



Instituto-Fundación Teófilo Hernando de I+D del Medicamento  
Departamento de Farmacología y Terapéutica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid

# **Alteraciones de la neurotransmisión relacionadas con la progresión de la enfermedad de Alzheimer en ratones transgénicos 3xTg-AD**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por

**Carmen Pérez de Nanclares Fernández**

Director:

**Luis Gandía Juan**

Madrid, enero de 2017

# ÍNDICE

<b>MARCO DE LA TESIS DOCTORAL .....</b>	<b>1</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER .....	7
1.1 <i>Hipótesis fisiopatológicas en la enfermedad de Alzheimer</i> .....	8
1.2 <i>Modelos para el estudio de la enfermedad de Alzheimer</i> .....	16
1.2.1 Ratón triple transgénico (3xTg-AD): Modelo de enfermedad de Alzheimer.....	19
2. LA CÉLULA CROMAFÍN COMO MODELO NEUROSECRETOR.....	22
2.1 <i>La célula cromafín adrenomedular</i> .....	23
2.1.1 Funciones fisiológicas de la célula cromafín.....	25
2.1.2 Acoplamiento excitación-secreción en la célula cromafín .....	25
2.1.3 El proceso de exocitosis en la célula cromafín.....	27
2.1.4 Similitudes entre la célula cromafín y la neurona simpática.....	30
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
1. ANIMALES UTILIZADOS.....	41
2. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS CROMAFINES DE RATÓN .....	41
3. TÉCNICA DE AMPEROMETRÍA.....	43
3.1 <i>Descripción de la técnica</i> .....	44
3.2 <i>Electrodos de amperometría</i> .....	46
3.2.1 Construcción.....	46
3.2.2 Calibrado .....	47
4. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS .....	48
4.1 <i>Descripción de la técnica</i> .....	49
4.1.1 Registro de las corrientes iónicas .....	52
4.1.2 Registro de la excitabilidad celular .....	53
4.1.3 Construcción de las pipetas de “patch clamp”.....	55
5. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR “WESTERN BLOT” .....	55
5.1 <i>Extracción de las proteínas de membrana</i> .....	56
5.2 <i>Extracción de proteínas totales</i> .....	56
5.3 <i>Cuantificación de proteínas</i> .....	57
5.4 <i>Separación e identificación de proteínas</i> .....	58
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	62
6.1 <i>Registros amperométricos</i> .....	62
6.2 <i>Registros electrofisiológicos</i> .....	63
6.2.1 Corrientes iónicas .....	63
6.2.2 Potencial de membrana.....	63
6.3 <i>Cuantificación de proteínas</i> .....	64
7. SOLUCIONES Y PRODUCTOS QUÍMICOS.....	65
7.1 <i>Soluciones para el cultivo celular</i> .....	65
7.1.1 Solución Locke .....	65
7.1.2 Solución de cultivo DMEM.....	65
7.2 <i>Soluciones para amperometría</i> .....	65
7.2.1 Solución Krebs-HEPES estándar.....	65
7.2.2 Solución Krebs-HEPES alto potasio (70 mM).....	66
7.3 <i>Soluciones para registros electrofisiológicos</i> .....	66

7.3.1	Soluciones extracelulares .....	66
7.3.2	Soluciones intracelulares.....	66
7.3.2.1	Solución intracelular INC.....	66
7.3.2.2	Solución intracelular KCC .....	67
7.4	<i>Soluciones para inmunodetección de proteínas (“western blot”)</i> .....	67
7.4.1	Soluciones para extracción de proteínas de membrana.....	67
7.4.2	Soluciones para extracción de proteínas totales .....	67
7.4.2	Soluciones para cuantificación de proteínas .....	68
7.4.2.1	Solución de BSA .....	68
7.4.2.2	Reactivo A.....	68
7.4.2.3	Reactivo B .....	68
7.4.3	Soluciones para separación e identificación de proteínas .....	68
7.4.3.1	Gel de apilamiento (“Stacking gel”) .....	68
7.4.3.2	Gel de resolución (“Resolving gel”) .....	68
7.4.3.3	Tris-HCl pH 6.8.....	69
7.4.3.4	Tris-HCl pH 8.8.....	69
7.4.3.5	Tampón de carga .....	69
7.4.3.6	Tampón de electroforesis .....	69
7.4.3.7	Tampón de transferencia .....	70
7.4.3.8	TBS.....	70
7.4.3.9	TBST .....	70
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>71</b>
1.	REGISTROS AMPEROMÉTRICOS EN EL RATÓN 3xTG-AD .....	73
1.1	<i>Secreción cuantitativa de catecolaminas y análisis cinético de eventos exocitóticos únicos en respuesta a ACh</i> .....	74
1.2	<i>Secreción cuantitativa de catecolaminas y análisis cinético de eventos exocitóticos únicos en respuesta a K<sup>+</sup></i> .....	78
1.3	<i>Secreción cuantitativa de catecolaminas y análisis cinético durante la formación del poro de fusión en respuesta a ACh</i> .....	80
1.4	<i>Secreción cuantitativa de catecolaminas y análisis cinético durante la formación del poro de fusión en respuesta a K<sup>+</sup></i> .....	82
1.5	<i>Diferentes tipos de eventos exocitóticos en CCs de ratones 3xTg-AD</i> .....	83
2.	REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS EN EL RATÓN 3xTG-AD.....	85
2.1	Corrientes iónicas en CCs de ratones 3xTg-AD .....	85
2.2	Potencial de membrana en CCs de ratones 3xTg-AD.....	89
2.2.1	Análisis cinético de los potenciales de acción .....	90
3.	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA EXOCITOSIS EN EL RATÓN 3xTG-AD .....	94
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>99</b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>115</b>
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>119</b>

# ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>:** Concentración de calcio en el citosol

**ACh:** Acetilcolina

**AMPA:** Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico

**APP:** Proteína precursora amiloide

**ATP:** Trifosfato de adenina

**A $\beta$ :** Péptido amiloide beta

**BSA:** Albúmina de suero bovino

**CCDVs:** Canales de calcio dependientes de voltaje

**CC:** Célula cromafín

**CCR:** Célula cromafín de ratón

**DMEM:** Medio de Dulbecco Modificado por Eagle

**EA:** Enfermedad de Alzheimer

**EAF:** Enfermedad de Alzheimer familiar

**SEM:** Error estándar de la media

**EGTA:** Ácido etilenglicol-bis(beta-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraacético

**GTP:** Trifosfato de guanina

**HEPES:** (N-[2-hidroxiethyl]-piperacino-N'-[2-ácido etanosulfónico])

**I:** Corriente

**I<sub>ACh</sub>:** Corriente nicotínica evocada por acetilcolina

**I<sub>Ca</sub>:** Corriente de calcio

**I<sub>K</sub>:** Corriente de potasio

**I<sub>K(Ca)</sub>:** Componente dependiente de calcio de la corriente de potasio

**I<sub>K(V)</sub>:** Componente dependiente de voltaje de la corriente de potasio

**I<sub>Na</sub>:** Corriente de sodio

**nAChR:** Receptor nicotínico neuronal para la acetilcolina

**NMDA:** Ácido N-metil-D-aspartico

**p:** Probabilidad

**PA:** Potencial de acción

**PS ó PSEN:** Proteína presenilina

**PVDF:** Polifluoruro de vinilideno

**RE:** Retículo endoplásmico

**SD:** Síndrome de Down

**SNAP-25:** Proteína asociada al sinaptosoma-25

**SNC:** Sistema nervioso central

**TEA:** Tetraetilamonio

**VAMP2:** Proteína de membrana asociada a vesículas-2

**V<sub>m</sub>:** Potencial de membrana

**TBS:** Tampón Tris salino

**TBST:** Tampón Tris salino con Tween-20

**$\Omega$ :** Ohmios



**“Lo que más se necesita para aprender es un espíritu humilde”**

**Confucio. Pensador chino (551 a. C-479 a. C)**

---

# **MARCO DE LA TESIS DOCTORAL**



El trabajo de investigación que ha conducido a la presente Tesis Doctoral ha sido realizado en el Instituto Teófilo Hernando de I+D del medicamento (ITH) de la Universidad Autónoma de Madrid. Dentro del ITH se desarrollan fundamentalmente dos líneas de investigación, una relacionada con el sistema nervioso y la otra con el sistema cardiovascular; siendo el sistema nervioso el que concierne a este trabajo.

Una de las características esenciales del sistema nervioso es su capacidad de traspasar información de unas células a otras, es el llamado proceso de neurotransmisión. Durante décadas, algunos de los estudios llevados a cabo en el ITH se han centrado en el esclarecimiento de los mecanismos y componentes que forman parte de este proceso. Entre ellos, el ITH ha contribuido en el esclarecimiento de los subtipos de canales de calcio implicados en la génesis de los incrementos transitorios de calcio citosólico que controlan la exocitosis, proceso por el que se produce la liberación de neurotransmisores y la comunicación neuronal. Asimismo, el ITH ha participado en la elaboración de la hipótesis de la tríada funcional, que define la contribución de estos canales de calcio, la mitocondria y el retículo endoplásmico en la regulación de la circulación celular del calcio y la neurosecreción (García et al., 2006).

Uno de los modelos experimentales que se viene utilizando ampliamente en el ITH es la célula cromafín de la médula suprarrenal. La célula cromafín posee el mismo origen embrionario que las neuronas simpáticas y comparte con ella multitud de elementos. La función fisiológica de las células cromafines consiste en la liberación exocitótica de catecolaminas al torrente sanguíneo en respuesta al estrés. Esta liberación es dependiente de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y por ello, no es de extrañar que las células cromafines posean todos los elementos necesarios para un estricto control, tanto espacial como cinético, de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  requeridos en los distintos pasos del proceso de neurotransmisión. Así, mediante la utilización de este modelo se han podido dilucidar las diferentes vías de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula, la participación de distintos orgánulos en la redistribución de este ion en el citosol, así como los mecanismos que ponen fin a la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  y sacan este ion al exterior celular.

Tras años de estudio de la fisiología de la célula cromafín y del proceso de neurotransmisión y de los distintos elementos implicados en el mismo, durante los últimos años estamos tratando de trasladar todos estos conocimientos adquiridos al estudio de las posibles alteraciones que sufre este proceso de comunicación celular en distintas enfermedades neurodegenerativas.



Resultado de esta nueva aproximación experimental son dos trabajos en los que se utilizaron distintos modelos murinos de enfermedades del sistema nervioso. A saber, el ratón APP/PS1 como modelo de enfermedad de Alzheimer y el ratón SOD1<sup>G93A</sup> como modelo de esclerosis lateral amiotrófica. En ambos modelos se han observado distintas perturbaciones en el poro de fusión exocitótico, así como en la cinética de liberación del neurotransmisor (de Diego et al., 2012, Calvo-Gallardo et al., 2015).

Como continuación a estos estudios se encuentra el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral. En ella, hemos empleado un modelo murino triple transgénico de enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD), que a diferencia del modelo APP/PS1 empleado en el estudio anterior del grupo, desarrolla, además de la patología amiloide, la patología tau, que puede observarse en los pacientes con esta enfermedad. Así, en el presente estudio hemos tratado de analizar posibles alteraciones en la neurotransmisión que pudiesen estar aconteciendo en la enfermedad de Alzheimer; para ello hemos investigado el comportamiento del poro de fusión exocitótico y la cinética de liberación del neurotransmisor en las células cromafines de estos ratones mediante la técnica de amperometría en célula única. Además, nos hemos servido de la técnica electrofisiológica de patch clamp para estudiar las corrientes iónicas implicadas en el proceso de neurotransmisión en la célula cromafín, así como su excitabilidad celular. Por último, hemos empleado también el marcaje con anticuerpos frente a proteínas implicadas en la exocitosis para apoyar los datos amperométricos.

**“La mayoría de la gente dice que el intelecto es lo que hace a un gran científico. Están equivocados: es el carácter”**

*Albert Einstein. Físico alemán (1879-1955)*

---

## **I. INTRODUCCIÓN**



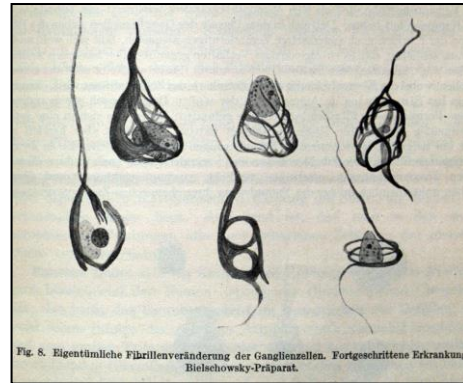
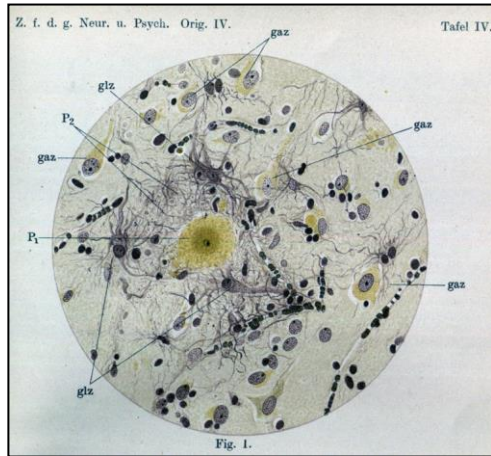
Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han tratado de dilucidar posibles alteraciones en el proceso de neurotransmisión durante el desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa como es la enfermedad de Alzheimer. Para ello, nos hemos servido de un modelo de ratón transgénico que contiene 3 mutaciones en distintos genes implicados en el desarrollo del Alzheimer familiar (y por tanto que se hereda genéticamente), utilizando la célula cromafín, ampliamente empleada como modelo en el estudio de procesos de neurotransmisión. A continuación, se detallan las ventajas e inconvenientes del uso de estos modelos y se tratará de dar una visión general del problema y las herramientas usadas para su estudio.

## **1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Más de 100 años son ya los transcurridos desde que la enfermedad de Alzheimer (EA) fuese descrita por primera vez. Esto ocurriría en 1907, a manos del psiquiatra y neurólogo alemán Alois Alzheimer. Alois Alzheimer describió una paciente llamada Auguste Deter, una mujer de 51 años de edad que había mostrado un deterioro cognitivo progresivo, alucinaciones, delirios... Tras la muerte de Auguste, Alzheimer realizó su autopsia y describió las características histopatológicas de la enfermedad (Figura 1), actualmente denominadas placas seniles (formadas por la agregación extracelular de la proteína  $\beta$  amiloide ( $A\beta$ )) y los ovillos neurofibrilares (formados por la desestructuración de los microtúbulos a causa de una hiperfosforilación de la proteína tau) (traducción al inglés del artículo original (Alzheimer et al., 1995)).

Actualmente la EA es la causa de demencia más común. La demencia es un síndrome clínico caracterizado por un conjunto de síntomas y signos que se manifiestan por las dificultades en la memoria, trastornos en el lenguaje, cambios psicológicos y psiquiátricos y alteraciones en las actividades de la vida diaria. Es una enfermedad específica que afecta a alrededor del 6% de la población mayor de 65 años, incidencia que va en aumento con la edad. La EA es un trastorno neurodegenerativo progresivo y crónico caracterizado por tres grupos principales de síntomas: (1) Disfunción cognitiva: incluye pérdida de memoria, dificultad con el lenguaje y pérdida de las funciones ejecutivas (problemas en la planificación y coordinación de las habilidades intelectuales), (2) Síntomas psiquiátricos y trastornos del comportamiento (depresión, alucinaciones, delirios, agitación... es lo que se

ha denominado síntomas no cognitivos), y (3) Dificultades con la realización de actividades de la vida diaria, entre ellas, conducir, hacer la compra, vestirse y comer sin ayuda, etc (Burns and Iliffe, 2009).



**Figura 1. Dibujos realizados por Alois Alzheimer donde se describen las características histopatológicas de la enfermedad en el cerebro de Auguste Deter.** A la izquierda, se muestra la relación entre células gliales (glz) y una placa senil (P<sub>1</sub>). En el centro de la placa (teñida con iodo) se observa un pequeño centro marrón oscuro, rodeado por un anillo de color todavía oscuro seguido de uno más claro. La zona periférica se encuentra rodeada de numerosas fibras gliales, provenientes de las células gliales de los alrededores. A la derecha, se muestran distintas células nerviosas con acumulación de filamentos (ovillos neurofibrilares). Extraído de Alzheimer and Förstl, *Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie: Originalen vol. 4* (1910-1911): 356–385; Traducido al inglés por Hans Förstl and Raymond Levy: *On certain peculiar diseases of old age* (Alzheimer et al., 1991).

A pesar de que la enfermedad fuese descrita hace más de un siglo, sus causas son todavía hoy desconocidas. Se habla de una enfermedad de etiología multifactorial, con numerosos factores de riesgo, entre los cuales destacan, factores genéticos, la edad, el sexo, el nivel educativo, la nutrición, padecer síndrome de Down... Este desconocimiento y multitud de factores han propiciado la aparición de numerosas teorías a lo largo de los años.

### 1.1 Hipótesis fisiopatológicas en la enfermedad de Alzheimer

A mediados de los años 70 fueron varios los estudios que pusieron de manifiesto la existencia de un déficit a nivel neocortical de la enzima responsable de la síntesis de la acetilcolina (ACh), la colina acetiltransferasa (ChAT) (Bowen et al., 1976, Davies and Maloney, 1976, Perry et al., 1977). Posteriormente, se encontró una reducción en la recap-

tación de colina (Rylett et al., 1983), así como en la liberación de ACh (Nilsson et al., 1986) y la pérdida de somas correspondientes a neuronas colinérgicas en el núcleo basal de Meynert (Whitehouse et al., 1982). Todos estos hallazgos apuntaban a la existencia de un déficit colinérgico en esta enfermedad. Estos estudios, junto con el emergente papel de la ACh en la memoria y en el aprendizaje (Drachman and Leavitt, 1974) condujeron a la **“hipótesis colinérgica de la enfermedad de Alzheimer”**.

El descubrimiento de que ciertas mutaciones en el gen que codifica para la proteína precursora amiloide (APP) conducen a la aparición de Alzheimer en las personas que las portan dio lugar a la formulación de la **hipótesis amiloidogénica** por John Hardy y David Allsop en 1991. Algunas de las funciones fisiológicas que se le atribuyen a APP son inhibición de proteasas, un papel en la adhesión celular y la regulación del crecimiento celular, aunque actualmente sigue habiendo controversia en sus funciones. Estos autores proponen que los déficits en neurotransmisores, enzimas metabolizadoras de transmisores y receptores encontrados en la EA son una consecuencia de la acumulación de proteína amiloide beta (A $\beta$ ) (resultante de la escisión aberrante de APP por acción de la  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas) y no la causa inicial de la enfermedad (Hardy and Allsop, 1991, Hardy and Selkoe, 2002). Así, los ovillos neurofibrilares, la pérdida celular, el daño vascular y la demencia característicos de la enfermedad aparecerían después del depósito de la proteína A $\beta$  (Hardy and Higgins, 1992). Esta teoría se ve apoyada además por la gran prevalencia de esta enfermedad en las personas con síndrome de Down (SD). Estas personas desarrollan cambios neuropatológicos presentes en las formas avanzadas de la EA a los 40-50 años de edad. El SD se caracteriza por la presencia de 3 copias del cromosoma 21, donde se encuentra el gen que codifica para la APP. J. Hardy y colaboradores sostienen que la deposición amiloide que aparece en las personas con este síndrome debe ser una consecuencia de una cantidad excesiva de APP (debida a un incremento del 50 % en la dosis génica) (Hardy and Allsop, 1991, Hardy and Higgins, 1992).

Por otro lado, estudios bioquímicos de los ovillos neurofibrilares permitieron conocer que el componente principal de los mismos es la proteína asociada a microtúbulos tau (Crowther, 1990). La principal función fisiológica de tau radica en su unión a los microtúbulos y su consiguiente estabilización. Unos años después de la asociación de la proteína tau con los ovillos neurofibrilares surgiría la **hipótesis de la taupatía**, la cual postula que el evento esencial en la patogenia de la EA es la hiperfosforilación de tau. A mayor fosforilación de tau, menor es su capacidad de unión a microtúbulos y de esta manera, menor es

su capacidad para promover el ensamblaje y estabilización de éstos. En última instancia esto dará lugar a la degeneración celular y a la aparición de los ovillos neurofibrilares (Goedert et al., 1992, Goedert and Spillantini, 2000). Además, el descubrimiento de distintas mutaciones en el gen que codifica para la proteína tau en la demencia frontotemporal familiar proporciona un vínculo directo entre la disfunción de tau y la demencia (Goedert and Spillantini, 2000).

Muchos son los estudios que relacionan la **excitotoxicidad** con las enfermedades neurodegenerativas. El término excitotoxicidad fue acuñado en 1986 por J.W. Olney, quien sugirió que la estimulación de determinados circuitos neuronales (aquellos que contienen células que usan glutamato o aspartato como transmisores) podía estimular otras neuronas hasta la muerte (Olney, 1986). Trabajos posteriores permitieron conocer mejor este mecanismo: la liberación de glutamato al medio extracelular provoca la activación de receptores ionotrópicos activados por glutamato (principalmente receptores de tipo AMPA y NMDA) con la subsiguiente entrada de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ; despolarización prolongada de la célula neuronal; liberación de glutamato vesicular; la estimulación de canales de calcio dependientes de voltaje (CCDVs) y NMDARs; el mayor ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  en la neurona; y la movilización de éste desde sus depósitos intracelulares. De esta manera, se acumula glutamato fuera de la célula y calcio dentro de ella. El  $\text{Ca}^{2+}$  es necesario para numerosas funciones, pero en exceso activa enzimas como fosfolipasas, proteína cinasa C, proteasas, proteínofosfatasas, endonucleasas... que dan lugar a la muerte celular (Lipton and Rosenberg, 1994, Gazulla and Cavero-Nagore, 2006). Sin embargo, la rapidez de los procesos de excitotoxicidad y la falta de evidencia de elevaciones en aminoácidos excitatorios en los cerebros de pacientes con EA sugieren la existencia de otros mecanismos citotóxicos distintos a esta forma convencional de excitotoxicidad. Tras estas observaciones, comenzaron a surgir así distintas propuestas sobre formas de excitotoxicidad más lentas que involucran una afectación energética neuronal, la cual podría provocar un incremento en la susceptibilidad al daño excitotóxico, de manera que se produciría muerte neuronal en respuesta a concentraciones normales de aminoácidos excitatorios (Francis et al., 1993, Gazulla and Cavero-Nagore, 2006).

Se habla entonces de la importancia de determinados **trastornos metabólicos** en la EA. Estudios *in vitro* demuestran que diversas formas de privación energética en cultivos neuronales incrementan la sensibilidad de las células a los efectos tóxicos del glutamato (Novelli et al., 1988). También se ha visto que cultivos de neuronas corticales sometidos

a una privación de glucosa degeneran más en presencia de A $\beta$  en el medio, efecto que se ve bloqueado por un antagonista del receptor NMDA (Copani et al., 1991). Resultados similares han sido descritos en estudios *in vivo* en cerebros de pacientes con EA. En 1996, Hoyer demostró la presencia de alteraciones en el catabolismo de la glucosa, en la oxidación del piruvato y en la generación de ATP (Hoyer, 1996). Aunque no está claro si la insuficiencia metabólica observada en la EA es la causa o el resultado de las alteraciones histológicas características de la enfermedad; parece claro el hecho de que la disminución del metabolismo energético propicia la toxicidad del glutamato y contribuye a la neurodegeneración (Francis et al., 1993, Gazulla and Cavero-Nagore, 2006).

A pesar de todo esto, la fisiopatología de la EA continúa sin ser conocida por completo y siguen apareciendo otros factores que podrían estar interviniendo en la generación y/o empeoramiento de la enfermedad.

El **estrés oxidativo** es uno de estos factores y ha sido propuesto como un potencial elemento en la patogénesis de distintos trastornos neurodegenerativos. Este término indica una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno por parte de los mecanismos de defensa naturales del cuerpo, que originan un daño en componentes celulares tales como el ADN, las proteínas y los lípidos. El primer estudio que sugiere la participación del estrés oxidativo en la EA fue descrito por Martins y colaboradores (Martins et al., 1986). En este estudio se observó un aumento en la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD) en cerebros postmortem de pacientes con EA, en comparación con controles sanos de la misma edad. El incremento en la actividad de estas enzimas se propuso como una respuesta a un mayor metabolismo de peróxido en el cerebro.

Una fuente de peróxido de hidrógeno es la dismutación de radicales superóxido por la superóxido dismutasa (SOD), que se encuentra aumentada también en cerebros de pacientes de EA (Marklund et al., 1985). Así, esta teoría también se ve apoyada por la gran incidencia de EA en personas con SD, anteriormente comentado. El gen para la SOD se localiza en el cromosoma 21, de manera que en este estado trisómico se produciría un aumento en la producción de peróxido de hidrógeno. Por lo tanto, el metabolismo del peróxido anormalmente elevado pueden caracterizar tanto la EA como al SD (Martins et al., 1986). Como se ha comentado, la elevación de especies reactivas de oxígeno produce una gran diversidad de daños en los lípidos, las proteínas y el ADN, alteraciones que se han observado en pacientes de Alzheimer (Niedzielska et al., 2016).



A este estrés oxidativo contribuye la activación de la microglía que se observa en pacientes con EA (Akiyama et al., 2000, Rogers et al., 2007, Mandrekar-Colucci and Landreth, 2010). Aunque la mayor parte de la investigación del estrés oxidativo y la EA se ha centrado principalmente en la generación de radicales libres por parte de neuronas afectadas, el concepto del estrés oxidativo tiene en buena parte sus raíces en la biología de la inflamación (Akiyama et al., 2000). La implicación de los **mecanismos neuroinflamatorios** en la EA en gran parte comenzó con el descubrimiento de que en la microglía (principal efector del sistema inmunitario en el sistema nervioso central (SNC), con un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis en el cerebro y en la protección del mismo frente a distintos patógenos) de cerebros de pacientes con EA se expresa el clásico marcador de activación de complejo principal de histocompatibilidad de tipo II (MHCII) (Luber-Narod and Rogers, 1988, Rogers et al., 1988).

Tras estos descubrimientos se ha descrito una gran cantidad de mediadores inflamatorios en relación con la EA, entre otros, las citoquinas, el complemento, la ciclooxigenasa (implicada en la síntesis de prostaglandinas), o las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Akiyama et al., 2000). Sin embargo, y aunque en un primer momento la neuroinflamación fue considerada como un mecanismo de defensa del cuerpo frente a distintos estímulos dañinos (placas de A $\beta$ , ovillos neurofibrilares), hoy en día si la neuroinflamación es una respuesta a la patología o es causante de la misma es un tema en controversia. Tal y como ocurre con los macrófagos en el sistema periférico, la microglía (en el SNC) una vez activada, tiene la propiedad de fagocitar. A principios de los años 90 se describió una relación entre la microglía fenotípicamente activada y las placas de A $\beta$  (Perlmutter et al., 1990), con el consiguiente debate de si la microglía es la responsable de la liberación de estos péptidos o de si, por el contrario, se encuentra en sus proximidades en un intento de fagocitar las placas.

La neuroinflamación engloba así a un complejo conjunto de procesos que pueden terminar tanto en efectos beneficiosos como perjudiciales. Un correcto balance de ambos efectos podría, en el caso de la EA, ser beneficioso. Sin embargo, muchos estudios muestran que la neuroinflamación en general y la activación microglial en particular no solo no pueden corregir la patología, si no que además contribuye a la muerte neuronal (Rogers et al., 2007).

Tanto el estrés oxidativo como la inflamación pueden dar lugar a un daño vascular, que en última instancia puede concluir con una degeneración de los terminales nerviosos y

la muerte celular. En el año 2004 comenzó a hacerse énfasis en la comorbilidad existente entre la EA y las enfermedades cerebrovasculares (Bailey et al., 2004, Gorelick, 2004, Iadecola, 2004). Así, se ha descrito que un porcentaje muy elevado (70-90 %) de pacientes con EA presenta patología amiloide en sus vasos sanguíneos, produciéndose un estrechamiento de los mismos y una hipoperfusión (Farkas and Luiten, 2001). De la misma manera, las enfermedades cardiovasculares y los daños cerebrales originados por pequeños procesos isquémicos son causas comunes de demencia y deterioro cognitivo en personas de avanzada edad (Erkinjuntti et al., 2004). Los eventos isquémicos y los daños neurovasculares también se han asociado con un incremento en la patología A $\beta$  y tau (Kalaria, 2000).

Estas observaciones han llevado a postular la llamada **hipótesis neurovascular**, que se centra alrededor de la unidad neurovascular, estructura formada por la interacción entre las células endoteliales de los capilares cerebrales (que constituyen la barrera hematoencefálica), las células musculares lisas, los astrocitos y los axones neuronales. Entre las funciones de esta unidad neurovascular se encuentran la protección de las células neuronales, el suministro de moléculas esenciales y la regulación del flujo sanguíneo. Así, cualquier daño que se produzca en esta unidad neurovascular producirá una complicada cascada que incluye una reducción en el flujo sanguíneo al cerebro, así como una ruptura de la barrera hematoencefálica (van de Haar et al., 2016). Esta disminución de la función vascular y del flujo sanguíneo cerebral pueden contribuir al fracaso del sistema vascular para filtrar el A $\beta$  desde el cerebro hacia la sangre para su depuración sistémica y su excreción a través del hígado, el riñón y posiblemente otros órganos excretores, favoreciéndose la acumulación de A $\beta$  en el cerebro (Zlokovic et al., 2005).

Hay una evidencia considerable de que la homeostasia intracelular del Ca<sup>2+</sup> está alterada en la EA (tanto en la forma esporádica como en la familiar), y que esto puede dar lugar a un aumento en la formación de A $\beta$  y promover de la misma manera la hiperfosforilación de tau (LaFerla, 2002, Bezprozvanny and Mattson, 2008). Estos datos han dado lugar a la **hipótesis del calcio** en la EA, propuesta por primera vez por Khachaturian (Khachaturian, 1989). Esta hipótesis fue inicialmente formulada sin ninguna evidencia experimental que la apoyase, pero con el objetivo de apartar a los investigadores de los estudios meramente descriptivos y acercarlos al estudio de los mecanismos celulares del envejecimiento del cerebro. Así, en los años sucesivos se fue ganando conocimiento acerca de la desregulación de este ion en esta enfermedad. En un primer momento la hipótesis del calcio trató de explorar cómo la activación de la vía amiloidogénica podría estar involu-

crada en el remodelamiento de las vías de señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  implicadas en la cognición (Berridge, 2010). Se ha descrito que el  $\text{A}\beta$  es capaz de producir un aumento del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de distintos receptores de membrana, entre ellos los receptores NMDA y AMPA, así como a través de CCDVs (Ferreira and Klein, 2011). Esto desencadena una elevación persistente en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ), que se mantiene principalmente por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR: del inglés, Calcium Induced Calcium Release) desde el retículo endoplásmico (RE) (Paula-Lima et al., 2011). Las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  elevadas en el citosol producen la activación de la fosfatasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina calcineurina. La calcineurina activada conduce a la activación de la glucógeno sintasa cinasa  $3\beta$  (GSK3 $\beta$ ), una de las enzimas responsables de la hiperfosforilación de tau (Reese and Taglialatela, 2011), así como a un aumento en los mecanismos de depresión a largo plazo (LTD: Long Term Depression), implicados en la pérdida de recuerdos recién adquiridos (Berridge, 2010). Sin embargo, estudios realizados tanto en seres humanos como en modelos animales generan la pregunta de si las alteraciones en el  $\text{Ca}^{2+}$  pudiesen preceder a la generación de  $\text{A}\beta$ , ya que se han observado estas alteraciones en etapas iniciales de la enfermedad y antes de la aparición de la patología de  $\text{A}\beta$  extracelular (Etcheberrigaray et al., 1998, Larson et al., 1999).

Lo que está claramente establecido es que el  $\text{Ca}^{2+}$  juega un importante papel en la regulación de una multitud de procesos neuronales. Por ejemplo, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los CCDVs da lugar a la liberación de neurotransmisores a la hendidura sináptica. La idea de que la demencia podría ser el resultado de algún tipo de **degeneración sináptica** ha estado con nosotros durante más de 100 años y fue expresada elocuentemente por Santiago Ramón y Cajal cuando sugirió que “la demencia podría resultar cuando las sinapsis entre las neuronas se debilitan como consecuencia de un mayor o menor estado patológico, es decir, cuando por procesos de atrofia ya no se forman contactos, o cuando las áreas mnemotécnicas o de asociación cortical sufren una desorganización parcial” (Cajal, 1914). Posteriormente, y gracias al avance de las técnicas de microscopía electrónica e inmunohistoquímica (entre otras), se ha observado una reducción significativa en la densidad de marcadores sinápticos en la corteza asociativa y en el hipocampo de cerebros de pacientes con EA (Davies et al., 1987, DeKosky and Scheff, 1990, Masliah et al., 2001). Aunque las rutas moleculares que dan lugar a la disfunción sináptica en la EA no son del todo conocidas, muchos estudios apuntan hacia el péptido  $\text{A}\beta$  como principal responsable de estos efectos (Small et al., 2001, Selkoe, 2002, Walsh and Selkoe, 2004).

Los mecanismos de la pérdida sináptica en la EA podrían incluir defectos axonales de transporte, estrés oxidativo, neuroinflamación y daño mitocondrial entre otros. La primera vez que se propuso la **hipótesis de la cascada mitocondrial** en la EA fue en 2004 por Swerdlow y Khan (Swerdlow and Khan, 2004), si bien estos autores no fueron realmente los primeros en describir alteraciones mitocondriales en pacientes con EA; desde hacía décadas se habían descrito deficiencias en enzimas del ciclo de Krebs, como la piruvato deshidrogenasa (Sorbi et al., 1983) y la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa (Gibson et al., 1988). Unos años después se describiría una reducción en la actividad de la citocromo oxidasa en pacientes de EA (Parker et al., 1990), que permitirían a Swerdlow y Khan trabajar y llegar a formular su hipótesis. Tanto las mitocondrias como el ADN mitocondrial son muy sensibles al daño oxidativo, e inversamente, las alteraciones mitocondriales pueden inducir o incrementar el estrés oxidativo (Shigenaga et al., 1994). De forma parecida, el efecto combinado del incremento de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  con el estrés oxidativo puede contribuir a dañar la función mitocondrial (Baloyannis et al., 2004), con el subsiguiente fallo en el suministro de niveles adecuados de ATP, elemento muy importante a nivel sináptico para la correcta comunicación neuronal. De manera que el daño mitocondrial y niveles bajos de ATP pueden dar lugar a la pérdida de sinapsis (Baloyannis, 2006). Vemos como el fallo mitocondrial está interrelacionado con otras numerosas alteraciones presentes en la EA (desregulación del  $\text{Ca}^{2+}$ , estrés oxidativo, fallo sináptico), así como con la principal marca histopatológica de la enfermedad, el péptido  $\text{A}\beta$ ; ya que este péptido promueve la formación de radicales libres de oxígeno (como el peróxido de hidrógeno;  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), la peroxidación lipídica y produce una disminución de la actividad de la citocromo c oxidasa (complejo IV en la cadena transportadora de electrones), que en última instancia llevan a la muerte celular (Lustbader et al., 2004, Manczak et al., 2006, Yao et al., 2009).

Finalmente, cabe destacar que existen numerosos datos que apuntan hacia la existencia de una interacción significativa entre  $\text{A}\beta$  y los **biometales** (Fe, Cu y Zn). Estos metales se encuentran de forma abundante en las zonas neocorticales (muy afectadas en la EA), donde juegan un papel en la regulación sináptica. Así por ejemplo, el Zn es liberado en concentraciones micromolares desde terminaciones nerviosas glutamatérgicas a la hendidura sináptica, donde interactúa con distintos receptores, canales iónicos y transportadores, inhibiendo así por ejemplo a los receptores NMDA (Smart et al., 2004). Estos metales también se encuentran en gran abundancia en las placas de  $\text{A}\beta$ ; se han encontrado así altas concentraciones de Cu (~400  $\mu\text{M}$ ), Zn (~1 mM) y Fe (~1 mM) en las placas seniles de pa-

cientes con EA (Lovell et al., 1998). Las interacciones entre estos metales y el péptido A $\beta$  pueden modular la precipitación del péptido, su toxicidad y el estado redox de la célula. El A $\beta$  precipita rápidamente cuando entra en contacto con Zn<sup>2+</sup> a pH = 7.4, mientras que el Cu<sup>2+</sup> y Fe<sup>3+</sup> inducen una gran agregación de este péptido en condiciones ligeramente ácidas, situación que se da en la inflamación (Atwood et al., 1998). En 1999, Atwood y colaboradores observaron en cultivos neuronales una mayor toxicidad del A $\beta$  en presencia de Cu (Atwood et al., 1999); de manera similar el Zn es capaz de dirigir y acumular oligómeros de A $\beta$  en las sinapsis (Deshpande et al., 2009). Por último, el péptido A $\beta$  es capaz de producir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de una manera dependiente de oxígeno y con la reducción de Fe(III) o Cu(II) a Fe(II) y Cu(I), respectivamente, provocando el estrés oxidativo anteriormente comentado (Huang et al., 1999).

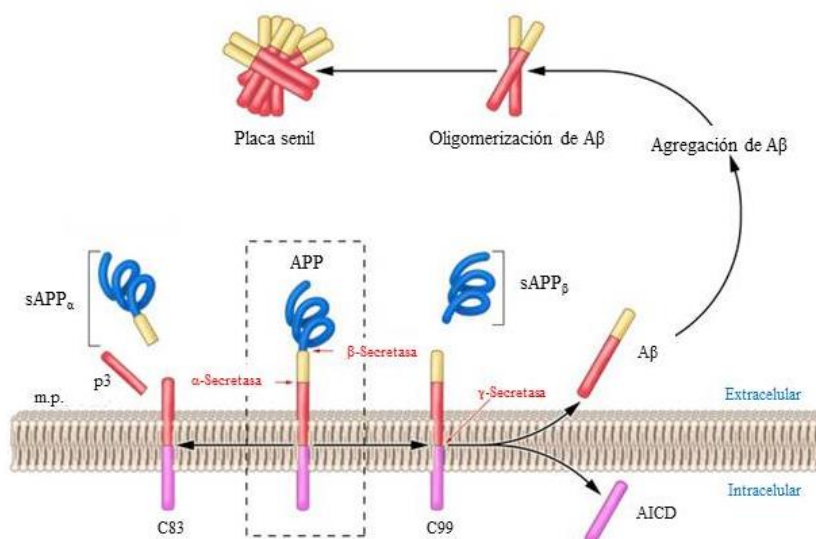
Como podemos observar, la mayoría de las hipótesis fisiopatológicas surgidas están estrechamente interrelacionadas unas con otras, de manera que la aparición de alguna alteración o daño genera el advenimiento de nuevos procesos perjudiciales y lesiones, y así sucesivamente. Aunque el papel que juega el péptido A $\beta$  en la enfermedad a día de hoy sigue siendo tema de controversia, bien es cierto que en todas las hipótesis arriba comentadas el péptido A $\beta$  (ya fuese en su forma soluble, oligómeros o en placas) está involucrado, de alguna u otra manera, en la gran diversidad de procesos nocivos descritos en la EA.

## **1.2 Modelos para el estudio de la enfermedad de Alzheimer**

Como ya se ha comentado, a nivel celular, la EA está asociada con el desarrollo de placas de A $\beta$  y ovillos neurofibrilares dentro y en los alrededores de las neuronas del SNC. La mayor parte del A $\beta$  producido en la célula (más del 95 %) está formado por péptidos de 40 aminoácidos (aa) (A $\beta$ <sub>1-40</sub>), mientras que una fracción menor (menos del 5 %) se compone de péptidos de mayor longitud, 42 aa (A $\beta$ <sub>1-42</sub>) (Naslund et al., 1994). Este A $\beta$  más largo tiene una mayor capacidad de agregación, y se cree que es el mayor responsable de la formación de oligómeros, fibrillas y, en última instancia, de las placas (Younkin, 1995).

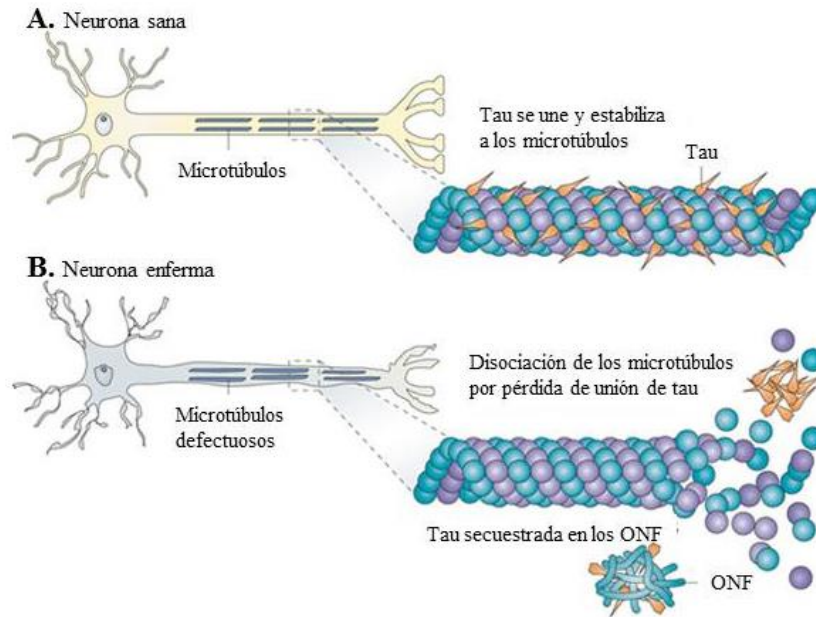
El A $\beta$  deriva del procesamiento de la proteína precursora APP, que es cortada en primer lugar en su extremo amino terminal por una aspartil proteasa de membrana ( $\beta$ -secretasa; BACE1) (Figura 2). Este corte da lugar a un derivado soluble de gran longitud (sAPP $\beta$ ) y a un fragmento carboxiterminal de APP unido a la membrana (C99). El posterior procesamiento de C99 por la  $\gamma$ -secretasa (complejo formado principalmente por las

presenilinas 1 y 2 (PSEN 1 y 2) y la nicastrina), tiene como resultado la formación de las especies  $A\beta_{1-40}$  y  $A\beta_{1-42}$  arriba comentadas (Gandy, 2005) (Figura 2).



**Figura 2. Procesamiento de APP y acumulación de Aβ.** APP (en el centro, dentro del trazado discontinuo) es metabolizado por 2 posibles vías. (1) la α-secretasa genera un fragmento soluble (sAPP<sub>α</sub>) y otro unido a la membrana, denominado C83 (a la izquierda) (2) la β-secretasa genera el fragmento soluble sAPP<sub>β</sub> y C99, embebido en la membrana (a la derecha). Ambos fragmentos carboxiterminales (C83 y C99) son sustratos para la γ-secretasa, originando el dominio intracelular de APP (AICD, del inglés APP intracellular domain) y, respectivamente, los péptidos solubles p3 (izquierda) y Aβ (derecha). Aβ se agrega en pequeños multímeros (dímeros, trímeros...) denominados oligómeros, hasta dar lugar a las placas seniles. Modificado de Gandy, S. (Gandy, 2005).

Por otro lado, los ovillos neurofibrilares resultan de la hiperfosforilación de la proteína tau. Tau es particularmente abundante en las neuronas, donde estabiliza los microtúbulos (estructuras tubulares que intervienen en el tránsito de vesículas, en la formación del huso mitótico y en la formación del citoesqueleto, entre otros efectos). Normalmente tau es fosforilada en múltiples residuos de serina y treonina, pero una fosforilación excesiva reduce su capacidad de unión a los microtúbulos, con su consecuente desestabilización, y podría incrementar además su capacidad de agregación (Brunden et al., 2009) (Figura 3).



**Figura 3. Proteína tau en neuronas sanas y con tautopatía.** **A.** fisiológicamente tau facilita la estabilización de microtúbulos en las células, particularmente en las neuronas, permitiendo un correcto funcionamiento del citoesqueleto, manteniendo la estructura celular y permitiendo el tráfico de componentes celulares a lo largo del axón. **B.** en tautopatías, tales como la enfermedad de Alzheimer, la función de tau está comprometida. Este fallo se debe tanto a la hiperfosforilación de tau, que reduce su unión a los microtúbulos, como al secuestro de la proteína tau hiperfosforilada en los ovillos neurofibrilares (ONF), lo que reduce la cantidad de proteína tau disponible para su unión a los microtúbulos. La pérdida de función de tau produce inestabilidad en los microtúbulos y reduce el transporte axonal. Modificado de Brunden, K. R. y colaboradores (Brunden et al., 2009).

Distintas mutaciones genéticas se han asociado con la aparición de algunos de los cambios patológicos que se producen en el cerebro durante el curso de la EA, en particular en los casos de EA familiar (EAF), que supone aproximadamente un 2-5% de los casos de EA. Las principales mutaciones genéticas que se vinculan a la aparición de EAF se relacionan con la proteína precursora de amiloide (APP), las presenilinas 1 y 2 (PSEN 1 y 2) o la  $\beta$ -secretasa (BACE 1).

Para el estudio de los procesos fisiopatológicos que acontecen en la EA y el desarrollo de nuevas terapias frente a esta enfermedad, la EA ha sido modelada de muy diversas formas tanto en experimentación *in vitro* como en modelos animales, intentando reproducir de la forma más precisa posible los efectos patológicos del  $A\beta$  y/o la hiperfosforilación de la proteína tau.

Centrándonos en los modelos animales, la inyección de escopolamina (un antagonista muscarínico), estreptozotocina (un antibiótico con poder citotóxico sobre las células  $\beta$ -pancreáticas) o A $\beta$  ha sido utilizada para el estudio de la forma esporádica de EA, en base a que estas maniobras inducen algunas características que son similares a la enfermedad, como son el trastorno afectivo y el deterioro de memoria (Bronner-Fraser, 1994, Huber et al., 2009, Webster et al., 2014).

Por otro lado, con el fin de obtener una mayor comprensión de cómo se produce y como progresa la EA, los investigadores han aprovechado los conocimientos sobre las diferentes mutaciones asociadas a la EA para desarrollar animales transgénicos (sobre todo ratones) que expresen estas proteínas mutadas. Así, se han creado distintos modelos transgénicos de la APP, de las PSEN 1 y 2 o de la BACE 1 para el estudio de la EAF (Bornstein et al., 2012).

De esta manera, se han creado por ejemplo diversas líneas de ratones transgénicos que expresan la proteína APP humana con alguna de las mutaciones que han sido asociadas con la EA, o con mutaciones en las PSEN 1 y 2 o de la  $\beta$ -secretasa. La mayoría de estos modelos murinos desarrollan depósitos extracelulares de A $\beta$  en distintos puntos en el tiempo a lo largo de la vida del animal. Además, hay evidencias de inflamación en el cerebro, así como de defectos comportamentales y cognitivos (Bornstein et al., 2012). Sin embargo, aunque estos ratones desarrollen la patología de A $\beta$  y déficits cognitivos, no desarrollan la otra característica distintiva de la EA, los ovillos neurofibrilares. En un intento de replicar ambos aspectos neuroanatómicos de la patología, se desarrolló un modelo triple transgénico de la enfermedad (3xTg-AD) (Oddo et al., 2003b).

En nuestro intento de tratar de esclarecer la existencia de posibles alteraciones en el proceso de neurotransmisión durante el desarrollo de la EA nos decantamos por la utilización de este modelo murino triple transgénico (3xTg-AD) de EA, ya que además de presentar la “patología de A $\beta$ ” (como hemos visto, con alta implicación en la enfermedad) descrita en los pacientes, es el primer modelo animal que desarrolla de manera conjunta la “patología de tau”.

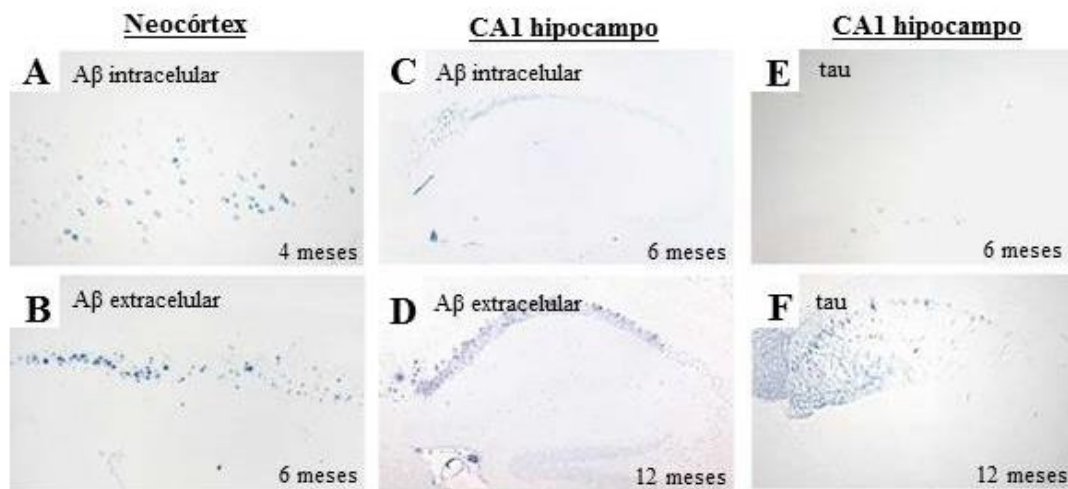
### **1.2.1 Ratón triple transgénico (3xTg-AD): Modelo de enfermedad de Alzheimer**

Tres mutaciones distintas en la APP han sido asociadas con el desarrollo de EAF, denominadas según el lugar donde fueron descubiertas: mutación sueca (K670N/M671L),



londinense (V717I) e indiana (V717F). Para la generación del modelo 3xTg-AD S. Oddo y colaboradores introdujeron 2 transgenes en la línea germinal de un ratón “knock in” para PSEN1, es decir, un ratón al que se le había sustituido el gen de la PSEN1 por un gen de PSEN1 mutado (M146V; sustitución de un solo aminoácido de metionina a valina en el codón 146). Los transgenes introducidos fueron la mutación sueca de APP (APP<sub>Swe</sub>), y una mutación en la proteína tau (P301L; sustitución de un solo aminoácido de prolina a leucina en el codón 301) (Oddo et al., 2003b). En este trabajo, además describieron algunas de las alteraciones que se producen en estos ratones.

En un seguimiento de las alteraciones histopatológicas de la enfermedad observaron que algunas de las regiones relevantes en la EA, como son el hipocampo y la corteza cerebral, eran las que presentaban mayores cantidades de las proteínas mutadas. Una de las manifestaciones más tempranas que encontraron fue inmunorreactividad para A $\beta$  intraneuronal, haciéndose aparente en el neocórtex entre los 3-4 meses de edad, y un poco más tarde (a los 6 meses) en la región CA1 del hipocampo (Figura 4A, C).



**Figura 4. Histopatología de A $\beta$  y tau en el cerebro del ratón 3xTg-AD.** Los depósitos de A $\beta$  preceden a la patología de tau. **A**, la inmunorreactividad de A $\beta$  se detecta inicialmente en el interior de las neuronas del neocórtex a los 4 meses. **B**, placas de A $\beta$  extracelulares en las capas 4 y 5 del neocórtex. **C**, la inmunorreactividad intracelular para A $\beta$  aparece en la región CA1 del hipocampo a los 6 meses. **D**, placas de A $\beta$  extracelulares en la región CA1 del hipocampo a los 12 meses. **E**, a los 6 meses de edad no se detecta inmunorreactividad de tau en la región CA1 del hipocampo. **F**, presencia de tau en la región CA1 del hipocampo a los 12 meses. A $\beta$  ha sido detectado con el anticuerpo mAb 1560 y tau con el anticuerpo HT7. Modificado de (Oddo et al., 2003b).

Las placas A $\beta$  aparecen primero en la corteza a los 6 meses, haciéndose notorias en el hipocampo a los 12 meses de edad (Figura 4B, D). Y no es hasta esta edad cuando se hace patente una marcada inmunorreactividad para tau en las neuronas CA1 del hipocampo (Figura 4E, F), extendiéndose en los meses sucesivos a la corteza cerebral (Oddo et al., 2003b)

La patología de A $\beta$  se desarrolla mucho antes que la de tau en estos ratones, hecho que está en consecuencia con la hipótesis amiloidogénica. Estos autores estudiaron también la función sináptica estimulando las colaterales de Schaffer y registrando en la región CA1 del hipocampo. De este modo, observaron una depresión en la potenciación a largo plazo (LTP, de sus siglas en inglés: Long Term Potentiation) en los ratones a partir de los 6 meses de edad, etapa en la que todavía no se han desarrollado las placas de A $\beta$  en el hipocampo, aunque sí hay presencia de A $\beta$  intracelular (Figura 4C, D) (Oddo et al., 2003b).

Evaluaron también la memoria y el aprendizaje utilizando el laberinto acuático de Morris (MWM, del inglés Morris Water Maze) y la prueba de evitación inhibitoria (IA, del inglés Inhibitory Avoidance), siendo ambas pruebas altamente dependientes del hipocampo. Los ratones jóvenes (de 1-3 meses de edad) presentaron una memoria y aprendizaje normales, de modo que estos ratones no nacen con estos déficits, sino que se adquieren a lo largo de la vida. El primer fallo cognitivo que aparece en estos ratones se produce a los 4 meses y es un problema en la retención (pero no en el aprendizaje). Y ya es a los 6 meses de edad cuando se observa un deterioro en la memoria, incluso en la memoria a corto plazo (Billings et al., 2005).

De esta manera, parece que estos ratones, aun poseyendo las mutaciones en APP, PSEN1 y tau desde su nacimiento, no empiezan a manifestar signos de la enfermedad hasta los 4 meses de edad.

Además de en los trabajos arriba comentados, en una revisión realizada por S. J. Webster y colaboradores se recogen varios estudios donde se miden distintos tipos de memoria (de referencia y de trabajo principalmente) en ratones con edades desde 1 mes hasta 18 meses. No se ha observado ninguna alteración en los ratones de 1 a 3 meses, empezando a mostrar deterioros cognitivos en el IA y MWM a los 4 meses, hasta los 15-18 meses (Webster et al., 2014).

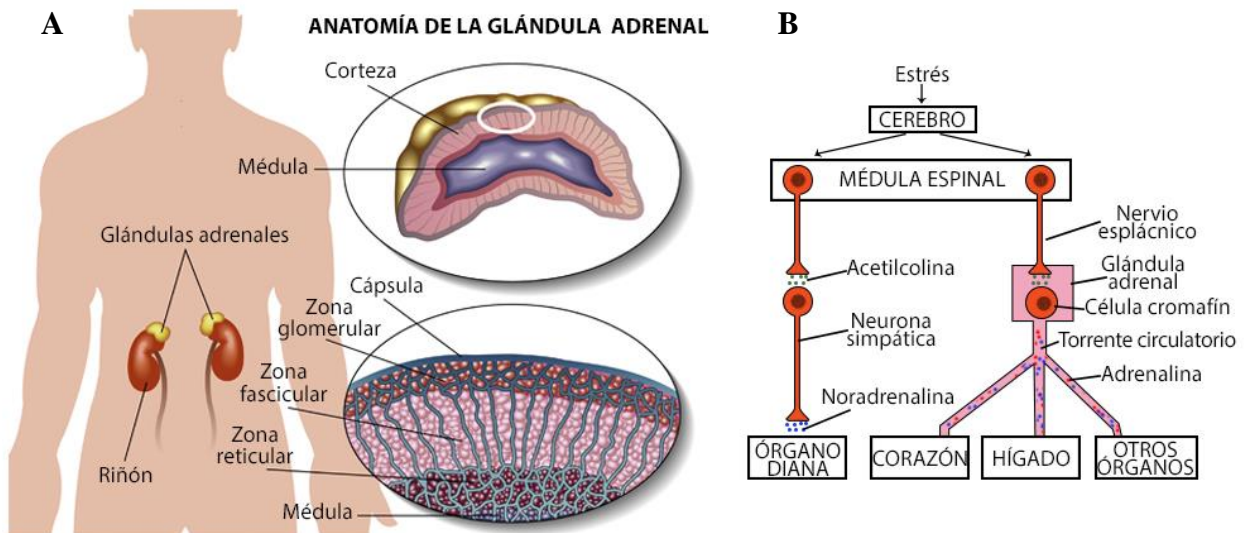
Teniendo en cuenta estos resultados, en el presente trabajo se decidió utilizar ratones 3xTg-AD presintomáticos (2 meses de edad), y ratones donde ya se hubiese estableci-

do (6 meses) y consolidado la enfermedad (más de 12 meses de edad), con el objetivo de estudiar posibles alteraciones en la neurotransmisión a lo largo del desarrollo de la enfermedad.

## 2. LA CÉLULA CROMAFÍN COMO MODELO NEUROSECRETOR

Las células cromafines son células neuroendocrinas, situadas en la médula de la glándula suprarrenal, aunque también aparecen localizadas en paraganglios “extra-adrenales”, como son el cuerpo carotídeo y el “órgano de Zuckerkandl”.

Las glándulas suprarrenales o adrenales se sitúan en las proximidades de los riñones, y en mamíferos se organizan en 2 partes bien diferenciadas anatómica y funcionalmente, estas son la corteza (en la parte externa) y la médula (localizada en el centro de la glándula); además, envolviendo a ambas estructuras se sitúa una gruesa cápsula de tejido conjuntivo (Simpson, 1937) (Figura 5A).



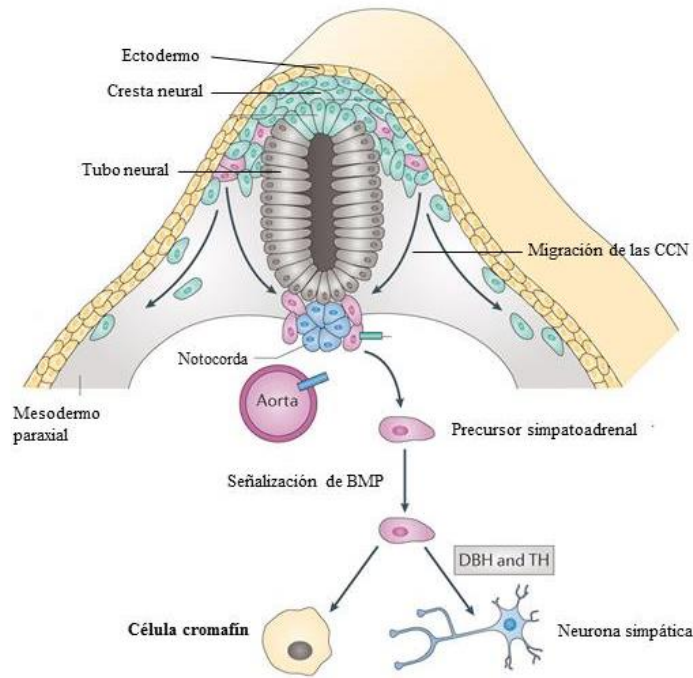
**Figura 5. La glándula adrenal.** **A**, ubicación de la glándula adrenal en el organismo humano y anatomía de la misma. En la glándula se pueden distinguir corteza (organizada en zona glomerular, zona fasciculata y zona reticular) y médula, donde se encuentran las células cromafines. **B**, respuesta del organismo frente al estrés. El nervio esplácnico libera ACh, que ejerce su efecto en las células cromafines de la médula adrenal, las cuales verterán sus productos de secreción (adrenalina y noradrenalina, entre otros) al torrente circulatorio. Modificado de <http://yourvascularhealth.com/miscellaneous-forms/adrenal-glands-diagram/> y de <https://iscb12.webs.ull.es/ChromaffinCell/Primer.html>.

La corteza se origina a partir del mesodermo y supone del 70-90 % del peso de la glándula. Está formada por columnas de células que se dividen en tres capas denominadas, desde la superficie hacia el interior, zona glomerular, zona fasciculata y zona reticular (Figura 5A). Su función consiste en la síntesis y secreción de una amplia gama de hormonas de naturaleza esteroidea: glucocorticoides (relacionados con el metabolismo energético y la inmunosupresión), mineralocorticoides (responsables del volumen circulante y la presión arterial) y hormonas sexuales (relacionadas con la aparición de algunos caracteres sexuales).

La médula adrenal constituye en el hombre alrededor del 30% de la masa total de la glándula, es de origen neuroectodérmico y está constituida principalmente por 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).

### **2.1 La célula cromafín adrenomedular**

El término “cromafín” fue acuñado por el histólogo Alfred Kohn y hace referencia a sus características propiedades de tinción con sales de cromo (Huber et al., 2009). Están altamente especializadas en la síntesis y liberación de múltiples hormonas. Se originan a partir de la cresta neural, grupo de células situadas entre el ectodermo y el tubo neural durante el desarrollo embrionario (Figura 6). El tubo neural dará lugar al sistema nervioso central (cerebro y médula espinal), mientras que las células de la cresta neural formarán la mayoría de los elementos del sistema nervioso periférico, así como cartílago facial, células pigmentarias y células neuroendocrinas. Debido a las diferentes rutas migratorias y distintos tipos celulares que originarán, las células de la cresta neural se han diferenciado a lo largo de la longitud del eje rostrocaudal del embrión. Así se han designado como craneales, vagales, del tronco y lumbosacrales. En la región del tronco, las células de la cresta neural migran siguiendo 2 rutas diferentes: una ruta dorsal, que dará lugar a células pigmentarias, y una ruta ventral, que dará lugar a ganglios sensoriales y simpáticos y a las células de la médula suprarrenal (Bronner-Fraser, 1994) (Figura 6).



**Figura 6. Desarrollo del linaje simpatoadrenal a partir de la cresta neural.** Las células de la cresta neural (CCN) (representadas en verde y rojo) formarán la mayoría de los elementos del sistema nervioso periférico, así como cartílago facial, células pigmentarias y células neuroendocrinas. Algunas de las CCN (las situadas en la zona del tronco del embrión) migrarán hacia la aorta y allí se comprometerán a formar parte del linaje simpatoadrenal, empezando su diferenciación en respuesta a la señalización de la proteína morfogénica ósea (BMP, del inglés Bone Morphogenetic Protein). A partir de este punto, las células darán lugar bien a células cromafines o bien a neuronas simpáticas. Las enzimas involucradas en la síntesis de catecolaminas (como la tirosina hidroxilasa (TH) o la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (DBH)) se encuentran reguladas a la alza en esta etapa de diferenciación del linaje simpatoadrenal. Modificado de Cheung, N-K. V. y Dyer, M. A. (Cheung and Dyer, 2013).

Como vemos, las células cromafines están íntimamente relacionadas con las neuronas simpáticas, y han sido ampliamente utilizadas como modelo para el estudio de mecanismos básicos de neurofisiología, secreción regulada y farmacología. Bornstein y colaboradores acuñaron el término de cerebro periférico para referirse a estas células, ya que comparten con las neuronas algunos mecanismos fundamentales: (1) reciben estímulos de naturaleza tanto química como eléctrica; (2) son capaces de descifrar y reconocer esas señales; (3) poseen la maquinaria necesaria para generar distintos patrones de respuestas, como es la liberación de catecolaminas y otras sustancias (Bornstein et al., 2012).

Las células cromafines han resultado de gran utilidad en el estudio de los mecanismos excitotóxicos, como pueden ser el funcionamiento de distintos canales iónicos, la dinámica de las vesículas y el acoplamiento estímulo-secreción. Pero no solo eso, sino que además de ayudar en la comprensión de los procesos de desarrollo neuronal, las células

cromafines han sido sumamente importantes en el estudio de procesos neurodegenerativos, tumorigénesis y desarrollo de fármacos.

### **2.1.1 Funciones fisiológicas de la célula cromafín**

Las células cromafines reciben señales de sinapsis excitatorias a través del nervio esplácnico, el cual libera en su mayoría acetilcolina (ACh) (Feldberg et al., 1934), aunque también se ha descrito la presencia de encefalina como transmisor (Holgert et al., 1995). Tras la estimulación, las células cromafines liberan catecolaminas (entre otros componentes, tales como péptidos opioides, ATP, cromograninas) al torrente sanguíneo, desde donde se distribuirán a la periferia hasta afectar a multitud de órganos diana (Wolf et al., 2016) (Figura 5B).

En condiciones fisiológicas de reposo, las células liberan aproximadamente un 80 % de adrenalina y un 20 % de noradrenalina. Sin embargo, las concentraciones de ambos neurotransmisores aumentan drásticamente en respuesta a un estrés físico, psicológico o ambiental, así como al ejercicio, exposición al frío, bajas concentraciones de oxígeno o glucosa, al miedo... en un intento de contrarrestar el estrés (Tank and Lee Wong, 2015).

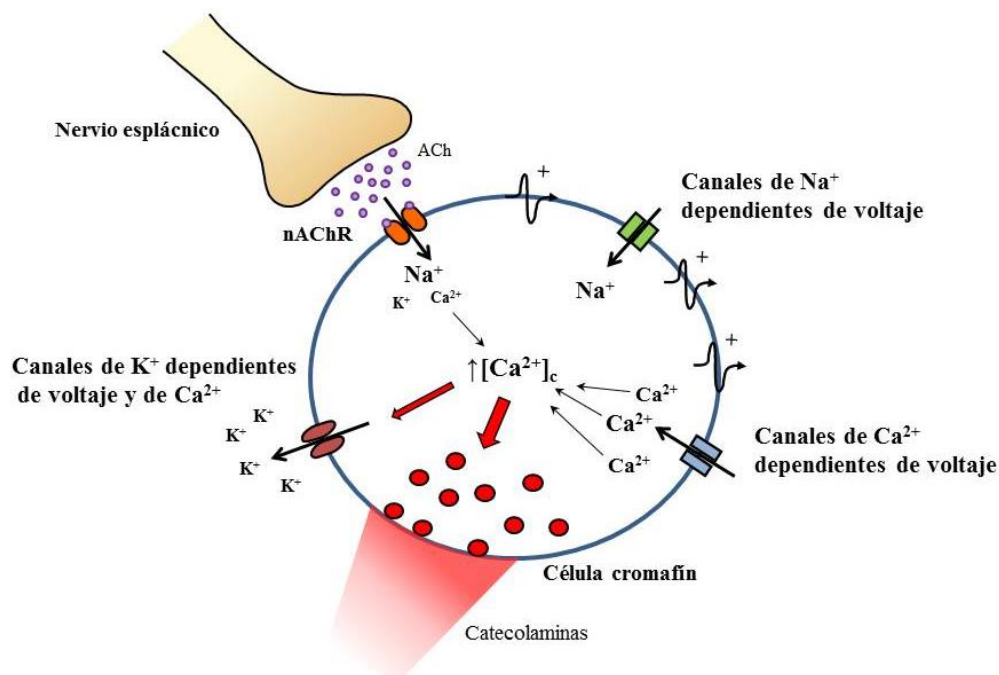
Las catecolaminas liberadas interactúan con receptores acoplados a proteínas G expresados en los tejidos diana (receptores  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos), iniciando así la respuesta de “lucha o huida”. Entre sus efectos se incluye el aumento de la presión sanguínea, desvío de la circulación hacia los músculos esqueléticos, cerebro y corazón, incremento de la frecuencia cardíaca y contractibilidad del corazón, relajación de los músculos bronquiales para aumentar el aporte de oxígeno a la sangre, incremento de la glucogenolisis y gluconeogénesis en el hígado y lipólisis en los adipocitos para proporcionar gran cantidad de sustratos energéticos que permitan incrementar la actividad muscular, aumento de la mi-driasis para mejorar la visión, la disminución del flujo de sangre a los intestinos y los riñones y la relajación del músculo liso intestinal (Tank and Lee Wong, 2015).

### **2.1.2 Acoplamiento excitación-secreción en la célula cromafín**

En 1952, Sandow acuñó el término “acoplamiento excitación-contracción” para designar a toda la secuencia de reacciones que ocurren desde la estimulación del músculo hasta su contracción, en donde el ion  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel fundamental (Sandow, 1952).

Años más tarde, y tras la observación de que la retirada del  $\text{Ca}^{2+}$  de la solución extracelular suprimía la liberación de catecolaminas inducida por ACh en las células cromafines, Douglas y Rubin adaptaron el término propuesto por Sandow a “acoplamiento excitación-secreción” para describir la importancia que tiene el  $\text{Ca}^{2+}$  en la secreción de catecolaminas tras la estimulación de las células cromafines (Douglas and Rubin, 1961).

En los años sucesivos se pudieron dilucidar toda la secuencia de acontecimientos que tienen lugar desde la estimulación de la célula por la ACh hasta la liberación de las catecolaminas al torrente sanguíneo (Figura 7).



**Figura 7. Esquema representativo del “acoplamiento excitación-secreción” en la célula cromafín.** La estimulación del nervio espláncico provoca la liberación de acetilcolina (ACh) en sus terminales. La ACh se une a los receptores nicotínicos (nAChR) presentes en la membrana plasmática provocando la entrada de distintos cationes (fundamentalmente  $\text{Na}^+$ ), lo que originará una despolarización en el potencial de membrana celular ( $V_m$ ), dando lugar a la apertura de canales de  $\text{Na}^+$  sensibles al voltaje y la consiguiente entrada de más iones  $\text{Na}^+$  al interior celular. Estos procesos llevan consigo una mayor despolarización del  $V_m$  y la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. La subsiguiente entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula lleva consigo, entre otros muchos procesos, la liberación del contenido vesicular (catecolaminas entre otros) al torrente circulatorio. El  $V_m$  regresará a su potencial de reposo gracias a la apertura de los canales de  $\text{K}^+$  dependientes tanto de voltaje como de calcio.

Una vez liberada del nervio espláncico, la ACh se une a receptores nicotínicos y muscarínicos en la membrana de la célula cromafín. Aunque la proporción de ambos tipos de receptores varía de una especie a otra y se altera también en situaciones de estrés cróni-

co, en los mamíferos predomina la acción de los receptores nicotínicos. Los receptores nicotínicos son receptores ionotrópicos, que tras la unión de la ACh, incrementan la conductancia para los cationes  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (aunque principalmente  $\text{Na}^+$ ) (Douglas et al., 1967). La entrada de estos cationes producirá una despolarización en la célula, que dará lugar a un cambio de conformación en canales dependientes de voltaje, como son los canales de sodio dependientes de voltaje (Cena et al., 1983). La entrada de  $\text{Na}^+$  por esos canales conducirá a una mayor despolarización celular, creación de potenciales de acción y a un aumento en la probabilidad de apertura de canales de calcio dependientes de voltaje (García et al., 1984). El aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior celular, como ya hemos visto, conduce a la secreción de catecolaminas (Figura 7).

La excitación colinérgica está regulada en diversos puntos. Uno de ellos es la enzima acetilcolinesterasa, que se encuentra localizada en la hendidura sináptica entre las fibras del nervio esplácnico y las células cromafines, y que es responsable de la degradación de la acetilcolina (Sawyer and Everett, 1947). A pesar de esta rápida eliminación de la ACh, la desensibilización de los receptores nicotínicos puede ocurrir, haciendo que las corrientes iónicas a su través disminuyan (Quick and Lester, 2002). Esta no es la única forma de desensibilización y reducción o terminación de la señal, ya que también se ha visto que se puede producir una inactivación de los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (Artalejo et al., 1987, Aunis, 1998). Otra manera de regulación de la liberación de catecolaminas se produce mediante el ATP (liberado junto con las catecolaminas). El ATP se une a receptores purinérgicos provocando una disminución de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ , proporcionando un mecanismo autocrino/paracrino de terminación de la respuesta colinérgica (Gandia et al., 1993). Además, la célula cromafín posee una serie de mecanismos que le permiten regular la cantidad y localización del ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Una vez que el calcio entra en la célula, éste va a ser tamponado y redistribuido por la acción de proteínas quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$ , por el RE y por la mitocondria (García et al., 2006).

### **2.1.3 El proceso de exocitosis en la célula cromafín**

La exocitosis es el proceso por el que hormonas y neurotransmisores almacenados en vesículas son liberados mediante la fusión de las membranas vesicular y plasmática. Se trata de un proceso enormemente dinámico, rápido y espacialmente restringido que involucra múltiples pasos; entre ellos el transporte vesicular, su llegada y atraque a la membrana plasmática, su maduración y finalmente fusión y liberación del contenido vesicular (Thorn

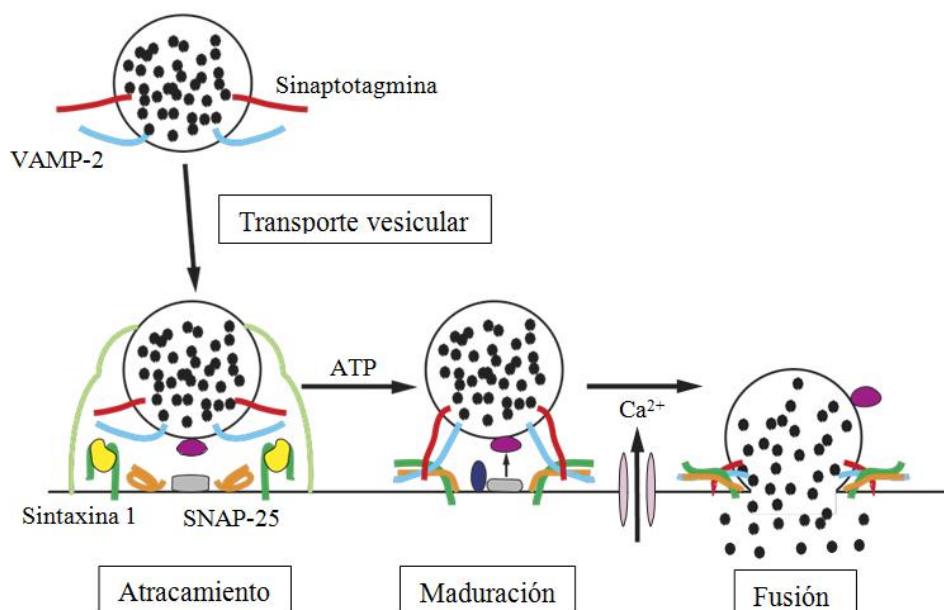


et al., 2016). El proceso de exocitosis es un componente esencial en la señalización celular, involucra la liberación de una amplia gama de moléculas y está presente en una multitud de vías fisiológicas esenciales.

Todas las células poseen una vía de **secreción constitutiva**, en la que las vesículas (salientes del aparato de Golgi) se fusionan con la membrana plasmática. Esta vía no requiere una elevación en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y es necesaria para el reciclado de la membrana plasmática y para la secreción de ciertas moléculas por parte de algunas células, como anticuerpos, proteínas plasmáticas y componentes de la matriz extracelular (De Matteis and Luini, 2008).

Sin embargo, algunos tipos celulares como pueden ser las neuronas, las células endocrinas y exocrinas y las células hematopoyéticas, presentan una vía de **secreción regulada** (Figura 8), que sólo tiene lugar en respuesta a una señal fisiológica y tras una elevación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . En esta vía de secreción, comúnmente las vesículas permanecen en un estado de atraque (“docking”) a la membrana antes de sufrir el proceso de exocitosis (Verhage and Sorensen, 2008). En este estado, las vesículas sufren un proceso de maduración (“priming”) dependiente de ATP, que las hace capaces de experimentar el proceso de fusión de membranas dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Rettig and Neher, 2002). Dicho proceso de fusión está mediado por grandes complejos moleculares que se ensamblan a demanda y se desensamblan cuando el proceso ha finalizado. Hay una gran cantidad de proteínas implicadas en la formación de estos complejos, siendo el denominado complejo SNARE (por sus siglas del inglés, soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) el núcleo de este motor de fusión (Jahn and Scheller, 2006). Estas proteínas fueron caracterizadas a finales de los años 80, y se encuentran muy conservadas a lo largo de la evolución. Las principales proteínas que forman este complejo son la SNAP-25 (synaptosome associated protein 25, por sus siglas en inglés), la sintaxina 1 y la VAMP2 (vesicle-associated membrane protein 2, por sus siglas en inglés; también denominada sinaptobrevina).

Han surgido varios modelos tratando de explicar el modo en el que la fusión de las membranas se produce, aunque sigue siendo un tema de controversia en la actualidad. Uno de los más aceptados sugiere que las proteínas SNARE localizadas en membranas enfrentadas (SNAP-25 y sintaxina 1 en la membrana plasmática y VAMP2 en la membrana vesicular) impulsan la fusión mediante el uso de la energía que se libera durante la formación de una estructura helicoidal de 4 hebras (Jahn and Scheller, 2006) (Figura 8).



**Figura 8. Modelo de exocitosis regulada.** Se muestran los componentes clave involucrados en los procesos de atraque, maduración y fusión de la vesícula sináptica con la membrana plasmática. La unión de VAMP2 (azul claro) con sintaxina 1 (verde) y SNAP-25 (naranja) formarán el núcleo del complejo SNARE, que llevará a la fusión de las membranas y liberación del contenido vesicular al espacio extracelular con la ayuda de otras proteínas accesorias: sinaptotagmina (rojo), Munc-18 (amarillo), dinamina (gris), sindapinas (azul oscuro) y complexinas (morado). Adaptado de (Seino and Shibasaki, 2005).

Los complejos SNARE pueden estar regulados por una gran cantidad de proteínas y moléculas accesorias. Entre ellas, una de las más importantes (si es posible hacer una diferenciación) es la sinaptotagmina. En mamíferos se han descrito hasta 14 isoformas de esta proteína y está considerada como el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  que desencadena el proceso de fusión. Se trata de una proteína transmembrana localizada en la membrana vesicular y que contiene 2 dominios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  C2 (del inglés, conserved región 2 of protein kinase C domains) (Jahn and Scheller, 2006).

Otras proteínas reguladoras de los complejos SNARE son la Munc-18, la dinamina, las sindapinas, las complexinas, y un largo etcétera. Se sabe que todas estas proteínas están implicadas en el proceso de exocitosis, sin embargo, su función concreta no es del todo conocida y continúa siendo tema de debate. Así por ejemplo, Heidi de Wit atribuye a Munc-18 una función en el atraque de las vesículas a la membrana plasmática, promoviendo la formación de un complejo 1:1 de sintaxina 1 y SNAP-25 y determinando el número de sitios de atraque mediante la modulación de la F-actina que se encuentra justo debajo de

la membrana plasmática (de Wit, 2010). Sin embargo, otros autores le han atribuido funciones posteriores en el proceso exocitótico. Richard, J. Fisher y colaboradores sostienen que Munc-18 juega un papel en la regulación del poro de fusión (Fisher et al., 2001), mientras que A. Gulyas-Kovacs y colaboradores defienden que su papel se produciría en el “priming” y no en el control del poro de fusión (Gulyas-Kovacs et al., 2007).

La dinamina es una GTPasa muy estudiada por su papel en la escisión vesicular durante el proceso de endocitosis, sin embargo, más recientemente se le ha atribuido también una función en la exocitosis vesicular (Artalejo et al., 1995, Lou et al., 2012). Así, la interacción entre la dinamina 1 y las sindapinas contribuyen a la expansión del poro de fusión (Samasilp et al., 2012).

Las complexinas son pequeñas proteínas citosólicas que se asocian al complejo SNARE y que podrían estar aumentando y estabilizando la unión de la sinaptotagmina al complejo SNARE, además de producir una aproximación de los complejos a los CCDVs, lo que produciría un aumento en la primera liberación rápida de las vesículas nada más entrar el  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula (Lin et al., 2013).

#### **2.1.4 Similitudes entre la célula cromafín y la neurona simpática**

Como se ha comentado anteriormente las células cromafines presentan un gran parentesco con las neuronas simpáticas debido a su mismo origen embrionario. Esto hace que ambos tipos celulares compartan una gran cantidad de características funcionales. Entre ellas, las células cromafines (al igual que las neuronas) poseen distintos tipos de receptores nicotínicos, así como muscarínicos (Feldberg et al., 1934, Aunis and Langley, 1999, de Diego et al., 2008, Olivos and Artalejo, 2008) sobre los que actúa la ACh. Disparan también potenciales de acción (Biales et al., 1976, Brandt et al., 1976, Kidokoro and Ritchie, 1980). Poseen canales de calcio, sodio y potasio sensibles al voltaje (Fenwick et al., 1982, Artalejo et al., 1993, Garcia et al., 2006). Las células cromafines expresan un sistema de óxido nítrico similar al presente en el cerebro. Así, los mecanismos básicos de regulación del sistema óxido nítrico para ambos sistemas fueron identificados en las células cromafines (Lu et al., 2008). Del mismo modo, el amplio papel del factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés) fue descubierto por primera vez en la médula suprarrenal (Bornstein et al., 2003).

Líneas celulares derivadas de las células cromafines, como es el caso de las PC12, línea derivada de un feocromocitoma de médula adrenal de rata, son ampliamente utilizadas en estos tipos de estudios. Por ejemplo, se ha visto que la privación de NGF en las células PC12 causa una sobreproducción de A $\beta$ , pudiendo ser causante de la enfermedad de Alzheimer (Matrone et al., 2008). Esta conexión entre la privación de NGF y la activación de la vía amiloidogénica fue descrita posteriormente en neuronas de hipocampo (Matrone et al., 2009).

Así pues, las células cromafines y las neuronas comparten multitud de vías de señalización y responden de manera similar ante una gran variedad de tratamientos. La utilización de las células cromafines como modelo de célula neuronal radica en la mayor simplicidad y estudio de estas células. Su cultivo y mantenimiento es sencillo. Además, la morfología esférica que adquieren las células cromafines en cultivo permite la realización de determinadas técnicas experimentales que en las neuronas resultaría imposible, como pueden ser la medida de capacidad de membrana ( $C_m$ ) mediante la técnica de patch-clamp o el estudio de la exocitosis mediante amperometría. Otra gran ventaja que aporta la utilización de estas células es la posibilidad de su cultivo a partir de animales adultos, hecho que resulta imposible (al menos por ahora) cuando se trata de un cultivo de neuronas. De esta manera, las células cromafines han sido y continúan siendo un buen modelo periférico para el estudio del cerebro y sus enfermedades.



“El conocimiento no es una vasija que se llena, sino un fuego que se enciende”

Plutarco. Historiador y filósofo griego (50-120)

---

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



Como ya se ha comentado en la Introducción, las principales características histopatológicas de la EA son la deposición del péptido A $\beta$ , con la subsiguiente formación de las placas seniles y la hiperfosforilación de la proteína tau, con la formación de ovillos neurofibrilares. Estos rasgos anormales cursan con un deterioro en la función neuronal y sináptica, que puede traer consigo déficits en la liberación de neurotransmisores y en la cognición (Hardy and Selkoe, 2002). Los déficits sinápticos podrían deberse a alteraciones en la síntesis, almacenamiento o liberación del neurotransmisor. Otra posibilidad reside en cambios en la densidad de los receptores postsinápticos o en alguna modificación en las vías de señalización intracelular (de Diego et al., 2012).

En este trabajo de investigación nos proponemos abordar el estudio de estas posibles alteraciones, centrándonos en la liberación del neurotransmisor, en un modelo murino que co-expresa 3 mutaciones ligadas a la enfermedad de Alzheimer de tipo familiar (PSEN1<sub>M156V</sub>, APP<sub>Swe</sub> y tau<sub>P301L</sub>). Este ratón desarrolla la patología amiloide y tau de una forma similar a como ocurre en pacientes con EA. Comenzando con una patología amiloide en la corteza que posteriormente se extiende hacia el hipocampo y más adelante en el tiempo una patología tau, que comienza a desarrollarse en el hipocampo para luego extenderse hacia la corteza (Oddo et al., 2003a, Oddo et al., 2003b). Los ratones jóvenes (1-3 meses) presentan una memoria y aprendizaje normales, apareciendo los primeros signos de fallo cognitivo a los 4 meses de edad como un problema en la retención. A los 6 meses comienza a observarse ya un deterioro en la memoria, incluso en la memoria a corto plazo (Billings et al., 2005).

Debido a los graves síntomas de pérdida de memoria que sufren estos pacientes, la investigación de la EA se ha centrado en el cerebro, y principalmente en las células de tipo neuronal. Sin embargo, ya son varios los estudios que postulan la afectación de otros tipos celulares en esta enfermedad. Así por ejemplo, se ha observado una desregulación del ion Ca<sup>2+</sup> en células periféricas, tales como los fibroblastos, de pacientes con EA (LaFerla, 2002), una disminución en la densidad de mitocondrias en células endoteliales (Stewart et al., 1992), así como alteración de algunas enzimas mitocondriales en fibroblastos y plaquetas de pacientes con EA (Blass et al., 2000).

La maquinaria exocitótica está compuesta por una compleja estructura proteica que es muy similar en células neuronales y células neuroendocrinas. Sin embargo, el análisis de los diferentes pasos que tienen lugar durante el proceso de exocitosis en el rango de milisegundos resulta muy complejo e imposible de medir con las técnicas disponibles ac-



tualmente en las células del SNC. No obstante, estudios de este tipo han sido muy utilizados en las células cromafines periféricas mediante la técnica de amperometría. A este respecto, también son varios ya los estudios que encuentran alteraciones en este tipo celular en la enfermedad de Alzheimer (Keating et al., 2008, de Diego et al., 2012), así como en otras enfermedades de tipo neurodegenerativo, como puede ser la enfermedad de Huntington (Mackenzie et al., 2014) o la esclerosis lateral amiotrófica (Calvo-Gallardo et al., 2015).

Con todo ello, nuestra **hipótesis** de partida emerge de la idea de que la célula cromafín sufre algunos de los cambios fisiopatológicos relacionados con los déficits sinápticos que acontecen en el SNC de pacientes con enfermedades neurodegenerativas. Estos cambios podrían ser primarios, relacionados con la patogénesis de estas enfermedades y/o secundarios, debidos a la afectación del sistema nervioso periférico, y más concretamente en el caso que nos atañe, al eje simpático-adrenal. Esta hipótesis se encontraría apoyada por el emergente concepto de que las enfermedades neurodegenerativas son enfermedades multisistémicas en las que, a medida que la enfermedad progresa, se afectan distintos subtipos de neuronas y sinapsis. Si dicha sospecha es cierta, ello implicaría que las señales de  $Ca^{2+}$ , la exocitosis y la excitabilidad de la célula cromafín, que posee un papel clave en situaciones de conflicto y estrés prolongado, se afectarían de forma similar a las neuronas del SNC.

Para su estudio nos hemos propuesto los siguientes **objetivos** concretos:

**1.- Estudiar el proceso de exocitosis y liberación de catecolaminas en las células cromafines de ratones 3xTg-AD en respuesta a ACh (neurotransmisor fisiológico) o altas concentraciones de  $K^+$ .** De esta manera, trataremos de analizar alteraciones en el proceso de neurotransmisión que puedan llevar consigo perturbaciones en la cantidad de neurotransmisor liberado. La utilización tanto del estímulo fisiológico ACh como de una solución alta en  $K^+$  nos permitirá hacernos una idea sobre posibles diferencias en el manejo del ion  $Ca^{2+}$  (debido a las diferentes señales que producen), así como la afectación del acoplamiento estímulo-secreción a distintos niveles (ya que la ACh actuará sobre los nAChRs mientras que el  $K^+$  lo hará directamente sobre los CCDVs).

**2.- Examinar electrofisiológicamente los distintos canales y receptores involucrados en el proceso de estimulación-secreción en la célula cromafín de ratones 3xTg-**

**AD.** Con ello, pondremos de manifiesto posibles cambios en el flujo de distintos iones que podrían estar afectando de manera directa el proceso de neurotransmisión.

**3.- Realizar medidas del potencial de membrana celular y disparo de potenciales de acción en situación de reposo y de estimulación de las células cromafines de ratones 3xTg-AD con ACh.** Cambios en los flujos iónicos en una célula influyen directamente en la excitabilidad de la misma, pudiendo observarse cambios en el potencial de membrana en reposo, así como en la forma y/o eficacia con que la célula responde ante un estímulo.

**4.- Cuantificar distintas proteínas implicadas en el proceso de exocitosis en las células cromafines de ratones 3xTg-AD.** Las alteraciones observadas en el proceso de neurotransmisión podrían estar explicadas por la afectación de alguna/s proteína/s implicada/s en dicho proceso.

En este contexto, el estudio de la biología de la célula cromafín en el modelo 3xTg-AD de EA podría proporcionarnos una valiosa información sobre la génesis y evolución de los déficits sinápticos que acontecen en el cerebro de los pacientes que sufren esta enfermedad, así como sobre la posible afectación de otros sistemas, como es el eje simpático-adrenal.



“El genio se compone del dos por ciento de talento y del noventa por ciento de perseverante aplicación”

Ludwig van Beethoven. Compositor y pianista alemán (1770-1827)

---

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



## **1. ANIMALES UTILIZADOS**

Todos los experimentos incluidos en esta Tesis Doctoral fueron realizados bajo las recomendaciones del Comité de Ética de la Universidad Autónoma de Madrid sobre el uso de animales para la experimentación en laboratorio, de acuerdo con 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 53/2013). Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales y para utilizar el menor número de animales permitido por el protocolo experimental y el poder estadístico de los datos del grupo. Los animales se alojaron en condiciones controladas de temperatura e iluminación con comida y agua *ad libitum*, y manteniendo ciclos de luz-oscuridad de 12:12 h.

Para los estudios realizados en este trabajo se utilizaron ratones macho 129/C57BL6, con mutaciones en los genes que codifican para la proteína precursora amiloide (sobre-expresan la mutación "Sueca" de la proteína precursora amiloide), para la presenilina 1 (contienen la mutación M146V: sustitución de un solo aminoácido de metionina a valina en el codón 146) y para la proteína tau (contienen la mutación humana P301L: sustitución de un solo aminoácido de prolina a leucina en el codón 301) (Oddo et al., 2003b), denominados a partir de ahora como 3xTg-AD.

Los ratones fueron utilizados en los días postnatales P60, P180 y más de P360; a los 2 meses de edad (P60) los animales no presentan deterioro cognitivo, mientras que a los 6 y 12 meses de edad (P180 y P360, respectivamente) ya son patentes los cambios histopatológicos y comportamentales característicos de la EA (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).

## **2. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS CROMAFINES DE RATÓN**

Los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical, y las glándulas adrenales fueron inmediatamente extraídas mediante laparotomía y colocadas en solución Locke fría (en hielo) (composición en mM: 154 NaCl, 5.58 KCl, 3.6 HNaCO<sub>3</sub>, 10 HEPES, 5.5 glucosa; pH = 7.35 ajustado con NaOH). Una vez extraídas, las glándulas son colocadas sobre un trozo de papel de filtro humedecido con solución Locke situado sobre una placa Petri con hielo, bajo un microscopio estereoscópico (lupa). Posteriormente se procede a la

retirada de la grasa de las glándulas con la ayuda de un bisturí y a la disección de la médula, que conlleva la eliminación de la cápsula y la corteza que la rodean. Para ello, la glándula es sujeta con la ayuda de dos pinzas por el orificio que deja la vena adrenolumbar, posteriormente al tirar con las pinzas hacia los extremos se consigue separar la médula de la corteza y la cápsula. Si la médula ha quedado con restos de corteza éstos son retirados manualmente con la ayuda de un bisturí. A continuación, las médulas adrenales disecadas se colocan en 500 µl de solución Locke que contiene papaína (P3125, Sigma Aldrich) en una concentración de 25 U/ml, durante 20-30 minutos a 37°C, tiempo en el que la papaína digerirá las uniones intercelulares, facilitando la disociación de las células cromafines.

Tras este proceso de digestión, se extrae y descarta la solución de papaína con cuidado de no aspirar las médulas, y se aplica rápidamente 1 ml de medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), con alta glucosa (4.5 g/L), 26 mM HNaCO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES, 4 % de suero bovino fetal, 50 UI/ml de penicilina-estreptomicina; pH = 7.35 (ajustado con NaOH), para diluir y lavar la papaína. Este lavado se repite 2 veces más (3 lavados en total).

Una vez retirado y descartado el DMEM del tercer lavado, se añaden 100 µl de DMEM nuevo a las médulas, y se procede a realizar una disgregación mecánica. Para ello, se utiliza en primer lugar una micropipeta de 1 ml (P1000) con un volumen seleccionado de 250 µl, y se realizan unos 20-30 pases suaves y lentos al DMEM con las médulas, con cuidado de no introducir burbujas, de forma que las médulas pasen repetidamente por la punta de la micropipeta, lo que ocasionará que las células se desprendan. Tras estos pases, se retira el máximo volumen de DMEM posible con cuidado (ya que este medio ya contendrá células cromafines) y sin absorber los trozos de médula, y se depositan en un eppendorf de 2 ml.

Seguidamente, se añaden otros 100 µl de DMEM a los restos de médulas que quedan y se repite el proceso anterior usando en este caso una micropipeta de 200 µl (P200), con un volumen seleccionado de 200 µl; se realizan unos 20-30 pases suaves y lentos al DMEM con las médulas, con cuidado de no introducir burbujas, y tras acabar, se retira el máximo volumen posible con cuidado sin absorber las médulas, y se deposita en el eppendorf anterior junto con el DMEM con células obtenido con la disgregación previa (unos 180 µl).

Si es necesario (porque todavía quede algún resto de médula) se realizará una última disgregación con el volumen residual (en torno a 20  $\mu\text{l}$ ) con una micropipeta de 10  $\mu\text{l}$  (P10) con un volumen seleccionado de 10  $\mu\text{l}$ . De nuevo se realizarán unos 20-30 pases suaves y lentos al DMEM con las médulas, con cuidado de no introducir burbujas, y tras acabar, se retirará el máximo volumen posible con cuidado y sin absorber las médulas, y se depositará en el eppendorf anterior junto el volumen obtenido de las dos disgregaciones anteriores (en torno a unos 200  $\mu\text{l}$  en total), obteniendo así la solución final de cultivo de células cromafines de ratón (CCR).

Para terminar, se descartan los restos de médula, y se procede al sembrado de las CCR en gotas de 10 a 15  $\mu\text{l}$  (dependiendo de la cantidad de pocillos a utilizar) sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro en placas multipocillo. Para ello, previamente se deben haber tratado los cubreobjetos para favorecer que las células se adhieran mejor: éstos son inicialmente esterilizados durante 30-45 min bajo luz ultravioleta (UV) y posteriormente se les añade una gota (de tamaño suficiente para que cubra el cubreobjetos por completo) de una solución de poli-D-lisina (P1024, Sigma Aldrich) a una concentración de 0.1 mg/ml, y se mantiene durante 30-45 min a 37°C. Por último, se realiza el lavado de la poli-D-lisina con agua estéril y se deja secar por completo.

Una vez realizado el sembrado de las CCR, se coloca la placa multipocillo en el incubador a una temperatura de 37°C, con una atmósfera saturada de humedad (95%) y con una concentración del 5% de CO<sub>2</sub> durante aproximadamente 40-45 min, tiempo en el que las células se adherirán al cubreobjetos. Pasado este tiempo, se añade a cada pocillo 500  $\mu\text{l}$  de DMEM.

### **3. TÉCNICA DE AMPEROMETRÍA**

Como su propio nombre indica la amperometría implica la medición de la intensidad de la corriente que circula por un circuito eléctrico.

Esta técnica fue descrita por primera vez por el grupo de Mark Wightman a principios de los años 90, al ser capaces de registrar la secreción de catecolaminas de células cromafines bovinas a nivel de célula única y de distinguir la secreción correspondiente a cada vesícula aislada (Leszczyszyn et al., 1990, 1991, Wightman et al., 1991). Por aquel entonces empezaba a tomar peso la idea de que la neurotransmisión química ocurría por el proceso de exocitosis, en el cual los neurotransmisores (almacenados en vesículas sinápti-



cas) eran liberados al espacio extracelular mediante la fusión de las membranas plasmática y vesicular.

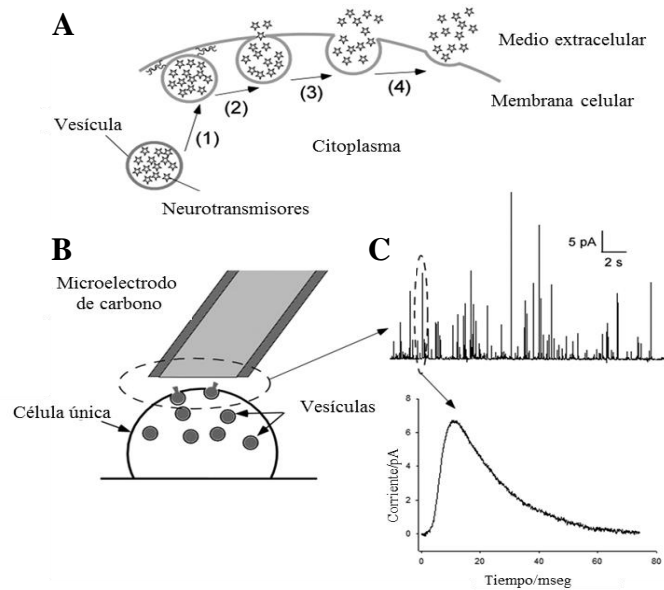
Algunos años antes se había conseguido cuantificar la exocitosis de neurotransmisores mediante distintas metodologías. Así, por ejemplo, en 1982, Erwin Neher y Alan Marty adaptaron la técnica de patch-clamp (descrita más adelante) para medir el incremento en la capacidad de la membrana celular que ocurre tras la fusión de la vesícula con la membrana plasmática (Neher and Marty, 1982). También, la secreción de acetilcolina había sido medida en los conos de crecimiento de neuronas individuales mediante la utilización de la técnica de patch-clamp en su configuración de parche escincido “fuera-fuera” (outside-out en inglés) (Hume et al., 1983, Young and Poo, 1983). Se comenzaban a utilizar también técnicas cromatográficas para analizar el contenido químico en células únicas (Kennedy et al., 1989).

Sin embargo, la medida química directa de eventos exocitóticos a nivel de célula única con una resolución temporal de milisegundos no había sido descrita hasta el momento. Estas medidas se realizaron colocando sobre la superficie de la membrana celular microelectrodos de fibra de carbono, que permitirán oxidar o reducir moléculas que tengan facilidad para ello mediante la aplicación de una corriente eléctrica.

### **3.1 Descripción de la técnica**

Al igual que hiciera el grupo de Mark Wightman para el desarrollo de esta Tesis Doctoral hemos utilizado la técnica de amperometría sobre células cromafines, secretoras de catecolaminas.

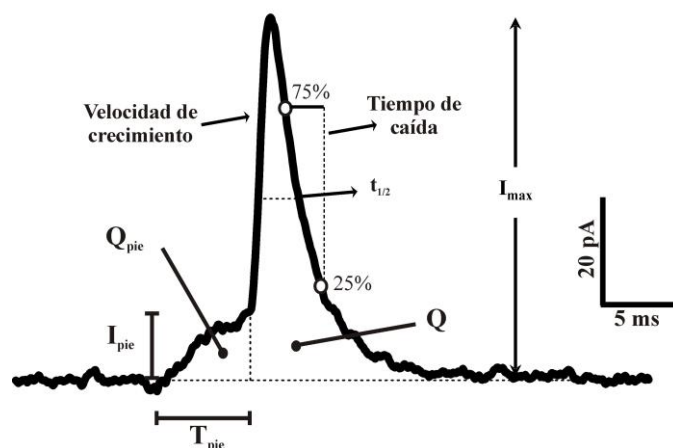
La técnica consiste en poner en contacto un electrodo polarizado a un voltaje superior al potencial de oxidación de las catecolaminas (unos 700 mV) con la superficie de la célula secretora de estas aminas (Figura 9B). Las moléculas liberadas en las inmediaciones del electrodo serán rápidamente oxidadas produciéndose especies reducidas y liberándose electrones (dos por molécula de catecolamina oxidada), los cuales se verán atraídos hacia el electrodo de carbono, debido a que este se encuentra a un potencial positivo. Este trasiego de electrones generará unas elevaciones de corriente (las llamadas “espigas amperométricas”, que representan el contenido de catecolaminas que libera una vesícula de secreción individual) que serán amplificadas mediante un amperómetro y registradas en un ordenador, y que finalmente veremos como un registro amperométrico (Figura 9C).



**Figura 9. Esquema del proceso de exocitosis y técnica de amperometría.** **A**, principales pasos en el proceso de exocitosis: (1) atraque de las vesículas a la membrana celular mediante proteínas del complejo SNARE; (2) formación del poro de fusión; (3) expansión del poro de fusión; y (4) posible liberación completa del contenido vesicular. **B**, esquema de la configuración experimental amperométrica. El microelectrodo con la fibra de carbono se posiciona en la superficie de la célula a estudiar. **C**, los neurotransmisores liberados mediante el proceso de exocitosis son oxidados en la superficie de la fibra de carbono, dando lugar a espigas de corriente en función del tiempo. Cada espiga se corresponde con la liberación de una sola vesícula. Adaptado de (Amatore et al., 2015).

El análisis cuantitativo y cinético de dichas espigas amperométricas nos proporcionará información acerca de la cantidad y el modo en el que se liberan los neurotransmisores contenidos en las vesículas sinápticas.

Existe una correlación entre la forma de la espiga y los procesos fisiológicos que están teniendo lugar. De este modo, en el momento en el que se produce el poro de fusión, esto es la unión de la membrana vesicular con la membrana plasmática (Figura 9A (2)) se genera una pequeña elevación en el registro, es el denominado “pie de espiga” (Figura 10). Cuando ese poro de fusión se expande se producirá la liberación del contenido vesicular (o de gran parte de él) (Figura 9A (3)(4)) dando lugar a una rápida y más notoria elevación en el registro (espiga amperométrica) (Figura 9C y Figura 10). El cierre del poro de fusión o fusión completa de las membranas vesicular y plasmática dará lugar a la caída de la señal en el registro (esto es, el agotamiento de catecolaminas a oxidar en el electrodo), y por lo tanto la finalización de la espiga amperométrica (Figura 10).



**Figura 10. Representación de una espiga amperométrica y sus parámetros cinéticos.** *Velocidad de crecimiento*: calculada con la pendiente de la fase de crecimiento de la espiga;  $I_{max}$ : altura de la espiga;  $t_{1/2}$ : anchura de la espiga al 50% de su altura;  $Q$ : área de la espiga, una indicación del contenido y/o liberación de catecolaminas de la vesícula; *tiempo de caída*: obtenido con el tiempo entre el 75 y el 25% de la altura de la espiga en la fase de descenso;  $I_{pie}$ : altura del pie de espiga;  $T_{pie}$ : duración del pie de espiga y  $Q_{pie}$ : área del pie de espiga, una indicación de la liberación de catecolaminas durante la creación del poro de fusión, antes de su expansión.

Como se menciona más arriba, el análisis cinético de estas espigas permiten conocer la forma en la que los neurotransmisores están siendo liberados (rápida o lentamente), siendo posible analizar gran cantidad de parámetros en ellas, a saber: la *velocidad de crecimiento* es calculada con la pendiente de la fase de crecimiento de la espiga, medida en pA/ms;  $I_{max}$  representa la altura de la espiga, medida en pA;  $t_{1/2}$  es la anchura de la espiga al 50% de su altura, medido en ms;  $Q$  es el área de la espiga, una indicación del contenido y/o liberación de catecolaminas de la vesícula (tamaño cuantal), medida en pC; el *tiempo de caída* es obtenido con el tiempo entre el 75 y el 25% de la altura de la espiga en la fase de descenso, medido en ms. Además, es posible estudiar características propias de los “pies de espiga” (amplitud de pie, tiempo de pie y liberación cuantal de catecolaminas durante el pie, representados por  $I_{pie}$ ,  $T_{pie}$  y  $Q_{pie}$ , respectivamente) (Figura 10).

### 3.2 Electrodos de amperometría

#### 3.2.1 Construcción

La construcción de los electrodos de amperometría se ha basado en el método previamente descrito por Kawagoe y colaboradores (Kawagoe et al., 1993). Brevemente, una fibra de carbono de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro (Amoco, Whiting, IN) es introducida en un capilar de borosilicato de 1.8 mm de diámetro exterior y 1.5 mm de luz interior (Kimble-Kontes, Querétaro, México). Posteriormente, los capilares con las fibras en su interior son estirados

mediante un estirador de pipetas (modelo PC-10, Narishige, Tokio, Japón), de manera que mediante la aplicación de 2 calores sucesivos por parte de una resistencia se obtendrán 2 pipetas por cada capilar de borosilicato. De las puntas de ambas pipetas separadas sobresale la fibra de carbono, que se corta con ayuda de unas pequeñas tijeras, obteniéndose así dos pipetas con sendas fibras sobresaliendo por la punta.

A continuación, se prepara una mezcla de resina epoxi (86 % p/p de resina EPON<sup>TM</sup> Resin-828 (Miller-Stephenson, Danbury, CT) y 14 % p/p de m-fenildiamina (P23954, Sigma Aldrich)). La mezcla se calienta en un tubo de ensayo al baño maría a unos 90°C, y se agita suavemente con una pipeta Pasteur hasta que se obtiene una mezcla homogénea. En ese momento, se introduce la punta de cada pipeta en la mezcla de resina mientras ésta aún se encuentra en estado líquido (debe mantenerse la temperatura elevada durante el máximo tiempo posible para evitar que la mezcla de resina epoxi se endurezca prematuramente). Posteriormente se deja secar la resina durante 24 h. Al día siguiente las puntas se introducen en un horno durante 2 h a 100°C y otras 2 h a 150°C para que la mezcla de resina se endurezca. Gracias a este proceso se consigue aislar eléctricamente la fibra de carbono y la punta de la pipeta impidiendo el paso de líquidos entre el interior y el exterior de la misma.

En el momento de uso del electrodo y, dado que toda la fibra que sobresale de la punta de la pipeta está recubierta de resina, se corta la fibra con ayuda de un bisturí dejándola con una longitud de no más de 1 mm. De este modo, quedará expuesta una zona libre de resina al final de la fibra que será conductora de la electricidad y que será la que esté en contacto con la célula.

### **3.2.2 Calibrado**

Para asegurar sensibilidades homogéneas y medidas de amplitud similares entre los registros de unas células y otras, es recomendable calibrar los electrodos con una solución conteniendo 20-50  $\mu\text{M}$  de adrenalina, noradrenalina u otra sustancia a medir (Machado et al., 2008). Para el calibrado de los electrodos utilizados en el desarrollo de esta Tesis Doctoral se utilizó una solución conteniendo 50  $\mu\text{M}$  de adrenalina en Krebs-Hepes (composición en mM: 145 NaCl, 5.6 KCl, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 2 CaCl<sub>2</sub>, 11 glucosa; pH = 7.35 ajustado con NaOH).

Se utilizaron pipetas que, una vez conectadas a nuestro amperómetro (Segainvex UAM, Madrid, España) y posicionadas por medio de un micromanipulador (modelo MHW-3, Narishige) a una distancia de unos 50-100  $\mu\text{m}$  de la salida del sistema de perfusión (distancia a la que se encontrará la célula a la hora de medir la secreción de catecolaminas), produjeran una corriente entre 100 y 400 pA tras ser perfundidas con la solución de adrenalina. El calibrado de los electrodos se realiza en condiciones de parada de flujo porque la magnitud de la señal electroquímica es altamente dependiente del flujo (Machado et al., 2008).

#### **4. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS**

Todas las células, por el hecho de estar vivas, poseen una diferencia de potencial ( $\Delta V$ ) entre ambos lados de su membrana plasmática (potencial de membrana,  $V_m$ ). Esta diferencia de potencial está producida por la distribución asimétrica de iones a ambos lados de la membrana, que viene marcada a su vez por las propiedades intrínsecas de la misma. El cálculo del  $V_m$  de una célula en reposo viene determinado por la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz:

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_e + P_{Na} [Na^+]_e + P_{Cl} [Cl^-]_e}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_i}$$

Donde: R = Constante de los gases ( $8.314472 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ )

T = Temperatura absoluta (298 K)

F = Constante de Faraday ( $96500 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$ )

$P_X$  = Permeabilidad relativa para cada ion

$[X]_e$  = Concentración de cada ion en el medio extracelular

$[X]_i$  = Concentración de cada ion en el medio intracelular

Así, el  $V_m$  de una célula depende fundamentalmente de la permeabilidad selectiva de la membrana a determinados iones y de la concentración de éstos tanto dentro como fuera de la célula. En esta fórmula se han representado únicamente los iones sodio, potasio y cloruro por ser los que más participan en la generación del potencial de membrana en las células nerviosas y musculares.

Esta asimetría iónica, con el consiguiente movimiento de iones a favor de los correspondientes gradientes electroquímicos, va a ser la responsable de la interacción de la célula con el medio que la rodea, permitiéndole intercambiar materia y energía. Las llamadas “células excitables” (células musculares, células nerviosas y células endocrinas) pueden además variar su  $V_m$  en respuesta a determinados estímulos, hecho que va a provocar una respuesta determinada en cada uno de estos tipos celulares. En concreto, esta variación del  $V_m$  celular constituye la base de la transmisión del impulso nervioso, que juega un papel fundamental en la comunicación y control de los organismos pluricelulares.

Las técnicas electrofisiológicas permiten medir este trasiego de iones y cambios en el potencial de membrana. La aparición de la electrofisiología contribuyó de manera significativa al avance en el conocimiento de estos mecanismos de membrana que permiten la comunicación celular, pero ha sido la aparición de la electrofisiología moderna con el desarrollo de la denominada técnica de “patch clamp”, la que está permitiendo profundizar mucho más en estos mecanismos (Hamill et al., 1981). La técnica de “patch clamp” es la que ha sido empleada en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Algunas ventajas que proporciona el desarrollo de esta técnica con respecto a las usadas con anterioridad es el empleo de un único electrodo que simultanea a elevada frecuencia el registro de voltaje y el registro de corriente; esto permite aplicar la técnica en células de pequeño tamaño y, además, la buena relación señal-ruido permite el registro de corrientes del orden de pA.

#### **4.1 Descripción de la técnica**

La técnica de “**patch clamp**” se basa en la inclusión de la célula objeto de estudio en un circuito eléctrico que está conectado a un amplificador (modelo EPC-9, HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemania).

Asumiendo que en los circuitos eléctricos se cumple la ley de Ohm:

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

se pueden aplicar esta técnica en dos modalidades: La modalidad de “**fijación de voltaje**”, en la que se le indica al amplificador que mantenga fijo el voltaje del circuito; de esta manera (y para que el voltaje se mantenga constante) cualquier cambio que se produzca en la resistencia (R), que se corresponderá con la apertura y cierre de canales iónicos en la membrana de la célula, se verá reflejado en cambios en la intensidad de la corriente (I). De

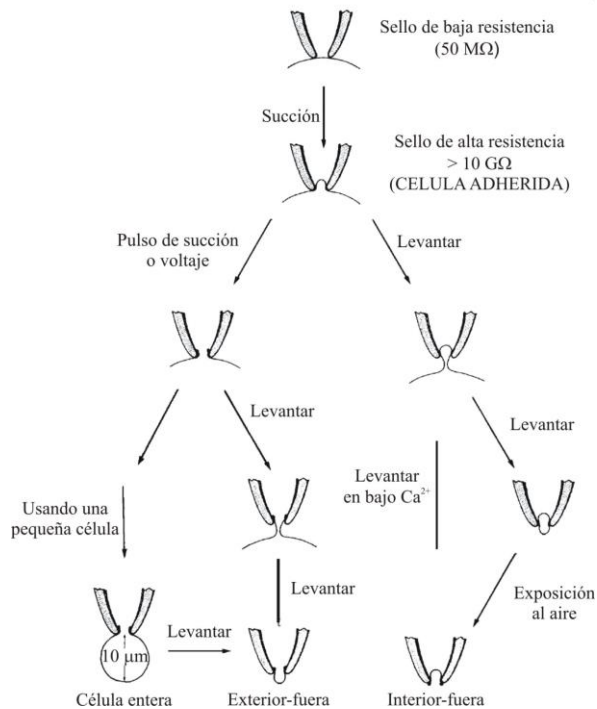
este modo, si en respuesta a un determinado estímulo se produce un trasiego de cargas a través de los diferentes canales iónicos y/o receptores presentes en la membrana, la corriente que se necesita inyectar para mantener fijo el  $V_m$  sería equivalente al movimiento de cargas que se ha producido a través de la membrana. Así, cuando nos encontremos en la modalidad de “fijación de voltaje” los registros que obtendremos se corresponderán con corrientes iónicas a través de distintos canales y/o receptores.

Se puede optar también por que el amplificador mantenga fija la intensidad de la corriente del circuito, en este caso nos encontraremos en la modalidad de “**fijación de corriente**”; si la intensidad de la corriente del sistema (I) es constante, cualquier cambio que se produzca en la resistencia (R), que se corresponderá con la apertura y cierre de canales iónicos en la célula, se verá reflejado en cambios en el voltaje (V). De este modo, al producirse un trasiego de cargas a través de los diferentes canales iónicos y/o receptores presentes en la membrana, esto se verá reflejado en cambios en el potencial de la membrana celular. Así, cuando nos encontremos en la modalidad de “fijación de corriente” los registros que obtendremos se corresponderán con cambios en el  $V_m$ .

El amplificador se conecta a una pipeta que contiene una solución salina y que se pone en contacto con la membrana celular. El primer paso en la ejecución de la técnica de “patch clamp” es la formación de un sello de alta resistencia eléctrica entre la membrana y la punta de la pipeta. Para ello se utiliza una pipeta de cristal cuya punta ha sido pulida mediante el calentamiento de una resistencia y que posee un diámetro de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ . La pipeta se aproxima a la membrana de la célula y se presiona contra ella, formando un sello eléctrico con una resistencia del orden de 50  $\text{M}\Omega$ . La alta resistencia de este sello asegura que la mayoría de las corrientes originadas en ese pequeño parche de membrana fluyan hacia el interior de la pipeta, y de allí al circuito de medida de corriente. Además, la elevada resistencia del sello contribuye a que exista un bajo nivel de ruido en los registros, al evitar el flujo de corriente entre pipeta y baño.

Bajo condiciones apropiadas (superficie de la pipeta limpia) y mediante la aplicación de una ligera succión al interior de la pipeta se pueden conseguir sellos pipeta-membrana celular con resistencias de 1-100  $\text{G}\Omega$ , conocidos como “giga-sellos”, que reducen el ruido del registro en un orden de magnitud, y permiten fijar el potencial del parche de membrana que se encuentra pinzado en la pipeta. Se alcanza así la configuración de célula adherida o parche *in situ* (“cell attached”). Además, estos sellos son mecánicamente muy estables, lo que permite realizar cierto número de manipulaciones mecánicas que dan

lugar a las distintas configuraciones de esta técnica (la ya nombrada célula adherida, célula entera, parche perforado, parche escindido interior-fuera y parche escindido exterior-fuera) (Figura 11).



**Figura 11. Representación esquemática de los procedimientos que conducen a las distintas configuraciones de la técnica de “patch clamp”.** Las cuatro configuraciones de registro son: célula adherida, registro de célula entera, parche escindido exterior-fuera y parche escindido interior-fuera. Esquema modificado de Hamill, D y colaboradores (Hamill et al., 1981).

Los experimentos desarrollados en esta Tesis se han realizado en la configuración de célula entera, ya que se trata de una configuración fácil de obtener, de manera rápida y que permite tener el control de la composición intracelular. Esta configuración se obtiene a partir de la configuración de célula adherida, con la aplicación de una suave succión o presión negativa que provoca la rotura del parche de membrana que hay bajo los bordes de la pipeta. Esto permite la comunicación del ambiente intracelular con el contenido de la pipeta. Al ser el contenido de la pipeta un volumen mucho mayor que el del citoplasma la solución del interior de la pipeta dializará al interior celular. En estos momentos el electrodo que se encuentra introducido en el interior de la pipeta podrá registrar la actividad de la totalidad de los canales iónicos presentes en la célula, de ahí el nombre de esta configuración, “célula entera”.

La principal limitación de esta configuración es la pérdida gradual de componentes intracelulares, principalmente segundos mensajeros, lo que puede causar una eventual desaparición de la respuesta modulada por estos compuestos.



#### **4.1.1 Registro de las corrientes iónicas**

Para el registro de las corrientes que fluyen a través de los distintos canales iónicos y/o receptores presentes en la célula cromafín, los cubreobjetos conteniendo las células se colocaron sobre una cámara experimental de metacrilato montada sobre la platina de un microscopio invertido Nikon Diaphot.

La cámara se perfunde constantemente con una solución control Krebs-HEPES (KH) (véase apartado de soluciones para la composición) a través de una pipeta de perfusión de fabricación artesanal formada por varios tubos de polietileno de pequeño diámetro (de 0.28 a 0.58 mm de diámetro interno), insertados dentro de una punta de pipeta de manera que no queden espacios entre los tubos y la pared de la pipeta. Todos los tubos desembocan en una salida común, la cual se sitúa a unos 100  $\mu\text{m}$  de la célula. Cada uno de los tubos se conecta por su extremo posterior a un reservorio donde se acumulan las soluciones de trabajo (donde se encuentra el KH u otras soluciones). El flujo por cada una de las vías se controla electrónicamente mediante válvulas solenoides (una para cada vía) de tal modo que sólo una de las válvulas puede permanecer abierta en el mismo período de tiempo. La velocidad del flujo fue de aproximadamente de 1 ml/min y regulada por gravedad de tal modo que se obtiene un cambio completo de soluciones en los alrededores de la célula en menos de 50 ms. Los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente ( $26 \pm 2$  °C).

Como se ha comentado anteriormente el registro de las corrientes iónicas se ha realizado en la modalidad de fijación de voltaje y en la configuración de célula entera. Las células se mantuvieron a un voltaje fijo de -80 mV y se dializaron con distintas soluciones intracelulares según las corrientes a medir, y que serán detalladas a continuación:

- Las corrientes nicotínicas ( $I_{\text{ACh}}$ ) a través de los receptores nicotínicos para la acetilcolina (nAChRs) se indujeron mediante la aplicación rápida de una solución conteniendo ACh (100  $\mu\text{M}$ ) durante 250 ms cada 30 s. Se midió el pico máximo de corriente (en pA). Las células fueron dializadas con la solución intracelular INC (ver composición en el apartado de soluciones).

- Las corrientes de  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{Na}}$ ) a través de los canales de sodio dependientes de voltaje se indujeron mediante la aplicación de pulsos despolarizantes de 10 ms de duración a distintos voltajes, esto es de -60 mV a +60 mV (en saltos de voltaje de 10 mV), aplicados a intervalos de 15 s. Se midió el pico máximo de corriente (en pA). Para evitar la entrada de

calcio a través de los canales para este ion dependientes de voltaje, las células fueron perfundidas con una solución KH conteniendo 0 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  nominal. Las células fueron dializadas con la solución intracelular INC (ver composición en el apartado de soluciones).

- Las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{Ca}}$ ) a través de los canales de calcio dependientes de voltaje se indujeron mediante la aplicación de pulsos despolarizantes de 50 ms de duración a distintos voltajes, esto es de -50 mV a +50 mV (en saltos de voltaje de 10 mV), aplicados a intervalos de 10 s. Se midió el pico máximo de corriente (en pA), lo cual se produce 5-10 ms tras el comienzo del pulso, ya que mediante este protocolo también se activan los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje, con una cinética de entrada de corriente más rápida que  $I_{\text{Ca}}$ . Las células fueron dializadas con la solución intracelular INC (ver composición en el apartado de soluciones).

- Las corrientes de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{K}(\text{Ca})}$ ) a través de los canales de potasio dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y voltaje se indujeron mediante la aplicación de pulsos despolarizantes de 400 ms de duración a distintos voltajes, esto es de -40 mV a +150 mV (en saltos de voltaje de 10 mV), aplicados a intervalos de 15 s. Se midió el pico máximo de corriente (en nA) a los 100 ms de haber comenzado el pulso. Las células fueron dializadas con la solución intracelular KCC (ver composición en el apartado de soluciones).

- Las corrientes de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje ( $I_{\text{K}(\text{V})}$ ) a través de los canales de potasio dependientes de voltaje se indujeron mediante la aplicación de pulsos despolarizantes de 400 ms de duración a distintos voltajes, esto es de -40 mV a +150 mV (en saltos de voltaje de 10 mV), aplicados a intervalos de 15 s. Se midió el pico máximo de corriente (en nA) a los 100 ms de haber comenzado el pulso. Para evitar la activación de los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , las células fueron perfundidas con una solución KH conteniendo 0 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  nominal. Las células fueron dializadas con la solución intracelular KCC (ver composición en el apartado de soluciones).

#### **4.1.2 Registro de la excitabilidad celular**

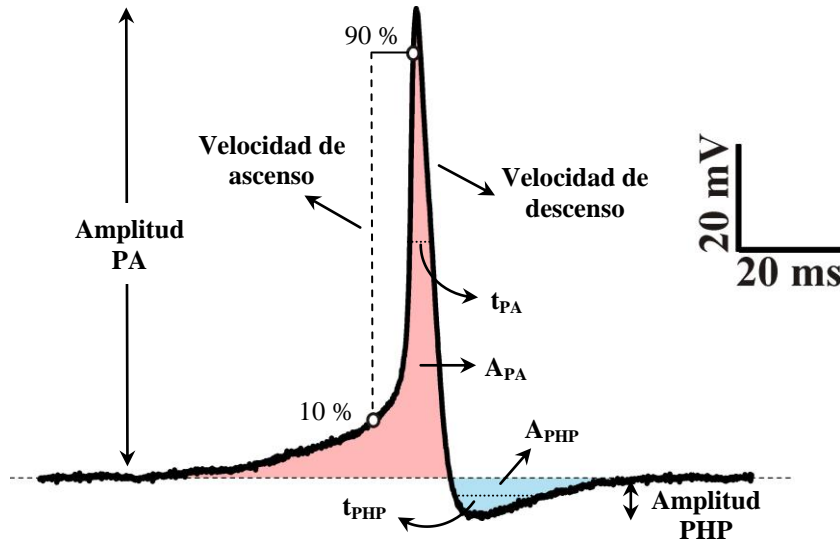
Las células cromafines (al igual que las neuronas) se comunican mediante un lenguaje electroquímico, de modo que las sustancias químicas (neurotransmisores) liberadas van a generar señales eléctricas.

Cuando la célula no está transmitiendo una señal decimos que la célula se encuentra en reposo; la medición del  $V_m$  en este momento será una indicación de lo que sucede cuando la célula está en reposo. Sin embargo, cuando la célula envíe una señal se generarán señales eléctricas, produciéndose los llamados potenciales de acción (PAs), una explosión de actividad eléctrica creada por una corriente despolarizante. Esto significa que algún evento (un estímulo) hace que el potencial de reposo cambie, de manera que cuando se alcance un determinado umbral, tendrá lugar un PA. En este punto, debemos destacar que las células cromafines de ratón generan PAs de forma espontánea, así como en respuesta a un estímulo como es la ACh. Esta peculiaridad fue descrita por primera vez en 1976 por Biales y colaboradores en CCs de jerbo y humanas (Biales et al., 1976).

Para el registro del potencial de membrana de las células cromafines ( $V_m$ ) y del disparo de potenciales de acción, se usó el modo de fijación de corriente (manteniendo una corriente de 0 pA) en la configuración de célula entera. Las células fueron perfundidas con la solución control KH y dializadas internamente con la solución KCC (véase apartado de soluciones para composiciones).

Con el fin de medir el  $V_m$  en reposo el potencial se registró durante 2 min, tras los cuales las células fueron estimuladas con ACh 100  $\mu$ M durante 1 min, de modo que se pueda estudiar los posibles cambios en la excitabilidad celular durante un período de estimulación igual al empleado en los experimentos de registro de la liberación de neurotransmisores por amperometría.

El análisis cuantitativo y cinético de los PAs proporcionará información acerca de la actividad eléctrica de la célula y de cómo ésta se comunica con el medio y células que le rodean. En la figura 12 se muestra un potencial de acción y la gran diversidad de parámetros que se pueden estudiar en ellos, a saber: *Amplitud del PA*: altura del PA, medida en mV;  $A_{PA}$ : Área bajo la curva formada por el PA (coloreado en rojo), medido en  $mV \cdot ms$ ;  $t_{PA}$ : anchura del PA al 50 % de su altura, medida en ms; *velocidad de ascenso*: calculada con la pendiente entre el 10 y el 90 % de la fase de crecimiento del PA, medida en mV/ms; *velocidad de descenso*: calculada con la pendiente entre el 90 y el 10 % de la fase de descenso del PA, medida en mV/ms. En la fase de descenso, y antes de regresar al potencial de membrana de reposo, se produce un período de post-hiperpolarización (PHP) (coloreado en azul), en el cual también se pueden medir varios parámetros cinéticos. *Amplitud del PHP*: altura del PHP, medida en mV;  $t_{PHP}$ : anchura del PHP al 50 % de su altura, medida en ms.



**Figura 12. Representación de un potencial de acción y sus parámetros cinéticos.** *Amplitud del PA:* altura del PA, medida en mV;  $A_{PA}$ : Área bajo la curva formada por el PA (coloreado en rojo), medido en  $mV \cdot ms$ ;  $t_{PA}$ : anchura del PA al 50 % de su altura, medida en ms; *velocidad de ascenso:* calculada con la pendiente entre el 10 y el 90 % de la fase de crecimiento del PA, medida en mV/ms; *velocidad de descenso:* calculada con la pendiente entre el 90 y el 10 % de la fase de descenso del PA, medida en mV/ms; *amplitud del PHP:* altura del PHP, medida en mV;  $t_{PHP}$ : anchura del PHP al 50 % de su altura, medida en ms.

#### 4.1.3 Construcción de las pipetas de “patch clamp”

Las pipetas se obtuvieron a partir de capilares de borosilicato de 100 mm de longitud, 1.5 mm de diámetro exterior y 0.84 mm de luz interior (World Precision Instruments). Colocando los capilares en un estirador Narishige, modelo PC-10 (Narishige, Tokio, Japón), y aplicando calor en dos pasos sucesivos se consiguen 2 pipetas cuyas puntas tienen un diámetro aproximado de 1  $\mu m$ . Posteriormente, y con el fin de que las puntas tengan una superficie lisa y suave de modo que la consecución del “giga-sello” sea posible, las pipetas se pulen aplicando calor con una microforja (modelo MF-830, Narishige). De este modo, obtuvimos pipetas con una resistencia variable entre 5-8  $M\Omega$ .

## 5. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR “WESTERN BLOT”

Los experimentos de inmunotransferencia se llevaron a cabo a partir de muestras de tejido congeladas. Los tejidos utilizados fueron la corteza prefrontal y el hipocampo (por su implicación en la EA) y la médula adrenal (por ser el modelo utilizado en este estudio). Una vez obtenidas las muestras (cada una por separado en un eppendorf) fueron congeladas a  $-80^{\circ}C$  hasta su uso.

### **5.1 Extracción de las proteínas de membrana**

Debido a que las proteínas de estudio están presentes en la membrana plasmática (proteínas del complejo SNARE y nAChR $\alpha$ 3) se utilizó un kit comercial (Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction Kit, ThermoFisher Scientific-89842) de extracción de proteínas de la membrana.

Para ello, primero se homogenizan los tejidos con ayuda de un homogenizador, en hielo, en una solución de permeabilización (proporcionada por el kit) a la que se añaden inhibidores de proteasas (SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Tablets, S8820-2TAB, Sigma Aldrich) para evitar la degradación proteica y de fosfatasas (ortovanadato 1:100 (S6508, Sigma Aldrich)). Se añade un volumen de 200  $\mu$ l para la homogenización de los hipocampos, de 100  $\mu$ l para las cortezas prefrontales y de 100  $\mu$ l para las médulas adrenales. Se mantienen las muestras incubando durante 10 min a 4 °C y en constante agitación. A continuación, se centrifugan durante 15 min a 16000 g y a 4 °C. Se retira el sobrenadante, que contienen las proteínas citosólicas y se conserva en eppendorfs nuevos.

Seguidamente, se procede a la solubilización de las proteínas embebidas en la membrana (que se encuentran en el pellet). Para ello, se resuspenden los precipitados en solución de solubilización (proporcionada por el kit), a la que también se añaden los inhibidores de proteasas y fosfatasas, en un volumen de 100  $\mu$ l en el caso de los hipocampos y de 50  $\mu$ l en el caso de las cortezas y las médulas. Se incuban las muestras durante 30 min, a 4 °C y en constante agitación. Pasado este tiempo, las muestras se centrifugan durante 15 min a 16000 g y a 4 °C. Para finalizar, se retira el sobrenadante, que contiene las proteínas asociadas a la membrana, a un eppendorf nuevo.

### **5.2 Extracción de proteínas totales**

Para el estudio de los complejos formados por las proteínas SNARE realizamos una extracción de proteína total de las muestras, tal y como había sido descrito por Y. Yang y colaboradores (Yang et al., 2015).

Para ello, primero se homogenizan los tejidos con ayuda de un homogenizador, en hielo, en una solución de lisis RIPA (150 mM NaCl, 1 % Tritón X-100, 0.5 % desoxicolato sódico, 0.1 % SDS, 50 mM Tris, pH 8) a la que se añaden inhibidores de proteasas (SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Tablets, S8820-2TAB, Sigma Aldrich) para evitar la degradación proteica. Se añade un volumen de 150  $\mu$ l por cada 5 mg de tejido. Se mantienen las muestras en constante agitación durante 2 h a 4 °C. A continuación, se centrifugan du-

rante 20 min a 13680 g y a 4 °C. Se retira el sobrenadante, que contienen las proteínas totales y se conserva en eppendorfs nuevos.

### 5.3 Cuantificación de proteínas

Para estimar la concentración proteica en los extractos se utilizó un kit comercial basado en el método del ácido bicinconínico (BCA) (Pierce™ BCA Protein Assay Kit-ThermoFisher Scientific-23225). El ácido bicinconínico, sal sódica, es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones  $\text{Cu}^+$  en medio alcalino (Figura 13). Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ion cuproso producido en una reacción entre las proteínas con  $\text{Cu}^{2+}$  en medio alcalino (reacción de Biuret) (Figura 13). La interacción de dos moléculas de BCA con el ion  $\text{Cu}^+$  es soluble en agua y exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm, lo que permite la cuantificación espectrofotométrica de las proteínas. La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible, y que muestra una gran tolerancia a compuestos que afectan a otros métodos, como son los detergentes no iónicos o los tampones salinos (Smith et al., 1985).

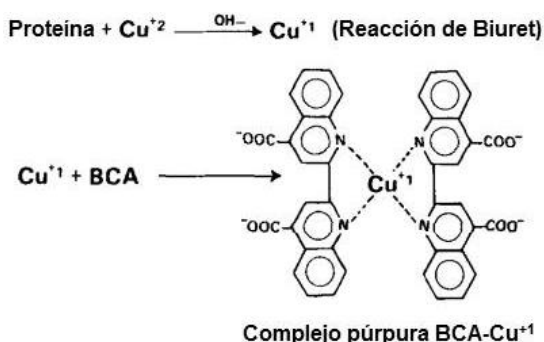


Figura 13. Formación del complejo BCA e ion cuproso (de color púrpura) generado en la reacción de Biuret. Adaptado de Smith, P. K. y colaboradores (Smith et al., 1985).

En primer lugar, se prepara una curva patrón de concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA) (el kit proporciona esta albúmina a una concentración de 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Y a continuación se preparan las muestras (en nuestro caso fueron diluidas en agua: 39  $\mu\text{l}$  de agua + 1  $\mu\text{l}$  de muestra). Con todo dispuesto, se procede a la preparación de los reactivos para que la reacción arriba comentada tenga lugar. Para ello se mezclan 49 partes de una solución de BCA (Reactivo A proporcionado por el kit: carbonato sódico, bicarbonato de sodio, ácido bicinconínico y tartrato de sodio en hidróxido de sodio 0.1 M) con 1

parte de una solución de cobre (Reactivo B proporcionada por el kit: solución al 4% de sulfato cúprico). Por último, y para que el complejo púrpura se forme, se incuban la muestra y la curva patrón (se diluyen 6 veces) con los reactivos durante 30 min, a 37 °C y en condiciones de oscuridad. Transcurrido este tiempo se mide la absorbancia a  $560 \pm 10$  nm.

#### **5.4 Separación e identificación de proteínas**

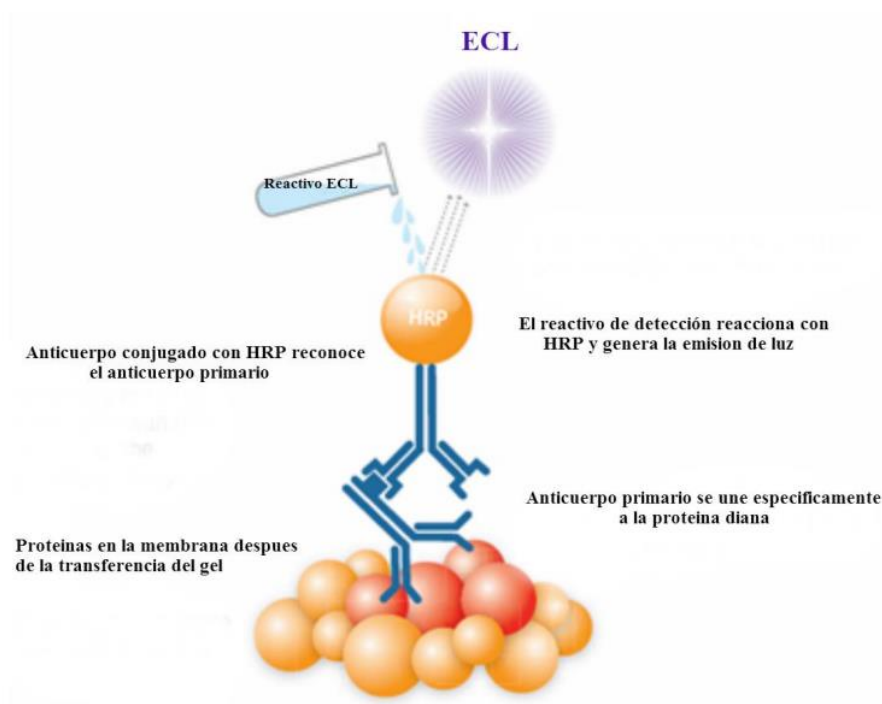
Una vez determinada la concentración proteica en cada muestra, se procede a separar (por tamaño) las distintas proteínas presentes en las muestras mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE); para lo cual se cargan en geles de poliacrilamida al 12% cantidades iguales de proteínas de membrana (20-30  $\mu$ g) mezcladas, en proporción 1:1, con tampón de carga 2X (100 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% glicerol, 4% dodecil sulfato sódico (SDS), 0,2% azul de bromofenol, 200 mM ditioneitol (DTT)), y calentadas a 99° C durante 2 min. Junto a las proteínas se carga siempre en cada gel un marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards #1610375, Bio-Rad) que permitirá posteriormente conocer el peso de las proteínas de interés. A continuación, se somete al gel a un campo eléctrico con una intensidad de corriente de 25 mA por gel (100 mA en caso de realizar 4 geles) durante 1 h, en una cubeta de electroforesis “Mini-PROTEAN® 3 cell” (Bio-Rad) conteniendo un tampón de electroforesis de composición (en mM): 25 Tris base, 192 glicina, 3.47 SDS.

Pasado ese tiempo se coloca el gel (o geles) en una unidad de transferencia en semiseco “Trans-Blot® Turbo™ Transfer System” (Bio-Rad) y se electrotransfiere a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Immobilon® -P Transfer Membranes, Millipore) con un tamaño de poro de 0.45  $\mu$ m, humedecido en un tampón de transferencia (de composición: 25 mM Tris base, 192 mM glicina, 20% metanol), mediante la aplicación de un campo eléctrico con una intensidad de corriente de 1 A durante 30 min; el PVDF debido a su naturaleza hidrofóbica ha de ser previamente activado sumergiendo la membrana en metanol puro durante 10 s, lavándose a continuación con agua destilada y permitiendo su equilibrado en el tampón de transferencia.

Una vez transferidas las proteínas a la membrana, éstas se tiñen introduciendo la membrana en una solución de rojo “ponceau” (P3504, Sigma Aldrich) (de composición: 0,2% (p/v) rojo ponceau, 3% (p/v) ácido tricloroacético, 3% (p/v) ácido sulfosalicílico)

durante aproximadamente 1 min para comprobar que la transferencia ha tenido lugar. A continuación, se lava la membrana con agua destilada y con ayuda de un lapicero se señalan las bandas de los pesos moleculares de interés. Por último, se deja secar la membrana a temperatura ambiente.

Con las proteínas separadas por tamaño y transferidas a una membrana se procede a la identificación de la/s proteína/s de interés por medio de anticuerpos específicos para cada proteína. En primer lugar, es necesario bloquear la membrana. Esto es debido a que la membrana escogida para transferir las proteínas une las mismas de manera inespecífica, de este modo el anticuerpo (de naturaleza proteica) que se empleará posteriormente en la detección podría unirse a los lugares libres en la membrana, dificultando la distinción del complejo antígeno-anticuerpo que se formará con la proteína a estudiar (Figura 14). El bloqueo se realiza con una solución de BSA al 4% en TBS (Tris-HCl pH 7.5 20 mM y NaCl 136.8 mM) durante 2 h a temperatura ambiente y en constante agitación.



**Figura 14. Principio de detección quimioluminiscente en “Western Blot”.** La/s proteína/s de interés fijadas en una membrana de PVDF serán detectadas por un anticuerpo (anticuerpo primario), el cual será detectado a su vez por otro anticuerpo (anticuerpo secundario), que lleva conjugado la peroxidasa de rábano. La peroxidasa catalizará la oxidación del peróxido de luminol, emitiéndose luz en la reacción. Modificado de General Electric Company (GE), 2011.



Posteriormente, para detectar la presencia de las proteínas de interés se incubó la membrana con anticuerpos específicos para ellas (son los llamados anticuerpos primarios) durante 2 h a temperatura ambiente y en constante agitación. En esta Tesis Doctoral se han utilizado los siguientes anticuerpos:

- Anti VAMP2 (3E5): sc-69706 (Santa Cruz Biotechnology). Se trata de un anticuerpo obtenido en ratón, que reconocerá a la proteína del complejo v-SNARE (vesicle-SNARE; presente en la membrana de las vesículas de secreción) VAMP2, con un peso molecular aproximado de unos 17 KDa. El anticuerpo se utilizó a una dilución 1:200 en TBS Tween 20 (TBST) (Tris-HCl pH 7.5 20 mM, NaCl 136.8 mM y Tween 20 al 0.1 %) con BSA al 0.4 %.
- Anti Sinaptotagmina-1 (N-19): sc-7753 (Santa Cruz Biotechnology). Se trata de un anticuerpo obtenido en cabra, que reconocerá a la proteína del complejo v-SNARE (presente en la membrana de las vesículas de secreción) sinaptotagmina-1, considerada un sensor de  $Ca^{2+}$  implicado en la regulación de la liberación de neurotransmisores, principalmente en el sistema nervioso central (SNC) (Geppert et al., 1994), con un peso molecular aproximado de 40-65 KDa. Al actuar principalmente en el SNC este anticuerpo fue utilizado únicamente en las muestras de corteza prefrontal e hipocampo. El anticuerpo se utilizó a una dilución 1:200 en TBST con BSA al 0.4 %.
- Anti Syntaxina 1 (HPC-1): sc-12736 (Santa Cruz Biotechnology). Se trata de un anticuerpo obtenido en ratón, que reconocerá a la proteína del complejo t-SNARE (target-SNARE; presente en la membrana de las terminaciones nerviosas o células secretoras) syntaxina 1, con un peso molecular aproximado de 31 KDa. El anticuerpo se utilizó a una dilución 1:200 en TBST con BSA al 0.4 %.
- Anti SNAP-25 (C-18): sc-12736 (Santa Cruz Biotechnology). Se trata de un anticuerpo obtenido en cabra, que reconocerá a la proteína del complejo t-SNARE (presente en la membrana de las terminaciones nerviosas o células secretoras) SNAP-25, con un peso molecular de 25 KDa. El anticuerpo se utilizó a una dilución 1:200 en TBST con BSA al 0.4 %.
- Anti Dinamina 1-2 (Dynamin #610245 (BD Biosciences). Se trata de un anticuerpo obtenido en ratón, que reconocerá las proteínas dinamina 1 y 2; la dinamina se ha considerado clásicamente como una proteína implicada en la escisión de nuevas ve-

sículas al interior celular durante el proceso de endocitosis, sin embargo, en los últimos años se le está atribuyendo también un papel en la expansión del poro de fusión durante los procesos exocitóticos (Chan et al., 2010, Samasilp et al., 2012). Tienen un peso molecular de aproximadamente 100 KDa. El anticuerpo se utilizó a una dilución 1:4000 en TBST con BSA al 0.4 %.

- Anti nAChR $\alpha$ 3 (H-100): sc-5590 (Santa Cruz Biotechnology). Se trata de un anticuerpo obtenido en conejo, que reconocerá al receptor nicotínico para la acetilcolina  $\alpha$ 3, con un peso molecular de 55 KDa. El anticuerpo se utilizó a una dilución 1:200 en TBST con BSA al 0.4 %.
- Anti  $\beta$ -actina (AC-15) A-3854 (Sigma Aldrich). Se trata de un anticuerpo obtenido en ratón, que reconocerá la proteína del citoesqueleto  $\beta$ -actina, utilizada como control de carga en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Este anticuerpo lleva conjugada la peroxidasa de rábano (HRP), por lo que no necesitará incubación con un anticuerpo secundario (ver más abajo). Tiene un peso molecular de 42 KDa. El anticuerpo se utilizó a una dilución 1:5000 en TBST con BSA al 0.4 %.

Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo primario se realizan 3 lavados con TBST de 5 min a temperatura ambiente y en constante agitación. Y después se incuban las membranas con el anticuerpo secundario (Figura 14) (este será un anticuerpo que reconoce la inmunoglobulina G (IgG) del animal en el que se haya obtenido el anticuerpo primario, y que se encuentra conjugado a peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés horseradish peroxidase) para su visualización posterior) durante 45 min a temperatura ambiente y en constante agitación. Los anticuerpos secundarios utilizados en esta Tesis han sido los siguientes:

- Anti-IgG de ratón, empleado a una dilución 1:10000 en TBST con BSA 0.4 %.
- Anti-IgG de cabra, empleado a una dilución 1:10000 en TBST con BSA 0.4 %.
- Anti-IgG de conejo, empleado a una dilución 1:10000 en TBST con BSA 0.4 %.

Posteriormente, se realizan 3 lavados con TBST de 5 min a temperatura ambiente y en constante agitación. Por último, las membranas se incuban con la solución de revelado “ECL™ Select Western Blotting Detection Reagent” (RPN2235, GE Healthcare). El ECL (por sus siglas en inglés, enhanced chemiluminescence) está compuesto por una solución

de luminol y una solución de peróxido que son mezcladas en proporción 1:1. Después de añadir el peróxido de luminol, la enzima HRP cataliza la oxidación del luminol, que pasa a estar en un estado excitado, el cual al volver a su estado basal emite luz a 428 nm. Esta luz fue detectada mediante un detector de quimioluminiscencia (Molecular Image<sup>®</sup> Chemi-Doc<sup>™</sup> XRS System, BioRad) (Figura 14).

## **6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

### **6.1 Registros amperométricos**

Los datos amperométricos se registraron usando el software Pulse v8.74 (HEKA Elektronik) y se analizaron en un ordenador personal usando el software Excel (Microsoft, Redmond, WA), y el software IgorPro v4.0.8 (Wavemetrics, Lake Oswego, OR). Solo se consideraron para el análisis las espigas mayores de 5 pA de amplitud.

El análisis cinético de los eventos amperométricos individuales se realizó usando una macro escrita en IgorPro y gentilmente cedida a la comunidad científica por el grupo de Eugene Mosharov (Mosharov and Sulzer, 2005), siendo posible el análisis de parámetros cinéticos indicadores del modo de liberación de los neurotransmisores, así como de la cantidad de catecolaminas liberadas (Figura 10).

La carga amperométrica total (total de catecolaminas liberadas a lo largo del período de estimulación de 1 min) se ha calculado como la suma de las cargas de las espigas amperométricas individuales registradas durante ese período de estimulación.

Se obtuvieron los valores de la media para cada parámetro a estudiar de todas las espigas de cada célula, luego se realizó la media para cada parámetro de todas las células pertenecientes a un mismo ratón y por último se agruparon los datos de todos los ratones pertenecientes a un mismo grupo para realizar la comparación estadística (Colliver et al., 2000a, Colliver et al., 2001); este método tiene en cuenta la variabilidad en el número de eventos observados en las distintas células individuales, y proporciona resultados consistentes de experimento a experimento.

Las representaciones gráficas se realizaron con el software GraphPad Prism v5.01 (GraphPad Prism Software, San Diego, CA) y el análisis estadístico con el software SPSS (IBM SPSS Statistics v21.0, New York, USA).

## **6.2 Registros electrofisiológicos**

### **6.2.1 Corrientes iónicas**

Los datos correspondientes a las corrientes iónicas fueron adquiridos con una frecuencia de muestreo de 20 kHz mediante el software Pulse v8.74 (HEKA Elektronik). El análisis de los datos se llevó a cabo considerando la corriente máxima (en pA o nA) obtenida en cada caso, con el mismo software Pulse v8.74 (HEKA Elektronik).

- Para  $I_{ACh}$  se midió el pico máximo de corriente
- Para  $I_{Na}$  se midió el pico máximo de corriente
- Para  $I_{Ca}$  se midió la corriente a los 5-10 ms de empezar el pulso despolarizante con el fin de evitar la corriente de  $Na^+$
- Para  $I_K$  (tanto  $Ca^{2+}$  como voltaje dependiente) la corriente se midió a los 100 ms de empezar el pulso despolarizante

Los datos obtenidos fueron tratados usando el software Excel (Microsoft). Las representaciones gráficas y análisis estadístico se realizaron con el software GraphPad Prism v5.01 (GraphPad Prism Software).

### **6.2.2 Potencial de membrana**

Los datos correspondientes a la excitabilidad celular fueron adquiridos con una frecuencia de muestreo de 20 kHz mediante el software Pulse v8.74 (HEKA Elektronik). El  $V_m$  basal se calculó considerando el valor medio (tener en cuenta que el potencial de membrana sufre fluctuaciones a lo largo del registro) durante los 2 primeros minutos de registro (situación basal) con el software Clampfit v10.4 (pCLAMP 10.4, Molecular Devices, California, USA).

La cuantificación y el análisis cinético de los potenciales de acción se llevó a cabo con el software Clampfit v10.4 (pCLAMP 10.4, Molecular Devices). Solo se consideraron para el análisis cuantitativo aquellos PAs que superasen los 0 mV desde el  $V_m$  de reposo.

De manera similar a lo realizado en el análisis de las espigas amperométricas, se obtuvieron los valores de la media para cada parámetro a estudiar de todos los PAs de cada célula, luego se realizó la media para cada parámetro de todas las células pertenecientes a

un mismo ratón y por último se agruparon los datos de todos los ratones pertenecientes a un mismo grupo para realizar la comparación estadística.

Los datos obtenidos fueron tratados usando el software Excel (Microsoft). Las representaciones gráficas de las medias de los valores y el análisis estadístico se realizaron con el software GraphPad Prism v5.01 (GraphPad Prism Software,). Mientras que los ejemplos representativos de  $V_m$  y PAs se representaron mediante el software Origin v.8.6 (OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA).

### **6.3 Cuantificación de proteínas**

Para la cuantificación relativa de proteínas obtenida en los ensayos de “western blot” se empleó el software Scion Image v4.0.3.2 (Scion Corporation, MA, USA). Se calculó la densitometría de cada banda (obtenida para cada proteína de interés) y se relativizó a la densitometría obtenida para la banda de  $\beta$ -actina (utilizada como control de carga en nuestras muestras).

Los datos obtenidos fueron tratados usando el software Excel (Microsoft). Las representaciones gráficas y análisis estadístico se realizaron con el software GraphPad Prism v5.01 (GraphPad Prism Software).

Los datos representados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Previo al análisis de los datos se estudió la distribución de los mismos y su ajuste a una distribución normal mediante la realización del test de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias entre las medias de los grupos que se ajustaron a una distribución normal fueron evaluadas por un test de ANOVA (análisis de la varianza) con test *post-hoc* de Neuman-Keuls (comparación múltiple entre varios grupos). En el caso de que las medias no se ajustaran a una distribución normal, se evaluaron por el test de Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns. En todos los casos se exigió un nivel de confianza del 95%, es decir,  $*p < 0.05$ ; se establecieron 2 límites estadísticos adicionales, situados en  $**p < 0.01$  y  $***p < 0.001$ .

Muchas de las figuras presentadas en la sección de Resultados fueron maquetadas con el software Corel Draw X3 Graphics Suite (Corel, Ottawa, Canadá).

## **7. SOLUCIONES Y PRODUCTOS QUÍMICOS**

### **7.1 Soluciones para el cultivo celular**

#### **7.1.1 Solución Locke**

Preparación en agua bi-destilada a partir de:

- NaCl (121659.1211, Panreac) 154 mM
- KCl (131494, Panreac) 5.58 mM
- HNaCO<sub>3</sub> (141638.1211, Panreac) 3.6 mM
- HEPES (H4034, Sigma Aldrich) 10 mM
- Glucosa (G8270, Sigma Aldrich) 5.5 mM

pH ajustado a 7.35 con NaOH.

#### **7.1.2 Solución de cultivo DMEM**

Esta solución consiste en medio DMEM convencional de alta glucosa (4.5 g/l) (Medio Eagle modificado por Dulbecco, D5648, Sigma Aldrich) al que se le añade HNaCO<sub>3</sub> 26 mM y HEPES 10 mM.

Posteriormente la solución se suplementa con suero bovino fetal (F7524, Sigma Aldrich) en una concentración del 4% v/v, 50 UI/ml de penicilina y 50 µg/ml estreptomicina (P0781, Sigma Aldrich). Su pH se ajusta a 7.35 usando NaOH y se esteriliza mediante filtrado de 0.22 µm de poro.

### **7.2 Soluciones para amperometría**

#### **7.2.1 Solución Krebs-HEPES estándar**

Preparación en agua bi-destilada a partir de:

- NaCl (121659.1211, Panreac) 145 mM
- KCl (131494, Panreac) 5.6 mM
- MgCl<sub>2</sub> (131396.1210, Panreac) 1.2 mM
- CaCl<sub>2</sub> (C5080, Sigma Aldrich) 2 mM
- HEPES (H4034, Sigma Aldrich) 10 mM

- Glucosa (G8270, Sigma Aldrich) 11 mM

pH ajustado a 7.35 con NaOH.

### **7.2.2 Solución Krebs-HEPES alto potasio (70 mM)**

Preparación en agua bi-destilada a partir de:

- NaCl (121659.1211, Panreac) 79.9 mM
- KCl (131494, Panreac) 70 mM
- MgCl<sub>2</sub> (131396.1210, Panreac) 1.2 mM
- CaCl<sub>2</sub> (C5080, Sigma Aldrich) 2 mM
- HEPES (H4034, Sigma Aldrich) 10 mM
- Glucosa (G8270, Sigma Aldrich) 11 mM

pH ajustado a 7.35 con KOH.

## **7.3 Soluciones para registros electrofisiológicos**

### **7.3.1 Soluciones extracelulares**

Se utilizó la solución Krebs-HEPES estándar descrita en el apartado anterior.

### **7.3.2 Soluciones intracelulares**

#### ***7.3.2.1 Solución intracelular INC***

Para medidas de corrientes nicotínicas ( $I_{ACh}$ ), corrientes de calcio ( $I_{Ca}$ ) y corrientes de sodio ( $I_{Na}$ ).

Preparación en agua bi-destilada a partir de:

- NaCl (121659.1211, Panreac) 10 mM
- Ácido glutámico (G1251, Sigma Aldrich) 100 mM
- EGTA (Ácido etilenglicol-bis ( $\beta$ -aminoetil éter) -N, N, N', N'-tetraacético) (E0396, Sigma Aldrich) 14 mM
- TEA-Cl (Cloruro de tetraetilamonio) (T2265, Sigma Aldrich) 20 mM
- HEPES (H4034, Sigma Aldrich) 20 mM
- Mg-ATP (A9187, Sigma Aldrich) 5 mM

- Na-GTP (G8877, Sigma Aldrich) 0.3 mM

pH ajustado a 7.2 con CsOH.

### 7.3.2.2 *Solución intracelular KCC*

Para medidas de corrientes de potasio ( $I_K$ ) y de potencial de membrana ( $V_m$ ).

Preparación en agua bi-destilada a partir de:

- NaCl (121659.1211, Panreac) 10 mM
- Ácido glutámico monopotásico (G1501, Sigma Aldrich) 120 mM
- EGTA (Ácido etilenglicol-bis ( $\beta$ -aminoetil éter) -N, N, N', N'-tetraacético) (E0396, Sigma Aldrich) 14 mM
- HEPES (H4034, Sigma Aldrich) 20 mM
- Mg-ATP (A9187, Sigma Aldrich) 5 mM
- Na-GTP (G8877, Sigma Aldrich) 0.3 mM

pH ajustado a 7.2 con KOH.

## 7.4 Soluciones para inmunodetección de proteínas (“western blot”)

### 7.4.1 Soluciones para extracción de proteínas de membrana

Se empleó el kit Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction Kit, ThermoFisher Scientific-89842, el cual proporciona una solución de permeabilización y una solución de solubilización (no proporciona su composición).

### 7.4.2 Soluciones para extracción de proteínas totales

Se empleó la solución de lisis RIPA:

- NaCl (121659.1211, Panreac) 150 mM
- Tritón® X-100 (X100, Sigma Aldrich) al 1 %
- Desoxicolato sódico (D6750, Sigma Aldrich) al 0.5 %
- SDS (Dodecil sulfato sódico) (L4390, Sigma Aldrich) al 0.1 %
- Tris-HCl pH 8 50 mM



## **7.4.2 Soluciones para cuantificación de proteínas**

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific-23225), que contiene las siguientes soluciones:

### **7.4.2.1 Solución de BSA**

Contiene albúmina de suero bovina a una concentración de 2 µg/µl en una solución salina al 0.9 % y azida sódica al 0.05 %.

### **7.4.2.2 Reactivo A**

Carbonato sódico, bicarbonato de sodio, ácido bicinconánico y tartrato de sodio en hidróxido de sodio 0.1 M (el kit no proporciona las cantidades de cada compuesto).

### **7.4.2.3 Reactivo B**

Solución al 4% de sulfato cúprico.

## **7.4.3 Soluciones para separación e identificación de proteínas**

### **7.4.3.1 Gel de apilamiento (“Stacking gel”)**

Se utilizó un gel de acrilamida/poliacrilamida en agua bi-destilada al **4%** a partir de:

- Acrilamida/bis-acrilamida 40% (A7802, Sigma Aldrich) al 10 %
- Tris-HCl pH 6.8 al 10 % a partir de la solución más abajo detallada
- SDS (Dodecil sulfato sódico) (L4390, Sigma Aldrich) al 10 %
- Persulfato amónico (A3678, Sigma Aldrich) al 10 %
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletildiamina) (T9281, Sigma Aldrich) al 0.1 %

### **7.4.3.2 Gel de resolución (“Resolving gel”)**

Se utilizó un gel de acrilamida/poliacrilamida en agua bi-destilada al **12%** a partir de:

- Acrilamida/bis-acrilamida 40 % (A7802, Sigma Aldrich) al 30 %
- Tris-HCl pH 8.8 al 20 % a partir de la solución abajo detallada
- SDS (Dodecil sulfato sódico) (L4390, Sigma Aldrich) al 10 %
- Persulfato amónico (A3678, Sigma Aldrich) al 10 %
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletildiamina) (T9281, Sigma Aldrich) al 0.05 %

O un gel de acrilamida/poliacrilamida en agua bi-destilada al **10%** a partir de:

- Acrilamida/bis-acrilamida 40 % (A7802, Sigma Aldrich) al 25 %
- Tris-HCl pH 8.8 al 20 % a partir de la solución abajo detallada
- SDS (Dodecil sulfato sódico) (L4390, Sigma Aldrich) al 10 %
- Persulfato amónico (A3678, Sigma Aldrich) al 10 %
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina) (T9281, Sigma Aldrich) al 0.05 %

#### **7.4.3.3 Tris-HCl pH 6.8**

Preparación en agua bi-destilada a partir de:

- Trizma<sup>®</sup> base (T1503, Sigma Aldrich) 1.25 M
- pH ajustado a 6.8 con HCl.

#### **7.4.3.4 Tris-HCl pH 8.8**

Preparación en agua bi-destilada a partir de:

- Trizma<sup>®</sup> base (T1503, Sigma Aldrich) 1.875 M
- pH ajustado a 8.8 con HCl.

#### **7.4.3.5 Tampón de carga**

Preparación en agua bi-destilada a partir de:

- Tris-HCl pH 6.8 100 mM
- Glicerol (G8773, Sigma Aldrich) al 20 %
- SDS (Dodecil sulfato sódico) (L4390, Sigma Aldrich) al 4 %
- Azul de bromofenol (B0126, Sigma Aldrich) al 0.2 %
- DTT (Ditiotreitol) (43815, Fluka) 200 mM

#### **7.4.3.6 Tampón de electroforesis**

Preparación en agua bi-destilada a partir de:

- Trizma<sup>®</sup> base (T1503, Sigma Aldrich) 25 mM
- Glicina (G8898, Sigma Aldrich) 192 mM
- SDS (Dodecil sulfato sódico) (L4390, Sigma Aldrich) 3.47 mM

#### **7.4.3.7 Tampón de transferencia**

Preparación en agua bi-destilada a partir de:

- Trizma<sup>®</sup> base (T1503, Sigma Aldrich) 25 mM
- Glicina (G8898, Sigma Aldrich) 192 mM
- Metanol (L4390, Sigma Aldrich) al 20 %

#### **7.4.3.8 TBS**

Preparación en agua bi-destilada a partir de:

- Tris-HCl pH 7.5 20 mM
- NaCl (121659.1211, Panreac) 136.8 mM

#### **7.4.3.9 TBST**

Preparación en agua bi-destilada a partir de:

- Tris-HCl pH 7.5 20 mM
- NaCl (121659.1211, Panreac) 136.8 mM
- Tween<sup>®</sup> 20 (P5927, Sigma Aldrich) al 0.1 %

**“La ciencia está hecha de datos, como una casa de piedras. Pero un montón de datos no es ciencia más de lo que un montón de piedras es una casa”**

**Henri Poincaré. Físico y matemático francés (1854-1912)**

---

## **IV. RESULTADOS**



Desde que surgiese la hipótesis colinérgica de la EA a mediados de los años 70 del siglo pasado hasta la actualidad se ha trabajado e investigado enormemente para intentar conocer en profundidad la etiopatología de esta enfermedad. Se ha descrito que si bien inicialmente el cuadro clínico del Alzheimer guarda una buena correlación con un déficit de la neurotransmisión colinérgica, los cambios de conducta que aparecen en las fases avanzadas de la enfermedad implican la afectación de otros sistemas neurotransmisores (Dewar and McCulloch, 1994). Estas alteraciones en los procesos de neurotransmisión podrían correlacionarse con cambios en la síntesis, el almacenamiento o la liberación del neurotransmisor.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral hemos tratado de estudiar posibles alteraciones en la liberación del neurotransmisor durante el desarrollo de la EA en células cromafines del modelo murino 3xTg-AD. Para ello, se ha empleado la técnica de registro amperométrico en célula única. Con ello, es posible evaluar (en el rango de milisegundos) el proceso de fusión de membranas que tiene lugar durante la exocitosis, y estudiar así la cinética del proceso exocitótico y la cantidad de neurotransmisor liberado (Wightman et al., 1991, Amatore et al., 2015). Se han estudiado también las distintas corrientes iónicas implicadas en el proceso excitación-secreción en la célula cromafín (Douglas and Rubin, 1961, Douglas et al., 1967, Cena et al., 1983, Garcia et al., 1984) mediante la técnica de “patch clamp”. Para evaluar posibles cambios en la excitabilidad celular a lo largo de la vida de estos ratones se han llevado a cabo medidas de  $V_m$ . Por último, en un intento de explicar los cambios observados en la cinética de liberación del neurotransmisor se realizaron medidas del grado de expresión de distintas proteínas implicadas en el proceso de exocitosis mediante la técnica de “western blot”.

Con este estudio pretendemos contribuir a la elucidación de los posibles déficits sinápticos y las posibles alteraciones de los mecanismos básicos implicados en la liberación de neurotransmisores en la EA.

## **1. REGISTROS AMPEROMÉTRICOS EN EL RATÓN 3xTg-AD**

La secreción de catecolaminas en las células cromafines de los ratones 3xTg-AD se indujo mediante la aplicación del neurotransmisor fisiológico ACh (100  $\mu$ M) o bien mediante la perfusión de una solución con alto contenido en  $K^+$  (70 mM).

La estimulación con ACh desencadenará toda la serie de procesos descritos en la figura 7, esto es: apertura de nAChRs, con posterior apertura de canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior celular y exocitosis de las vesículas de secreción. Sin embargo, la aplicación de una solución con alto contenido en  $\text{K}^+$  en el medio extracelular provocará un cambio en el  $V_m$  celular con lo que la célula se despolarizará, provocando directamente la apertura de CCDVs, entrada de calcio y secreción por exocitosis de las vesículas secretoras.

Por otro lado, a pesar de que la ACh y el  $\text{K}^+$  produzcan una respuesta secretora similar, la maquinaria intracelular encargada de tamponar el  $\text{Ca}^{2+}$  que entra en la célula (como el RE y la mitocondria) detectan los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  de manera diferente según cual sea el estímulo empleado; ambos estímulos van a producir incrementos en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  con patrones distintos, ya que el aumento originado por el  $\text{K}^+$  es más pronunciado y se extiende más rápidamente por el citosol que en el caso de la ACh, donde las elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  son más discretas y localizadas en las proximidades de la membrana plasmática (Cuchillo-Ibáñez et al., 2002).

Por estas razones, ante la posibilidad de que exista alguna diferencia en el modo de tamponar y redistribuir el ión  $\text{Ca}^{2+}$  a medida que se desarrolla la EA en los ratones 3xTg-AD nos propusimos utilizar en la presente Tesis Doctoral ambos estímulos secretagogos.

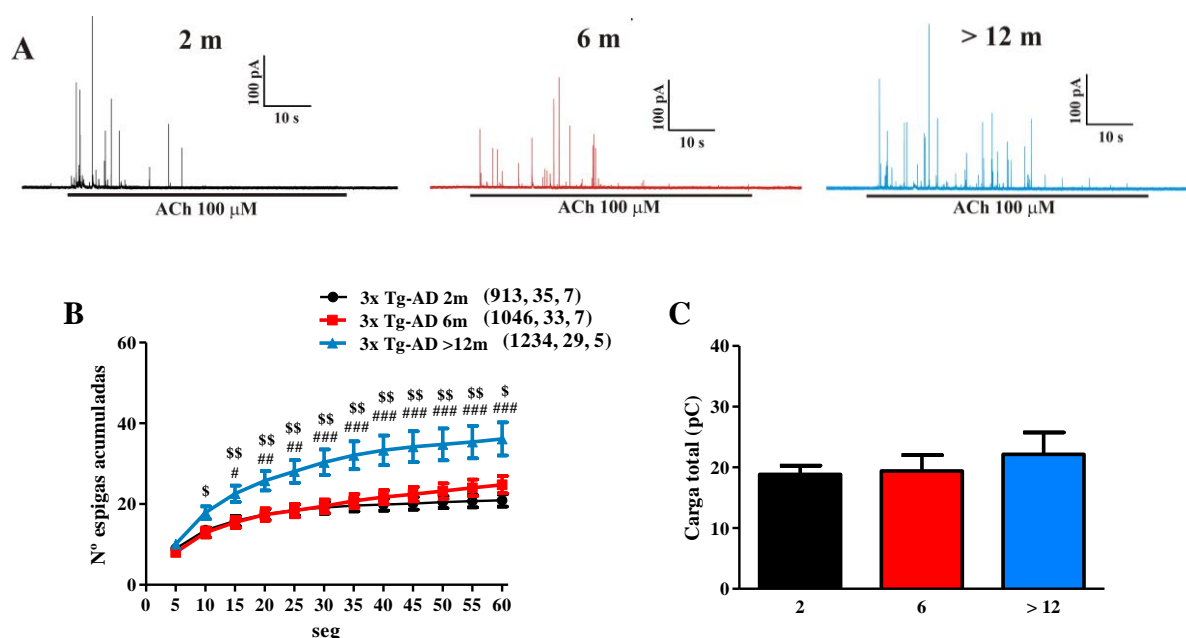
### **1.1 Secreción cuantál de catecolaminas y análisis cinético de eventos exocitóticos únicos en respuesta a ACh**

Con el fin de estudiar la liberación cuantál espontánea de catecolaminas las células se perfundieron con una solución estándar de Krebs-Hepes (KH) conteniendo 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . Durante este período no se encontraron espigas amperométricas (o se produjeron muy pocas). Para inducir la exocitosis la solución KH estándar fue sustituida por otra conteniendo ACh (100  $\mu\text{M}$ ) durante 1 min. Este tiempo de estimulación tan largo fue empleado con el objetivo de obtener el máximo número de espigas amperométricas posible, de modo que se pueda aumentar el poder estadístico al realizar el análisis cinético detallado de las mismas.

La figura 15A muestra registros representativos correspondientes a la estimulación de células cromafines de ratones 3xTg-AD de distintas edades. Como puede observarse en la figura, en las células procedentes de ratones de 2 meses de edad se produce una marcada

liberación de catecolaminas durante aproximadamente los primeros 10 segundos (seg) tras el inicio de la aplicación del estímulo, que se continúa con un período en el que se liberan muy pocas vesículas (espigas) más. Se obtuvieron registros similares en células cromafines de ratones de 6 meses de edad. Sin embargo, en células provenientes de ratones de más de 12 meses de edad la liberación de catecolaminas se hace patente durante prácticamente todo el período de estimulación (1 min).

Estas diferencias en el patrón secretor de catecolaminas se observan mejor al cuantificar el número acumulado de espigas liberadas a intervalos de 5 seg, produciéndose un aumento significativo del número de espigas liberadas en las células de los ratones de > 12 meses, (Figura 15B).



**Figura 15. Respuesta exocitótica de CCs de ratón 3xTg-AD en respuesta a ACh (100 μM).** La liberación de catecolaminas en CCs de ratón de distintas edades (2, 6 y más de 12 meses) estimuladas con ACh durante 1 min fue registrada mediante amperometría en célula única. **A**, registros amperométricos representativos correspondientes a CC de ratón de distintas edades. **B**, número de espigas acumuladas en intervalos de 5 seg. **C**, cantidad total de catecolaminas liberadas (área bajo la curva de todas las espigas del registro; representado en pC) durante el período de estimulación. Los datos son medias ± SEM del número de espigas, número de células y número de ratones que aparecen entre paréntesis. #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.005$ ; ###  $p < 0.001$  en los ratones de más de 12 meses en comparación con los de 2 meses. \$  $p < 0.05$ ; \$\$  $p < 0.005$  en los ratones de más de 12 meses en comparación con los de 6 meses (ANOVA de una vía, con el post-test Kruskal-Wallis).

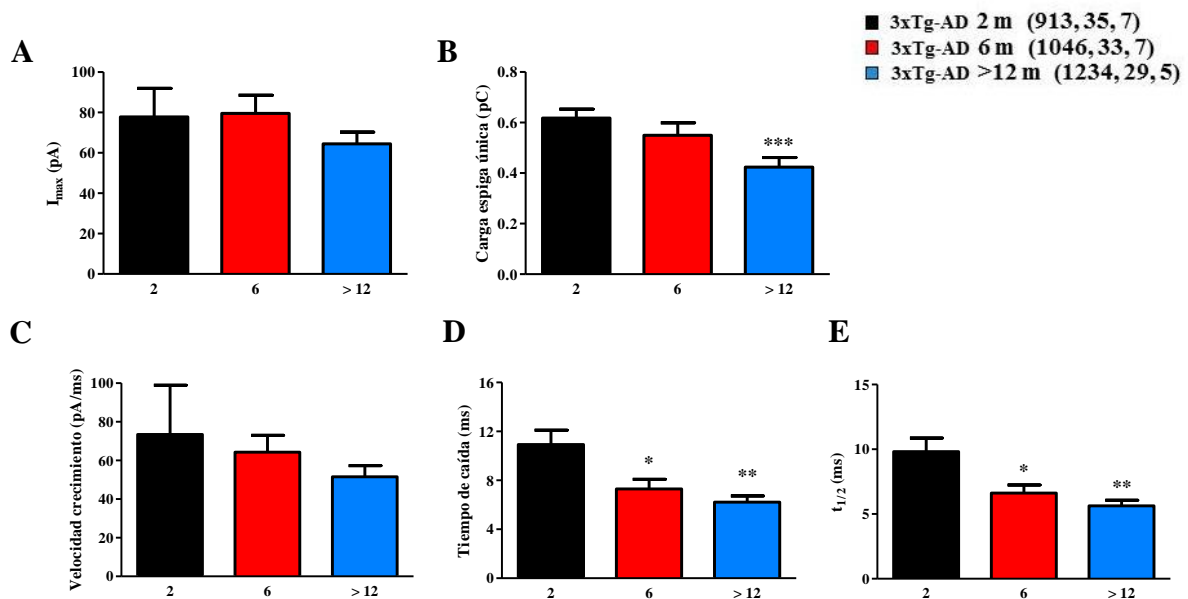
Resulta curioso que, a pesar de este aumento en el número de vesículas liberadas, cuando se cuantifica la carga total (correspondiente a las catecolaminas totales liberadas



durante el minuto de estimulación) no se observaron diferencias entre las distintas edades estudiadas (Figura 15C).

Este resultado hace pensar que, aunque se esté produciendo la liberación de un mayor número de vesículas sinápticas, posiblemente se esté produciendo una reducción en el contenido cuantal de las vesículas individuales, por lo que nos planteamos realizar un análisis detallado de las características cinéticas de las espigas individuales (según los distintos parámetros detallados en la figura 10) en las tres condiciones experimentales.

En el análisis cinético detallado de las espigas de secreción inducidas por un pulso de ACh, no se encontraron diferencias significativas en la amplitud máxima de las espigas ( $I_{max}$ , Figura 16A) entre las distintas edades estudiadas, aunque sí que se observó una disminución progresiva en el contenido cuantal de catecolaminas de las espigas individuales (Q) a medida que se desarrolla la enfermedad (Figura 16B).



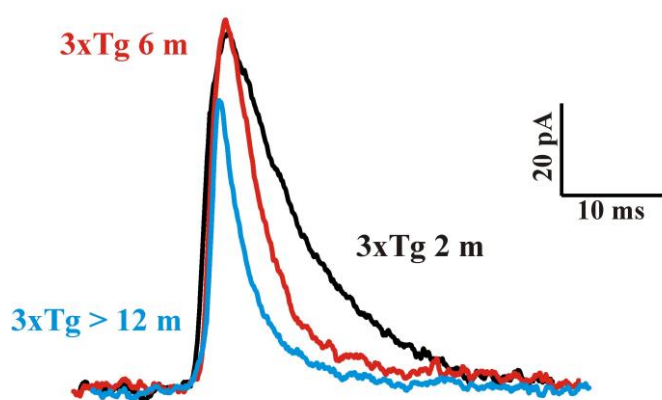
**Figura 16. Parámetros cinéticos de las espigas amperométricas en CCs de ratón 3xTg-AD en respuesta a ACh (100  $\mu$ M).** La liberación de catecolaminas en CCs de ratón de distintas edades (2, 6 y más de 12 meses) estimuladas con ACh durante 1 min, fueron registradas mediante amperometría en célula única. **A**,  $I_{max}$ , representa la altura de la espiga. **B**, *carga de espiga única (Q)*, es el área de la espiga, una indicación del contenido y/o liberación de catecolaminas de la vesícula (tamaño cuantal). **C**, *velocidad de crecimiento*, es calculada con la pendiente de la fase de crecimiento de la espiga. **D**, *tiempo de caída*, es obtenido con el tiempo entre el 75 y el 25% de la altura de la espiga en la fase de descenso. **E**,  $t_{1/2}$  es la anchura de la espiga al 50% de su altura. Los datos son medias  $\pm$  SEM del número de espigas, número de células y número de ratones que aparecen entre paréntesis. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*

$p < 0.001$  en los ratones de 6 y más de 12 meses en comparación con los de 2 meses (ANOVA de una vía, con el post-test Kruskal-Wallis).

Este hecho podría correlacionarse con la ausencia de diferencias significativas en la cantidad total de catecolaminas liberadas durante el estímulo de 1 min, a pesar de haber un mayor número de vesículas liberadas a los 12 meses de edad, como hemos descrito previamente (Figura 15). Es decir, pese a que los ratones de más de 12 meses liberen más vesículas a lo largo del período de estimulación, cada vesícula individual libera un menor contenido de catecolaminas, de manera que en el registro completo la cantidad total de catecolaminas no varía, respecto a las otras edades estudiadas.

Una posible explicación a esta menor liberación cuantál de catecolaminas a medida que el ratón envejece se pone de manifiesto al hacer un estudio detallado de los parámetros que definen la velocidad con la que se secretan las vesículas. Así, una vez instaurada la enfermedad en los ratones 3xTg-AD (6 y más de 12 meses de edad), las espigas caen de manera más rápida que a edades pre-sintomáticas (2 meses de edad) (Figura 16D), lo que se traduce en un estrechamiento de la espiga (Figura 16E).

En base a estos datos podemos concluir que a medida que los ratones 3xTg-AD envejecen y van desarrollando la enfermedad sus células cromafines liberan una menor cantidad de neurotransmisor con cada evento excitotóxico (menor contenido cuantál de las espigas secretoras) y lo hacen de una manera más rápida (menor tiempo de caída y anchura de la espiga). La figura 17 muestra una superposición de las espigas de secreción típicas obtenidas de células cromafines de ratones 3xTg-AD de 2, 6 o más de 12 meses de edad.

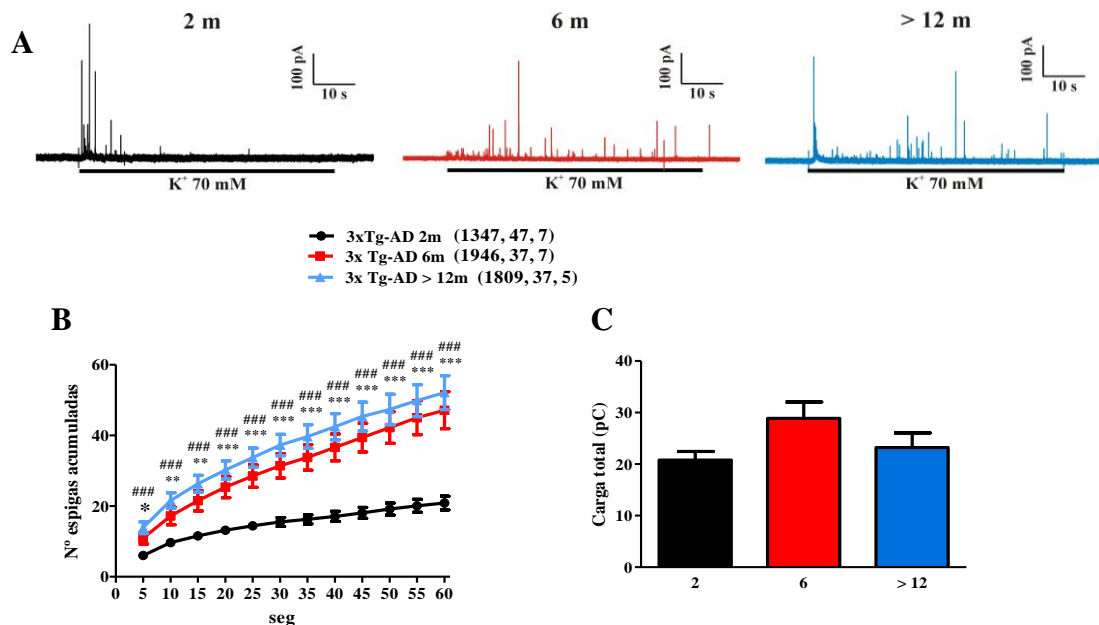


**Figura 17. Espigas amperométricas representativas de CCs de ratón 3xTg-AD en respuesta a ACh (100  $\mu$ M).** Espiga media perteneciente a un ratón de 2 meses (negro), de 6 meses (rojo) y de más de 12 meses (azul). Obsérvese como a medida que el ratón envejece las espigas amperométricas son más rápidas y tienen menor carga cuantál.

## 1.2 Secreción cuantitativa de catecolaminas y análisis cinético de eventos excitotóxicos en respuesta a $K^+$

Al igual que en el caso anterior se empleó una solución KH conteniendo 2 mM  $Ca^{2+}$  para monitorizar la secreción de catecolaminas por parte de las células cromafines de los ratones 3xTg-AD a las distintas edades de estudio. En este caso, para inducir la exocitosis se empleó una solución con alto contenido en  $K^+$  (70 mM) aplicada en pulsos de 1 min.

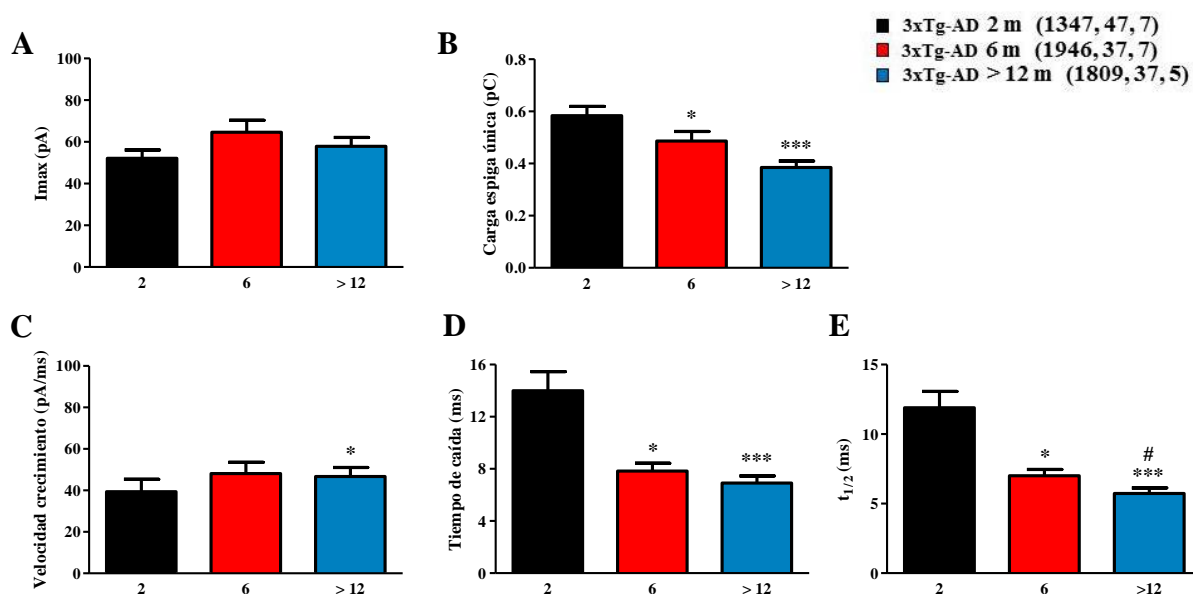
La figura 18A muestra registros representativos correspondientes a la estimulación de células cromafines de ratones de distintas edades. Como puede observarse, a los 2 meses de edad (al igual que en el caso de la estimulación con ACh) hay una gran liberación de catecolaminas durante los primeros 10 seg de estímulo, que se continúa de un período en el que apenas se liberan vesículas. Sin embargo, ya a partir de los 6 meses la liberación de catecolaminas se hace patente durante todo el período de estimulación, como puede observarse en la cuantificación de espigas acumuladas a intervalos de 5 seg en la figura 18B.



**Figura 18. Respuesta excitotóxica de CCs de ratón 3xTg-AD en respuesta a  $K^+$  (70 mM).** La liberación de catecolaminas en CCs de ratón de distintas edades (2, 6 y más de 12 meses) estimuladas con  $K^+$  durante 1 min fue registrada mediante amperometría en célula única. **A**, registros amperométricos representativos correspondientes a CC de ratón de distintas edades. **B**, número de espigas acumuladas en intervalos de 5 seg. **C**, cantidad total de catecolaminas liberadas (área bajo la curva de todas las espigas del registro) durante el período de estimulación. Los datos son medias  $\pm$  SEM del número de espigas, número de células y número de ratones que aparecen entre paréntesis. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$  en los ratones de 6 meses en comparación con los de 2 meses. ###  $p < 0.001$  en los ratones de más de 12 meses en comparación con los de 2 meses (ANOVA de una vía, con el post-test Kruskal-Wallis).

Al igual que ocurría al utilizar ACh como estímulo secretor, a pesar del aumento en el número de vesículas liberadas, el cálculo de secreción total no mostró diferencias significativas entre las distintas edades estudiadas (Figura 18C).

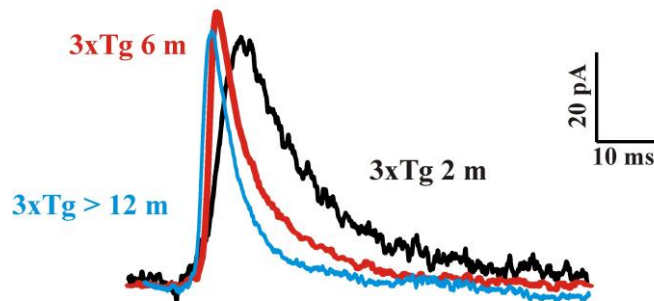
Para estudiar si en el caso de la estimulación con alto  $K^+$  también se estaban produciendo cambios cinéticos en el modo de liberación del neurotransmisor, se realizó de nuevo un análisis cinético de cada espiga individual. Los resultados obtenidos siguen el mismo patrón que en el caso de la estimulación con ACh, incluso de una forma más marcada. Como se puede observar en la figura 19, a pesar de no haber diferencias significativas en la amplitud de las espigas (Figura 19A) el contenido cuantales de cada espiga individual disminuye a medida que el ratón envejece (Figura 19B). Igual que en el caso anterior, esto es posiblemente debido a una liberación del neurotransmisor más breve, lo cual se traduce en menores tiempos de caída (Figura 19D) y estrechamiento de las espigas (menor  $t_{1/2}$ ) (Figura 19E).



**Figura 19. Parámetros cinéticos de las espigas amperométricas en CCs de ratón 3xTg-AD en respuesta a  $K^+$  (70 mM).** La liberación de catecolaminas en CCs de ratón de distintas edades (2, 6 y más de 12 meses) estimuladas con  $K^+$  durante 1 min, fueron registradas mediante amperometría en célula única. **A**,  $I_{max}$ , representa la altura de la espiga. **B**, *carga de espiga única* ( $Q$ ), es el área de la espiga, una indicación del contenido y/o liberación de catecolaminas de la vesícula (tamaño cuantales). **C**, *velocidad de crecimiento*, es calculada con la pendiente de la fase de crecimiento de la espiga. **D**, *tiempo de caída*, es obtenido con el tiempo entre el 75 y el 25% de la altura de la espiga en la fase de descenso. **E**,  $t_{1/2}$  es la anchura de la espiga al 50% de su altura. Los datos son medias  $\pm$  SEM del número de espigas, número de células y número de ratones que aparecen entre paréntesis. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  en los ratones de 6 y más de 12 meses en comparación con los de 2 meses. #  $p < 0.05$  en los ratones de más de 12 meses en comparación con los de 6 meses (ANOVA de una vía, con el post-test Kruskal-Wallis).

Es de destacar que en este caso, además, se observa un aumento de la velocidad de crecimiento de la espiga en los ratones de más de 12 meses de edad (Figura 19C); esto indica que además de tardar menos tiempo en caer, en el caso de la estimulación con  $K^+$ , las espigas de los ratones enfermos ascienden de una manera más rápida.

La figura 20 muestra una superposición de espigas modelo (espigas con valores similares a la media de cada parámetro cinético estudiado) obtenidas en ratones de distintas edades. En ella se puede apreciar la mayor rapidez y menor contenido cuantales de las espigas a medida que el ratón avanza en edad.



**Figura 20. Espigas amperométricas representativas de CCs de ratón 3xTg-AD en respuesta a  $K^+$  (70 mM).** Espiga media perteneciente a un ratón de 2 meses (negro), de 6 meses (rojo) y de más de 12 meses (azul). Obsérvese como a medida que el ratón envejece las espigas amperométricas son más rápidas y tienen menor carga cuantales.

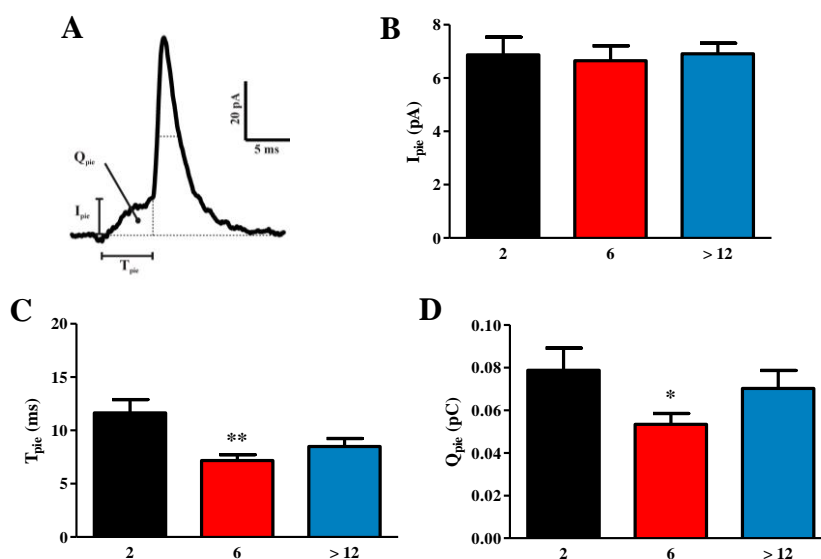
En base a estos resultados podemos concluir que tanto al estimular las células cromafines con ACh como con alto  $K^+$  en los ratones de 6 y más de 12 meses la liberación del neurotransmisor tiene lugar de una forma más rápida y con una liberación cuantales de catecolaminas en cada vesícula menor, de manera que a lo largo de 1 minuto de estimulación la cantidad total de catecolaminas liberada no varía.

### **1.3 Secreción cuantales de catecolaminas y análisis cinético durante la formación del poro de fusión en respuesta a ACh**

Antes de que la vesícula se fusione por completo con la membrana plasmática y libere todo o gran parte de su contenido, se produce una fusión de forma transitoria, donde se pueden liberar pequeñas cantidades de neurotransmisor (Figura 9, paso (2)). Esta liberación moderada de catecolaminas da lugar a pequeñas elevaciones en el registro antes de que se produzca la espiga propiamente dicha, es lo que se ha denominado “pie de espiga”;

y en él se pueden realizar estudios cinéticos de una manera similar a la efectuada anteriormente en la espiga (Figura 21A). Los parámetros medidos en este “pie de espiga” ofrecen una visión de la formación del poro de fusión y su estabilidad. Así, la duración del pie ( $T_{pie}$ ) sería una indicación del tiempo requerido para la estabilización del poro antes de que se produzca su expansión, y su altura ( $I_{pie}$ ) y carga ( $Q_{pie}$ ) un reflejo de la conductancia a su través (Zhou et al., 1996, Fang et al., 2008, Zhang and Jackson, 2010).

Como no en todas las espigas se registra el pie, en primer lugar, se estudió si se producía alguna diferencia en el número de espigas que presentan pie a las distintas edades examinadas. En el caso de la estimulación de las células con ACh se obtuvo un porcentaje de espigas con pie del  $36.62 \pm 3.37$  % en los ratones de 2 meses, del  $41.62 \pm 2.93$  % en ratones de 6 meses y del  $31.23 \pm 1.53$  % en los de más de 12 meses (##  $p < 0.005$  en los ratones de más de 12 meses con respecto a los de 6 meses).



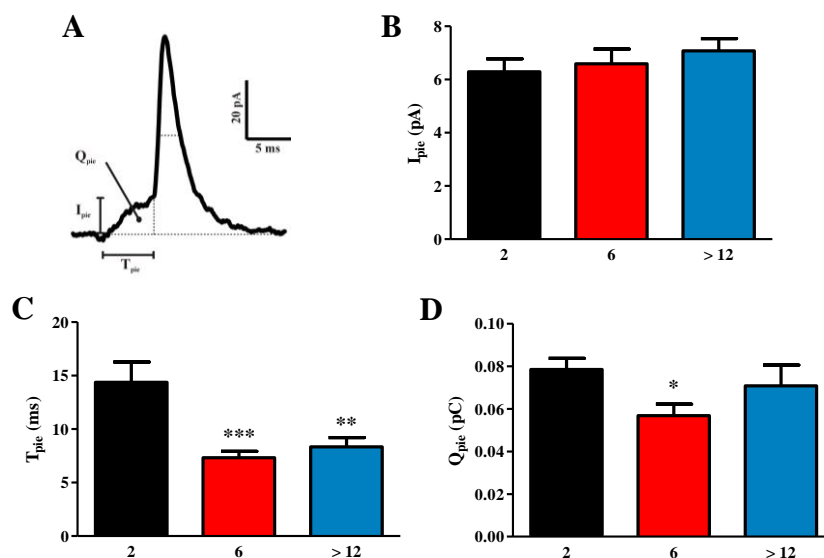
**Figura 21. Parámetros cinéticos de los “pies de espiga” en CCs de ratón 3xTg-AD en respuesta a ACh (100 μM).** **A**, esquema representativo de una espiga con “pie”, donde se indican los parámetros a estudiar. **B**,  $I_{pie}$ , representa la altura del “pie de espiga”. **C**,  $T_{pie}$ , representa la duración del “pie de espiga”. **D**,  $Q_{pie}$ , representa la carga del “pie de espiga”, esto es el área bajo el pie, una indicación de la liberación de catecolaminas durante la formación del poro de fusión. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$  en los ratones de 6 meses en comparación con los de 2 meses (ANOVA de una vía, con el post-test Kruskal-Wallis).

En la figura 21 pueden observarse los distintos parámetros cinéticos correspondientes a los pies de estas espigas. Como ya ocurriese en las espigas no se encontraron diferencias en la amplitud de los pies (Figura 21B), aunque la duración de los mismos, así como

su carga sí que disminuyen en las edades sintomáticas en estos ratones (Figura 21C, D), alcanzando relevancia estadística sólo a los 6 meses de edad. Estos resultados indicarían una estabilización del poro de fusión más rápida en los animales que presentan la enfermedad, con una liberación de neurotransmisor menor durante la formación de este poro, lo que contribuiría a la secreción del contenido vesicular completo más veloz que se observa en las espigas individuales (Figuras 16, 17).

#### 1.4 Secreción cuantitativa de catecolaminas y análisis cinético durante la formación del poro de fusión en respuesta a $K^+$

En el caso de estimular las células con  $K^+$  tampoco se observaron grandes diferencias en el porcentaje de espigas que presentan pie. Así, un  $34.21 \pm 2.51$  % presentan pie a la edad de 2 meses, un  $37.33 \pm 3.07$  % a los 6 meses y un  $34.97 \pm 2.21$  % en los ratones de más de 12 meses de edad (sin diferencias significativas entre ellos).



**Figura 22. Parámetros cinéticos de los “pies de espiga” en CCs de ratón 3xTg-AD en respuesta a  $K^+$  (70 mM).** A, esquema representativo de una espiga con “pie”, donde se indican los parámetros a estudiar. B,  $I_{pie}$ , representa la altura del “pie de espiga”. C,  $T_{pie}$ , representa la duración del “pie de espiga” D,  $Q_{pie}$ , representa la carga del “pie de espiga”, esto es el área bajo el pie, una indicación de la liberación de catecolaminas durante la formación del poro de fusión. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$  en los ratones de 6 meses en comparación con los de 2 meses (ANOVA de una vía, con el post-test Kruskal-Wallis).

En la figura 22 pueden observarse los distintos parámetros cinéticos correspondientes a los pies de estas espigas. Al igual que en el caso anterior no se encontraron diferen-

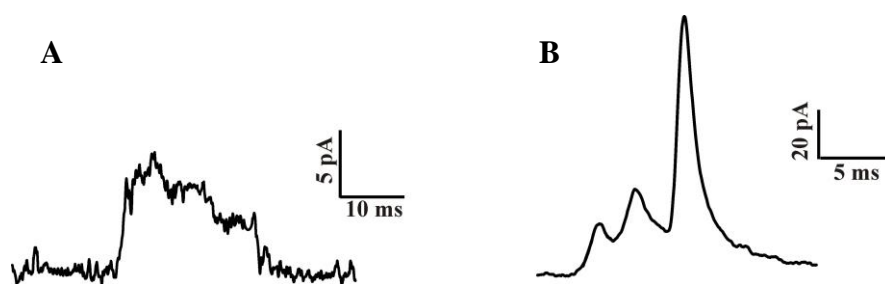
cias en la altura de los pies (Figura 22B), aunque la duración de los mismos sí que disminuye en las edades sintomáticas en estos ratones (Figura 22C), produciendo también una disminución en la carga de los mismos (Figura 22D), alcanzando relevancia estadística sólo a los 6 meses de edad.

Estos resultados (de manera muy similar a lo que ocurre al estimular las células con ACh) indicarían una estabilización del poro de fusión más rápida en los animales de 6 y más de 12 meses, contribuyendo a que la liberación del neurotransmisor tenga lugar de manera más rápida.

### 1.5 Diferentes tipos de eventos excitotóxicos en CCs de ratones 3xTg-AD

Durante la exocitosis, la fusión de las vesículas que se encuentran ya ancladas a la membrana plasmática, tiene lugar en respuesta a un aumento de la  $[Ca^{2+}]_c$  y bajo el control de las proteínas del complejo SNARE principalmente, junto con una gran variedad de otras proteínas reguladoras (Jahn and Scheller, 2006).

En las células cromafines, este poro de fusión puede ser inicialmente inestable, produciéndose lo que se conoce como “flickering” o parpadeo (Zhou et al., 1996, Zhang and Jackson, 2010). Si este poro de fusión se cierra (y no se produce su expansión completa) tiene lugar el fenómeno conocido como “kiss and run”, donde se produce la liberación de pequeñas cantidades de neurotransmisor (Figura 23A).



**Figura 23. Diferentes tipos de eventos excitotóxicos en CCs de ratón 3xTg-AD.** A, esquema representativo de un “flicker”. B, esquema representativo de una espiga múltiple, donde pueden apreciarse la superposición de 3 espigas.

Por el contrario, si este poro de fusión inestable se estabiliza y progresa hacia una expansión completa, tendrá lugar la liberación del contenido total (o gran parte de él) de la vesícula, y entonces podrá registrarse una “espiga con pie”. Cuando varios eventos exci-



tóticos se encuentran temporalmente muy cerca se produce una superposición de espigas (espigas múltiples) (Figura 23B) (Amatore et al., 2009). Este fenómeno sería una indicación de una liberación casi simultánea de varias vesículas en las zonas próximas a donde se encuentra el electrodo de registro. Todos estos procesos se pueden monitorizar y estudiar mediante la técnica de amperometría.

Tal y como se ha descrito previamente no se encontraron grandes diferencias en cuanto al porcentaje de espigas que presentan pie a lo largo de la vida de estos ratones e independientemente del estímulo secretagogo empleado. Únicamente aparecieron diferencias estadísticamente significativas entre los ratones de más de 12 meses con los de 6 meses (pero no con los de 2), al estimular las células con ACh (Tabla 1).

El estudio de los “flickers”, es decir, de los procesos de formación del poro de fusión y posterior cierre del mismo sin liberación completa del contenido vesicular, no mostró ninguna diferencia entre los ratones de distintas edades, en ninguno de los estímulos empleados (Tabla 1).

Por último, el análisis de espigas múltiples puso de manifiesto la existencia de una mayor cantidad de eventos simultáneos en los ratones de más de 12 meses, tanto al estimular las células con ACh (donde únicamente se han encontrado diferencias con los ratones de 6 meses), como mediante la estimulación con  $K^+$  70 mM (Tabla 1).

**Tabla 1.** Características de los eventos excitotóxicos en diferentes etapas de células cromafines de ratones 3xTg-AD estimuladas con ACh (100  $\mu$ M) o  $K^+$  (70 mM) durante 1 min

Edad del ratón en meses (estímulo)	Eventos (células)	Espigas con pie (%)	“Flickering” (%)	Espigas múltiples (%)
2 m (ACh)	913 (35)	36.62 $\pm$ 3.37	20.20 $\pm$ 1.70	8.03 $\pm$ 1.07
6 m (ACh)	1046 (33)	41.62 $\pm$ 2.93	18.46 $\pm$ 1.97	5.21 $\pm$ 0.72
> 12 m (ACh)	1234 (29)	31.23 $\pm$ 1.53 <sup>##</sup>	20.00 $\pm$ 1.65	7.87 $\pm$ 0.67 <sup>##</sup>
2 m ( $K^+$ )	1347 (47)	34.21 $\pm$ 2.51	19.86 $\pm$ 1.58	6.32 $\pm$ 0.77
6 m ( $K^+$ )	1946 (37)	37.33 $\pm$ 3.07	19.41 $\pm$ 1.90	6.81 $\pm$ 0.75
> 12 m ( $K^+$ )	1809 (37)	34.97 $\pm$ 2.21	18.26 $\pm$ 1.76	10.36 $\pm$ 0.81 <sup>***, ##</sup>

Datos obtenidos a partir del análisis manual de las espigas amperométricas obtenidas de experimentos como los mostrados en la figura 15A (ACh) y figura 18A ( $K^+$ ), analizando los diferentes tipos de eventos excitotóxicos. Los datos son medias  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0.001$  en ratones de más de 12 meses en comparación con ratones de 2 meses para cada estímulo; ##  $p < 0.01$  en ratones de más de 12 meses en comparación con los ratones de 6 meses para cada estímulo (ANOVA de una vía, con el post-test Kruskal-Wallis).

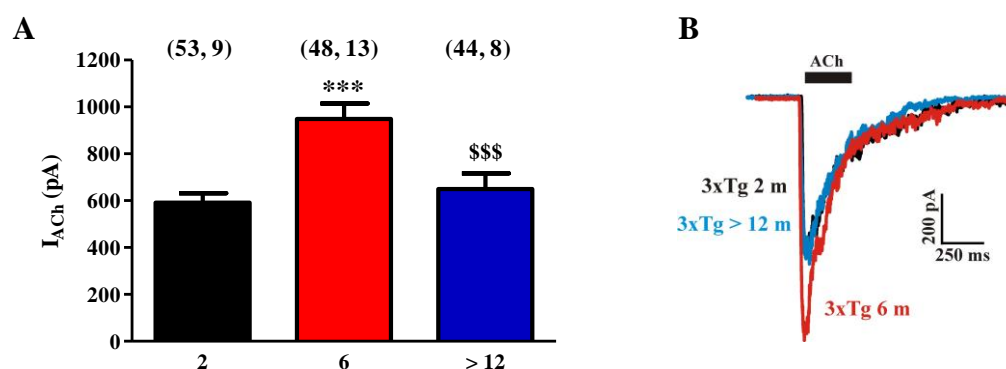
## 2. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS EN EL RATÓN 3xTg-AD

Tras los cambios observados en la cinética de liberación de las catecolaminas en la célula cromafín durante el desarrollo de la EA en los ratones 3xTg-AD, decidimos explorar también las posibles alteraciones de la excitabilidad celular y de las corrientes iónicas implicadas en el proceso exocitótico a lo largo de la vida de estos ratones.

### 2.1 Corrientes iónicas en CCs de ratones 3xTg-AD

Teniendo en cuenta los mecanismos implicados en el acoplamiento “excitación-secreción” descritos en la figura 7, realizamos medidas de las corrientes iónicas a través de todos los receptores y canales iónicos implicados fisiológicamente en el proceso exocitótico. Para ello, se empleó la configuración de célula entera de la técnica de “patch clamp”, en su modalidad de fijación de voltaje. El potencial de membrana de las células se fijó a -80 mV.

La corriente nicotínica ( $I_{ACh}$ ) fue evocada mediante la aplicación de breves pulsos de ACh (100  $\mu$ M) de 250 msec de duración a intervalos de 30 seg. En la figura 24A se representa la amplitud media de la  $I_{ACh}$  a las distintas edades estudiadas.



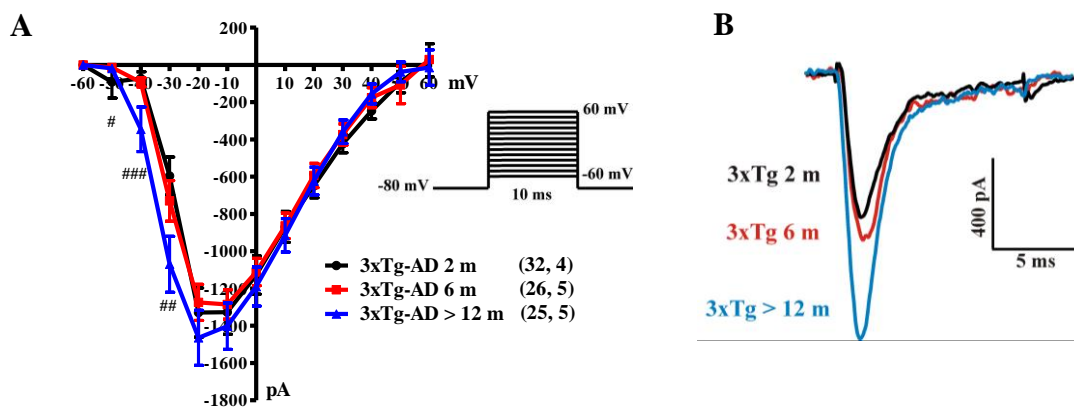
**Figura 24. Corriente nicotínica en CCs de ratón 3xTg-AD.** **A**, amplitud media del pico máximo de  $I_{ACh}$ . **B**, registros representativos superpuestos pertenecientes a  $I_{ACh}$  de ratones de distintas edades. Los datos son medias  $\pm$  SEM del número de células y número de ratones que aparecen entre paréntesis. \*\*\*  $p < 0.001$  en los ratones de 6 en comparación con los de 2 meses. \$\$\$  $p < 0.001$  en los ratones de más de 12 meses en comparación con los de 6 meses (ANOVA de una vía, con el post-test Kruskal-Wallis).

Como puede observarse, se produce un marcado aumento de la  $I_{ACh}$  a los 6 meses de edad, que vuelve a alcanzar valores similares a los de los ratones pre-sintomáticos a los 12 meses de edad (valores de  $591.9 \pm 39.4$  pA a la edad de 2 meses,  $948.8 \pm 65.7$  pA a los

6 meses y  $649.2 \pm 67.4$  pA en los ratones de más de 12 meses de edad). En el panel B se muestran registros representativos de estas corrientes, donde puede observarse con claridad el ya mencionado aumento de corriente a la edad de 6 meses.

Para el estudio de la corriente de sodio a través de los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje ( $I_{\text{Na}}$ ) se realizaron curvas I-V, lo que significa que se midió la corriente (I) a través de estos canales al someter a la célula a distintos voltajes (V). Para ello se aplicaron pulsos despolarizantes de 10 mseg de duración a intervalos de 15 seg, desde -60 mV hasta +60 mV, en saltos crecientes de 10 mV, y se midió el pico máximo de corriente obtenido en cada caso. Para evitar la entrada simultánea de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los CCDVs, estos registros fueron realizados con una solución KH en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (0 mM  $\text{Ca}^{2+}$  nominal).

Los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo de  $I_{\text{Na}}$  en los ratones de más de 12 meses de edad, siendo este efecto particularmente manifiesto a potenciales más negativos (Figura 25).

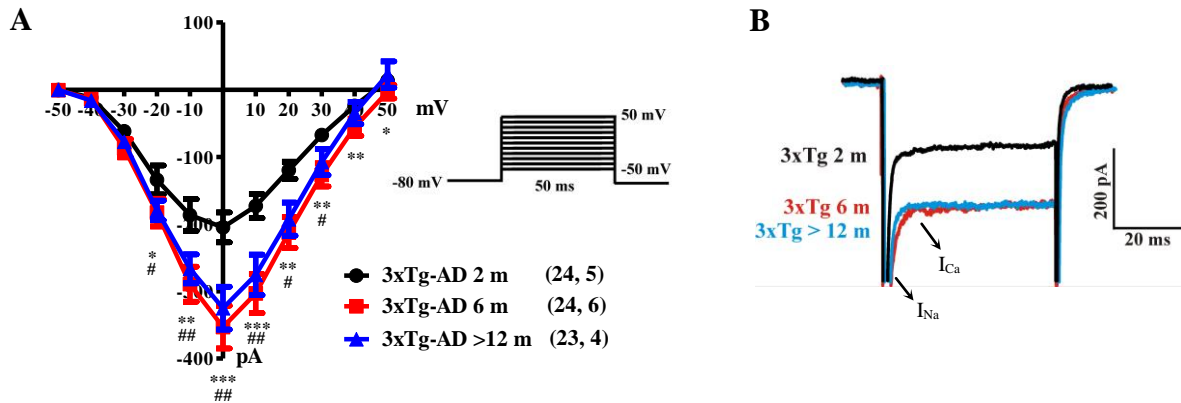


**Figura 25. Corriente de sodio en CCs de ratón 3xTg-AD.** **A**, curva I-V, donde se mide la amplitud media del pico máximo de  $I_{\text{Na}}$  a distintos voltajes. Protocolo empleado (a la derecha de la curva I-V). **B**, registros representativos superpuestos pertenecientes a  $I_{\text{Na}}$  a un voltaje de -30 mV de ratones de distintas edades. Los datos son medias  $\pm$  SEM del número de células y número de ratones que aparecen entre paréntesis. #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.005$ ; ###  $p < 0.001$  en los ratones de más de 12 meses en comparación con los de 2 meses (ANOVA de una vía, con el post-test Kruskal-Wallis).

La corriente de calcio a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje ( $I_{\text{Ca}}$ ) se midió mediante la aplicación de pulsos despolarizantes de 50 mseg de duración a distintos voltajes (curva I-V) a intervalos de 10 seg. Los voltajes empleados comprendieron desde -50 mV hasta +50 mV, en saltos crecientes de 10 mV, y se midió el pico máximo de

corriente para cada caso. En esta ocasión las células fueron perfundidas con una solución KH conteniendo 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ .

Los resultados obtenidos mostraron un claro aumento de  $I_{\text{Ca}}$  en los ratones de 6 y más de 12 meses de edad a prácticamente todos los voltajes estudiados (Figura 26).



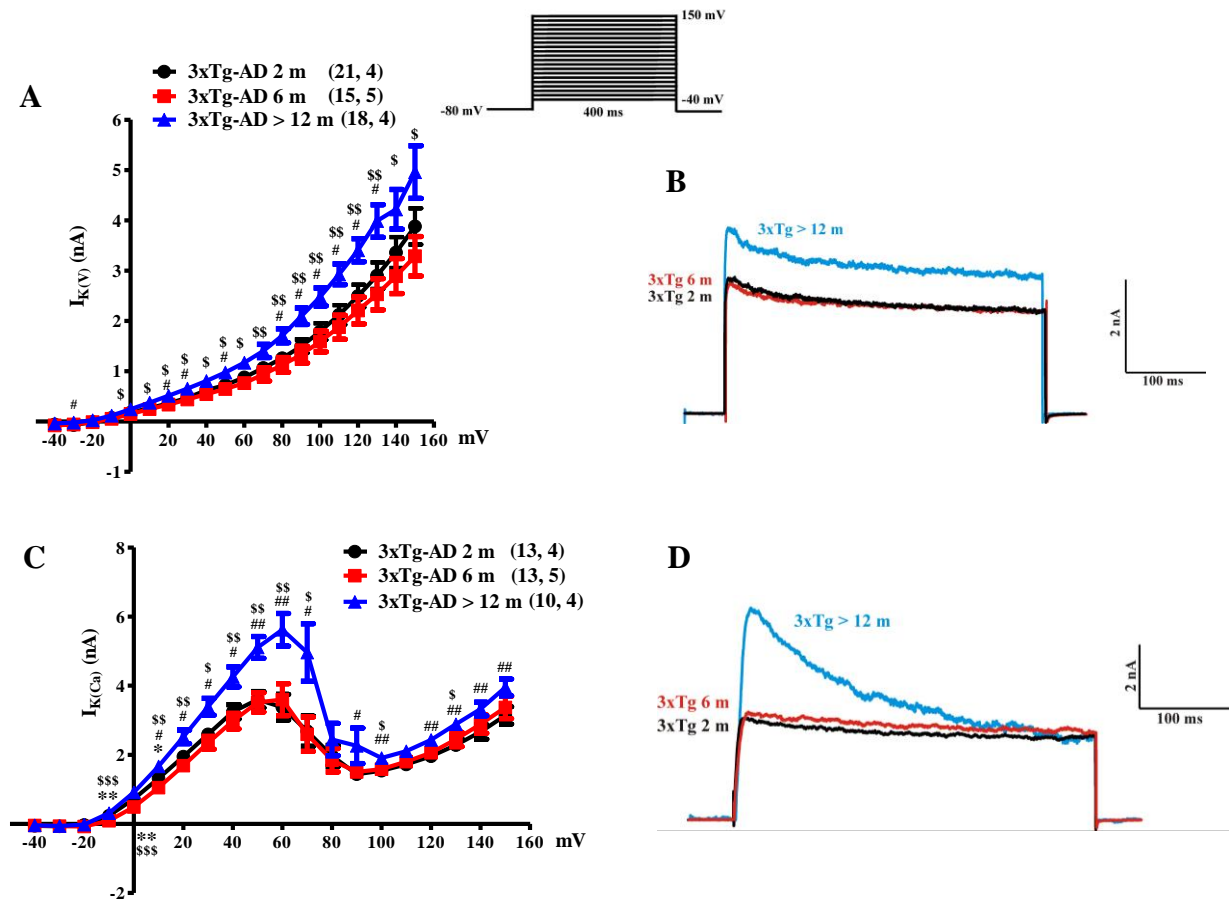
**Figura 26. Corriente de calcio en CCs de ratón 3xTg-AD.** **A**, curva I-V, donde se mide la amplitud media del pico máximo de  $I_{\text{Ca}}$  a distintos voltajes. Protocolo empleado (a la derecha de la curva I-V). **B**, registros representativos superpuestos pertenecientes a  $I_{\text{Ca}}$  a un voltaje de 0 mV de ratones de distintas edades. Nótese que al comienzo de los registros puede apreciarse la corriente de  $\text{Na}^+$ , la cual aparece fuera de escala para poder apreciar con mayor claridad la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los datos son medias  $\pm$  SEM del número de células y número de ratones que aparecen entre paréntesis. \*  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  en los ratones de 6 meses en comparación con los de 2 meses. #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.005$ ; ###  $p < 0.001$  en los ratones de más de 12 meses en comparación con los de 2 meses (ANOVA de una vía, con el post-test Kruskal-Wallis).

Todos los eventos descritos hasta el momento conducen a una elevación de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  con la consiguiente liberación de catecolaminas por parte de las CCs. En este momento se ponen en marcha distintos mecanismos encaminados a conseguir que el  $V_m$  (actualmente despolarizado), así como las concentraciones de los distintos iones dentro de la célula, vuelvan a su estado de reposo. Así, entre otros mecanismos, se produce la apertura de canales de potasio y la consiguiente salida de este ion. La corriente de salida de potasio ( $I_{\text{K}}$ ) en las células cromafines se produce a través de canales de potasio dependientes de voltaje ( $I_{\text{K(V)}}$ ) y de canales dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y voltaje ( $I_{\text{K(Ca)}}$ ) (Marty, 1981, Marty and Neher, 1985, Martinez-Espinosa et al., 2014).

Estos dos subtipos de  $I_{\text{K}}$  se registraron mediante la aplicación de pulsos despolarizantes de 400 mseg de duración a distintos voltajes (curva I-V) a intervalos de 15 seg. Los voltajes empleados comprendieron desde -40 mV hasta +150 mV en saltos crecientes de 10 mV, y se midió el pico máximo de corriente para cada caso. Con el objetivo de diferen-

ciar entre ambos subtipos de  $I_K$  se empleó una solución KH 0 mM  $Ca^{2+}$  nominal para los registros de la  $I_{K(V)}$  y una solución KH conteniendo 2 mM  $Ca^{2+}$  para el registro de la  $I_{K(Ca)}$ .

Los resultados obtenidos mostraron un claro aumento tanto de la  $I_{K(V)}$  como de la  $I_{K(Ca)}$  en los ratones de más de 12 meses de edad a prácticamente todos los voltajes estudiados (Figura 27).

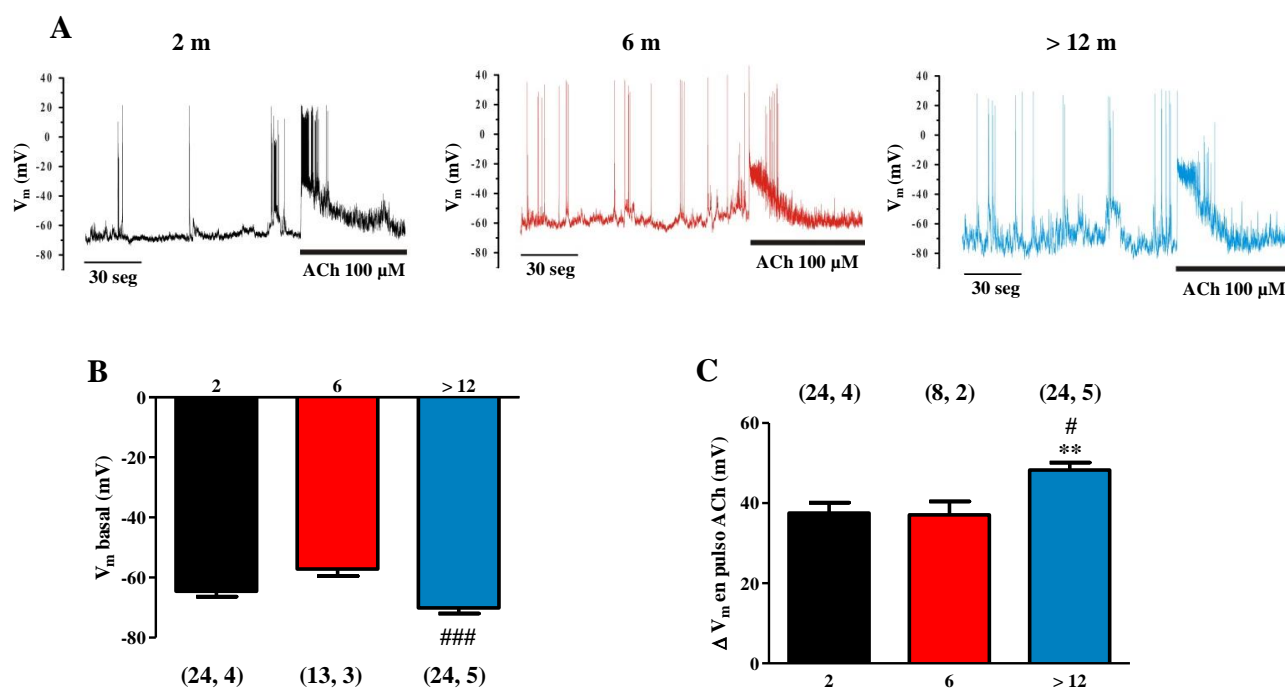


**Figura 27. Corrientes de potasio en CCs de ratón 3xTg-AD.** **A**, curva I-V, donde se mide la amplitud media del pico máximo de  $I_{K(V)}$  a distintos voltajes. Protocolo empleado (parte superior derecha de la curva I-V). **B**, registros representativos superpuestos pertenecientes a  $I_{K(V)}$  a un voltaje de +120 mV de ratones de distintas edades. **C**, curva I-V, donde se mide la amplitud media del pico máximo de  $I_{K(Ca)}$  a distintos voltajes. **D**, registros representativos superpuestos pertenecientes a  $I_{K(Ca)}$  a un voltaje de +50 mV de ratones de distintas edades. Los datos son medias  $\pm$  SEM del número de células y número de ratones que aparecen entre paréntesis. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$  en los ratones de 6 meses en comparación con los de 2 meses. #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.005$  en los ratones de más de 12 meses en comparación con los de 2 meses. \$  $p < 0.05$ ; \$\$  $p < 0.005$ ; \$\$\$  $p < 0.001$  en los ratones de más de 12 meses en comparación con los de 6 meses (ANOVA de una vía, con el post-test Kruskal-Wallis).

## 2.2 Potencial de membrana en CCs de ratones 3xTg-AD

Teniendo en cuenta los cambios observados en las distintas corrientes iónicas nos cuestionamos si el  $V_m$  celular pudiese estar alterado en las CCs de estos ratones. Así, para explorar este parámetro se empleó la configuración de célula entera de la técnica de “patch clamp”, en su modalidad de fijación de corriente.

Todos los experimentos se llevaron a cabo con una inyección de corriente de 0 pA, con el fin de poder explorar el potencial de membrana celular en un estado de reposo. Además, tras 2 min de registro basal se decidió estimular las células con un pulso de ACh (100  $\mu$ M) de 1 min de duración (al igual que se había empleado en los experimentos de registro de secreción de catecolaminas mediante amperometría en célula única) y poder estudiar así algún posible cambio en la respuesta a un estímulo. La figura 28A muestra registros representativos de los cambios en el  $V_m$  en situaciones de reposo y tras la estimulación con ACh en CCs de ratones 3xTg-AD de las tres edades estudiadas.



**Figura 28. Potencial de membrana en CCs de ratón 3xTg-AD.** El  $V_m$  de las CCs de ratones de distintas edades (2, 6 y más de 12 meses) en situación basal (2 min) y durante un estímulo con ACh (100  $\mu$ M) durante 1 min fue registrado mediante la técnica de patch clamp, en su configuración de fijación de corriente (inyección de corriente de 0 pA). **A**, registros de  $V_m$  representativos correspondientes a CCs de ratón de distintas edades. Obsérvese el disparo de potenciales de acción que se producen de forma espontánea en todos los registros. **B**, potencial de membrana medio en situación basal. **C**, diferencia de potencial de membrana que se produce entre la estimulación con ACh y el estado basal; calculado como la resta entre el  $V_m$  al principio del pulso con ACh y el  $V_m$  basal de la célula. Los datos son medias  $\pm$  SEM del número de células y número de ratones que aparecen entre paréntesis. \*\*  $p < 0.005$  en los ratones de más de 12 meses en comparación con los de 2 meses. #  $p < 0.05$ ; ###  $p < 0.001$  en los ratones de más de 12 meses en comparación con los de 6 meses. (ANOVA de una vía, con el post-test Kruskal-Wallis).

Como puede observarse en la figura 28, a pesar de las variaciones encontradas en las distintas corrientes iónicas estudiadas ( $I_{ACh}$ ,  $I_{Na}$ ,  $I_{Ca}$ ,  $I_{K(V)}$ ,  $I_{K(Ca)}$ ) los registros de  $V_m$  durante el período de 2 min de registro basal no mostraron diferencias significativas entre las distintas edades estudiadas, observándose una ligera hiperpolarización en las células de los ratones de avanzada edad. Así, el  $V_m$  estudiado en condiciones de reposo alcanzó unos valores de  $-64.58 \pm 1.77$  mV en los ratones de 2 meses de edad,  $-57.16 \pm 2.33$  mV en los ratones de 6 meses y de  $-70.10 \pm 1.87$  mV en los de más de 12 meses (Figura 28B).

Sin embargo, al estimular las células con ACh se puso de manifiesto una diferencia en el grado de despolarización que alcanzan las mismas en respuesta a dicho estímulo. Así, mientras que la ACh produjo una diferencia de  $V_m$  ( $\Delta V_m$ ) (desde el estado de reposo al nuevo estado despolarizado) de  $37 \pm 2.61$  mV y de  $37.09 \pm 3.34$  mV en los ratones de 2 y 6 meses, respectivamente, la despolarización fue de  $48.27 \pm 1.85$  mV en los ratones de más de 12 meses de edad (Figura 28C). Es decir, que ante un mismo estímulo, las células cromafines de los ratones que desarrollan la EA responden con una mayor despolarización, lo que podría contribuir al aumento en el número de vesículas liberadas observado en los ratones de más de 12 meses tras un estímulo con ACh (Figura 15).

### 2.2.1 Análisis cinético de los potenciales de acción

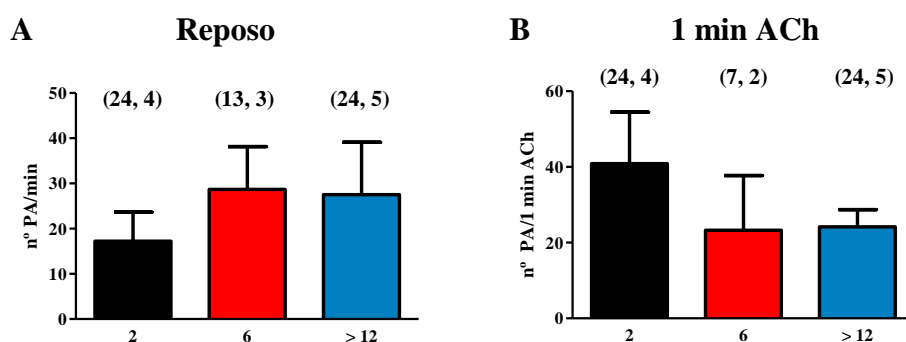
Fue en 1939 cuando A. L. Hodgkin y A. F. Huxley publicaron el primer registro de un potencial de acción empleando una preparación del axón gigante de calamar (*Loligo forbesi*) (Hodgkin and Huxley, 1939). Sin embargo, no fue hasta años después cuando se lograron dilucidar las corrientes iónicas responsables de este fenómeno. De manera simple, la fase de ascenso de un potencial de acción está producida por el aumento en la permeabilidad para el ion  $Na^+$ , con su consiguiente entrada en la célula. A medida que la permeabilidad para el  $Na^+$  empieza a disminuir (por la inactivación de los canales de  $Na^+$  dependientes de voltaje), comienza a aumentar la permeabilidad para el  $K^+$ , lo que hará que los iones  $K^+$  salgan de la célula, de manera que se compense la entrada de iones  $Na^+$ . La salida de  $K^+$  consigue que el  $V_m$  celular vuelva a su estado de reposo, aunque antes de que se produzca eso la célula pasa por un estado hiperpolarizado debido a un exceso de salida de  $K^+$  (Huxley, 2002).

Como se ha comentado, las células cromafines de ratón disparan potenciales de acción (PA) de forma espontánea, así como en respuesta a un estímulo como es la ACh. Esta

característica de las células cromafines fue descrita por primera vez en 1976 por B. Biales y colaboradores en CCs de jerbo y humanas. Estos autores observaron la capacidad de estas células de generar respuestas “todo o nada” similares a los PA generados por las neuronas simpáticas. En su estudio concluyen que las CCs son capaces de generar PA tanto en estado de reposo como en respuesta a ACh, por un mecanismo probablemente dependiente de  $\text{Na}^+$  (Biales et al., 1976). No obstante, a la luz de estos datos les surgiría una importante cuestión, ¿están los potenciales de acción implicados en el acoplamiento excitación-secreción?

Una característica determinante de las sinapsis de los terminales nerviosos es que la propagación de los PA tiene como consecuencia una rápida, altamente sincronizada y  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente exocitosis de neurotransmisores. Las células cromafines tienen una función similar a las neuronas simpáticas post-ganglionares, y en respuesta a la liberación de ACh por parte del nervio esplácnico liberan catecolaminas (junto con otros neurotransmisores como son las encefalinas) al torrente sanguíneo. Es en 1995, mediante la combinación de registros de “patch clamp” con registros amperométricos, cuando se demuestra el acoplamiento directo entre la liberación de catecolaminas y la generación de potenciales de acción (Zhou and Misler, 1995).

El recuento del número de PA en situación de reposo en registros similares a los que se muestran en el panel A de la figura 28 no mostró diferencias significativas entre las distintas edades estudiadas, aunque sí que se aprecia un aumento en la frecuencia de potenciales de acción ( $\text{n}^\circ$  PA/min) en células procedentes de ratones de 6 y de más de 12 meses de edad (Figura 29A).



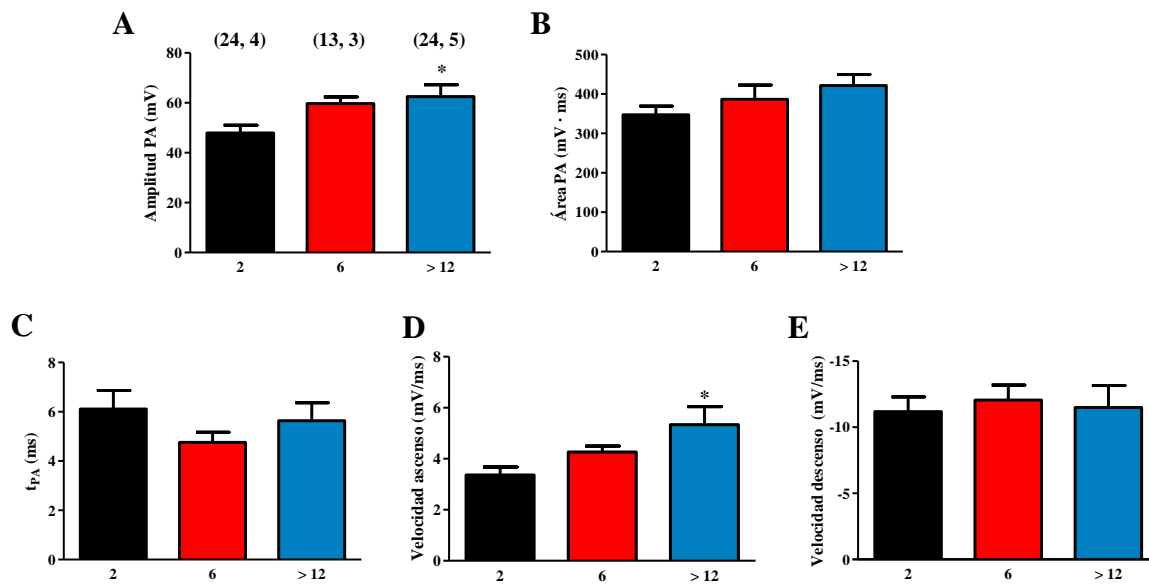
**Figura 29. Número de potenciales de acción en CCs de ratón 3xTg-AD.** Los potenciales de acción (PA) de las CCs de ratones de distintas edades (2, 6 y más de 12 meses) se registraron mediante la técnica de patch clamp, en su configuración de fijación de corriente (inyección de corriente de 0 pA). **A**, frecuencia de PA en reposo, calculada como el  $\text{n}^\circ$  de PA por min en situación basal. **B**, frecuencia de PA durante 1 min de estimulación con ACh, calculada como el  $\text{n}^\circ$  de PA disparados durante el período de estimulación con ACh. Los datos son medias  $\pm$  SEM del número de células y número de ratones que aparecen entre paréntesis, (ANOVA de una vía, con el post-test Kruskal-Wallis).



Sin embargo, el recuento del número de PA registrados durante el período de estimulación con ACh mostró el resultado inverso, observándose un mayor disparo de PA en los ratones de 2 meses (Figura 29B).

Tras este recuento inicial de PAs se prosiguió con el análisis cinético de cada potencial de acción individual. El esquema de la figura 12 muestra todos los parámetros cinéticos estudiados. Los resultados obtenidos del estudio de los PA disparados espontáneamente por las células en situación de reposo fueron similares a los de los PA evocados por la estimulación con ACh.

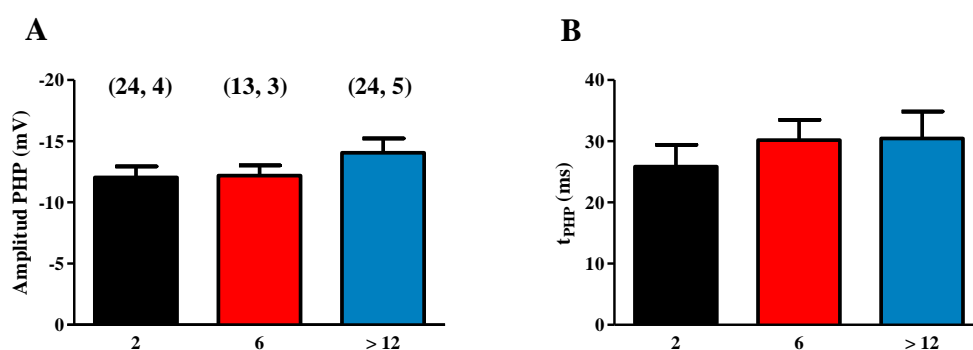
Puede observarse así un aumento en la amplitud de los PA a medida que el ratón desarrolla la enfermedad (Figura 30A), al igual que en el área de los mismos (Figura 30B), aunque aquí las diferencias encontradas no alcanzan la significancia estadística.



**Figura 30. Parámetros cinéticos de los potenciales de acción en CCs de ratón 3xTg-AD.** Los potenciales de acción (PA) de las CCs de ratones de distintas edades (2, 6 y más de 12 meses) se registraron mediante la técnica de patch clamp, en su configuración de fijación de corriente (inyección de corriente de 0 pA). **A**, *amplitud del PA*: altura del PA, medida en mV. **B**,  $A_{PA}$ : Área bajo la curva formada por el PA, medido en mV · ms. **C**,  $t_{PA}$ : anchura del PA al 50 % de su altura, medida en ms. **D**, *velocidad de ascenso*: calculada con la pendiente entre el 10 y el 90 % de la fase de crecimiento del PA, medida en mV/ms. **E**, *velocidad de descenso*: calculada con la pendiente entre el 90 y el 10 % de la fase de descenso del PA, medida en mV/ms. Los datos son medias  $\pm$  SEM de los PAs contabilizados en el número de células y número de ratones que aparecen entre paréntesis. \*  $p < 0.05$  en los ratones de más de 12 meses en comparación con los de 2 meses (ANOVA de una vía, con el post-test Kruskal-Wallis).

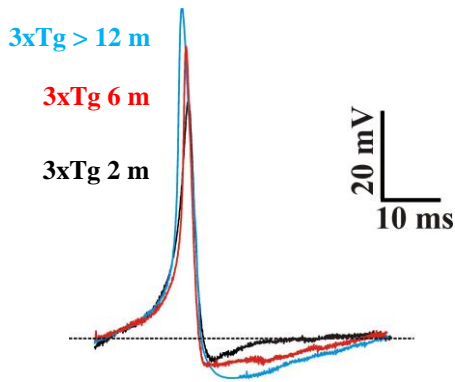
Tampoco se encontraron diferencias en la anchura media de los PA ( $t_{PA}$ ) (Figura 30C). De un modo similar a lo que ocurriese con las espigas amperométricas, los PA ascienden de una manera más rápida a medida que la edad del ratón avanza, como indica la pendiente de ascenso (Figura 30D), sin percibirse ningún cambio en la velocidad de descenso del PA (Figura 30E).

Algunos de los parámetros explorados en la fase de post-hiperpolarización (zona sombreada en azul en la figura 12) sugieren un aumento (tanto en amplitud como en anchura) de la post-hiperpolarización en los ratones de más de 12 meses de edad, sin embargo, este incremento no alcanza la significancia estadística (Figura 31).



**Figura 31. Parámetros cinéticos de la fase de post-hiperpolarización (PHP) de los potenciales de acción en CCs de ratón 3xTg-AD.** Los potenciales de acción (PA) de las CCs de ratones de distintas edades (2, 6 y más de 12 meses) se registraron mediante la técnica de patch clamp, en su configuración de fijación de corriente (inyección de corriente de 0 pA). **A**, *amplitud del PHP*: altura del PHP, medida en mV. **B**,  $t_{PHP}$ : anchura del PHP al 50 % de su altura, medida en ms. Los datos son medias  $\pm$  SEM de la fase de post-hiperpolarización de los PAs contabilizados en el número de células y número de ratones que aparecen entre paréntesis (ANOVA de una vía, con el post-test Kruskal-Wallis).

Tal y como demostrasen Hodgkin y Huxley, con la ayuda de otros investigadores, tales como K. S. Cole y B. Katz, los principales iones involucrados en la generación de un PA son el  $Na^+$  y el  $K^+$ . El aumento en  $I_{Na}$  e  $I_K$  encontrado en las CCs de ratones de más de 12 meses (Figuras 25 y 27) podría ser el responsable del aumento de amplitud tanto del PA como de la fase de post-hiperpolarización que se observa en los ratones de avanzada edad. En resumen, a medida que los ratones 3xTg-AD envejecen y van desarrollando la enfermedad sus células cromafines disparan un mayor número de potenciales de acción, de mayor tamaño y de una manera más rápida (Figura 32).



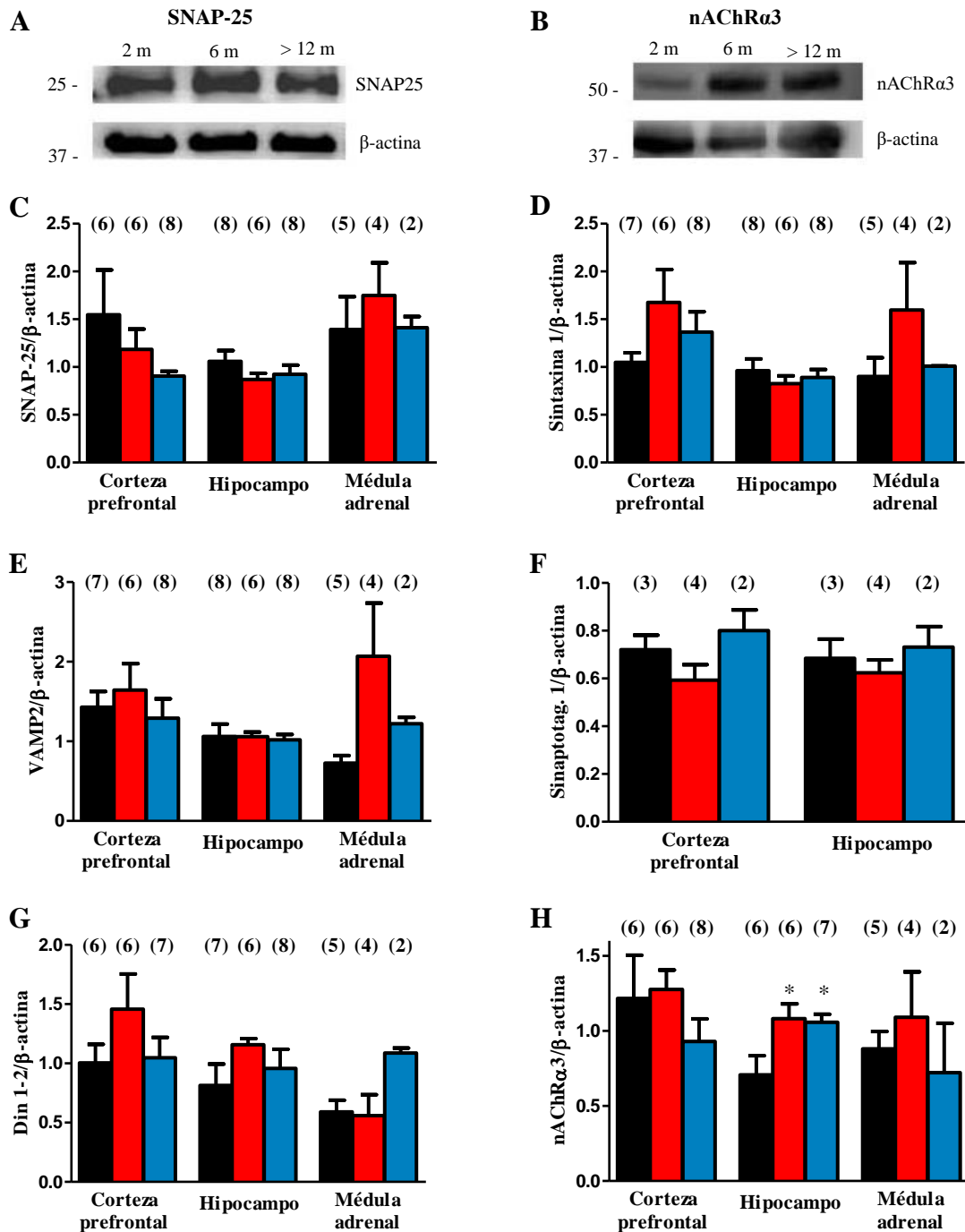
**Figura 32. Potenciales de acción representativos de CCs de ratón 3xTg-AD.** Potencial de acción media perteneciente a un ratón de 2 meses (negro), de 6 meses (rojo) y de más de 12 meses (azul). Obsérvese como a medida que el ratón envejece los potenciales de acción son más rápidos y de mayor amplitud.

### 3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA EXOCITOSIS EN EL RATÓN 3xTg-AD

Aunque las diferencias encontradas en las corrientes iónicas y excitabilidad celular podrían estar implicadas en los cambios cinéticos de liberación del neurotransmisor encontrados, se realizaron experimentos de “western blot” con el objetivo de estudiar posibles alteraciones en proteínas implicadas en el proceso de secreción. En este estudio nos hemos centrado en distintas proteínas del complejo SNARE (Jahn and Scheller, 2006) y el nA-ChR $\alpha$ 3, por tratarse de uno de los más representativos y abundantemente expresado en las células cromafines (Criado et al., 1992).

Para ello, se aislaron las proteínas de membrana de diferentes tejidos. Ante la escasez de muestra de médula adrenal de ratones 3xTg-AD, se decidió también recoger y estudiar otros tejidos pertenecientes al SNC y afectados en la EA, como son la corteza prefrontal y el hipocampo. Las proteínas extraídas se separaron en geles de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturizantes y reductoras, posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF, para finalmente identificarlas mediante anticuerpos específicos para las distintas proteínas a estudiar. Como control de carga se empleó la  $\beta$ -actina, utilizada para normalizar las señales de las proteínas de interés.

Los resultados obtenidos se resumen en la figura 33. Los paneles A y B contienen ejemplos representativos del revelado del “western blot” de la proteína SNAP-25 (Figura 33A) y del receptor nicotínico  $\alpha$ 3 (Figura 33B) extraídas del hipocampo a las distintas edades estudiadas. Los paneles C-H muestran los resultados medios de la intensidad de las bandas pertenecientes a las distintas proteínas examinadas, en los tres tejidos bajo estudio (corteza prefrontal, hipocampo y médula adrenal) y a las distintas edades de los ratones.

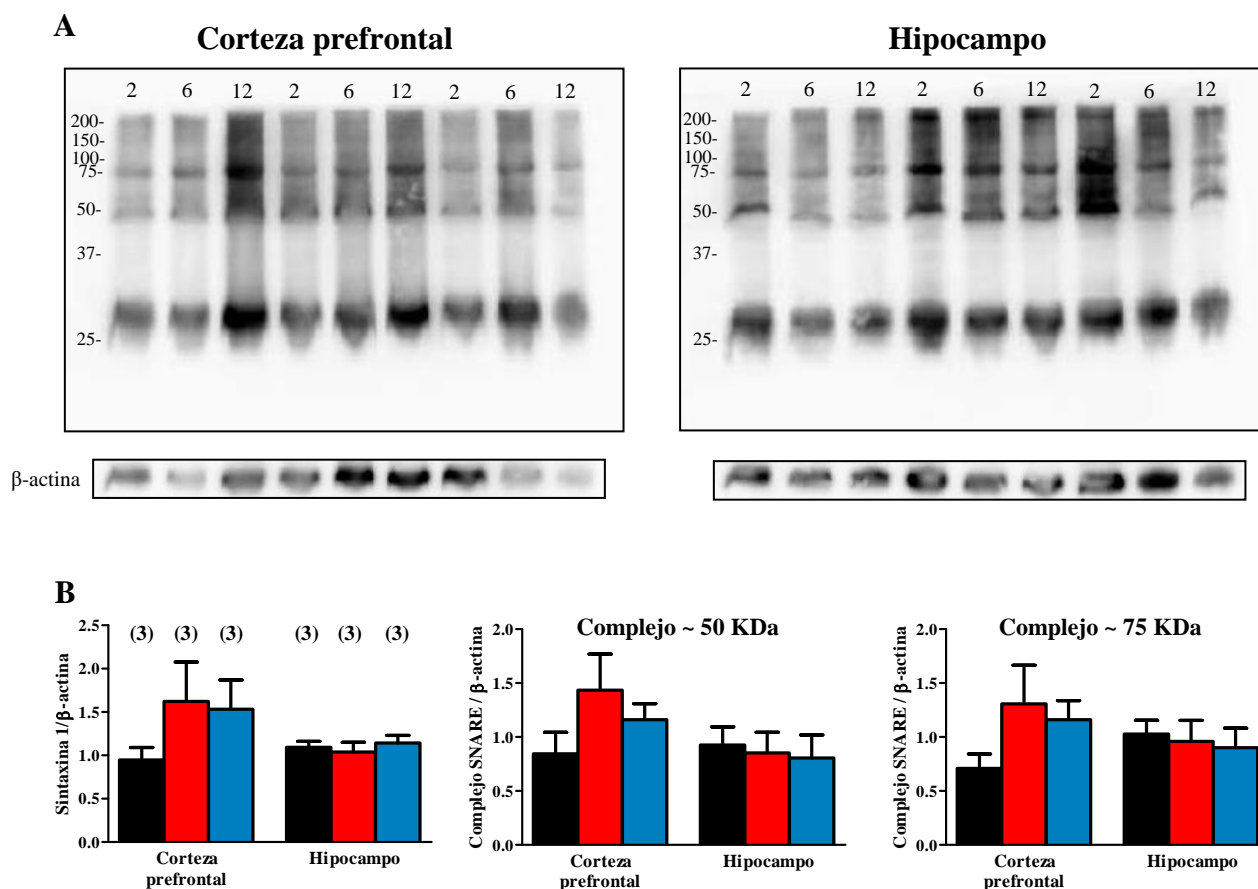


**Figura 33. Expresión relativa de proteínas implicadas en la exocitosis en distintos tejidos del ratón 3xTg-AD.** La expresión de proteínas fue examinada mediante “western blot”; la densidad relativa de las bandas fue calculada como ratios entre la banda perteneciente a cada proteína y su correspondiente banda de β-actina (empleada como control de carga). Los diagramas de barras representan los resultados promedio de la corteza prefrontal, el hipocampo y la médula adrenal en ratones de 2 meses (barras negras), 6 meses (barras rojas) y más de 12 meses (barras azules). **A**, ejemplo representativo del revelado del “western blot” de la proteína SNAP-25 en el hipocampo de ratones 3xTg-AD de 2, 6 y más de 12 meses de edad. **B**, ejemplo representativo del revelado del “western blot” del receptor nicotínico α3 en el hipocampo de ratones 3xTg-AD de 2, 6 y más de 12 meses de edad. **C**, expresión de SNAP-25. **D**, expresión de Sintaxina 1. **E**, expresión de VAMP 2. **F**, expresión de Sinaptotagmina 1. **G**, expresión de Dinamina 1-2. **H**, expresión de nAChRα3. Los datos son medias ± SEM del número de muestras que aparecen entre paréntesis. \*  $p < 0.05$  en las muestras de hipocampo de los ratones de 6 meses y más de 12 meses en comparación con los de 2 meses (ANOVA de una vía, con el post-test Newman-Keuls).

No se encontraron diferencias en la expresión de ninguna de las proteínas del complejo SNARE estudiadas (SNAP-25, Syntaxina 1 y VAMP2) en ninguno de los tejidos examinados (Figura 33C, D, E). Tampoco en el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  implicado en la exocitosis Sinaptotagmina 1 (Figura 33F), ni en la dinamina (Figura 33G). A pesar de que tampoco se encontraron diferencias en la expresión del nAChR $\alpha$ 3 ni en corteza prefrontal ni en la médula adrenal, sí que se observó un aumento en la expresión de este receptor en los hipocampos de los ratones de 6 y más de 12 meses de edad (Figura 33H).

Con los experimentos anteriormente mostrados se ha estudiado la cantidad de proteína individual total que hay en cada tejido. Sin embargo, la mayor parte de estas proteínas se encuentran formando parte de un complejo; es por ello que a continuación decidimos examinar también la formación de complejos SNARE en estas muestras. Para llevar este nuevo objetivo a cabo se procedió a la extracción de proteína total (no sólo la que se encuentra anclada en la membrana) de muestras de corteza prefrontal e hipocampo y, además, no se hirvió la proteína durante el procesamiento de la misma (de esta manera no se desensamblan los complejos).

Las proteínas extraídas se separaron en geles de poliacrilamida al 10 % en condiciones desnaturizantes y reductoras (los complejos SNARE son resistentes a este tratamiento), posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF, para finalmente marcarlas con un anticuerpo específico para syntaxina 1 (proteína escogida para el estudio de los complejos, ya que detectando una de las proteínas que forman parte del complejo se podrá observar la cantidad de esa proteína aislada y todos los complejos de los que esté formando parte; es decir, que con un solo anticuerpo (el que reconoce a syntaxina 1) aparecerán bandas de distintos tamaños) (Figura 34).



**Figura 34. Expresión relativa de complejos SNARE en distintos tejidos del ratón 3xTg-AD.** La expresión de proteínas fue examinada mediante “western blot”; la densidad relativa de las bandas fue calculada como ratios entre la banda perteneciente a cada complejo y su correspondiente banda de  $\beta$ -actina (empleada como control de carga). Los diagramas de barras representan los resultados promedio de la corteza prefrontal y el hipocampo en ratones de 2 meses (barras negras), 6 meses (barras rojas) y más de 12 meses (barras azules). **A**, ejemplo del revelado del “western blot” de la proteína sintaxina 1 (banda de ~ 31 KDa) y los complejos SNARE de los que forma parte (Bandas ~ 50 KDa y ~ 75 KDa) en la corteza prefrontal e hipocampo de ratones 3xTg-AD de 2, 6 y más de 12 meses de edad. **B**, cuantificación de la expresión de Sintaxina 1 y complejos SNARE. Los datos son medias  $\pm$  SEM del número de muestras que aparecen entre paréntesis (ANOVA de una vía, con el post-test Newman-Keuls).



“Donde todos piensan igual, ninguno piensa mucho”

Walter Lippmann. Intelectual estadounidense (1889-1974)

---

## **V. DISCUSIÓN**





A lo largo de la realización de esta Tesis Doctoral hemos encontrado importantes diferencias en las corrientes iónicas y en la cinética de liberación de las catecolaminas por las células cromafines a lo largo de la vida y a medida que se desarrolla la enfermedad de Alzheimer en el ratón 3xTg-AD, un modelo transgénico de esta enfermedad.

Los resultados aquí expuestos muestran claras diferencias en dos niveles diferentes del proceso de exocitosis, esto es, en el número de vesículas que sufren exocitosis y en la velocidad con la que las catecolaminas son liberadas. El mecanismo subyacente a estas diferencias todavía no está claro, pudiendo influir en dichos efectos cambios en la excitabilidad de la membrana celular y en la respuesta que presentan las células cromafines frente a un determinado estímulo secretagogo. Además, y puesto que el proceso de liberación de neurotransmisores depende directamente del ión  $\text{Ca}^{2+}$ , el aumento de la corriente de entrada de este ion a través de los CCDVs también podría influir en las alteraciones exocitóticas observadas.

Utilizando como modelo de célula neurosecretora la célula cromafín adrenomedular, hemos encontrado en este estudio un incremento en el número de vesículas que experimentan exocitosis en ratones que padecen la EA (de 6 y de más de 12 meses de edad) en comparación con los ratones en los que todavía no se ha desarrollado la enfermedad (de 2 meses de edad), empleando como estímulos secretagogos tanto el neurotransmisor fisiológico ACh (Figura 15), como una solución conteniendo altas cantidades de  $\text{K}^+$  (Figura 18). Este incremento podría ser debido a diversas razones. Entre ellas, un aumento en el tamaño del reservorio de vesículas disponibles para ser liberadas, o modificaciones en las proteínas encargadas del proceso de exocitosis.

Con respecto a las posibles alteraciones en las proteínas que forman parte de la llamada maquinaria de la exocitosis, se ha descrito que alteraciones en los niveles de la proteína SNAP-25, así como polimorfismos de un solo nucleótido en esta misma proteína están involucrados en la aparición de deterioro cognitivo (Guerini et al., 2014). En cultivos de neuronas de hipocampo, el  $\text{A}\beta_{1-42}$  interacciona con la proteína vesicular sinaptofisina, dificultando su unión a VAMP2, lo que se ha visto que produce un aumento en el número de vesículas maduras (“primed”), así como en la exocitosis (Russell et al., 2012). Se han encontrado también niveles disminuidos de SNAP-25 tanto en cerebros de pacientes con EA y síndrome de Down (Greber et al., 1999) como en el hipocampo del modelo murino 3xTg-AD (Cassano et al., 2012). De manera similar a lo que se ha obtenido en el presente estudio, y utilizando el mismo modelo celular (células cromafines), Margarita Segovia y

colaboradores describieron en el año 2010 que mutaciones puntuales en el dominio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  CB2 de la sinaptotagmina 7 producían un mayor número de espigas amperométricas, con una anchura y carga cuantales disminuídas (Segovia et al., 2010).

A pesar del vasto número de trabajos en el que se encuentran diferencias en alguna de las proteínas involucradas en el proceso de exocitosis, en el presente estudio no hemos encontrado diferencias significativas en los niveles de expresión de las proteínas del complejo SNARE (SNAP-25, syntaxina 1, VAMP2), así como del sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  sinaptotagmina o de la proteína dinamina 1-2 (Figura 33), en ninguno de los tejidos explorados, esto es corteza prefrontal, hipocampo y médula adrenal. Asimismo, el análisis del número de complejos SNARE formados, mediante el reconocimiento de la proteína syntaxina 1 en muestras no hervidas, tampoco mostró ninguna diferencia significativa en nuestras muestras (Figura 34), lo que sugiere que estas proteínas no estarían involucradas en los cambios exocitóticos aquí observados.

Por otro lado, independientemente de un posible cambio en el tamaño del reservorio de vesículas listas para ser liberadas, nuestros resultados revelan diferencias evidentes en la cinética de liberación de estas vesículas. Así, una vez que la EA se ha instaurado se puede observar una disminución en el tiempo de caída de la espiga (Figuras 16D y 19D), así como un estrechamiento de la misma (Figuras 16E y 19E). Además, en el caso de la estimulación de las células con soluciones despolarizantes (con alto  $\text{K}^+$ ) las espigas amperométricas obtenidas de ratones de 6 y de más de 12 meses presentan una velocidad de ascenso mayor (Figura 19C). Todo ello indica que la liberación de catecolaminas por parte de las células cromafines de ratones que presentan la EA se produce de una manera más rápida que en aquellos ratones donde la enfermedad aún no se ha desarrollado, lo que podría correlacionarse con el menor contenido cuantales por evento exocitótico encontrado en nuestros registros (Figuras 16B y 19B). Resultados similares han sido descritos por de Diego y colaboradores en células cromafines de otro modelo murino de EA, el ratón APP/PS1, donde encontraron una cinética de liberación de neurotransmisor más rápida (menor  $t_{1/2}$  y menor velocidad de descenso de la espiga amperométrica) con un menor tamaño cuantales (de Diego et al., 2012).

Las alteraciones encontradas en varios de los parámetros de la espiga amperométrica estudiados podrían deberse a cambios en el contenido cuantales de las vesículas. Así, la amplitud de la espiga amperométrica ( $I_{\text{max}}$ ) depende de la cantidad de neurotransmisores contenidos en las vesículas, ya que el aumento de catecolaminas en el interior vesicular me-

diante una pre-incubación con L-DOPA (Colliver et al., 2000b, Pothos et al., 2002), o su reducción mediante la inhibición de la bomba  $H^+$ -ATPasa vesicular (Pothos et al., 2002), o el transportador vesicular de monoaminas (Colliver et al., 2000b), da como resultado un incremento o un descenso de la amplitud de la espiga, respectivamente. Por lo tanto, podríamos asumir que las variaciones encontradas en nuestro estudio no son debidas a diferentes niveles en el contenido cuantal de catecolaminas, puesto que a lo largo del desarrollo de los ratones 3xTg-AD no observamos diferencias en la  $I_{max}$  de las espigas, ni al estimular con ACh (Figura 16A), ni al estimular con alto  $K^+$  (Figura 19A).

Por otra parte, se podría descartar también una alteración en la síntesis de catecolaminas a medida que se desarrolla la enfermedad, ya que ha sido descrito que apenas hay variaciones en la cantidad de tirosina hidroxilasa (enzima limitante en la síntesis de catecolaminas) en distintas regiones del cerebro de ratones 3xTg-AD a los 18 meses de edad en comparación con sus controles (Romano et al., 2014). De entre todas las regiones cerebrales estudiadas (en las que se encontraban corteza prefrontal e hipocampo) sólo encontraron un pequeño descenso en la cantidad de tirosina hidroxilasa en el putamen.

A la mayor rapidez en la liberación del neurotransmisor podría estar contribuyendo la estabilización inicial del poro de fusión (identificado en nuestros registros por el “pie de espiga”) en los animales más viejos, ya que la duración del poro de fusión que se forma previo a la expansión del mismo y liberación del contenido vesicular es menor en estos animales (Figuras 21C y 22C), lo que hace que la liberación de neurotransmisor durante el mismo (al igual que ocurría en la espiga propiamente dicha) también sea menor (Figuras 21D y 22D).

A pesar de que la ACh y el  $K^+$  han dado resultados similares en cuanto a la cantidad y en cuanto a la cinética de liberación del neurotransmisor, algunas diferencias entre ambos estímulos son patentes. Entre estas cabe destacar:

- El aumento en el número de espigas es significativo tan solo en los ratones de más de 12 meses en el caso de estimular las células con ACh, mientras que si la estimulación se produce con alto  $K^+$  este incremento significativo se observa ya a partir de los 6 meses de edad.
- La disminución en el contenido cuantal se pone de manifiesto de manera estadísticamente significativa en los ratones de más de 12 meses cuando se estimulan las

células con ACh, apareciendo estas diferencias significativas ya en ratones de 6 meses en el caso de la estimulación con alto  $K^+$ .

- La estimulación de las células con alto  $K^+$  produce un aumento en la velocidad de crecimiento de la espiga (lo que contribuye a una liberación más rápida) a medida que la edad del ratón avanza, cosa que no ocurre cuando las células son estimuladas con ACh.
- La estabilización del poro de fusión (menor  $T_{pie}$ ) es más notoria en el caso de utilizar el alto  $K^+$  como estímulo secretagogo, en comparación con la obtenida en respuesta a la estimulación con ACh.

Como ya se ha mencionado, los patrones de  $[Ca^{2+}]_c$  que producen ambos estímulos son distintos, produciéndose un aumento más pronunciado y general (por todo el citosol) en el caso del alto  $K^+$  (Cuchillo-Ibáñez et al., 2002). Esto influye en una detección y manejo del  $Ca^{2+}$  diferente por parte de la maquinaria intracelular encargada del tamponamiento de este ion dependiendo del estímulo que se use. Así, cuando se estimulan las células con alto  $K^+$  se estarían produciendo señales más robustas que acelerarían la aparición de los cambios observados. Una posibilidad (comentada más adelante), radica en que a medida que la enfermedad avanza (y todavía en ausencia de síntomas) las células se encuentren en un estado o situación vulnerable, de manera que son capaces de responder de manera adecuada y mantener las funciones fisiológicas de un modo normal, hasta que se produce algún daño o estrés (como pondría representar los largos pulsos de estimulación con alto  $K^+$ ) que desencadene toda una ruta de cascadas patológicas.

El proceso de exocitosis depende marcadamente del  $Ca^{2+}$ , y la disfunción sináptica ha sido correlacionada con una desregulación en la homeostasis este ion (Green et al., 2007). El estudio de todos estos elementos ha sido vasto, con una hipótesis actualmente centrada en un exceso aparente de afluencia de  $Ca^{2+}$  a través de CCDVs. Cambios a nivel sistémico en el calcio acompañan casi todo el proceso de la patología cerebral que se observa en la EA, incluyendo la disfunción sináptica, la disfunción mitocondrial, la producción de  $A\beta$  y la hiperfosforilación de tau. Así por ejemplo, se ha visto que el péptido  $A\beta$  es capaz de producir un aumento en el flujo de  $Ca^{2+}$  a la célula mediante la formación de poros en la membrana, actuando directamente sobre CCDVs y sobre NMDARs, entre otros (Yu et al., 2009). Parece ser, además, que el aumento intracelular de este ion se produce a través de los CCDVs del subtipo L. El tratamiento de neuronas de hipocampo con  $A\beta_{25-35}$

produjo un incremento de la  $I_{Ca}$  a través de los CCDVs del subtipo L de 2 veces (Ueda et al., 1997). De forma similar, la expresión de la proteína precursora amiloide humana (hAPP) en neuronas corticales de rata produce un aumento de la corriente a través de este mismo subtipo de canal (Santos et al., 2009).

En el presente estudio se ha observado un significativo incremento (cerca del doble) en las corrientes de  $Ca^{2+}$  cuando las células cromafines procedentes de ratones 3xTg-AD seniles (de 6 y de más de 12 meses) son estimuladas con pulsos despolarizantes (Figura 26). Con los datos obtenidos en el presente trabajo no podemos diferenciar entre distintos subtipos de CCDVs, pero sí podemos concluir que se produce un aumento de flujo de corriente a través de ellos. Además, otros estudios realizados en estos mismos ratones (3xTg-AD) sugieren la existencia de un aumento en la expresión de receptores de rianodina, por lo que el retículo endoplásmico también podría estar contribuyendo en el aumento de  $Ca^{2+}$  observado en este modelo de EA (Smith et al., 2005, Chakroborty et al., 2012a). De esta manera, el aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular podría ser el responsable o estar colaborando con la elevación en el número de vesículas liberadas.

Además de un aumento en las corrientes de  $Ca^{2+}$ , debemos destacar también que los resultados del presente trabajo revelan un incremento en las corrientes de sodio (Figura 25) y en las corrientes de potasio (tanto  $Ca^{2+}$  como voltaje-dependientes) (Figura 27) en los ratones de más de 12 meses de edad. La respuesta que una determinada célula ofrece ante un estímulo depende del tipo, número y distribución de los canales iónicos presentes en la membrana plasmática, de modo que las propiedades de estos canales determinarán la respuesta celular.

A la luz de los cambios en las corrientes iónicas encontrados nos propusimos examinar el  $V_m$  celular, tanto en condiciones de reposo como en respuesta a un estímulo (ACh 100  $\mu$ M durante 1 min). A pesar de que no se encontraron grandes diferencias en el  $V_m$  en reposo, es posible apreciar una ligera hiperpolarización en las células cromafines de los ratones viejos (más de 12 meses) (Figura 28B). Sin embargo, la despolarización que se produce al perfundir ACh fue mayor en esas células que la que sucede en ratones más jóvenes (Figura 28C). Una explicación factible a este hecho es la presencia de canales iónicos inactivos al potencial de membrana de reposo ( $\sim -60$  mV) encontrado en los ratones de 2 y 6 meses, pero que se reactivan a potenciales más hiperpolarizados ( $\sim -70$  mV) encontrados en los ratones de más de 12 meses. Así, en estos ratones habría un mayor número de

canales disponibles y susceptibles a ser estimulados, y por lo tanto que estarían contribuyendo a la entrada de corriente de sodio en la célula y a una mayor despolarización de la misma. Asimismo, esta mayor despolarización que experimentan las CCs procedentes de ratones de más de 12 meses al ser estimuladas con ACh podría contribuir al mayor número de vesículas liberadas observado en estos ratones.

Alteraciones en la excitabilidad intrínseca de las células podrían tener efectos importantes sobre la generación de PAs. De hecho, aunque sin significancia estadística (debido a la amplia variabilidad en la respuesta celular), hemos observado un aumento en la frecuencia de disparo de PAs de forma espontánea una vez instaurada la enfermedad en los ratones 3xTg-AD (Figuras 28A y 29A). Además, estos PA son de mayor amplitud y presentan una velocidad de ascenso mayor (Figuras 31A y 31D). Como ya se ha mencionado, la rápida fase inicial de un PA depende de la  $I_{Na}$ , de manera que estos cambios en la cinética de los PAs podrían depender del aumento en la corriente de  $Na^+$  observado en este trabajo mediante la técnica de “patch clamp”. Por otro lado, la fase de repolarización y post-hiperpolarización (PHP) de un PA dependen de la  $I_K$ , en especial de la  $I_{K(Ca)}$ . Una vez más, aunque sin diferencias estadísticamente significativas hemos observado un aumento en la amplitud y anchura de la fase de post-hiperpolarización en los ratones de más de 12 meses de edad (Figura 32), que podrían estar relacionados con el aumento en las corrientes de  $K^+$  observado en el presente estudio. Asimismo, este aumento en amplitud y duración de la PHP podría estar facilitando disparos de PAs posteriores debido a la eliminación de la inactivación de los canales de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ , dando lugar al aumento en el número de PA observado. Al contrario de lo que ocurre en situación basal, durante el período de estimulación con ACh (100  $\mu$ M, durante 1 min) se observa un incremento en el disparo de PAs en los ratones presintomáticos de 2 meses de edad (Figuras 28A y 29B).

En relación a esta mayor frecuencia de disparo de PAs, Z. Zhou y S. Misler describieron la existencia de al menos 2 modos de secreción de catecolaminas por parte de las células cromafines, uno dependiente de PAs y otro no relacionado con la generación de PAs (Zhou and Misler, 1995). En este trabajo pusieron de manifiesto una profunda relación entre la frecuencia de PAs y la secreción de catecolaminas, de modo que cuanto mayor es la frecuencia de disparos de PAs por parte de las CCs, mayor es la liberación de catecolaminas al torrente circulatorio. Pero, además, por otra parte observaron la capacidad que tiene un transmisor excitatorio (carbamilcolina en este caso) de evocar la secreción en ausencia de despolarización celular o actividad eléctrica. Así, es probable que la respuesta

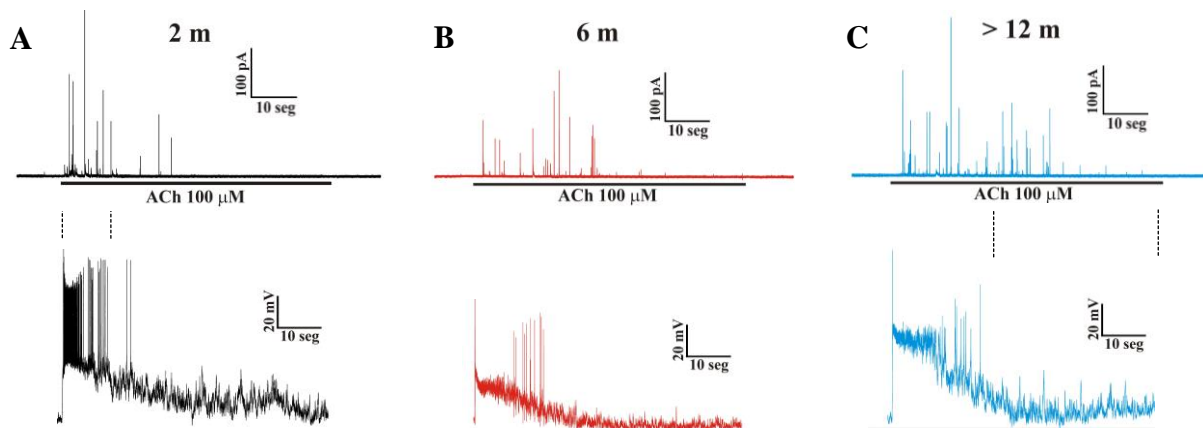
secretora transitoria (temporalmente relacionada con la despolarización y generación de PAs) se deba, en gran medida, a la activación de nAChRs, despolarización celular y apertura de CCDVs. Mientras que una secreción de catecolaminas más sostenida en el tiempo, y que ocurre con una despolarización mínima o en ausencia de la misma, debido a una desensibilización de los nAChRs, podría deberse a la activación de receptores muscarínicos, cascadas de segundos mensajeros y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de depósitos intracelulares (Zhou and Mislser, 1995).

Con todo ello, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente estudio, la posibilidad reside en una participación patente e importante de los PAs en la respuesta secretora al inicio de la estimulación con ACh (notorio en ratones de edad temprana, cuando todavía no se encuentran cognitivamente afectados). Sin embargo, a medida que el ratón envejece y comienza a presentar deterioro cognitivo, la generación de PAs ante un estímulo no es tan efectiva y toman protagonismo otros mecanismos implicados en la liberación de neurotransmisores, como puede ser una mayor liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de depósitos intracelulares. A este respecto, otros grupos han descrito una mayor liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE en el ratón 3xTg-AD, debido a un aumento en la expresión de receptores de rianodina (Smith et al., 2005, Chakroborty et al., 2012a). Esto podría explicar la menor liberación de vesículas en los ratones de 2 meses de edad, liberación que se produce aproximadamente en los 10 primeros segundos de estimulación (coincidiendo con la despolarización y generación de PAs en estas células durante la perfusión con ACh) (Figura 35A). Mientras que en los ratones de más de 12 meses de edad, a esta primera fase de secreción (ya aumentada con respecto a los ratones más jóvenes; nótese el aumento en el número de espigas acumuladas a los 10 seg. en la figura 15B, y probablemente debido al mayor salto despolarizante que produce la ACh en estas células (Figura 28C)) le sigue una patente liberación de vesículas a lo largo del minuto de estimulación que, como se ha comentado podría ser consecuencia de una mayor eficacia en la secreción en ausencia de despolarización celular o actividad eléctrica (Figura 35C).

A la edad de 6 meses podría estar produciéndose una transición entre las respuestas fisiológicas normales y las patológicas, lo que hace que a lo largo del estudio algunos de los parámetros estudiados coincidiesen con los de los ratones de 2 meses (nº de espigas acumuladas y carga de espiga única al estimular con ACh, corriente de  $\text{Na}^+$ , salto de despolarización en el  $V_m$  producido por la ACh...) y otros con los de los ratones de más de 12



meses de edad (nº de espigas acumuladas y carga de espiga única al estimular con alto  $K^+$ , corrientes de  $Ca^{2+}$ , frecuencia de disparo de PAs...) (Figura 35B).



**Figura 35. Respuesta excitotónica y cambios en el  $V_m$  y disparo de PAs en CCs de ratón 3xTg-AD en respuesta a ACh (100  $\mu$ M).** La liberación de catecolaminas en CCs de ratón de distintas edades (2, 6 y más de 12 meses) estimuladas con ACh durante 1 min fue registrada mediante amperometría en célula única, mientras que los cambios en el  $V_m$  se llevó a cabo mediante la técnica de patch clamp, en su configuración de fijación de corriente (inyección de corriente de 0 pA). **A**, registro amperométrico (panel superior) y de  $V_m$  (panel inferior) representativos correspondientes a CCs de ratón de 2 meses de edad. Nótese como la liberación de catecolaminas correlaciona con la despolarización de la membrana y disparo de PAs (zona delimitada con las líneas de puntos). **B**, registro amperométrico (panel superior) y de  $V_m$  (panel inferior) representativos correspondientes a CCs de ratón de 6 meses de edad. **C**, registro amperométrico (panel superior) y de  $V_m$  (panel inferior) representativos correspondientes a CCs de ratón de más de 12 meses de edad. Nótese como la liberación de catecolaminas correlaciona al principio con la despolarización de la membrana, aunque después continúa produciéndose la secreción de vesículas en ausencia de despolarización celular (zona delimitada con las líneas de puntos).

Aunque la etiología precisa de la EA no se conoce en detalle, lo que sí sabemos es que el mayor factor de riesgo para su aparición es la edad. El envejecimiento trae consigo una progresiva desaceleración de las funciones del cerebro; se reduce la capacidad para formar nuevos recuerdos, las funciones motoras se deterioran, incluso las funciones homeostáticas del cerebro se hacen cada vez menos robustas. De esta manera, en el ratón 3xTg-AD, a pesar de poseer las mutaciones que en principio van a originar la patología cognitiva desde el nacimiento, la enfermedad no se pone de manifiesto hasta los 6 meses de edad. Hemos visto que, a esta edad, se encuentran afectados algunos de los parámetros alterados a los 12 meses, sin embargo otros no. La hipótesis aquí sugerida plantea la posi-

bilidad de la aparición de mecanismos compensatorios entre la edad de 2 y 6 meses, que estarían ocultando los déficits tempranos que aparecen en esta enfermedad, y estarían manteniendo un fenotipo fisiológico normal.

Sin embargo, el mantenimiento de la homeostasis sináptica podría comprometer la función celular a largo plazo. En este sentido, S. Chakroborty y colaboradores describieron uno de estos mecanismos. A lo largo de varios trabajos observaron destacadas alteraciones en los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE en el ratón 3xTg-AD, antes de la aparición de las marcas histopatológicas de la enfermedad o del déficit cognitivo. Entre ellas, encontraron una disminución en el umbral que induce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE a través de los receptores de rianodina durante la transmisión sináptica basal, una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  evocada por rianodina exagerada y la alteración de la plasticidad sináptica al bloquear los receptores de rianodina (Chakroborty et al., 2009, Goussakov et al., 2010, Goussakov et al., 2011). Más recientemente, en el año 2012, demostraron que el aumento en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  producido a través de los receptores de rianodina estaba “normalizando” el sistema de transmisión sináptica (que se encuentra trabajando bajo un estado homeostático alterado, que no está presente en los ratones controles). En este proceso, descubrieron mecanismos de señalización compensatorios reclutados en estadios tempranos de la enfermedad y que contrarrestan la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  alterada, a saber, un aumento en la liberación de vesículas espontáneo, una alteración en la probabilidad de la liberación de vesículas, y un incremento en la actividad de los canales de  $\text{K}^+$  SK postsinápticos (los canales SK son una subfamilia de canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$ ; de sus siglas en inglés: small conductance calcium-activated potassium channels) (Chakroborty et al., 2012b).

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se ha observado un aumento en la liberación de vesículas en respuesta a un estímulo, a lo largo del desarrollo de la vida en el ratón 3xTg-AD (Figuras 15, 18, 28 y 29), observándose de una manera más acentuada cuando el estímulo fisiológico ACh era sustituido por altas concentraciones de  $\text{K}^+$  (lo que produce un mayor estrés y alteración que la estimulación con ACh).

En el año 2010, K. Herrup propuso un nuevo modelo implicado en el desarrollo de la EA con el factor edad en el centro de su teoría (Herrup, 2010). Este nuevo modelo propone que para que un individuo pase de una función cognitiva normal apropiada a su edad, a una condición donde aparecen la totalidad de los síntomas clínicos asociados a la EA, han de producirse 3 pasos clave: (1) una lesión o daño que comience el proceso, (2) una

respuesta inflamatoria crónica, y (3) un cambio de estado celular, que involucra a la mayoría (si no todos) los tipos celulares presentes en el cerebro. Las lesiones o daños originarios del proceso pueden ser muy variados, desde un traumatismo craneal, una enfermedad o infección grave, un evento vascular (posiblemente tan pequeño como para ser clínicamente indetectable), estrés metabólico o asociado a un evento traumático (como puede ser la muerte de un familiar), incluso una mutación genética podría constituir ese daño. Este daño desencadena una respuesta celular de protección, sin embargo, los mecanismos homeostáticos alterados por la edad hace que la respuesta continúe, incluso después de que el daño haya cesado. De modo que es la respuesta, y no la naturaleza del daño, lo que estaría dando lugar al desarrollo de la enfermedad. Se produce entonces un estado de respuesta inmune e inflamación crónica, que perdura durante meses e incluso años. Como ya se expuso en la Introducción la neuroinflamación es una característica importante presente en los cerebros de pacientes con EA, habiéndose encontrado por ejemplo, niveles elevados de citoquinas, tales como IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$  (Akiyama et al., 2000). Estos hechos crean un ambiente químico y celular distinto que dan lugar a un cambio en el estado celular. Este dramático cambio de estado tiene como resultado una “nueva normalidad” biológica, dirigida hacia la neurodegeneración y aparición de la demencia (Herrup, 2010).

Este nuevo modelo incorpora también la principal marca histopatológica de la enfermedad, el A $\beta$ . Este péptido se acumula de manera natural en el exterior de las células, y esto da lugar a una estimulación del sistema inmunitario, cuya respuesta favorece la formación de A $\beta$ . Hay que tener en cuenta que el estrecho vínculo propuesto entre la inflamación crónica y los depósitos de A $\beta$  ofrece una vía por la cual los genes implicados en la EA familiar podrían dar lugar a la aparición de la enfermedad. Acelerando la aparición de depósitos de A $\beta$ , estas mutaciones (por ejemplo, mutaciones en APP o PSEN 1 y 2) estarían incrementando la inflamación y, por tanto, el ciclo de deposición de A $\beta$  se produciría antes y de una manera más acusada de lo normal (Herrup, 2010). Esto no implica que en todos los casos de aparición de demencia, el desencadenante de la misma sea el péptido beta amiloide.

Si recordamos, en nuestra hipótesis de partida sugerimos que la célula cromafín podría estar sufriendo algunos de los cambios fisiopatológicos relacionados con los déficits sinápticos que tienen lugar en el SNC de pacientes con enfermedades neurodegenerativas. Pudiendo ser estos cambios primarios, y relacionados directamente con las marcas histopa-

tológicas de la enfermedad y/o secundarios, debidos a la afectación del sistema nervioso periférico. A pesar, de que en el presente trabajo no se ha explorado la presencia de placas amiloides en la médula adrenal de los ratones 3xTg-AD, en el trabajo anterior del grupo en el que se usó el modelo murino APP/PS1, el péptido A $\beta$  no fue detectado en las médulas adrenales ni con tioflavina (empleada para la visualización y cuantificación de agregados de proteínas mal plegadas, ricas en estructuras láminas  $\beta$ , como es el caso de las placas de  $\beta$  amiloide) ni con anticuerpos anti-A $\beta$  (de Diego et al., 2012), lo que sugiere que en nuestro modelo 3xTg-AD tampoco estarán presentes. Además, las 3 mutaciones introducidas en nuestro modelo de trabajo se encuentran bajo el control transcripcional del casete de expresión Thy1.2, el cual dirige la expresión predominantemente, si no exclusivamente, al SNC, restringiendo particularmente la expresión a las neuronas (Caroni, 1997). Así, parece que las alteraciones en cuanto a la excitabilidad celular, corrientes iónicas y liberación de neurotransmisor aquí encontradas no estarían directamente vinculadas a la típica patología A $\beta$ .

Aunque, como se ha discutido en el párrafo anterior la producción excesiva de A $\beta$  (que sí que se produce en el modelo 3xTg-AD, predominantemente en el cerebro) da lugar a una situación de inflamación crónica y cambios en los estados celulares (no exclusivamente en neuronas) que sí que podrían ponerse de manifiesto en la célula cromafín. De hecho, varias son las similitudes encontradas en las alteraciones que se producen en este tipo celular y las neuronas. Entre ellas, la privación de NGF causa una sobreproducción de A $\beta$  tanto en neuronas de hipocampo como en células PC12 (Matrone et al., 2008, Matrone et al., 2009). De igual manera, la perfusión de A $\beta_{1-42}$  sobre neuronas CA1 del hipocampo dio lugar a un incremento en la frecuencia de disparo de PAs, debido a un aumento en la corriente de Na<sup>+</sup> (Ren et al., 2014), algo muy similar a lo encontrado en el presente trabajo en las células cromafines.

En esta línea, varios son los trabajos que describen una hiperexcitabilidad neuronal en relación con la EA. Así, se ha encontrado una hiperexcitabilidad en neuronas corticales en el modelo de Alzheimer APP23 x PS45 (Busche and Konnerth, 2016), así como en el modelo Tg2576 (Busche et al., 2015). Incrementos relativamente pequeños (1,5 veces) en la producción de A $\beta$  endógeno produce una elevación en la probabilidad de liberación vesicular, así como un aumento en la actividad en neuronas en cultivo (Palop and Mucke, 2010). También se ha encontrado hiperexcitabilidad en el giro dentado del hipocampo (Hazra et al., 2013), así como un acrecentamiento en la liberación espontánea de vesículas

y actividad de los canales de potasio SK en rodajas de hipocampo (Chakroborty et al., 2012b). Publicaciones similares demuestran que este exceso de actividad se puede producir también en células gliales. Se han encontrado así astrocitos hiperactivos en el modelo murino de EA APP/PS1 (Kuchibhotla et al., 2009, Delekate et al., 2014), así como en la microglía, en este caso empleando los modelos APP/PS1 y APP23 x PS45 (Brawek et al., 2014). Todos estos estudios, junto con los datos presentados en esta Tesis Doctoral, sugieren un cambio fundamental en el modo de entendimiento que hasta ahora se tenía de la EA. Así, la visión clásica de que el daño estructural por las placas de  $\beta$  amiloide, junto con una pérdida neuronal eran las responsables del deterioro cognitivo presente en la EA, a través de una actividad neuronal reducida, parecen estar en confrontación con los hallazgos recientemente comentados, donde el exceso de actividad celular podría ser una característica clave en la enfermedad.

También ha sido muy estudiada la pérdida de neuronas colinérgicas en la patogénesis de la EA, lo que permitió formular la hipótesis colinérgica de la enfermedad de Alzheimer (comentada en la Introducción). Así, son muchos los trabajos que describen una reducción de los nAChRs en cerebros de pacientes con EA; se ha observado por ejemplo una reducción en la expresión de varias subunidades, principalmente de la subunidad  $\alpha 4$ , pero también de  $\alpha 3$  y de  $\alpha 7$  en la corteza e hipocampo de pacientes con esta enfermedad en comparación con controles sanos (Wevers et al., 1999, Banerjee et al., 2000, Burghaus et al., 2000, Guan et al., 2000). Además, se ha encontrado que el péptido A $\beta$  es capaz de suprimir la expresión de nAChRs (en términos de unión a ligando, y niveles de proteína y ARNm) en células PC12 (Guan et al., 2001, Guan et al., 2003). Sin embargo, más recientemente se ha observado un aumento (en lugar de una reducción) en algunos de estos receptores en células gliales. La incubación de concentraciones nanomolares (pero no micromolares) de A $\beta$  produjo un aumento en los niveles de  $\alpha 7$ ,  $\alpha 4$  y  $\beta 2$  en cultivos primarios de astrocitos de rata a nivel de ARNm y proteína (Xiu et al., 2005). De una manera similar se ha observado un aumento de nAChR $\alpha 7$  en astrocitos presentes en el hipocampo y corteza temporal de pacientes portadores de la mutación sueca en la proteína precursora amiloide (APP<sub>Swe</sub>), así como en pacientes con EA esporádica (Yu et al., 2005). En el modelo transgénico de enfermedad de Alzheimer APdE9 (se trata de un ratón que porta la mutación APP<sub>Swe</sub> y una delección del exón 9 en la proteína humana presenilina 1) encontraron un aumento en la expresión de nAChR $\alpha 7$  en la microglía de los ratones de 6 meses de edad (que no aparecía a los 3 meses), y que fue progresivamente disminuyendo con el tiempo

(medido hasta los 18 meses de edad). Los autores atribuyen esta disminución gradual en el porcentaje de nAChR $\alpha$ 7 a una disfunción en la microglía provocada por el aumento progresivo de los depósitos de A $\beta$  en este modelo (Matsumura et al., 2015). Ya ha sido sugerido que el aumento en la expresión de nAChRs (sobre todo nAChR $\alpha$ 7) podría contribuir en la modulación de la excitabilidad celular (Shen and Wu, 2015).

En el modelo transgénico aquí empleado, hemos observado un incremento en la cantidad de la subunidad  $\alpha$ 3 de los nAChRs en el hipocampo de los ratones de 6 y de más de 12 meses de edad (Figura 33H), lo que podría estar contribuyendo con la hiperexcitabilidad celular encontrada en estos ratones (a nivel de SNC, ya que en médula adrenal no observamos diferencias significativas en la expresión de la subunidad  $\alpha$ 3 posiblemente debido al bajo número de datos disponibles), que sí que hemos podido medir funcionalmente mediante la técnica de patch clamp en las células cromafines a las distintas edades estudiadas, encontrando un incremento considerable en la corriente nicotínica evocada por ACh en los ratones de 6 meses de edad en comparación con los ratones presintomáticos de 2 meses de edad, corriente que vuelve a adquirir estos valores presintomáticos cuando el ratón supera el año de vida (Figura 24). La explicación a este hecho no puede inferirse de los resultados de western blot (Figura 33H), debido a la escasa disponibilidad de médulas adrenales de ratones envejecidos. Además de cambios en el nivel de expresión de los receptores nicotínicos, variaciones en la desensibilización y/o función de estos receptores a medida que progresa la enfermedad podría también dar una explicación al perfil de  $I_{ACh}$  que presentan estos ratones a lo largo de su vida.



“Sucedre con frecuencia que llega uno a encontrar una idea que buscaba, llega a darle forma, es decir a obtenerla, sacándola de la nebulosa de percepciones oscuras a que representa, gracias a los esfuerzos que hace para presentarla a los demás”

Miguel de Unamuno. Ensayista, novelista, poeta, dramaturgo y filósofo español (1864-1936)

---

## **VI. CONCLUSIONES**





El objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar las posibles alteraciones en la neurotransmisión presentes en el modelo murino de enfermedad de Alzheimer 3xTg-AD, así como analizar los posibles mecanismos implicados en dichas alteraciones. Las principales conclusiones que podemos extraer a partir de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral, así como de su análisis y discusión son:

- 1.- Tras una estimulación con ACh o alto  $K^+$ , se produce un aumento en el número de vesículas liberadas a medida que se instaura la enfermedad en los ratones 3xTg-AD.
- 2.- La exocitosis de neurotransmisor tiene lugar de una manera más rápida y con una liberación de menor contenido cuantal por vesícula liberada en los ratones que presentan la enfermedad (de 6 y de más de 12 meses de edad) en comparación con los ratones de edades presintomáticas (2 meses).
- 3.- Se han observado cambios en las corrientes iónicas que dan lugar a la liberación de catecolaminas en las células cromafines a lo largo del desarrollo de los ratones 3xTg-AD. Así, se produce un aumento en  $I_{ACh}$  en los ratones de 6 meses de edad, que disminuye hasta los niveles presentados a los 2 meses cuando el ratón supera el año de vida, momento en el que presenta un aumento en el resto de corrientes iónicas implicadas, esto es en  $I_{Na}$ ,  $I_{Ca}$ ,  $I_{K(Ca)}$  e  $I_{K(V)}$ .
- 4.- El potencial de membrana celular en reposo se encuentra ligeramente hiperpolarizado en las células cromafines de los ratones de más de 12 meses de edad, produciéndose una despolarización mayor en estas células frente a un estímulo con ACh.
- 5.- En etapas avanzadas (más de 12 meses) las células cromafines disparan potenciales de acción de mayor amplitud y con una velocidad de ascenso mayor.
- 6.- Las variaciones en el número y en la cinética de liberación de las vesículas secretoras no pueden atribuirse a diferencias en la expresión en las proteínas del complejo SNARE (SNAP-25, syntaxina 1, VAMP2), ni en el sensor de calcio sinaptotagmina 1, ni en la proteína dinamina 1-2, implicada tanto en procesos de exo- como de endocitosis.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que a lo largo del desarrollo de los ratones 3xTg-AD y a medida que la enfermedad de Alzheimer se instaura y progresa se produce un cambio en la excitabilidad de las células cromafines, lo cual hace que se acelere la neurotransmisión. Estas alteraciones podrían tener una repercusión en la respuesta que ofrece el organismo ante situaciones de estrés. Finalmente, si estas alteraciones ocurren también a nivel de sistema nervioso central, la célula cromafín adrenomedular podría constituir un nuevo enfoque y abordaje para el estudio de esta compleja enfermedad.

“El que no sabe nada no duda de nada”

George Herbert. Poeta, orador y sacerdote inglés (1593-1633)

---

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 21:383-421.
- Alzheimer A, Förstl H, Levi R (1991) On certain peculiar diseases of old age. *History of psychiatry* 2:71-101.
- Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR (1995) An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clinical anatomy* 8:429-431.
- Amatore C, Arbault S, Bouret Y, Guille M, Lemaitre F, Verchier Y (2009) Invariance of exocytotic events detected by amperometry as a function of the carbon fiber microelectrode diameter. *Analytical chemistry* 81:3087-3093.
- Amatore C, Delacotte J, Guille-Collignon M, Lemaitre F (2015) Vesicular exocytosis and microdevices - microelectrode arrays. *The Analyst* 140:3687-3695.
- Arsenault D, Julien C, Tremblay C, Calon F (2011) DHA improves cognition and prevents dysfunction of entorhinal cortex neurons in 3xTg-AD mice. *PLoS one* 6:e17397.
- Artalejo AR, Garcia AG, Neher E (1993) Small-conductance Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels in bovine chromaffin cells. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 423:97-103.
- Artalejo CR, Garcia AG, Aunis D (1987) Chromaffin cell calcium channel kinetics measured isotopically through fast calcium, strontium, and barium fluxes. *The Journal of biological chemistry* 262:915-926.
- Artalejo CR, Henley JR, McNiven MA, Palfrey HC (1995) Rapid endocytosis coupled to exocytosis in adrenal chromaffin cells involves Ca<sup>2+</sup>, GTP, and dynamin but not clathrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:8328-8332.
- Atwood CS, Huang X, Moir RD, Tanzi RE, Bush AI (1999) Role of free radicals and metal ions in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Metal ions in biological systems* 36:309-364.
- Atwood CS, Moir RD, Huang X, Scarpa RC, Bacarra NM, Romano DM, Hartshorn MA, Tanzi RE, Bush AI (1998) Dramatic aggregation of Alzheimer abeta by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *The Journal of biological chemistry* 273:12817-12826.
- Aunis D (1998) Exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *International review of cytology* 181:213-320.
- Aunis D, Langley K (1999) Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta physiologica Scandinavica* 167:89-97.
- Bailey TL, Rivara CB, Rocher AB, Hof PR (2004) The nature and effects of cortical microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Neurological research* 26:573-578.
- Baloyannis SJ (2006) Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 9:119-126.
- Baloyannis SJ, Costa V, Michmizos D (2004) Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias* 19:89-93.
- Banerjee C, Nyengaard JR, Wevers A, de Vos RA, Jansen Steur EN, Lindstrom J, Pilz K, Nowacki S, Bloch W, Schroder H (2000) Cellular expression of alpha7 nicotinic

- acetylcholine receptor protein in the temporal cortex in Alzheimer's and Parkinson's disease--a stereological approach. *Neurobiology of disease* 7:666-672.
- Berridge MJ (2010) Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 459:441-449.
- Bezprozvanny I, Mattson MP (2008) Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends in neurosciences* 31:454-463.
- Biales B, Dichter M, Tischler A (1976) Electrical excitability of cultured adrenal chromaffin cells. *The Journal of physiology* 262:743-753.
- Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM (2005) Intraneuronal Aβ causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 45:675-688.
- Blass JP, Sheu RK, Gibson GE (2000) Inherent abnormalities in energy metabolism in Alzheimer disease. Interaction with cerebrovascular compromise. *Annals of the New York Academy of Sciences* 903:204-221.
- Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Androutsellis-Theotokis A, Eisenhofer G, Vukicevic V, Licinio J, Wong ML, Calissano P, Nistico G, Preziosi P, Levi-Montalcini R (2012) Chromaffin cells: the peripheral brain. *Molecular psychiatry* 17:354-358.
- Bornstein SR, Yoshida-Hiroi M, Sotiriou S, Levine M, Hartwig HG, Nussbaum RL, Eisenhofer G (2003) Impaired adrenal catecholamine system function in mice with deficiency of the ascorbic acid transporter (SVCT2). *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17:1928-1930.
- Bowen DM, Smith CB, White P, Davison AN (1976) Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain : a journal of neurology* 99:459-496.
- Brandt BL, Hagiwara S, Kidokoro Y, Miyazaki S (1976) Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *The Journal of physiology* 263:417-439.
- Brawek B, Schwendele B, Riester K, Kohsaka S, Lerdkrai C, Liang Y, Garaschuk O (2014) Impairment of in vivo calcium signaling in amyloid plaque-associated microglia. *Acta neuropathologica* 127:495-505.
- Bronner-Fraser M (1994) Neural crest cell formation and migration in the developing embryo. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 8:699-706.
- Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM (2009) Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nature reviews Drug discovery* 8:783-793.
- Burghaus L, Schutz U, Krempel U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Wevers A, Lindstrom J, Schroder H (2000) Quantitative assessment of nicotinic acetylcholine receptor proteins in the cerebral cortex of Alzheimer patients. *Brain research Molecular brain research* 76:385-388.
- Burns A, Iliffe S (2009) Alzheimer's disease. *Bmj* 338:b158.
- Busche MA, Grienberger C, Keskin AD, Song B, Neumann U, Staufenbiel M, Forstl H, Konnerth A (2015) Decreased amyloid-beta and increased neuronal hyperactivity by immunotherapy in Alzheimer's models. *Nature neuroscience* 18:1725-1727.
- Busche MA, Konnerth A (2016) Impairments of neural circuit function in Alzheimer's disease. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 371.
- Cajal SR (1914) *Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nerviosa*: Imprenta de Hijos de Nicolás Moya.

- Calvo-Gallardo E, de Pascual R, Fernandez-Morales JC, Arranz-Tagarro JA, Maroto M, Nancrales C, Gandia L, de Diego AM, Padin JF, Garcia AG (2015) Depressed excitability and ion currents linked to slow exocytotic fusion pore in chromaffin cells of the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *American journal of physiology Cell physiology* 308:C1-19.
- Caroni P (1997) Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *Journal of neuroscience methods* 71:3-9.
- Cassano T, Serviddio G, Gaetani S, Romano A, Dipasquale P, Cianci S, Bellanti F, Laconca L, Romano AD, Padalino I, LaFerla FM, Nicoletti F, Cuomo V, Vendemiale G (2012) Glutamatergic alterations and mitochondrial impairment in a murine model of Alzheimer disease. *Neurobiology of aging* 33:1121 e1121-1112.
- Cena V, Nicolas GP, Sanchez-Garcia P, Kirpekar SM, Garcia AG (1983) Pharmacological dissection of receptor-associated and voltage-sensitive ionic channels involved in catecholamine release. *Neuroscience* 10:1455-1462.
- Colliver TL, Hess EJ, Ewing AG (2001) Amperometric analysis of exocytosis at chromaffin cells from genetically distinct mice. *Journal of neuroscience methods* 105:95-103.
- Colliver TL, Hess EJ, Pothos EN, Sulzer D, Ewing AG (2000a) Quantitative and statistical analysis of the shape of amperometric spikes recorded from two populations of cells. *Journal of neurochemistry* 74:1086-1097.
- Colliver TL, Pyott SJ, Achalabun M, Ewing AG (2000b) VMAT-Mediated changes in quantal size and vesicular volume. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:5276-5282.
- Copani A, Koh JY, Cotman CW (1991) Beta-amyloid increases neuronal susceptibility to injury by glucose deprivation. *Neuroreport* 2:763-765.
- Coupland RE (1965) *The natural history of the chromaffin cell*. London: Longmans.
- Criado M, Alamo L, Navarro A (1992) Primary structure of an agonist binding subunit of the nicotinic acetylcholine receptor from bovine adrenal chromaffin cells. *Neurochemical research* 17:281-287.
- Crowther RA (1990) Structural aspects of pathology in Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta* 1096:1-9.
- Cuchillo-Ibáñez I, Olivares R, Aldea M, Villarroya M, Arroyo G, Fuentealba J, García AG, Albillos A (2002) Acetylcholine and potassium elicit different patterns of exocytosis in chromaffin cells when the intracellular calcium handling is disturbed. *Pflügers Archiv* 444:133-142.
- Chakroborty S, Briggs C, Miller MB, Goussakov I, Schneider C, Kim J, Wicks J, Richardson JC, Conklin V, Cameransi BG, Stutzmann GE (2012a) Stabilizing ER Ca<sup>2+</sup> channel function as an early preventative strategy for Alzheimer's disease. *PloS one* 7:e52056.
- Chakroborty S, Goussakov I, Miller MB, Stutzmann GE (2009) Deviant ryanodine receptor-mediated calcium release resets synaptic homeostasis in presymptomatic 3xTg-AD mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:9458-9470.
- Chakroborty S, Kim J, Schneider C, Jacobson C, Molgo J, Stutzmann GE (2012b) Early presynaptic and postsynaptic calcium signaling abnormalities mask underlying synaptic depression in presymptomatic Alzheimer's disease mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:8341-8353.
- Chan SA, Doreian B, Smith C (2010) Dynamin and myosin regulate differential exocytosis from mouse adrenal chromaffin cells. *Cellular and molecular neurobiology* 30:1351-1357.



- Cheung NK, Dyer MA (2013) Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nature reviews Cancer* 13:397-411.
- Davies CA, Mann DM, Sumpter PQ, Yates PO (1987) A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *Journal of the neurological sciences* 78:151-164.
- Davies P, Maloney AJ (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2:1403.
- de Diego AM, Gandia L, Garcia AG (2008) A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta physiologica* 192:287-301.
- de Diego AM, Lorrio S, Calvo-Gallardo E, Garcia AG (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* 428:482-486.
- De Matteis MA, Luini A (2008) Exiting the Golgi complex. *Nature reviews Molecular cell biology* 9:273-284.
- de Wit H (2010) Morphological docking of secretory vesicles. *Histochemistry and cell biology* 134:103-113.
- DeKosky ST, Scheff SW (1990) Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Annals of neurology* 27:457-464.
- Delekate A, Fuchtemeier M, Schumacher T, Ulbrich C, Foddis M, Petzold GC (2014) Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model. *Nature communications* 5:5422.
- Deshpande A, Kawai H, Metherate R, Glabe CG, Busciglio J (2009) A role for synaptic zinc in activity-dependent Abeta oligomer formation and accumulation at excitatory synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:4004-4015.
- Dewar D, McCulloch J (1994) Abnormalities in Non-Cholinergic Neurotransmitter Systems in Alzheimer's Disease. In: *Dementia* (Burns, A. and Levy, R., eds), pp 159-183 Boston, MA: Springer US.
- Douglas WW, Kanno T, Sampson SR (1967) Influence of the ionic environment on the membrane potential of adrenal chromaffin cells and on the depolarizing effect of acetylcholine. *The Journal of physiology* 191:107-121.
- Douglas WW, Rubin RP (1961) The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *The Journal of physiology* 159:40-57.
- Drachman DA, Leavitt J (1974) Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? *Archives of neurology* 30:113-121.
- Erkinjuntti T, Roman G, Gauthier S, Feldman H, Rockwood K (2004) Emerging therapies for vascular dementia and vascular cognitive impairment. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 35:1010-1017.
- Etcheberrigaray R, Hirashima N, Nee L, Prince J, Govoni S, Racchi M, Tanzi RE, Alkon DL (1998) Calcium responses in fibroblasts from asymptomatic members of Alzheimer's disease families. *Neurobiology of disease* 5:37-45.
- Fang Q, Berberian K, Gong LW, Hafez I, Sorensen JB, Lindau M (2008) The role of the C terminus of the SNARE protein SNAP-25 in fusion pore opening and a model for fusion pore mechanics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:15388-15392.
- Farkas E, Luiten PG (2001) Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Progress in neurobiology* 64:575-611.

- Feldberg W, Minz B, Tsudzimura H (1934) The mechanism of the nervous discharge of adrenaline. *The Journal of physiology* 81:286-304.
- Fenwick EM, Marty A, Neher E (1982) Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *The Journal of physiology* 331:599-635.
- Ferreira ST, Klein WL (2011) The Abeta oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiology of learning and memory* 96:529-543.
- Fisher RJ, Pevsner J, Burgoyne RD (2001) Control of fusion pore dynamics during exocytosis by Munc18. *Science* 291:875-878.
- Francis PT, Sims NR, Procter AW, Bowen DM (1993) Cortical pyramidal neurone loss may cause glutamatergic hypoactivity and cognitive impairment in Alzheimer's disease: investigative and therapeutic perspectives. *Journal of neurochemistry* 60:1589-1604.
- Gandia L, Garcia AG, Morad M (1993) ATP modulation of calcium channels in chromaffin cells. *The Journal of physiology* 470:55-72.
- Gandy S (2005) The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *The Journal of clinical investigation* 115:1121-1129.
- Garcia AG, Garcia-De-Diego AM, Gandia L, Borges R, Garcia-Sancho J (2006) Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiological reviews* 86:1093-1131.
- Garcia AG, Sala F, Reig JA, Viniestra S, Frias J, Fonteriz R, Gandia L (1984) Dihydropyridine BAY-K-8644 activates chromaffin cell calcium channels. *Nature* 309:69-71.
- Gazulla J, Cavero-Nagore M (2006) [Glutamate and Alzheimer's disease]. *Revista de neurologia* 42:427-432.
- Geppert M, Goda Y, Hammer RE, Li C, Rosahl TW, Stevens CF, Sudhof TC (1994) Synaptotagmin I: a major Ca<sup>2+</sup> sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 79:717-727.
- Gibson GE, Sheu KF, Blass JP, Baker A, Carlson KC, Harding B, Perrino P (1988) Reduced activities of thiamine-dependent enzymes in the brains and peripheral tissues of patients with Alzheimer's disease. *Archives of neurology* 45:836-840.
- Gimenez-Llort L, Blazquez G, Canete T, Johansson B, Oddo S, Tobena A, LaFerla FM, Fernandez-Teruel A (2007) Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: a role for intraneuronal amyloid. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 31:125-147.
- Goedert M, Spillantini MG (2000) Tau mutations in frontotemporal dementia FTDP-17 and their relevance for Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta* 1502:110-121.
- Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA (1992) Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8:159-168.
- Gorelick PB (2004) Risk factors for vascular dementia and Alzheimer disease. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 35:2620-2622.
- Goussakov I, Chakroborty S, Stutzmann GE (2011) Generation of dendritic Ca<sup>2+</sup> oscillations as a consequence of altered ryanodine receptor function in AD neurons. *Channels* 5:9-13.
- Goussakov I, Miller MB, Stutzmann GE (2010) NMDA-mediated Ca(2+) influx drives aberrant ryanodine receptor activation in dendrites of young Alzheimer's disease mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:12128-12137.

- Greber S, Lubec G, Cairns N, Fountoulakis M (1999) Decreased levels of synaptosomal associated protein 25 in the brain of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease. *Electrophoresis* 20:928-934.
- Green KN, Smith IF, Laferla FM (2007) Role of calcium in the pathogenesis of Alzheimer's disease and transgenic models. *Sub-cellular biochemistry* 45:507-521.
- Guan ZZ, Miao H, Tian JY, Unger C, Nordberg A, Zhang X (2001) Suppressed expression of nicotinic acetylcholine receptors by nanomolar beta-amyloid peptides in PC12 cells. *J Neural Transm (Vienna)* 108:1417-1433.
- Guan ZZ, Yu WF, Shan KR, Nordman T, Olsson J, Nordberg A (2003) Loss of nicotinic receptors induced by beta-amyloid peptides in PC12 cells: possible mechanism involving lipid peroxidation. *Journal of neuroscience research* 71:397-406.
- Guan ZZ, Zhang X, Ravid R, Nordberg A (2000) Decreased protein levels of nicotinic receptor subunits in the hippocampus and temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 74:237-243.
- Guerini FR, Agliardi C, Sironi M, Arosio B, Calabrese E, Zanzottera M, Bolognesi E, Ricci C, Costa AS, Galimberti D, Griffanti L, Bianchi A, Savazzi F, Mari D, Scarpini E, Baglio F, Nemni R, Clerici M (2014) Possible association between SNAP-25 single nucleotide polymorphisms and alterations of categorical fluency and functional MRI parameters in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 42:1015-1028.
- Gulyas-Kovacs A, de Wit H, Milosevic I, Kochubey O, Toonen R, Klingauf J, Verhage M, Sorensen JB (2007) Munc18-1: sequential interactions with the fusion machinery stimulate vesicle docking and priming. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:8676-8686.
- Halagappa VK, Guo Z, Pearson M, Matsuoka Y, Cutler RG, Laferla FM, Mattson MP (2007) Intermittent fasting and caloric restriction ameliorate age-related behavioral deficits in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease* 26:212-220.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 391:85-100.
- Hardy J, Allsop D (1991) Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in pharmacological sciences* 12:383-388.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.
- Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184-185.
- Hazra A, Gu F, Aulakh A, Berridge C, Eriksen JL, Ziburkus J (2013) Inhibitory neuron and hippocampal circuit dysfunction in an aged mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS one* 8:e64318.
- Herrup K (2010) Reimagining Alzheimer's disease--an age-based hypothesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:16755-16762.
- Hodgkin AL, Huxley AF (1939) Action potentials recorded from inside a nerve fibre. *Nature* 144:710-711.
- Holgert H, Aman K, Cozzari C, Hartman BK, Brimijoin S, Emson P, Goldstein M, Hokfelt T (1995) The cholinergic innervation of the adrenal gland and its relation to enkephalin and nitric oxide synthase. *Neuroreport* 6:2576-2580.
- Hoyer S (1996) Oxidative metabolism deficiencies in brains of patients with Alzheimer's disease. *Acta neurologica Scandinavica Supplementum* 165:18-24.

- Huang X, Atwood CS, Hartshorn MA, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, Cuajungco MP, Gray DN, Lim J, Moir RD, Tanzi RE, Bush AI (1999) The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry* 38:7609-7616.
- Huber K, Kalcheim C, Unsicker K (2009) The development of the chromaffin cell lineage from the neural crest. *Autonomic neuroscience : basic & clinical* 151:10-16.
- Hume RI, Role LW, Fischbach GD (1983) Acetylcholine release from growth cones detected with patches of acetylcholine receptor-rich membranes. *Nature* 305:632-634.
- Huxley AF (2002) Hodgkin and the action potential 1935-1952. *The Journal of physiology* 538:2.
- Iadecola C (2004) Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nature reviews Neuroscience* 5:347-360.
- Jahn R, Scheller RH (2006) SNAREs--engines for membrane fusion. *Nature reviews Molecular cell biology* 7:631-643.
- Kalaria RN (2000) The role of cerebral ischemia in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 21:321-330.
- Kawagoe KT, Zimmerman JB, Wightman RM (1993) Principles of voltammetry and microelectrode surface states. *Journal of neuroscience methods* 48:225-240.
- Keating DJ, Dubach D, Zanin MP, Yu Y, Martin K, Zhao YF, Chen C, Porta S, Arbones ML, Mittaz L, Pritchard MA (2008) DSCR1/RCAN1 regulates vesicle exocytosis and fusion pore kinetics: implications for Down syndrome and Alzheimer's disease. *Human molecular genetics* 17:1020-1030.
- Kennedy RT, Oates MD, Cooper BR, Nickerson B, Jorgenson JW (1989) Microcolumn separations and the analysis of single cells. *Science* 246:57-63.
- Khachaturian ZS (1989) Calcium, membranes, aging, and Alzheimer's disease. Introduction and overview. *Annals of the New York Academy of Sciences* 568:1-4.
- Kidokoro Y, Ritchie AK (1980) Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. *The Journal of physiology* 307:199-216.
- Kuchibhotla KV, Lattarulo CR, Hyman BT, Bacskai BJ (2009) Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice. *Science* 323:1211-1215.
- LaFerla FM (2002) Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nature reviews Neuroscience* 3:862-872.
- Larson J, Lynch G, Games D, Seubert P (1999) Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice. *Brain research* 840:23-35.
- Leszczyszyn DJ, Jankowski JA, Viveros OH, Diliberto EJ, Jr., Near JA, Wightman RM (1990) Nicotinic receptor-mediated catecholamine secretion from individual chromaffin cells. Chemical evidence for exocytosis. *The Journal of biological chemistry* 265:14736-14737.
- Leszczyszyn DJ, Jankowski JA, Viveros OH, Diliberto EJ, Jr., Near JA, Wightman RM (1991) Secretion of catecholamines from individual adrenal medullary chromaffin cells. *Journal of neurochemistry* 56:1855-1863.
- Lin MY, Rohan JG, Cai H, Reim K, Ko CP, Chow RH (2013) Complexin facilitates exocytosis and synchronizes vesicle release in two secretory model systems. *The Journal of physiology* 591:2463-2473.
- Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *The New England journal of medicine* 330:613-622.

- Lou X, Fan F, Messa M, Raimondi A, Wu Y, Looger LL, Ferguson SM, De Camilli P (2012) Reduced release probability prevents vesicle depletion and transmission failure at dynamin mutant synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:E515-523.
- Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *Journal of the neurological sciences* 158:47-52.
- Lu L, Shimizu T, Nakamura K, Yokotani K (2008) Brain neuronal/inducible nitric oxide synthases and cyclooxygenase-1 are involved in the bombesin-induced activation of central adrenomedullary outflow in rats. *European journal of pharmacology* 590:177-184.
- Luber-Narod J, Rogers J (1988) Immune system associated antigens expressed by cells of the human central nervous system. *Neuroscience letters* 94:17-22.
- Lustbader JW, Cirilli M, Lin C, Xu HW, Takuma K, Wang N, Caspersen C, Chen X, Pollak S, Chaney M, Trinchese F, Liu S, Gunn-Moore F, Lue LF, Walker DG, Kuppusamy P, Zewier ZL, Arancio O, Stern D, Yan SS, Wu H (2004) ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science* 304:448-452.
- Mackenzie KD, Duffield MD, Peiris H, Phillips L, Zanin MP, Teo EH, Zhou XF, Keating DJ (2014) Huntingtin-associated protein 1 regulates exocytosis, vesicle docking, readily releasable pool size and fusion pore stability in mouse chromaffin cells. *The Journal of physiology* 592:1505-1518.
- Machado DJ, Montesinos MS, Borges R (2008) Good practices in single-cell amperometry. *Methods in molecular biology* 440:297-313.
- Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, Quinn J, Reddy PH (2006) Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Human molecular genetics* 15:1437-1449.
- Mandrekar-Colucci S, Landreth GE (2010) Microglia and inflammation in Alzheimer's disease. *CNS & neurological disorders drug targets* 9:156-167.
- Marklund SL, Adolfsson R, Gottfries CG, Winblad B (1985) Superoxide dismutase isoenzymes in normal brains and in brains from patients with dementia of Alzheimer type. *Journal of the neurological sciences* 67:319-325.
- Martinez-Espinosa PL, Yang C, Gonzalez-Perez V, Xia XM, Lingle CJ (2014) Knockout of the BK beta2 subunit abolishes inactivation of BK currents in mouse adrenal chromaffin cells and results in slow-wave burst activity. *The Journal of general physiology* 144:275-295.
- Martins RN, Harper CG, Stokes GB, Masters CL (1986) Increased cerebral glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in Alzheimer's disease may reflect oxidative stress. *Journal of neurochemistry* 46:1042-1045.
- Marty A (1981) Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature* 291:497-500.
- Marty A, Neher E (1985) Potassium channels in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *The Journal of physiology* 367:117-141.
- Maslah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA, McKeel DW, Jr., Morris JC (2001) Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* 56:127-129.
- Matrone C, Di Luzio A, Meli G, D'Aguzzo S, Severini C, Ciotti MT, Cattaneo A, Calissano P (2008) Activation of the amyloidogenic route by NGF deprivation

- induces apoptotic death in PC12 cells. *Journal of Alzheimer's disease* : JAD 13:81-96.
- Matrone C, Marolda R, Ciafre S, Ciotti MT, Mercanti D, Calissano P (2009) Tyrosine kinase nerve growth factor receptor switches from prosurvival to proapoptotic activity via A $\beta$ -mediated phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:11358-11363.
- Matsumura A, Suzuki S, Iwahara N, Hisahara S, Kawamata J, Suzuki H, Yamauchi A, Takata K, Kitamura Y, Shimohama S (2015) Temporal changes of CD68 and  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor expression in microglia in Alzheimer's disease-like mouse models. *Journal of Alzheimer's disease* : JAD 44:409-423.
- Mosharov EV, Sulzer D (2005) Analysis of exocytotic events recorded by amperometry. *Nature methods* 2:651-658.
- Naslund J, Schierhorn A, Hellman U, Lannfelt L, Roses AD, Tjernberg LO, Silberring J, Gandy SE, Winblad B, Greengard P, et al. (1994) Relative abundance of Alzheimer A  $\beta$  amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:8378-8382.
- Neher E, Marty A (1982) Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79:6712-6716.
- Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, Filip M (2016) Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Molecular neurobiology* 53:4094-4125.
- Nilsson L, Nordberg A, Hardy J, Wester P, Winblad B (1986) Physostigmine restores 3H-acetylcholine efflux from Alzheimer brain slices to normal level. *Journal of neural transmission* 67:275-285.
- Novelli A, Reilly JA, Lysko PG, Henneberry RC (1988) Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain research* 451:205-212.
- Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM (2003a) Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 24:1063-1070.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003b) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction. *Neuron* 39:409-421.
- Olivos L, Artalejo AR (2008) Muscarinic excitation-secretion coupling in chromaffin cells. *Acta physiologica* 192:213-220.
- Olney JW (1986) Inciting excitotoxic cytotoxicity among central neurons. *Advances in experimental medicine and biology* 203:631-645.
- Palop JJ, Mucke L (2010) Amyloid- $\beta$ -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nature neuroscience* 13:812-818.
- Parker WD, Jr., Filley CM, Parks JK (1990) Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurology* 40:1302-1303.
- Paula-Lima AC, Adasme T, SanMartin C, Sebollela A, Hetz C, Carrasco MA, Ferreira ST, Hidalgo C (2011) Amyloid  $\beta$ -peptide oligomers stimulate RyR-mediated Ca<sup>2+</sup> release inducing mitochondrial fragmentation in hippocampal neurons and prevent RyR-mediated dendritic spine remodeling produced by BDNF. *Antioxidants & redox signaling* 14:1209-1223.

- Perlmutter LS, Barron E, Chui HC (1990) Morphologic association between microglia and senile plaque amyloid in Alzheimer's disease. *Neuroscience letters* 119:32-36.
- Perry EK, Gibson PH, Blessed G, Perry RH, Tomlinson BE (1977) Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *Journal of the neurological sciences* 34:247-265.
- Pietro Paolo S, Feldon J, Yee BK (2008) Age-dependent phenotypic characteristics of a triple transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Behavioral neuroscience* 122:733-747.
- Pothos EN, Mosharov E, Liu KP, Setlik W, Haburcak M, Baldini G, Gershon MD, Tamir H, Sulzer D (2002) Stimulation-dependent regulation of the pH, volume and quantal size of bovine and rodent secretory vesicles. *The Journal of physiology* 542:453-476.
- Quick MW, Lester RA (2002) Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *Journal of neurobiology* 53:457-478.
- Reese LC, Taglialetta G (2011) A role for calcineurin in Alzheimer's disease. *Current neuropharmacology* 9:685-692.
- Ren SC, Chen PZ, Jiang HH, Mi Z, Xu F, Hu B, Zhang J, Zhu ZR (2014) Persistent sodium currents contribute to Abeta1-42-induced hyperexcitation of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuroscience letters* 580:62-67.
- Rettig J, Neher E (2002) Emerging roles of presynaptic proteins in Ca<sup>++</sup>-triggered exocytosis. *Science* 298:781-785.
- Rogers J, Lubner-Narod J, Styren SD, Civin WH (1988) Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 9:339-349.
- Rogers J, Mastroeni D, Leonard B, Joyce J, 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.
- Romano A, Pace L, Tempesta B, Lavecchia AM, Macheda T, Bedse G, Petrella A, Cifani C, Serviddio G, Vendemiale G, Gaetani S, 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.
- Russell CL, Semerdjieva S, Empson RM, Austen BM, Beesley PW, Alifragis P (2012) Amyloid-beta acts as a regulator of neurotransmitter release disrupting the interaction between synaptophysin and VAMP2. *PloS one* 7:e43201.
- Rylett RJ, Ball MJ, Colhoun EH (1983) Evidence for high affinity choline transport in synaptosomes prepared from hippocampus and neocortex of patients with Alzheimer's disease. *Brain research* 289:169-175.
- Samasilp P, Chan SA, Smith C (2012) Activity-dependent fusion pore expansion regulated by a calcineurin-dependent dynamin-syndapin pathway in mouse adrenal chromaffin cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:10438-10447.
- Sandow A (1952) Excitation-contraction coupling in muscular response. *The Yale journal of biology and medicine* 25:176-201.
- Santos SF, Pierrot N, Morel N, Gailly P, Sindic C, Octave JN (2009) Expression of human amyloid precursor protein in rat cortical neurons inhibits calcium oscillations. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:4708-4718.

- Sawyer CH, Everett JW (1947) Cholinesterases in rat tissues and the site of serum nonspecific cholinesterase production. *The American journal of physiology* 148:675-683.
- Segovia M, Ales E, Montes MA, Bonifas I, Jemal I, Lindau M, Maximov A, Sudhof TC, Alvarez de Toledo G (2010) Push-and-pull regulation of the fusion pore by synaptotagmin-7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:19032-19037.
- Seino S, Shibasaki T (2005) PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiological reviews* 85:1303-1342.
- Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298:789-791.
- Shen J, Wu J (2015) Nicotinic Cholinergic Mechanisms in Alzheimer's Disease. *International review of neurobiology* 124:275-292.
- Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN (1994) Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:10771-10778.
- Simpson SL (1937) Physiology of the Adrenal Gland. *British medical journal* 1:229-232.
- Small DH, Mok SS, Bornstein JC (2001) Alzheimer's disease and Abeta toxicity: from top to bottom. *Nature reviews Neuroscience* 2:595-598.
- Smart TG, Hosie AM, Miller PS (2004) Zn<sup>2+</sup> ions: modulators of excitatory and inhibitory synaptic activity. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 10:432-442.
- Smith IF, Hitt B, Green KN, Oddo S, LaFerla FM (2005) Enhanced caffeine-induced Ca<sup>2+</sup> release in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 94:1711-1718.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 150:76-85.
- Sorbi S, Bird ED, Blass JP (1983) Decreased pyruvate dehydrogenase complex activity in Huntington and Alzheimer brain. *Annals of neurology* 13:72-78.
- Stewart PA, Hayakawa K, Akers MA, Vinters HV (1992) A morphometric study of the blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 67:734-742.
- Swerdlow RH, Khan SM (2004) A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. *Medical hypotheses* 63:8-20.
- Tank AW, Lee Wong D (2015) Peripheral and central effects of circulating catecholamines. *Comprehensive Physiology* 5:1-15.
- Thorn P, Zorec R, Rettig J, Keating DJ (2016) Exocytosis in non-neuronal cells. *Journal of neurochemistry* 137:849-859.
- Ueda K, Shinohara S, Yagami T, Asakura K, Kawasaki K (1997) Amyloid beta protein potentiates Ca<sup>2+</sup> influx through L-type voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels: a possible involvement of free radicals. *Journal of neurochemistry* 68:265-271.
- van de Haar HJ, Jansen JF, van Osch MJ, van Buchem MA, Muller M, Wong SM, Hofman PA, Burgmans S, Verhey FR, Backes WH (2016) Neurovascular unit impairment in early Alzheimer's disease measured with magnetic resonance imaging. *Neurobiology of aging* 45:190-196.
- Verhage M, Sorensen JB (2008) Vesicle docking in regulated exocytosis. *Traffic* 9:1414-1424.
- Walsh DM, Selkoe DJ (2004) Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44:181-193.



- Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, Schmitt FA, Van Eldik LJ (2014) Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Frontiers in genetics* 5:88.
- Wevers A, Monteggia L, Nowacki S, Bloch W, Schutz U, Lindstrom J, Pereira EF, Eisenberg H, Giacobini E, de Vos RA, Steur EN, Maelicke A, Albuquerque EX, Schroder H (1999) Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the cerebral cortex in Alzheimer's disease: histotopographical correlation with amyloid plaques and hyperphosphorylated-tau protein. *The European journal of neuroscience* 11:2551-2565.
- Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR (1982) Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215:1237-1239.
- Wightman RM, Jankowski JA, Kennedy RT, Kawagoe KT, Schroeder TJ, Leszczyszyn DJ, Near JA, Diliberto EJ, Jr., Viveros OH (1991) Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:10754-10758.
- Wolf K, Zarkua G, Chan SA, Sridhar A, Smith C (2016) Spatial and activity-dependent catecholamine release in rat adrenal medulla under native neuronal stimulation. *Physiological reports* 4.
- Xiu J, Nordberg A, Zhang JT, Guan ZZ (2005) Expression of nicotinic receptors on primary cultures of rat astrocytes and up-regulation of the alpha7, alpha4 and beta2 subunits in response to nanomolar concentrations of the beta-amyloid peptide(1-42). *Neurochemistry international* 47:281-290.
- Yang Y, Kim J, Kim HY, Ryoo N, Lee S, Kim Y, Rhim H, Shin YK (2015) Amyloid-beta Oligomers May Impair SNARE-Mediated Exocytosis by Direct Binding to Syntaxin 1a. *Cell reports* 12:1244-1251.
- Yao J, Irwin RW, Zhao L, Nilsen J, Hamilton RT, Brinton RD (2009) Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:14670-14675.
- Young SH, Poo MM (1983) Spontaneous release of transmitter from growth cones of embryonic neurones. *Nature* 305:634-637.
- Younkin SG (1995) Evidence that A beta 42 is the real culprit in Alzheimer's disease. *Annals of neurology* 37:287-288.
- Yu JT, Chang RC, Tan L (2009) Calcium dysregulation in Alzheimer's disease: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Progress in neurobiology* 89:240-255.
- Yu WF, Guan ZZ, Bogdanovic N, Nordberg A (2005) High selective expression of alpha7 nicotinic receptors on astrocytes in the brains of patients with sporadic Alzheimer's disease and patients carrying Swedish APP 670/671 mutation: a possible association with neuritic plaques. *Experimental neurology* 192:215-225.
- Zhang Z, Jackson MB (2010) Membrane bending energy and fusion pore kinetics in Ca(2+)-triggered exocytosis. *Biophysical journal* 98:2524-2534.
- Zhou Z, Mislis S (1995) Action potential-induced quantal secretion of catecholamines from rat adrenal chromaffin cells. *The Journal of biological chemistry* 270:3498-3505.
- Zhou Z, Mislis S, Chow RH (1996) Rapid fluctuations in transmitter release from single vesicles in bovine adrenal chromaffin cells. *Biophysical journal* 70:1543-1552.
- Zlokovic BV, Deane R, Sallstrom J, Chow N, Miano JM (2005) Neurovascular pathways and Alzheimer amyloid beta-peptide. *Brain pathology* 15:78-83.

