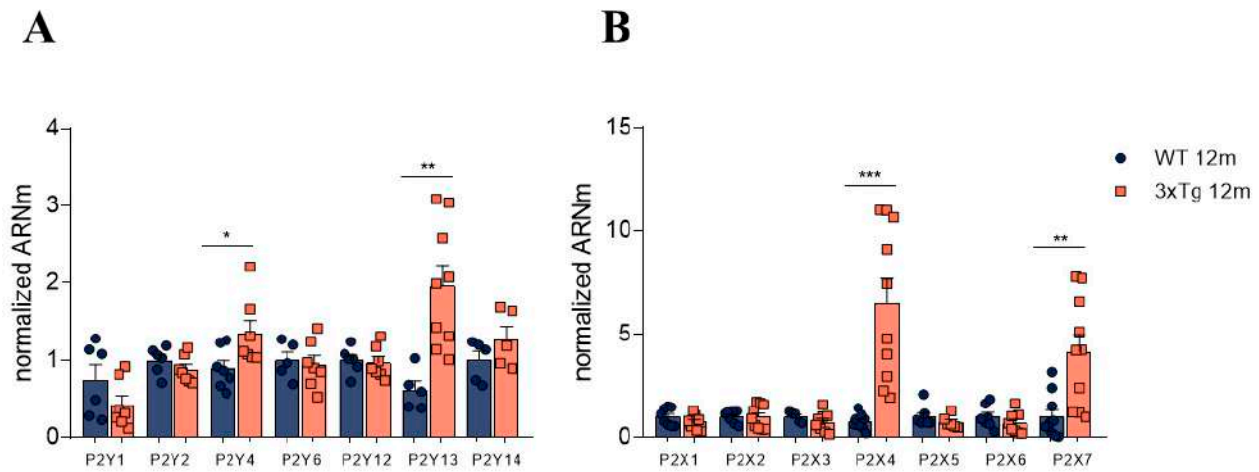


Figure 2. Normalized mRNA levels of the indicated receptors in adrenal medulla tissue obtained from WT and 3xTg mice that were more than 12 months old. (A) Normalized mRNA levels of fibroblast growth factor receptor (P2Y receptors). (B) Normalized mRNA levels of ionotropic purinergic receptors (P2X receptors). Each dot corresponds to the result of both pure and mixed groups. Bars represent mean \pm SEM. A Student's *t*-test was used to statistically compare the WT and 3xTg groups. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

When measuring the relative expression of the main ionotropic (P2X) purinergic receptors, we found a significant increase in the main ionotropic (P2X) purinergic receptor P2X7R found a significant increase in the mRNA levels of P2X4R (6.51 \pm 1.18 fold) and P2X7R (4.41 \pm 0.83 fold) in 3xTg mice compared to the age-paired control group. No significant differences were found between the WT and 3xTg-AD groups at 2 m of age (Data not shown).

3.3. Increase in P/Q Currents and Decrease in L Currents in 3xTg Mice

The expression of different subtypes of voltage-gated calcium channels (VDCC) in 3xTg mice (L type) and Cav2 (P/Q, N, and R type) in the ventral horn of the brain has been reported (previously in different studies [20,28–31]). In fact, L-type channels account for 40% of the total calcium current (I_{Ca}), and non-L-type (60%) channels consist of about 25% N type and 35% P/Q type [31].

We used supra-maximal concentrations of nifedipine (NIFE, 10 μ M), ω -conotoxin-GVIA (GVIA; 1 μ M) and ω -agatoxin IVA (AGAIVA; 1 μ M) which selectively block the L-, N- and P/Q components of inward currents through the VDCCs of CCs [20] to characterize possible differences in their expression related to the progression of AD. To this aim, we initially applied a series of 50-ms depolarizing pulses to +10 mV until the current peak was stabilized. Then, we added the different blockers (i.e., AGAIVA, GVIA, and nifedipine) to quantify the degree of blockade induced by each one. Figure 3A shows a representative I_{Ba} current recording from a WT CC (left panel) and a 3xTg CC (right panel), and the blockade induced by the addition of the different blockers, as indicated. Figure 3B shows the time course of I_{Ba} amplitude and its blockade after the cumulative addition of the different blockers. After blocker washout, only the L component of the I_{Ba} current (NIFE-sensitive) was recovered. These experiments suggest that the L-, N-, and P/Q-types of VDCCs are present in CCs isolated from both WT and 3xTg mice; however, some differences, particularly in the amplitude of the AGAIVA blockade, were observed.

cated. Figure 3B shows the time course of I_{Ba} amplitude and its blockade after the cumulative addition of the different blockers. After blocker washout, only the L component of the I_{Ba} current (NIFE-sensitive) was recovered. These experiments suggest that the L-, N-, and P/Q-types of VDCCs are present in CCs isolated from both WT and 3xTg mice; however, some differences, particularly in the amplitude of the AGAIVA blockade, were observed.

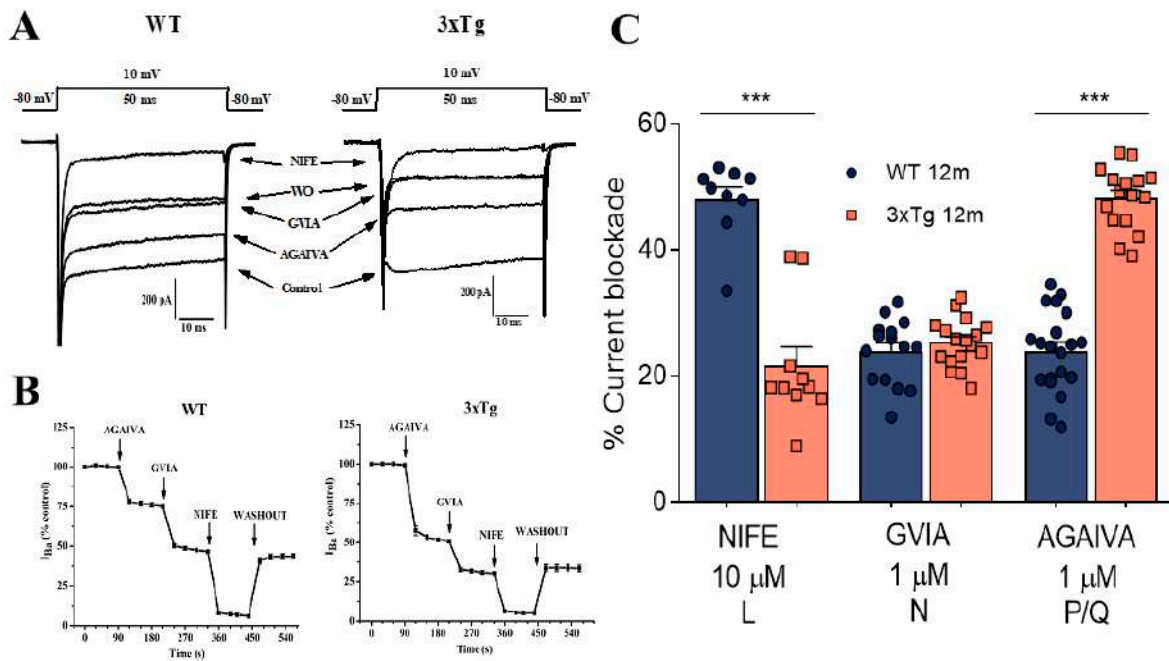


Figure 3. Pharmacological dissection of I_{Ba} subcomponents linked to different VDCC subtypes in chromaffin cells from WT and 3xTg mice older than 12 m. Cells were voltage-clamped at -80 mV and the I_{Ba} current was generated by 50-ms depolarizing pulses to $+10$ mV applied at 30 s intervals. The cells were sequentially fast perfused with an extracellular solution containing 2 mM Ba^{2+} in the absence (control current) and the presence of with an extracellular solution containing 2 mM Ba^{2+} in the presence (blocker current) of the different blockers. (A) Representative traces of I_{Ba} blockade were cumulatively added (panel B). (A) Representative I_{Ba} traces from a WT cell (left) and a 3xTg cell (right) each trace was selected from the time course of I_{Ba} traces after 2 min of cell perfusion with each blocker and once the steady state equilibrium of the new level of the peak I_{Ba} current was reached. (C) Pooled averaged results on the extent of peak I_{Ba} blockade (at equilibrium) elicited by each blocker (abscissa); note that only one blocker was tested in each cell. The percent blockade was calculated by normalizing the control I_{Ba} to 100% and expressing the I_{Ba} blockade elicited by each blocker within each individual cell. Bars represent mean \pm SEM. Student's *t*-test was used to statistically compare the WT and 3xTg groups. *** $p < 0.001$.

To measure potential differences in the activity of VDCC subtypes, we applied the different drugs separately. Figure 3C shows the averaged pooled results of 22 WT and 23 3xTg CCs, derived from a total number of five animals from each experimental group. In these experiments, GVIA exerted a similar blockade—nearly 25% of the whole-cell current. However, large differences were found in the L and P/Q components. The nifedipine blockade was halved in 3xTg cells compared to WT control cells (from $47.96 \pm 2.12\%$ to $21.56 \pm 1.38\%$). In the case of AGAIVA, the I_{Ba} blockade increased from $23.90 \pm 1.47\%$ in WT cells to 48.18 ± 1.23 in 3xTg cells, suggesting that a reduction in the L-type current is compensated by a larger I_{Ba} fraction of P/Q channels in 3xTg mice.

3.4. In 3xTg Adrenal Medulla There Is an Increase in P/Q Channels and a Decrease in L Subtype Channel Expression

In order to assess whether the differences found in the currents flowing through the different VDCC subtypes in >12 m 3xTg mice correlated with changes in their expression, we measured the mRNA levels of the channels in both WT and 3xTg adrenal medullae using RT-qPCR.

Figure 4A shows the averaged data of the normalized mRNA levels for the different VDCCs found in 3xTg relative to WT. We found that the relative expression of the L subtype of VDCCs was significantly decreased in >12 m 3xTg mice compared to the age-matched

In order to assess whether the differences found in the currents flowing through the different VDCC subtypes in >12 m 3xTg mice correlated with changes in their expression, we measured the mRNA levels of the channels in both WT and 3xTg adrenal medullae using RT-qPCR.

Figure 4A shows the averaged data of the normalized mRNA levels for the different VDCCs found in 3xTg relative to WT. We found that the relative expression of the L subtype of VDCCs was significantly decreased in >12 m 3xTg mice compared to the age-matched control group (0.181 ± 0.04 AU in 3xTg, 1.000 ± 0.188 AU in WT). The opposite was observed for the P/Q subtype, which showed an almost three-fold increase in mRNA levels in 3xTg (2.481 ± 0.396 relative to WT) mice (0.886 ± 0.147 ; Figure 4C).

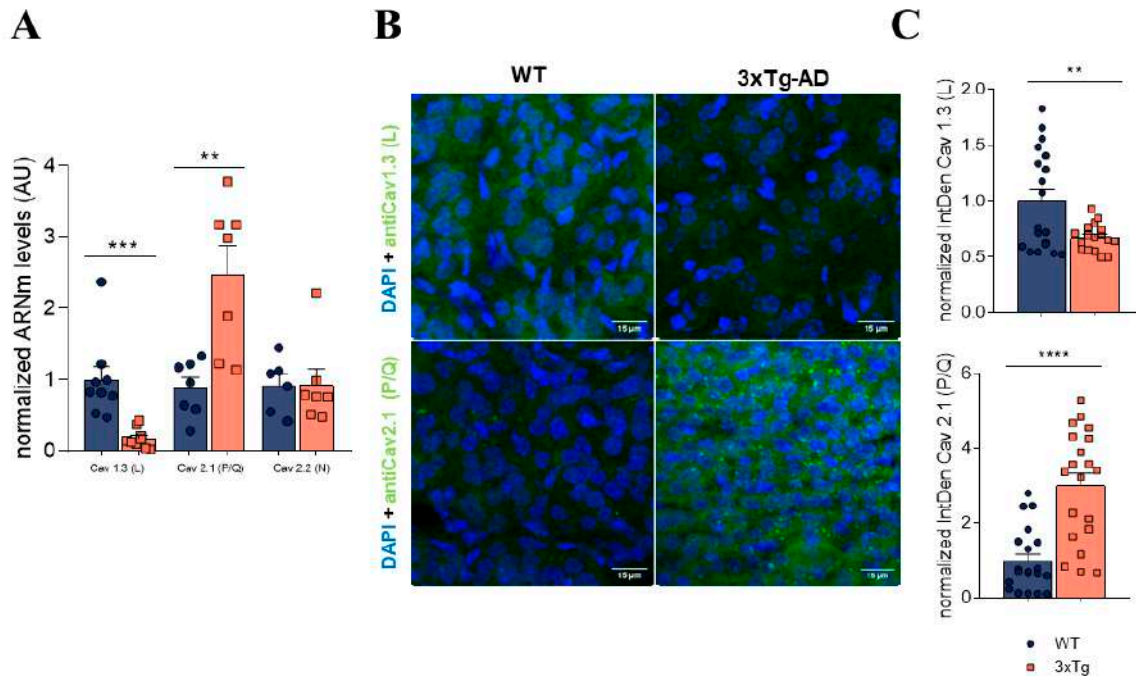


Figure 4. Analysis of mRNA levels and the expression of different VDCC subtypes in adrenal medullae of WT and 3xTg mice over 12 m age. (A) Normalized mRNA levels of different VDCCs in adrenal medullae from WT and 3xTg mice >12 m. Both medullas of the same mouse were homogenized, so each dot represents an individual mouse. (B) Representative image of WT and 3xTg adrenal medulla stained with anti-Cav1.3 (top) and anti-Cav2.1 (bottom) + DAPI (nuclei). (C) IntDen quantification of calcium channel expression. Each dot represents an image analyzed, and the bars represent mean ± SEM. A Student's *t*-test was used to statistically compare the WT and 3xTg groups. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

To correlate the VDCC mRNA levels with their expression in the cell membrane, immunohistochemistry experiments were performed on adrenal gland slices. By using specific antibodies targeting the L and P/Q subtypes of VDCCs, we found a decreased expression of L-type VDCCs in the 3xTg adrenal medulla and an increased expression of the P/Q type. Figure 4B shows representative adrenal slices incubated with L-type (top) and P/Q (bottom) antibodies. Figure 4C displays the average data from the *IntDen* analysis of L-type (top) and P/Q-type (bottom) expression from a total number of five animals of each experimental group. Thus, it seems that the observed alterations in VDCC activity in 3xTg mice may be due to a differential expression of these channels in the CC membrane.

3.5. Alterations Observed in mRNA Levels of Purinergic Receptors and Calcium Channels Are Found Also in the Hippocampus

Similar to what occurs in adrenomedullary CCs, hippocampal neurons and microglial cells also express different subtypes of purinergic receptors [32] and VDCCs [33]. Therefore, we questioned whether the alterations we found regarding the mRNA levels of purinergic receptors and VDCCs in the CCs might also be present in the hippocampus.

Similar to our findings from the adrenal medulla, the levels of P2Y13R were also elevated in the hippocampus. However, the same did not occur in case of P2Y4R levels (Figure 5A). Regarding the ionotropic P2X receptors, the observed changes in mRNA levels in the adrenal medulla were similar to those found in the hippocampus, with a higher mRNA content of P2X4R and P2X7R in >12 m 3xTg mice (Figure 5B).

synthesize and secrete catecholamines. While the most common sign of pheochromocytoma is hypertension, additional symptoms include episodes of headaches, palpitation, anxiety, and sweating related to excess catecholamine secretion [37]. One of the few physiological studies that has been conducted on cultured human pheochromocytoma cells [27] revealed that they express densities and proportions of L, N, and P/Q types of voltage-gated Ca^{2+} channels similar to those of normal human CCs [38]. Nonetheless, the extent of the downmodulation of Ca^{2+} currents by ATP and opioids is quite heterogeneous in these cells. It was found that normal CCs coexist with pathological CCs that escape the autocrine-paracrine downmodulation of Ca^{2+} channels and, hence, may produce abnormal Ca^{2+} signals and catecholamine hypersecretion.

Alterations in the autocrine-paracrine modulation of catecholamine release have been also described in hypertension. A study conducted with spontaneously hypertensive rats (SHRs) showed a greater modulation of I_{Ba} by ATP in SHR compared with normotensive rat CCs [24]. In addition, it was also found that SHR CCs had a lower density of L-type VDCCs that was compensated for by a higher density of PQ-type channels, an effect similar to that found in the present study in CCs isolated from aged 3xTg mice (see Figure 3C).

The expected increase in catecholamine release under stressful situations in AD patients as a consequence of the reversion of VDCC modulation under these conditions could explain the appearance of non-cognitive symptoms as AD progresses. It has been determined that in advanced AD stages, in addition to the initial cognitive symptoms, non-cognitive behavioral problems, particularly agitation and aggression, become prevalent in AD patients [39]. As the noradrenergic system has been implicated in the disorder of behavior in animals, as well as other psychiatric disorders, it has been suggested that norepinephrine may likely play a role in the non-cognitive behavioral disturbances associated with AD [40]. As a result of this noradrenergic overactivation, AD patients would no longer be able to focus their attention, and their mechanisms of coping with stressful stimuli would be compromised. Even in the absence of stressful stimuli, the noradrenergic system would be active. This may account for the increased aggression displayed in many AD patients [39].

To further identify the mechanisms involved in the increased modulation of catecholamine secretion observed in 3xTg CCs that occurs with AD progression, we decided to study possible changes in the two main elements involved in ATP-induced modulation, i.e., the purinergic receptors and the VDCCs.

Firstly, regarding the expression of purinergic receptors, our data indicate that upon the progression of AD in 3xTg mice, a significant three-fold increase in the relative expression of P2Y13 receptor mRNA compared to expression in control WT animals occurs (Figure 2). The modulation of catecholamine release by ATP is thought to be mediated by a P2Y purinergic receptor [21]. Unfortunately, the absence of selective pharmacology (i.e., selective agonists or antagonists) precludes the characterization of the P2Y receptor subtypes implicated in this modulation. It should be noted that the levels of P2Y13 receptor mRNA were also increased in hippocampus (Figure 5). A cytoprotective activity mediated through an increase in the activity of heme oxygenase and by the enhanced expression of transcription factor Nrf2, which prevents neuronal death due to oxidative stress, has been described for P2Y13 receptors [41,42]; therefore, the observed increased expression of this receptor subtype could be interpreted as a compensatory, neuroprotective mechanism that occurs during AD progression [43].

In parallel to the determination of P2Y receptor mRNA levels, although purinergic ionotropic (P2X) receptors do not appear to be involved in the modulating effects of ATP, we decided to also characterize possible changes in these receptors that could be related to the progression of AD. In these experiments, we found a significant increase in mRNA levels of P2X4 and P2X7 receptors in 12-month-old 3xTg mice with respect to the age-matched control animals, both in the adrenal medulla tissue (Figure 2) and hippocampus (Figure 5). P2X4 and P2X7 receptors seem to be involved in inflammatory signals in neurodegenerative

diseases. Among other functions, it has been reported that microglial activation results in the upregulation of P2X4 and P2X7 [44].

Other authors have reported an increase in these receptors in different neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease [45]; they have therefore been proposed as potential therapeutic targets for the treatment of these diseases. Regarding the P2X7 receptor, there are studies that have reported its relationship with the formation of A β plaques in AD patients, in which this receptor has been found to be overexpressed [46,47]. The P2X7 receptor, as previously discussed, has an important role in neuroinflammation; thus, it may be implicated in the maintenance of the characteristic pro-inflammatory environment in AD pathophysiology by releasing pro-inflammatory interleukins and cytokines via caspase 1 activation [48].

Finally, regarding possible modifications in the expression of VDCCs related to AD progression in 3xTg mice, we found a significant decrease in both the inward currents through VDCCs and the expression levels of L-type VDCCs, which was compensated by an increase in P/Q-type VDCCs (Figures 3C and 5C). It should be noted that the voltage-dependent modulation induced by ATP and other neurotransmitters affects non-L-type (mainly P/Q) VDCCs [20,27,33]. Moreover, as previously mentioned, similar changes in the relative expression of VDCC subtypes have been reported in other pathologies, such as hypertension, where an altered regulation of the sympathoadrenal axis is also observed [38].

Despite the contributions that this work provides to the field, there are three major limitations that should be addressed in future research. First, although the 3xTg mouse model fulfills many pathophysiological traits present in AD patients, there may be species-related differences that prevent the application of these observations to human pathology. Therefore, further investigations should be performed using human samples from AD patients' necropsy, or in models including induced pluripotent stem cells derived from AD patients.

On the other hand, in order to address if the observed alterations of the purinergic receptors' expression at the transcriptional level lead to differences at the translational level, and also to see their location in the cell membrane, it would be desirable to conduct some immunohistochemistry or Western blot experiments. Finally, further research into the synthesis of pharmacological compounds that provides selective agonists and antagonist for the different P2Y receptors would be very helpful for elucidating the specific contribution of the different metabotropic purinergic receptors to the modulation of VDCCs.

5. Conclusions

In conclusion, an impairment in the sympathoadrenal axis seems to occur with the progression of AD in the 3xTg mouse model of this disease. This alteration is evidenced by the increased autocrine-paracrine modulation of VDCC activity, which is reversed during stressful conflicts and may produce an increase in catecholamine secretion that, in turn, could be involved in the appearance of non-cognitive symptoms as AD progresses.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biology11040511/s1>, Figure S1: behavioral changes in 3xTg mice related to disease progression.

Author Contributions: Conceptualization, L.G. and A.M.-M.; methodology, A.M.-M., A.S.-M. and R.d.P.; writing—original draft preparation, A.M.-M., A.S.-M. and R.d.P.; writing—review and editing, A.M.-M., I.C. and L.G.; supervision, L.G.; project administration, L.G.; funding acquisition, L.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), grant number SAF2017-78892-R. Additionally, A.M.M. has a fellowship from the Spanish Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Ref. FPU2016/02559).

Institutional Review Board Statement: All experimental procedures were performed following the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were previously approved by the institutional Ethics Committee of the Universidad Autónoma de Madrid and the Comunidad Autónoma of

Madrid, Spain, (PROEX 075/18) following the European Guidelines for the use and care of animals for research in accordance with the European Union Directive of 22 September 2010 (2010/63/UE) and with the Spanish Royal Decree of 1 February 2013 (53/2013).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy.

Acknowledgments: We would like to thank Instituto/Fundación Teófilo Hernando for its continued support. We would also like to thank María Dolores Morales-García from the Confocal Unit of the Universidad Autónoma de Madrid and Nuria García-Magro from the Anatomy Department of the Universidad Autónoma de Madrid. We also thank BioRender for allowing us to generate the graphical abstract (created with [Biorender.com](https://www.biorender.com), accessed on 11 February 2022).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Hardy, J.; Selkoe, D.J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* **2002**, *297*, 353–356. [[CrossRef](#)]
- Selkoe, D.J. Alzheimer's Disease Is a Synaptic Failure. *Science* **2002**, *298*, 789–791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hampel, H.; Mesulam, M.-M.; Cuello, C.; Khachaturian, A.S.; Vergallo, A.; Farlow, M.R.; Snyder, P.J.; Giacobini, E. Revisiting the cholinergic hypothesis in alzheimer's disease: Emerging evidence from translational and clinical research. *J. Prev. Alzheimer's Dis.* **2018**, *6*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bartus, R.T.; Dean, R.L., III; Beer, B.; Lippa, A.S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **1982**, *217*, 408–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bell, K.F.; Cuello, A.C. Altered synaptic function in Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *545*, 11–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bornstein, S.R.; Ehrhart-Bornstein, M.; Androutsellis-Theotokis, A.; Eisenhofer, G.; Vukicevic, V.; Licinio, J.; Wong, M.L.; Calissano, P.; Nisticò, G.; Preziosi, P.; et al. Chromaffin cells: The peripheral brain. *Mol. Psychiatry* **2012**, *17*, 354–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zhang, C.; Wu, B.; Beglopoulos, V.; Wines-Samuelson, M.; Zhang, D.; Dragatsis, I.; Südhof, T.C.; Shen, J. Presenilins are essential for regulating neurotransmitter release. *Nature* **2009**, *460*, 632–636. [[CrossRef](#)]
- Larsen, K.E.; Schmitz, Y.; Troyer, M.D.; Mosharov, E.; Dietrich, P.; Quazi, A.Z.; Savalle, M.; Nemani, V.; Chaudhry, F.A.; Edwards, R.H.; et al. Synuclein Overexpression in PC12 and Chromaffin Cells Impairs Catecholamine Release by Interfering with a Late Step in Exocytosis. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 11915–11922. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Liao, M.; Shen, J.; Zhang, Y.; Li, S.-H.; Li, X.-J.; Li, H. Immunohistochemical Localization of Huntingtin-associated Protein 1 in Endocrine System of the Rat. *J. Histochem. Cytochem.* **2005**, *53*, 1517–1524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- MacKenzie, K.D.; Duffield, M.D.; Peiris, H.; Phillips, L.; Zanin, M.P.; Teo, E.H.; Zhou, X.-F.; Keating, D.J. Huntingtin-associated protein 1 regulates exocytosis, vesicle docking, readily releasable pool size and fusion pore stability in mouse chromaffin cells. *J. Physiol.* **2014**, *592*, 1505–1518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mackenzie, K.D.; Lim, Y.; Duffield, M.D.; Chataway, T.; Zhou, X.-F.; Keating, D.J. Huntingtin-associated protein-1 (HAP1) regulates endocytosis and interacts with multiple trafficking-related proteins. *Cell. Signal.* **2017**, *35*, 176–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Calvo-Gallardo, E.; De Pascual, R.; Fernández-Morales, J.-C.; Arranz-Tagarro, J.-A.; Maroto, M.; Nanclares, C.; Gandía, L.; De Diego, A.M.G.; Padín, J.-F.; García, A.G. Depressed excitability and ion currents linked to slow exocytotic fusion pore in chromaffin cells of the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2015**, *308*, C1–C19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- De Diego, A.M.; Lorrio, S.; Calvo-Gallardo, E.; Garcia, A.G. Smaller quantal size and faster kinetics of single exocytotic events in chromaffin cells from the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *428*, 482–486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Johnson, M.; Villanueva, M.; Haynes, C.L.; Seipel, A.T.; Buhler, L.A.; Wightman, R.M. Catecholamine exocytosis is diminished in R6/2 Huntington's disease model mice. *J. Neurochem.* **2007**, *103*, 2102–2110. [[CrossRef](#)]
- Martínez-Ramírez, C.; Baraibar, A.M.; Nanclares, C.; Méndez-López, I.; Gómez, A.; Muñoz, M.P.; De Diego, A.M.G.; Gandía, L.; Casarejos, M.J.; García, A.G. Altered excitability and exocytosis in chromaffin cells from the R6/1 mouse model of Huntington's disease is linked to over-expression of mutated huntingtin. *J. Neurochem.* **2018**, *147*, 454–476. [[CrossRef](#)]
- Calorio, C.; Gavello, D.; Guarina, L.; Salio, C.; Sassoè-Pognetto, M.; Riganti, C.; Bianchi, F.T.; Hofer, N.T.; Tuluc, P.; Obermair, G.J.; et al. Impaired chromaffin cell excitability and exocytosis in autistic Timothy syndrome TS2-neo mouse rescued by L-type calcium channel blockers. *J. Physiol.* **2019**, *597*, 1705–1733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- De Diego, A.M.G.; Ortega-Cruz, D.; García, A.G.G. Disruption of Exocytosis in Sympathoadrenal Chromaffin Cells from Mouse Models of Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cannon, W.B. Organization for physiological homeostasis. *Physiol. Rev.* **1929**, *9*, 399–431. [[CrossRef](#)]
- Hernández-Guijo, J.-M.; Gandía, L.; Lara, B.; García, A.G. Autocrine/paracrine modulation of calcium channels in bovine chromaffin cells. *Pflügers Archiv. Eur. J. Physiol.* **1998**, *437*, 104–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

20. García, A.G.; García-De-Diego, A.M.; Gandia, L.; Borges, R.; Garcia-Sancho, J. Calcium Signaling and Exocytosis in Adrenal Chromaffin Cells. *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 1093–1131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Gandía, L.; Garcia, A.G.; Morad, M. ATP modulation of calcium channels in chromaffin cells. *J. Physiol.* **1993**, *470*, 55–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Albillos, A.; Carbone, E.; Gandia, L.; Garcia, A.G.; Polio, A. Opioid Inhibition of Ca²⁺ Channel Subtypes in Bovine Chromaffin Cells: Selectivity of Action and Voltage-dependence. *Eur. J. Neurosci.* **1996**, *8*, 1561–1570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Oddo, S.; Caccamo, A.; Shepherd, J.D.; Murphy, M.P.; Golde, T.E.; Kaye, R.; Metherate, R.; Mattson, M.P.; Akbari, Y.; LaFerla, F.M. Triple-Transgenic Model of Alzheimer’s Disease with Plaques and Tangles: Intracellular Abeta and Synaptic Dysfunction. *Neuron* **2003**, *39*, 409–421. [[CrossRef](#)]
24. de Pascual, R.; Miranda-Ferreira, R.; Galvão, K.M.; Lameu, C.; Ulrich, H.; Smaili, S.S.; Jurkiewicz, A.; García, A.G.; Gandía, L. Lower density of L-type and higher density of P/Q-type of calcium channels in chromaffin cells of hypertensive, compared with normotensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *706*, 25–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Hamill, O.P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B.; Sigworth, F.J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* **1981**, *391*, 85–100. [[CrossRef](#)]
26. Fenwick, E.M.; Marty, A.; Neher, E. Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* **1982**, *331*, 599–635. [[CrossRef](#)]
27. Hernández-Guijo, J.M.; Gandia, L.; Cuchillo-Ibañez, I.; Albillos, A.; Novalbos, J.; Gilsanz, F.; Larrañaga, E.; De Pascual, R.; Abad, F.; Garcia, A.G. Altered regulation of calcium channels and exocytosis in single human pheochromocytoma cells. *Pflügers Archiv. Eur. J. Physiol.* **2000**, *440*, 253–263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Carbone, E.; Borges, R.; Eiden, L.E.; Garcia, A.G.; Hernandez-Cruz, A. Chromaffin Cells of the Adrenal Medulla: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Compr. Physiol.* **2019**, *9*, 1443–1502. [[CrossRef](#)]
29. Albillos, A.; Neher, E.; Moser, T. R-Type Ca²⁺ Channels Are Coupled to the Rapid Component of Secretion in Mouse Adrenal Slice Chromaffin Cells. *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 8323–8330. [[CrossRef](#)]
30. Mahapatra, S.; Calorio, C.; Vandael, D.; Marcantoni, A.; Carabelli, V.; Carbone, E. Calcium channel types contributing to chromaffin cell excitability, exocytosis and endocytosis. *Cell Calcium* **2012**, *51*, 321–330. [[CrossRef](#)]
31. Hernández-Guijo, J.M.; de Pascual, R.; García, A.G.; Gandía, L. Separation of calcium channel current components in mouse chromaffin cells superfused with low- and high-barium solutions. *Pflügers Archiv. Eur. J. Physiol.* **1998**, *436*, 75–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Lommen, J.; Detken, J.; Harr, K.; von Gall, C.; Ali, A. Analysis of Spatial and Temporal Distribution of Purinergic P2 Receptors in the Mouse Hippocampus. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Vinet, J.; Sík, A. Expression pattern of voltage-dependent calcium channel subunits in hippocampal inhibitory neurons in mice. *Neuroscience* **2006**, *143*, 189–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Albillos, A.; Gandia, L.; Michelena, P.; A Gilabert, J.; Del Valle, M.; Carbone, E.; García, A.G. The mechanism of calcium channel facilitation in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* **1996**, *494*, 687–695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Hernandez, A.; Segura-Chama, P.; Albiñana, E.; Hernández-Cruz, A.; Hernández-Guijo, J.M. Down-Modulation of Ca²⁺ Channels by Endogenously Released ATP and Opioids: From the Isolated Chromaffin Cell to the Slice of Adrenal Medullae. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2010**, *30*, 1209–1216. [[CrossRef](#)]
36. Hernández, A.; Segura-Chama, P.; Jiménez, N.; García, A.G.; Hernández-Guijo, J.M.; Hernández-Cruz, A. Modulation by endogenously released ATP and opioids of chromaffin cell calcium channels in mouse adrenal slices. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2011**, *300*, C610–C623. [[CrossRef](#)]
37. Amar, L.; Servais, A.; Gimenez-Roqueplo, A.-P.; Zinzindohoue, F.; Chatellier, G.; Plouin, P.-F. Year of Diagnosis, Features at Presentation, and Risk of Recurrence in Patients with Pheochromocytoma or Secreting Paraganglioma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90*, 2110–2116. [[CrossRef](#)]
38. Gandía, L.; Mayorgas, I.; Michelena, P.; Cuchillo, I.; de Pascual, R.; Abad, F.; Novalbos, J.M.; Larrañaga, E.; García, A.G. Human adrenal chromaffin cell calcium channels: Drastic current facilitation in cell clusters, but not in isolated cells. *Pflügers Archiv—Eur. J. Physiol.* **1998**, *436*, 696–704. [[CrossRef](#)]
39. Herrmann, N.; Lanctôt, K.L.; Khan, L.R. The Role of Norepinephrine in the Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **2004**, *16*, 261–276. [[CrossRef](#)]
40. Raskind, M.A.; Peskind, E.R. Neurobiologic bases of noncognitive behavioral problems in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **1994**, *8*, 54–60. [[CrossRef](#)]
41. Cieślak, M.; Wojtczak, A. Role of purinergic receptors in the Alzheimer’s disease. *Purinergic Signal.* **2018**, *14*, 331–344. [[CrossRef](#)]
42. Espada, S.; Ortega, F.; Molina-Jijón, E.; Rojo, A.I.; Pérez-Sen, R.; Pedraza-Chaverri, J.; Miras-Portugal, M.T.; Cuadrado, A. The purinergic P2Y₁₃ receptor activates the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced neuronal death. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49*, 416–426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Pérez-Sen, R.; Queipo, M.J.; Morente, V.; Ortega, F.; Delicado, E.G.; Miras-Portugal, M.T. Neuroprotection Mediated by P2Y₁₃ Nucleotide Receptors in Neurons. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2015**, *13*, 160–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Zarrinmayeh, H.; Territo, P.R. Purinergic Receptors of the Central Nervous System: Biology, PET Ligands, and Their Applications. *Mol. Imaging* **2020**, *19*, 1536012120927609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Calzaferri, F.; Ruiz-Ruiz, C.; De Diego, A.M.G.; De Pascual, R.; Méndez-López, I.; Cano-Abad, M.F.; Maneu, V.; Ríos, C.D.L.; Gandía, L.; García, A.G. The purinergic P2X7 receptor as a potential drug target to combat neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Med. Res. Rev.* **2020**, *40*, 2427–2465. [[CrossRef](#)]
46. Martin, E.; Amar, M.; Dalle, C.; Youssef, I.; Boucher, C.; Le Duigou, C.; Brückner, M.; Prigent, A.; Sazdovitch, V.; Halle, A.; et al. New role of P2X7 receptor in an Alzheimer's disease mouse model. *Mol. Psychiatry* **2019**, *24*, 108–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. McLarnon, J.G.; Ryu, M.J.K.; Walker, D.G.; Choi, B.H.B. Upregulated Expression of Purinergic P2X7Receptor in Alzheimer Disease and Amyloid- β Peptide-Treated Microglia and in Peptide-Injected Rat Hippocampus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2006**, *65*, 1090–1097. [[CrossRef](#)]
48. Adinolfi, E.; Giuliani, A.L.; De Marchi, E.; Pegoraro, A.; Orioli, E.; Di Virgilio, F. The P2X7 receptor: A main player in inflammation. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *151*, 234–244. [[CrossRef](#)]