



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

**INTERACCIÓN ENTRE SUBTIPOS DE RECEPTORES
NICOTÍNICOS NEURONALES: CONSECUENCIAS
FUNCIONALES Y FISIOPATOLÓGICAS**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por
Amanda Jiménez Pompa

Directora:
Almudena Albillos Martínez

Madrid, 2022

MARCO DE LA TESIS DOCTORAL

El trabajo de investigación que ha conducido a la presentación de esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Laboratorio 6 de la Dra. Almudena Albillos, en el Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM). En este Departamento, con distintas áreas de investigación, el Laboratorio 6 se encuadra en la línea de "Neurotransmisión, canales iónicos, señales de Ca²⁺ y excitosis".

La mayoría de los estudios del Laboratorio 6 se han llevado a cabo en células cromafines de la glándula adrenal de distintas especies animales. La célula cromafín tiene el mismo origen embrionario que las neuronas simpáticas, y su función fisiológica es la de secretar catecolaminas al torrente sanguíneo en respuesta a la estimulación del nervio esplácnico. Ambas características convierten a esta célula en un modelo experimental ideal para el estudio de la neurosecreción. Además, gracias a la colaboración que nuestro laboratorio mantiene desde hace años con varios hospitales de la Comunidad de Madrid, hemos tenido la oportunidad de trabajar con glándulas adrenales de donantes de órganos, un marco incomparable para el estudio de la fisiología de estas células en la especie humana.

En la última década, una de las principales líneas de investigación de nuestro laboratorio se ha centrado en el estudio de los receptores nicotínicos neuronales para la acetilcolina (nAChRs): desde su papel en el proceso de excitosis de neurotransmisores (Pérez-Alvarez y Albillos, 2007; Pérez-Alvarez *et al.*, 2012b), su caracterización (Pérez-Alvarez *et al.*, 2012a; Hone *et al.*, 2015) o su farmacología (Hone *et al.*, 2017; Jiménez-Pompa *et al.*, 2021). Para estudiar todos estos procesos ha resultado fundamental la colaboración con el Dr. J. Michael McIntosh, del Departamento de Biología y Psiquiatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Utah (E.E.U.U.), en el que se han desarrollado y validado todas las α -Conotoxinas selectivas utilizadas en este proyecto.

Como continuación a esos estudios se encuentra el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral. Durante el transcurso de la misma hemos intentado dilucidar la posible interacción física y funcional entre los dos subtipos de nAChRs expresados fundamentalmente en las células cromafines humanas, el $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ (Pérez-Alvarez *et al.*,

2012a; Hone *et al.*, 2015), y su posible regulación. El objetivo último de este estudio es profundizar en aspectos básicos de la fisiología de estos receptores y trasladar posteriormente dicho conocimiento a patologías en las que la función colinérgica se encuentra alterada. Esto nos permitirá abrir una nueva vía de investigación encaminada a la búsqueda de herramientas farmacológicas para su tratamiento. Por ello en esta Tesis Doctoral hemos comenzado adicionalmente a investigar la expresión y colocalización de estos receptores en el Sistema Nervioso Central, gracias a sendas colaboraciones con el Dr. Cristóbal de los Ríos y el Dr. Luis Gandía, ambos del Departamento de Farmacología y Terapéutica e Instituto de Investigación Teófilo Hernando de la UAM. El primero nos facilitó una de sus moléculas novedosas activadora de fosfatasa, para estudiar la posible regulación de los nAChRs por procesos de fosforilación en cultivos primarios de neuronas de hipocampo aisladas de embriones de ratón. El Prof. Gandía nos cedió ratones de una cepa transgénica utilizada como modelo de enfermedad de Alzheimer, que desarrolla además de una patología amiloide, la patología tau que puede observarse en pacientes con esta enfermedad, y que cursa con un grave déficit de la actividad colinérgica.

Para la realización de los estudios funcionales hemos utilizado la técnica electrofisiológica de *patch-clamp*. Además, hemos empleado técnicas de marcaje selectivo gracias a la utilización de α -Conotoxinas unidas a un fluoróforo para observar la expresión, colocalización e interacciones de ambos subtipos de nAChRs, tanto en células cromafines, como en neuronas de hipocampo, así como en cortes de cerebro de ratones control y transgénico.

ÍNDICE

Clave de abreviaturas	6
Introducción	8
1. Receptores nicotínicos.....	8
1.1. Estructura.....	8
1.2. Biogénesis y tráfico de nAChRs.....	9
1.3. Estados funcionales.....	12
1.4. Farmacología de los nAChRs.....	13
1.4.1. Ligandos: agonistas y antagonistas competitivos.....	13
1.4.2. Modulación.....	15
1.5. Distribución y subtipos de nAChRs nativos.....	18
1.5.1. Localización celular.....	18
1.5.2. Localización regional.....	20
2. nAChRs en la célula cromafín.....	23
2.1. La célula cromafín como modelo de estudio.....	24
2.2. Subtipos de nAChRs en células cromafines humanas.....	25
3. nAChRs en el hipocampo.....	27
3.1. Estructura del hipocampo y tipos de neuronas.....	27
3.2. Subtipos de nAChRs en el hipocampo.....	28
4. Fisiopatología de los nAChRs: Enfermedad de Alzheimer	31
4.1. Implicación de los nAChRs en la EA.....	33
4.2. Modelo triple transgénico.....	34
Antecedentes, hipótesis y objetivos	36
Materiales y métodos	38
1. Soluciones, reactivos, fármacos y toxinas empleados	38
2. Modelos de estudio.....	40
2.1. Células cromafines humanas.....	40
2.1.1. Obtención de glándulas adrenales humanas.....	40
2.1.2. Aislamiento y cultivo de células cromafines humanas	41
2.2. Neuronas de hipocampo de embriones de ratón	43
2.3. Ratón triple transgénico.....	45
2.3.1. Estudios de comportamiento.....	45
2.3.2. Cortes de cerebro.....	47
3. Registro de corrientes nicotínicas y capacitancia de membrana en CCH	48
3.1. La técnica de "patch-clamp".....	48
3.2. Protocolos y tratamientos.....	50
3.3. Análisis de corrientes nicotínicas.....	52
4. Medida de la expresión e interacción de los nAChRs por fluorescencia.....	53
4.1. Células aisladas.....	53
4.1.1. Pretratamientos.....	53

4.1.2	<i>Protocolo de marcaje</i>	53
4.1.3	<i>Adquisición de imágenes</i>	55
4.1.4	<i>Análisis de imágenes</i>	55
4.1.5	<i>Medida de interacción física entre subtipos de nAChRs</i>	57
4.2	<i>Cortes de tejido</i>	58
4.2.1	<i>Protocolo de marcaje</i>	58
4.2.2	<i>Adquisición de imágenes</i>	59
4.2.3	<i>Análisis de imágenes</i>	59
5.	<i>Análisis estadístico</i>	60
Resultados		61
1.	<i>Incremento de I_{nic} por estimulación sucesiva</i>	61
2.	<i>Modulación recíproca de la actividad $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$</i>	63
2.1	<i>Incremento de la corriente $\alpha 7$ por estimulación sucesiva con ACh</i>	63
2.2	<i>Modulación de la I_{nic} por los $\alpha 7$-nAChRs</i>	65
2.3	<i>Consecuencias funcionales de la potenciación de $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$-nAChRs</i>	67
2.4	<i>Expresión de los nAChRs en las CCH</i>	68
2.5	<i>Dependencia de Ca^{2+}</i>	70
3.	<i>Interacción física $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$-nAChRs</i>	72
3.1.	<i>Regulación de la interacción física entre $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$-nAChRs</i>	74
4.	<i>Expresión y colocalización de $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$-nAChRs en neuronas de hipocampo</i> ...77	
4.1.	<i>Regulación a nivel de Tyr</i>	77
4.2.	<i>Regulación a nivel de Ser/Thr</i>	79
5.	<i>Diferencias poblacionales: sexo y edad</i>	81
6.	<i>nAChRs en ratón modelo de enfermedad de Alzheimer</i>	83
6.1	<i>Estudio fenotípico</i>	83
6.2	<i>Expresión y colocalización de nAChRs en hipocampo de ratón 3xTg-AD</i>	84
6.3	<i>Expresión y colocalización de nAChRs: CA1, CA3 y GD</i>	86
Discusión		89
Conclusiones		101
Bibliografía		103
Artículos publicados durante el desarrollo de la tesis		118

CLAVE DE ABREVIATURAS

3xTg-AD	Modelo de ratón transgénico B6;129-Tg PSEN1 M146V, APP _{Swe} , Tau-P301L
α-BgTx	Alfa-Bungarotoxina
α-Ctx	Alfa-Conotoxina
β-AP/Aβ	Péptido β -amiloide/ acúmulo de β amiloide
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
APP	Proteína precursora de amiloide
AraC	Arabinósido de citosina
AO	Ácido Okadaico
BSA	Albúmina de suero bovino
CA (1-3)	Cuerno de Ammón (1-3)
CCH	Célula cromafín humana
CCDV	Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje
ChAT	Colina acetiltransferasa
Chol	Colina
C_m	Capacitancia de membrana
DA	Dopamina
DHβE	Dihidro beta eritroidina
DIV	Día in vitro
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMPP	1,1-dimetil-4-fenilpiperazinio
EA	Enfermedad de Alzheimer
FRET	Transferencia por energía de resonancia de Förster
GD	Giro dentado
HBSS	Solución salina balanceada de Hanks
I	Corriente
I_{Corr}	Índice de Correlación
IntDen	Densidad de fluorescencia integrada
LGICs	Canales iónicos dependientes de ligando (del inglés, <i>ligand gated ion channels</i>)
MAP2	Proteína asociada a microtúbulos 2
NA	Noradrenalina
nAChR	Receptor nicotínico neuronal
nHP	Neuronas de hipocampo
nMDP	Producto normalizado de la desviación de la media de colocalización
NOR	Reconocimiento del objeto nuevo (del inglés, <i>Novel Object Recognition</i>)
NT	Neurotransmisor
PFA	Paraformaldehído
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés, <i>phosphate buffered saline</i>)
PNMT	Feniletanolamina N-metil transferasa
PP2A	Proteína fosfatasa 2 A
Q	Carga
RE	Retículo endoplásmico
RIC3	Proteína resistente a inhibidores de colinesterasa 3

RMP	Potencial de membrana en reposo (del inglés, <i>Resting membrane potential</i>)
ROI	Región de interés (del inglés, <i>region of interest</i>)
RT	Temperatura ambiente (del inglés, <i>room temperature</i>)
SEM	Error estándar de la media (del inglés, <i>standard error of the mean</i>)
SBF	Suero bovino fetal
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
Tyr-K	Tirosina-quinasa
Tyr-P	Tirosina-fosfatasa
vAChT	Proteína de transporte vesicular de ACh

INTRODUCCIÓN

1. Receptores nicotínicos

Los receptores nicotínicos neuronales (nAChRs) pertenecen a la superfamilia de canales iónicos dependientes de ligando (LGICs, del inglés *ligand-gated ion channels*), en la que se incluyen los receptores catiónicos excitatorios 5-HT₃ de serotonina, los receptores de glutamato (AMPA, NMDA) y los receptores purinérgicos P2X, así como los aniónicos inhibitorios GABA_A, GABA_C y glicina (Alexander *et al.*, 2011).

La unión de un neurotransmisor (NT) a uno o varios sitios ortostéricos induce un cambio conformacional en los LGICs, que forman un poro transmembrana a través del cual dejan pasar iones para los que son selectivos: Cl⁻, Na⁺ y/o Ca²⁺ (Unwin, 1993). Esta activación genera transmisiones sinápticas muy rápidas (del orden de milisegundos) en músculo liso y esquelético, en el Sistema Nervioso Central (SNC) y Periférico (SNP), y en el Sistema Endocrino. También puede desencadenar procesos más lentos en los que están implicados el Ca²⁺ y otros segundos mensajeros en células no excitables, como linfocitos T, glía o células endoteliales (Briggs y Gopalakrishnan, 2007).

1.1. Estructura

Los nAChRs son una familia de canales iónicos formada por diferentes subtipos, cada uno de los cuales presenta una farmacología, fisiología y distribución anatómica específicas (Gotti y Clementi, 2004). Son complejos constituidos por 5 subunidades peptídicas ensambladas en torno al poro iónico formadas por: una porción extracelular amino-terminal relativamente hidrofóbica, tres dominios hidrofóbicos transmembrana (M1-M3) conectados por un bucle intracelular largo a un cuarto dominio transmembrana (M4), éste último unido a la región carboxi-terminal extracelular, que es relativamente corta (Sargent, 1993) (**Fig. 1A**).

El dominio extracelular contiene el sitio específico de unión a ligando, mientras el segmento transmembrana M2 es el encargado de tapizar la pared del poro y, por tanto, proporcionar permeabilidad y selectividad iónica a cada subtipo de receptor (Changeux,

2010) (**Fig. 1B**). El bucle intracelular, el más variable entre los distintos subtipos de nAChRs, posee sitios críticos de fosforilación que regulan el ensamblaje de las subunidades y modulan la actividad del receptor (Colombo *et al.*, 2013).

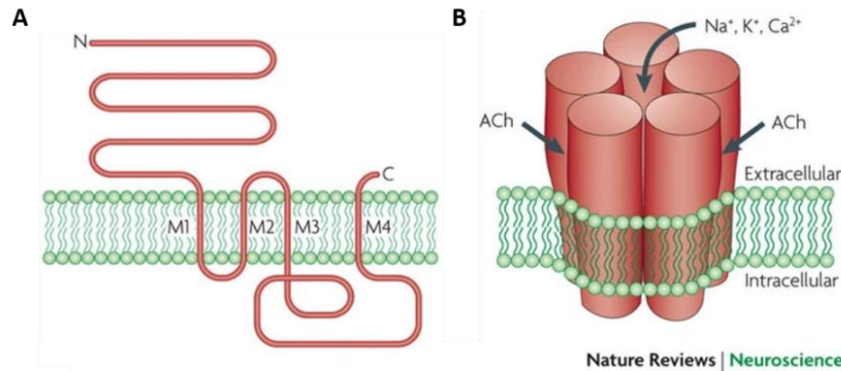


Fig. 1. Estructura del nAChR. **A.** Estructura terciaria de una subunidad del nAChR: dominio N-terminal, seguido de tres dominios transmembrana unidos al cuarto a través de un largo bucle citoplasmático. **B.** Estructura cuaternaria del nAChR: 5 subunidades peptídicas con sitio extracelular de unión de ligando, organizadas en torno al poro iónico (*modificado de Changeux, 2010*).

En mamíferos, existen distintos subtipos de nAChRs formados por las subunidades $\alpha 2$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$; $\beta 2$ - $\beta 4$ (Albuquerque *et al.*, 2009). La distinta combinación de las subunidades confiere propiedades farmacológicas y cinéticas específicas a cada subtipo de receptor (Gotti *et al.*, 2006; Taly *et al.*, 2009), que de manera general se dividen en dos grandes grupos: homoméricos (homopentámeros formados por subunidades α iguales entre sí: $\alpha 7$ - $\alpha 9$) y heteroméricos (formados por una combinación de subunidades α y β : $\alpha 2$ - $\alpha 6$ y $\beta 2$ - $\beta 4$) (Gotti y Clementi, 2004).

1.2. Biogénesis y tráfico de nAChRs

La formación de nuevos receptores es un proceso muy poco eficiente, ya que tan solo el 30% de las subunidades sintetizadas en los ribosomas va a formar receptores funcionales expresados en la membrana plasmática (Colombo *et al.*, 2013). Esta baja eficiencia se produce por la estrecha regulación que existe en el retículo endoplásmico (RE) mediada por chaperonas, que permite el plegamiento y la maduración de las subunidades que se ensamblan para formar la estructura pentamérica (Gaimarri *et al.*, 2007). Si existe algún error en el plegamiento o la conformación de las subunidades, estas son retrotraslocadas para su degradación en el proteosoma. Solo los pocos pentámeros correctamente ensamblados salen del RE a través de vesículas que primero

llegan al aparato de Golgi y finalmente a la membrana plasmática (Crespi *et al.*, 2018) (**Fig. 2**). La eficiencia de este proceso varía dependiendo del subtipo de nAChR y del tipo celular en el que se exprese. En este sentido, existen células “permisivas”, en las que los nAChRs se expresan, ensamblan y localizan en la membrana con cierta facilidad, y células “no permisivas” en las que las subunidades nicotínicas se retienen en el RE (Letchworth y Whiteaker, 2011).

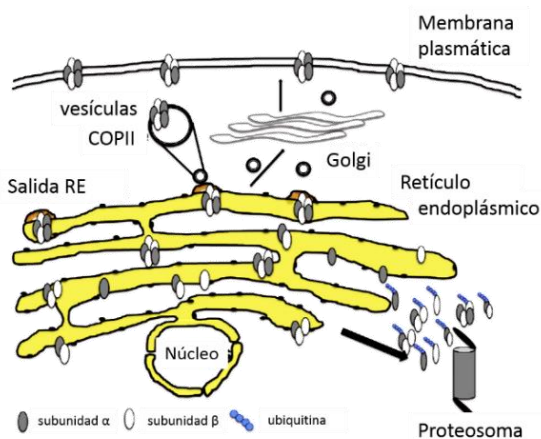


Fig. 2. Tráfico de nAChRs a membrana. Ensamblaje de las subunidades nicotínicas en pentámeros en el RE y posterior transporte al proteosoma para su degradación, o hacia el aparato de Golgi y la membrana plasmática para su expresión a través de la vía secretora, en vesículas de tipo COPII (*modificado de Colombo et al., 2013*).

Durante la síntesis y ensamblaje de los nAChRs en el lumen del RE participan una gran cantidad de chaperonas. Algunas de ellas son residentes del RE (inespecíficas), como BiP/GRP78, calnexina y ERp57, cuya función es asegurar el plegamiento correcto y retener las proteínas inmaduras en el lumen (Wanamaker y Green, 2007). Otras sin embargo son específicas de nAChRs, como RIC3 (proteína resistente a inhibidores de colinesterasa), que es imprescindible para el ensamblaje de las subunidades nicotínicas y la formación de los nAChRs homoméricos de tipo $\alpha 7$ ($\alpha 7$ -nAChRs) (Halevi *et al.*, 2002), regulando este proceso de forma dosis-dependiente: a niveles bajos, RIC3 promueve el ensamblaje y tráfico del receptor, mientras que a niveles altos suprime el tráfico, reteniendo el receptor en el RE (Alexander *et al.*, 2010). Esta chaperona puede actuar también a nivel de la membrana plasmática controlando la expresión del subtipo $\alpha 4\beta 2$ ($\alpha 4\beta 2$ -nAChR) (St John, 2009).

En el RE también se inicia el mecanismo de degradación de proteínas mal plegadas, asociando a estas subunidades fallidas, copias de ubiquitina para su transporte y

degradación en el proteosoma. En este proceso participan por ejemplo la ubiquitilina-1 (Plic-1), promoviendo la ubiquitinación de subunidades $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 2$ y $\beta 4$ mal plegadas (Ficklin *et al.*, 2005; Rezvani *et al.*, 2010) o la proteína UBXD4 sobre subunidades $\alpha 3$ y $\alpha 4$ tanto en tejido neuronal como en no neuronal (Rezvani *et al.*, 2009).

Una vez superados todos los controles, los receptores ya ensamblados continúan avanzando en la vía secretora hasta el aparato de Golgi, donde chaperonas como VILIP son capaces de controlar la cantidad del subtipo $\alpha 4\beta 2$ ($\alpha 4\beta 2$ -nAChRs) que llegan a la membrana celular (Zhao *et al.*, 2009).

El tráfico final a la membrana plasmática es un proceso bastante complejo del que aún no se conocen todos los mecanismos. Los nAChRs tienen que llegar a sitios diana concretos, ya que dependiendo de su localización celular tendrán funciones diferentes en la transmisión colinérgica (ver apartado 1.5.1). En este sentido, parece ser muy relevante el bucle intracelular de los propios receptores, que es quien marca la localización celular en el caso de nAChRs con subunidades $\alpha 3$ (Williams *et al.*, 1998), $\alpha 4$ y $\alpha 7$ (Colombo *et al.*, 2013). Además, una vez insertados en la membrana, los nAChRs pueden unirse formando “clusters” en los que participarían tanto proteínas citoplasmáticas de andamiaje (Millar y Harkness, 2008; Neff *et al.*, 2009), como modificaciones post-traduccionales del propio bucle intracelular (fosforilación, palmitoilación o miristoilación) (Crespi *et al.*, 2018). Algunos subtipos como los que contienen subunidades $\alpha 3$ y $\alpha 7$, tienen además una cierta movilidad una vez insertados en la membrana entre dominios sinápticos y extrasinápticos, al liberarse de andamiajes del citoesqueleto citoplasmático según el tipo celular (Fernandes *et al.*, 2010).

Algunos agonistas como nicotina pueden inducir la sobreexpresión de nAChRs en la membrana plasmática. Se han propuesto diferentes escenarios que explicarían el mecanismo de este fenómeno observado tanto *in vivo* como *in vitro*: i) incremento en el ensamblaje de subunidades y/o disminución de la degradación; ii) incremento del transporte a través de la vía secretora; iii) disminución de la internalización de receptores en membrana; iv) isomerización de los receptores en una conformación más fácilmente activable (Peng *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Buisson y Bertrand, 2001; Harkness y Millar, 2002; Darsow *et al.*, 2005).

Todos estos mecanismos de control, dependientes de cada tipo celular así como de cada subtipo de receptor, van a limitar por tanto la expresión y la función en la membrana plasmática de los nAChRs (Gotti *et al.*, 2006).

1.3. Estados funcionales

Una vez insertados en la membrana plasmática, los nAChRs funcionales fluctúan entre tres estados diferentes: reposo, activo o desensibilizado. Esta última situación además puede suceder en escala de milisegundos o lentamente durante minutos (Katz y Thesleff, 1957). En estado de reposo, el receptor puede ser activado por ligando estabilizándose en el estado activo, donde el poro permanece abierto y conduce cationes al interior celular. Después, si el ligando abandona el sitio de unión, el receptor puede volver al estado cerrado de reposo. Sin embargo, en presencia continuada del ligando, entra en un estado de desensibilización en el cual no se puede activar por nuevos agonistas y tampoco es conductor (Wittenberg *et al.*, 2020) (**Fig. 3**).

La distinta composición de subunidades del receptor gobierna la cinética entre estos tres estados conformacionales, la selectividad catiónica de la permeabilidad del poro, así como la afinidad farmacológica por los distintos agonistas (Wittenberg *et al.*, 2020).

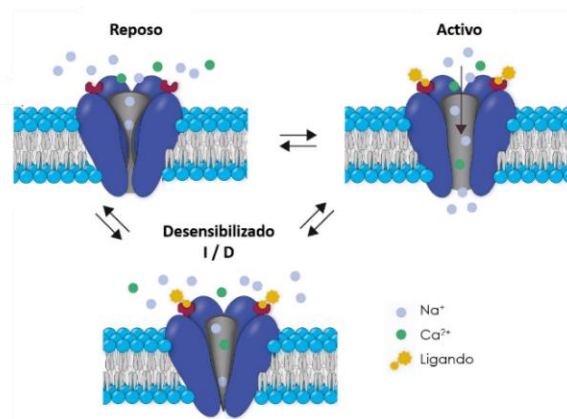


Fig. 3. Estados funcionales del nAChR. **Reposo**, receptor cerrado, disponible para la unión a ligando. **Activo**, receptor abierto conductor de cationes. **Desensibilizado**, receptor cerrado y sitio de unión a ligando no disponible (*modificado de Wittenberg et al., 2020*).

1.4. Farmacología de los nAChRs

1.4.1. Ligandos: agonistas y antagonistas competitivos

Tanto las subunidades α como las β contribuyen al sitio de unión de ligandos (Luetje y Patrick, 1991), ya que éstos se unen a la interfaz entre dos subunidades (Sine, 2002; Sine y Engel, 2006) (**Fig. 4**). Cada subunidad aporta un componente: el componente primario, que determina la afinidad de la unión del ligando (subunidades $\alpha 2$ - $\alpha 9$) y el componente complementario, que determina la selectividad del ligando (subunidades $\beta 2$ - $\beta 4$, $\alpha 7$ - $\alpha 10$).

Los receptores homoméricos, por tanto, contarían con 5 sitios de unión a ligando idénticos, aunque se ha visto que la ocupación de uno solo de ellos ya produce una cierta activación del receptor (Andersen *et al.*, 2013). Los de tipo heteromérico según este planteamiento poseerían entonces tan solo dos bolsillos hidrofóbicos localizados entre las interfaces α y β (Gotti *et al.*, 2006; Taly *et al.*, 2009; Zoli *et al.*, 2018). Sin embargo, recientemente se han descrito otros sitios de unión llamados “heterodoxos”, en los que la unión de un ligando no activaría el receptor, pero sí modularía positivamente los sitios de unión “ortodoxos” o convencionales (Wang y Lindstrom, 2018).

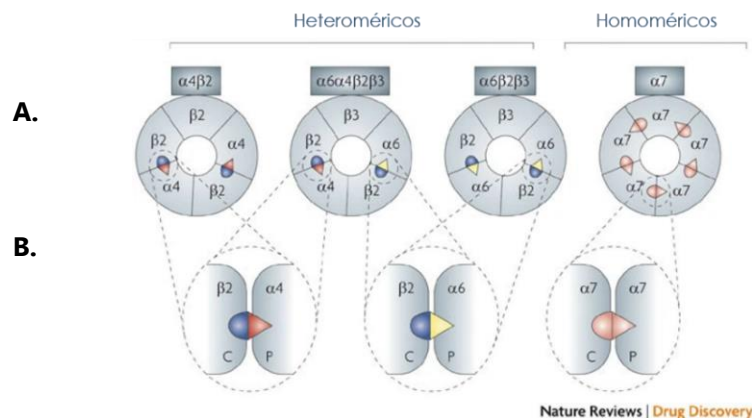


Fig. 4. nAChRs heteroméricos y homoméricos. **A.** Los nAChRs se nombran de acuerdo a las subunidades que los conforman. **B.** Representación de la variabilidad en la especificidad farmacológica del sitio de unión a ligando en las interfaces entre dos subunidades: los triángulos representan el componente primario, mientras que los semicírculos representan el componente complementario (*modificado de Taly et al., 2009*).

El principal ligando fisiológico de los nAChRs es la **acetilcolina (ACh)**. Esta molécula fue identificada en 1913 por Henry Dale y caracterizada como NT por Otto Loewi en

1921; por lo que ambos recibieron el Premio Nobel en Medicina y Fisiología en el año 1936 (Tansey, 2006). El resto de ligandos nicotínicos tanto naturales como sintéticos se subdividen de acuerdo a su efecto farmacológico comparado con el de ACh, pudiendo ser: agonistas totales si su eficacia para activar el receptor es similar a la de ACh; agonistas parciales si su eficacia es menor que la de ACh; o antagonistas si impiden la activación por ACh del receptor (Rollema *et al.*, 2010). Además, según su selectividad pueden ser selectivos de algún subtipo concreto de nAChR o no selectivos si se unen a más de un subtipo diferente.

Dada la diversidad de funciones fisiológicas que desempeñan los distintos subtipos de nAChRs y su implicación en algunos desórdenes colinérgicos, se ha puesto especial interés (tanto en la práctica clínica como en la investigación farmacológica) en estos ligandos cuya diana directa es el receptor nicotínico (**Tabla 1**). Algunos de estos agonistas como la nicotina, la lobelina o la epibatidina son alcaloides que se encuentran en la naturaleza (Daly, 2005); otros como vareniclina son derivados sintéticos de agonistas naturales (en este caso, de la citisina) desarrollados como fármacos para distintas funciones.

En cuanto a los antagonistas, también existen alcaloides en la naturaleza que actúan como tal, como la dihidro- β -eritroidina (DH β E) o la erisodina, aisladas del coral *Erythrina*, la metilcaconitina (MLA) o alcaloides cuaternarios como la tubocurarina. Pero la auténtica revolución en este campo llegó con el aislamiento de toxinas de origen animal: neurotoxinas procedentes de veneno de serpiente como la cobrotoxina y la α -bungarotoxina (BgTx), que se unen al nAChR y lo bloquean de forma irreversible (Chang, 1962; Fertuck y Salpeter, 1974; Barnard *et al.*, 1977); y las α -Conotoxinas (α -Ctx), péptidos pequeños (de entre 12-15 aminoácidos) aislados de caracoles marinos del género *Conus* (Cartier *et al.*, 1996; McIntosh *et al.*, 1999; Bekbossynova *et al.*, 2021). Adicionalmente a la gran diversidad de α -Ctx naturales aisladas, desde mediados de los años 80 se ha hecho hincapié en el diseño de α -Ctx sintéticas modificadas con el objetivo de mejorar su selectividad y afinidad, así como para simplificar su estructura (Craig y Adams, 2007; Akondi *et al.*, 2014). Estos péptidos derivados sintéticos de toxinas son antagonistas selectivos de diferentes subtipos e incluso subunidades de nAChRs, por lo que además han servido como herramienta para caracterizarlos a lo largo de las últimas décadas.

Existen dos aproximaciones para producir estos derivados sintéticos: la expresión recombinante de α -Ctx en sistemas de expresión heteróloga como *E. coli* o levaduras y la más utilizada, la síntesis química, que además de contar con la ventaja de ser un proceso automatizado, permite la libertad de inserción o modificación de aminoácidos naturales y no naturales de una manera controlada (Akondi *et al.*, 2014).

Tabla 1. Agonistas y antagonistas de nAChRs.

Agonistas		Antagonistas	
Selectivos	No selectivos	Selectivos	No selectivos
ABT 089/ 594 ($\alpha 4\beta 2$)	ACh	α -Ctx ArIB ($\alpha 7$)	α -BgTx
AR-R17779 ($\alpha 4\beta 2$)	anabaseína	α -Ctx BuIA (* $\beta 4$)	α -Ctx ImI
(4-OH) GTS-21 ($\alpha 7$)	anatoxina	α -Ctx TxID ($\alpha 3\beta 4$)	α -Ctx MII
Morantel ($\alpha 7$)	carbacol	α -Ctx PeIA-5667 ($\alpha 6\beta 4$)	α -Ctx Vcl.1
PHA ($\alpha 7$)	citisina	nicotina ($\alpha 9$)	clorisondamina
PNU 282987 ($\alpha 7$)	colina	muscarina ($\alpha 9$)	N-metil Cocaína
RJR 2403 ($\alpha 4\beta 2$)	DMPP	TC 5214 ($\alpha 4\beta 2$)	hexa/decametonio
S 24795 ($\alpha 7$)	epibatidina	α -Ctx RgIA ($\alpha 9$)	DH β E
TC 5619/ 1698 ($\alpha 7$)	lobelina	α -Ctx AuIB ($\alpha 3\beta 4$)	d-tubocurarina
tropisetron ($\alpha 7$)	nicotina	α -Ctx MII[H9A;L15A] ($\alpha 6^*$)	erisodina
A 582941/844606 ($\alpha 7$)	5-I-A85380	α -Ctx LvIA ($\beta 2$)	estricnina
SRS 180711 ($\alpha 7$)	vareniclina		mecamilamina
AZD0328 ($\alpha 7$)	3-Bromocitisina		MLA
			trimetafán

1.4.2. Modulación

La función de los nAChRs está sujeta a modulación por una serie de compuestos que no se unen a los sitios clásicos de unión a ligando, sino a distintos **sitios alostéricos** insensibles a ACh (**Fig. 5**), entre los que se encuentran:

- Sitios activadores alostéricos no competitivos: localizados en la porción extracelular de las subunidades α . Algunos de los compuestos que se unen a estos sitios potencian la apertura y la conductancia del canal iónico (Pereira *et al.*, 1993), como los inhibidores de colinesterasa fisostigmina, tacrina y galantamina. Otros enlentecen la desensibilización de los nAChRs, como es el caso del PNU120596 sobre el subtipo $\alpha 7$ (Williams *et al.*, 2011).

- Sitios inhibidores alostéricos no competitivos: localizados en el interior del canal iónico (segmento M2, alta afinidad) o en la interfaz entre el receptor y la bicapa lipídica (baja afinidad). La unión de diversos ligandos bloqueantes como etanol, clorpromacina, fenciclidina o MK80 en estos sitios inhibe la función del nAChR (Léna y Changeux, 1993).
- Sitio de unión a esteroides: localizado en el dominio extracelular hidrofóbico (Bertrand *et al.*, 1991). La unión de esteroides como corticosterona, progesterona o dexametasona desensibilizan de manera muy potente los nAChRs que contienen subunidades $\alpha 3$ y $\alpha 7$ (Ke y Lukas, 1996; Stitzel *et al.*, 1996).
- Sitio de dihidropiridinas: Existen múltiples sitios de unión de Ca^{2+} en los nAChRs (Fairclough *et al.*, 1993) cuyo bloqueo farmacológico con nimodipino o nifedipino (antagonistas de canales de Ca^{2+} de tipo L), produce una disminución en la conductancia del receptor dependiente de voltaje (López *et al.*, 1993).
- Sitios de unión a Ca^{2+} : se ha visto que la unión alostérica de Ca^{2+} a la región amino-terminal extracelular promueve la potenciación de las corrientes evocadas por ACh, de manera no dependiente de voltaje (Mulle *et al.*, 1992). Sin embargo, cuando el Ca^{2+} se une a sitios intracelulares del receptor, se produce una reducción de la conductancia de forma dependiente del voltaje (Glushakov *et al.*, 1999)

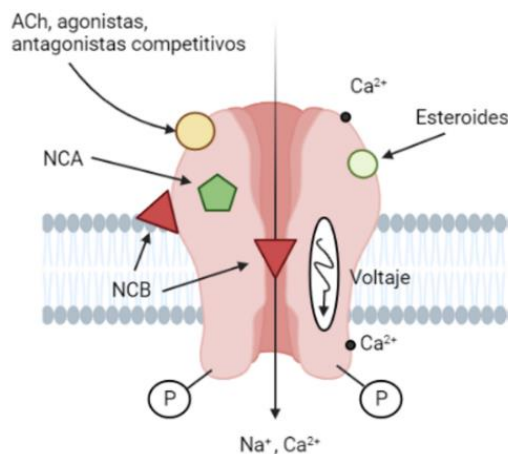


Fig. 5. Modulación de los nAChRs. Esquema de los sitios de unión de moléculas a un nAChR: sitio ortostérico o de unión a ligando (ACh, agonistas selectivos, antagonistas competitivos), NCA (sitios activadores alostéricos no competitivos), NCB (sitios inhibidores alostéricos no competitivos), unión a Ca^{2+} y dihidropiridinas, esteroides; y regulación por fosforilación (*inspirado en Léna y Changeux, 1993; creado con Biorender.com*).

Además de estos sitios de modulación alostérica, los nAChRs pueden verse modulados desde la cara citosólica por **fosforilación**. Esta regulación se produce a nivel del dominio intracelular que conecta los bucles M3 y M4 y está catalizada al menos, por tres tipos de quinasas: proteina-quinasa dependientes de AMP_c, proteina-quinasa C (PKC) y proteina-quinasa de la familia Src (SFKs: serina/treonina y tirosina-quinasa) (Huganir *et al.*, 1984; Huganir *et al.*, 1986), siendo estas últimas las más estudiadas.

Existen numerosos estudios que describen de qué manera la activación de proteínas de la familia Src modula la actividad de los nAChRs. Por un lado, estudios realizados sobre el receptor homomérico del subtipo $\alpha 7$ ($\alpha 7$ -nAChR) sugieren que la desfosforilación de sus residuos de tirosina conduciría a una mayor actividad iónica del receptor (Charpantier *et al.*, 2005) (**Fig. 6A**) así como a una mayor expresión del mismo en la membrana plasmática (Cho *et al.*, 2005). Otros estudios añaden además propiedades funcionales, mostrando que aunque es cierto que cuando el $\alpha 7$ -nAChR se encuentra desfosforilado sus propiedades como ionóforo se ven mejoradas, es en su estado fosforilado cuando es capaz de desencadenar respuestas metabotrópicas relacionadas con la neuroprotección (Chrestia *et al.*, 2021). Adicionalmente, se ha descrito que quinasas pertenecientes a esta misma familia activarían los nAChRs heteroméricos de las células cromafines de la glándula adrenal, potenciando la secreción de catecolaminas al torrente sanguíneo (Wang *et al.*, 2004) (**Fig. 6B**).

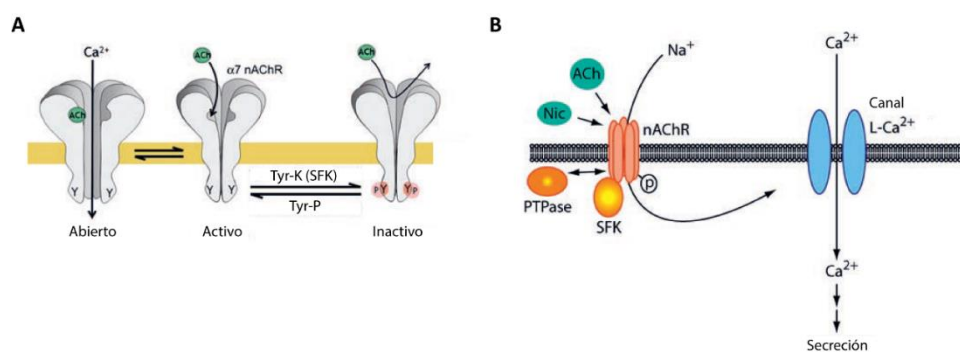


Fig. 6. Modulación de los nAChRs por fosforilación. **A.** La fosforilación de los $\alpha 7$ -nAChRs en el SNC por quinasas de la familia Src (SFKs) inhibe su actividad. **B.** La fosforilación de nAChRs heteroméricos en células cromafines aumenta su conductancia, potenciando con ello la secreción (modificado de Wiesner y Fuhrer, 2006).

En resumen, la modulación por fosforilación parece afectar cualquier tipo de nAChR, pero las consecuencias funcionales, incluso las provocadas por una misma familia de

quinasas, son específicas para cada subtipo de receptor y localización del mismo (Wiesner y Fuhrer, 2006).

1.5. Distribución y subtipos de nAChRs nativos

Los nAChRs están ampliamente distribuidos tanto en el SNC como en el SNP, pudiendo coexistir diferentes subtipos en un mismo área, incluso en una misma célula. La localización regional y celular se ha podido estudiar gracias a técnicas de cuantificación de transcritos de mRNA (hibridación *in situ*, qPCR) o de proteínas (inmunoprecipitación, inmunocitoquímica), técnicas de imagen (autoradiografía, tomografía de emisión de positrones o resonancia magnética), estudios de farmacología (unión a ligando, inmunopurificación) y estudios funcionales (técnicas de electrofisiología, cuantificación de liberación de NTs) (Gotti y Clementi, 2004).

1.5.1. Localización celular

Los nAChRs se localizan en varios tipos de neuronas incluyendo las acetilcolinérgicas, serotoninérgicas, GABAérgicas y glutamatérgicas (Kutlu y Gould, 2015), y dependiendo de su localización a nivel celular, están implicados en distintos procesos fisiológicos (**Fig. 7**).

- nAChRs postsinápticos (Fig. 7A): están implicados en procesos de señalización celular y neurotransmisión rápida. La activación de nAChRs postsinápticos en interneuronas GABAérgicas del hipocampo promueve una compleja trama de activación e inhibición de las neuronas piramidales (Albuquerque *et al.*, 1997; Dani, 2001). Además, a través de procesos mediados por fosforilación, promueven rutas de señalización que conducen a la regulación de la expresión génica, la diferenciación celular y la supervivencia (Hu *et al.*, 2002).
- nAChRs presinápticos (Fig. 7B): su función principal es la regulación de la liberación del propio NT, ya que su estimulación produce un incremento en la liberación de prácticamente todos los NTs estudiados: ACh, dopamina (DA), noradrenalina (NA), serotonina (5-HT₃), glutamato y GABA (Dani, 2001). Uno de los receptores presinápticos más estudiado ha sido el **α7-nAChR**. En hipocampo, la entrada de Ca²⁺ a través del propio receptor (Séguéla *et al.*, 1993) promueve la liberación de glutamato o GABA, dependiendo del tipo neuronal (McGehee *et al.*,

1995; Gray *et al.*, 1996). El Ca^{2+} que entra a través de estos receptores puede también ejercer un papel de segundo mensajero, favoreciendo una variada actividad enzimática a nivel intracelular por medio de la activación de quinasas y fosfatasa, lo que modifica la sinapsis y favorece indirectamente la liberación de los NTs (Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004). En terminaciones dopaminérgicas además regula el tamaño de la población de vesículas sinápticas, modulando por tanto la liberación de DA (Turner, 2004). En células granulares del hipocampo, inicia una ruta de señalización a través de AMP_c que conduce a la activación de PKA (Cheng y Yakel, 2015), imprescindible en la activación de sinapsina I, que facilita la liberación de glutamato desde la terminal presináptica (Welsby *et al.*, 2009). Además, se ha visto su papel fundamental en cuanto a plasticidad sináptica y remodelado dendrítico en ratones *knock-out* para este receptor, que presentaban una pobre ramificación dendrítica en la capa CA1 y en neuronas piramidales de la corteza durante el desarrollo (Morley y Mervis, 2013).

- nAChRs axonales (Fig. 7C): modulan la liberación de varios NTs simultáneamente y remodelan las sinapsis terminales. En sinapsis GABAérgicas, la activación de estos nAChRs despolariza la membrana localmente, conduciendo a la activación de canales dependientes de voltaje que a su vez, median el flujo de Ca^{2+} que potencia la liberación de GABA (Albuquerque *et al.*, 1997). Esta liberación puede bloquearse con tetrodotoxina (TTX) (Lena *et al.*, 1993), lo que indicaría que es dependiente de canales de Na^+ . Además, su localización también les permite controlar de manera local la excitabilidad de la célula, transmitiendo o cortando la progresión de un potencial de acción en una bifurcación neuronal, alterando o propagando así la excitación. Entre los subtipos de nAChRs expresados en terminales axónicos se encuentran aquellos que contienen la subunidad $\alpha 6$, presentes en neuronas dopaminérgicas del núcleo estriado (Champtiaux *et al.*, 2003).

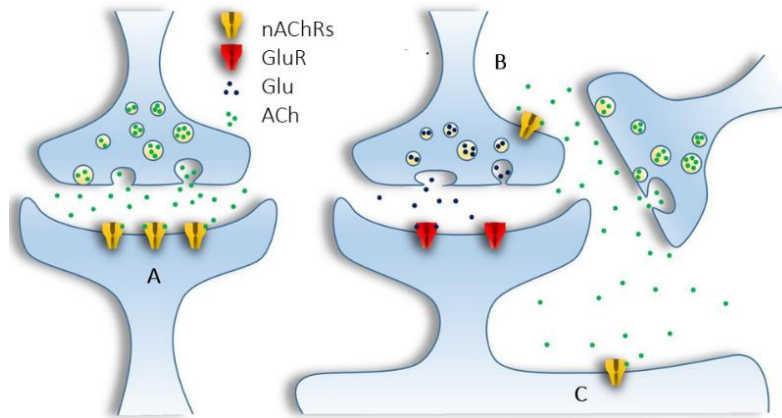


Fig. 7. Localización celular de los nAChRs. Dependiendo de su situación en la membrana, los receptores desempeñan funciones muy diferenciadas: **A.** Postsinápticos: contribuyen a la despolarización de la célula. **B.** Presinápticos: su activación facilita la liberación de NT, en este caso glutamato. **C.** Axonales: su activación modula la sinapsis mediante despolarizaciones localizadas (modificado de Corradi y Bouzat, 2016).

1.5.2. Localización regional

Los nAChRs se expresan de manera ubicua y heterogénea en diferentes regiones del SNC y SNP. Además, algunos subtipos homoméricos como $\alpha 7$ se expresan también en tejidos y células no neuronales como la microglía, astrocitos y oligodendrocitos, queratinocitos, plaquetas, células del sistema inmune, células tumorales y epitelios (intestinal, pulmonar, oral) (Colombo *et al.*, 2013). En ellos por medio de su actividad dual ionotrópica/metabotrópica desempeñan distintas funciones de señalización relacionadas con la vía colinérgica anti-inflamatoria (Wang *et al.*, 2003b).

Los receptores que contienen subunidades $\alpha 4$, $\beta 2$ y $\alpha 7$ son los más expresados en cerebro, aunque su distribución en las distintas regiones varía enormemente dependiendo de la especie (Gotti y Clementi, 2004; Gotti *et al.*, 2006; Albuquerque *et al.*, 2009).

En el subtipo $\alpha 4\beta 2$, la estequiometría entre subunidades α y β condiciona la sensibilidad por el agonista y la permeabilidad al Ca^{2+} (Tapia *et al.*, 2007). Está directamente implicado en fenómenos de adicción y dependencia por su abundante expresión en el circuito dopaminérgico de recompensa, por lo que se ha estudiado como diana terapéutica para el tratamiento de estas afecciones.

El subtipo **$\alpha 7$** se encuentra expresado abundantemente en regiones implicadas en funciones cognitivas y relacionadas con la memoria y la plasticidad sináptica, como el hipocampo, corteza y áreas subcorticales del sistema límbico (Corradi y Bouzat, 2016). Su función ionotrópica en localizaciones presinápticas es fundamental para la transmisión nerviosa dependiente de Ca^{2+} (Dani, 2001), así como su función metabotrópica a través de su unión a proteínas G, desempeñaría papeles de señalización y neuroprotección fundamentales en el cerebro (King *et al.*, 2015). Aunque la mayor parte de subunidades $\alpha 7$ forman receptores homoméricos, recientemente se han descrito en la especie humana receptores heteroméricos **$\alpha 7\beta 2$** en la corteza cerebral (Moretti *et al.*, 2014; Thomsen *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2016) así como **$\alpha 7 \text{dup}\alpha 7$** , una subunidad aberrante de $\alpha 7$, que limitaría la función del receptor (Araud *et al.*, 2011; Martín-Sánchez *et al.*, 2021).

La expresión de subunidades **$\alpha 2$** es una de las más variables dependiendo de la especie. En la especie humana, se expresa junto con **$\beta 2$** en el área 21, perteneciente al área de Wernicke (Gotti *et al.*, 2006).

Los genes que codifican para las subunidades **$\alpha 3$** , **$\beta 4$** y **$\alpha 5$** se encuentran formando un *cluster* en el cromosoma 15 humano, lo que indica la estrecha relación que existe entre ellos. Los receptores que contienen la subunidad $\alpha 3$ son los más expresados en SNP, siendo **$\alpha 3\beta 4$** el principal receptor implicado en la transmisión sináptica ganglionar. En el cerebro, su expresión se restringe a determinadas áreas neuronales del hipocampo con funciones específicas (ver apartado 3.2.) (Whiteaker *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2004), así como en cerebelo y núcleos superiores. La inclusión de la subunidad **$\alpha 5$** incrementa su permeabilidad al Ca^{2+} , la afinidad por los agonistas y la desensibilización del receptor (Ramírez-Latorre *et al.*, 1996).

Los nAChRs con subunidades **$\alpha 6$** se expresan fundamentalmente en el área ventral tegmental y otras estructuras de los ganglios basales (Gotti *et al.*, 2005), y están implicados en procesos cognitivos. Dado su papel en la regulación de la liberación de DA, se ha propuesto como diana terapéutica para el tratamiento en la enfermedad de Parkinson (Quik y McIntosh, 2006). Se encuentra también en estructuras relacionadas con la visión, formando receptores heteroméricos con distintas subunidades α y β (Gotti *et al.*, 2006).

La subunidad $\alpha 9$ mayoritariamente expresada en sistema inmune, puede formar receptores homoméricos y heteroméricos junto con $\alpha 10$. Su localización en Sistema Nervioso está muy restringida, y en los últimos años se le ha implicado en la percepción del dolor, por lo que se está utilizando como potencial diana terapéutica para paliarlo (McIntosh *et al.*, 2009). En rata además, se han descrito nAChRs que contienen subunidades $\alpha 9$ en la médula adrenal, que contribuyen a la adaptación de este tejido antes situaciones de estrés (Colomer *et al.*, 2010).

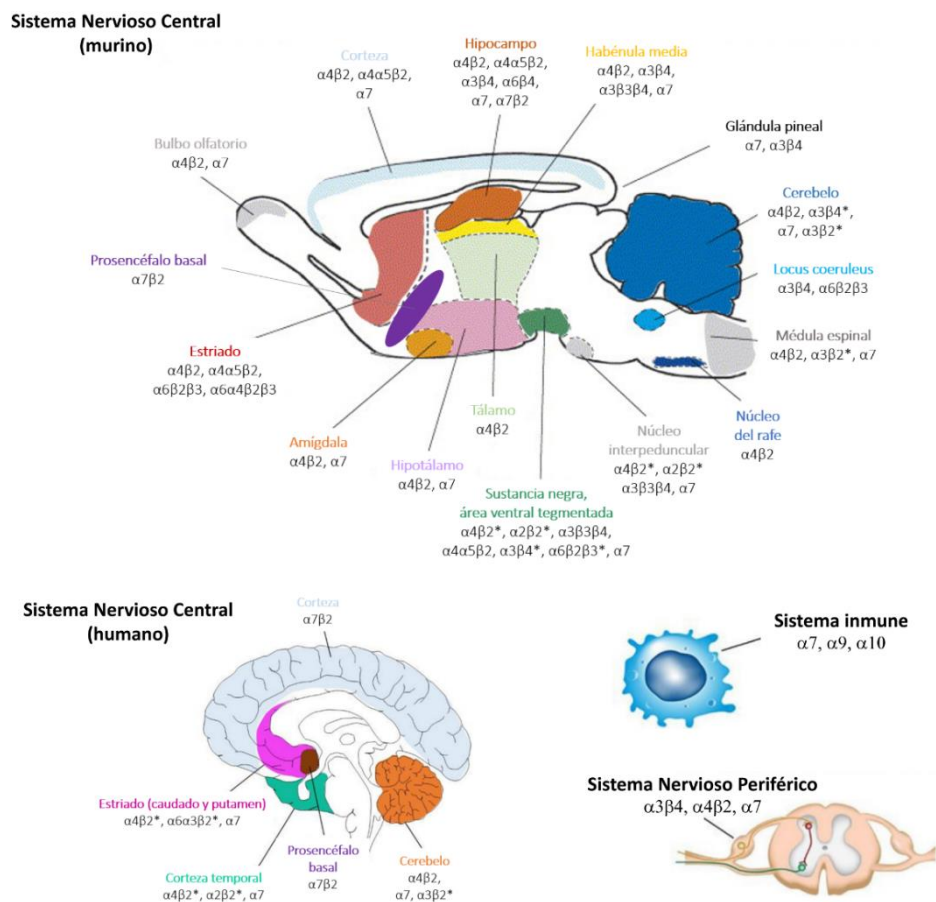


Fig. 8. Distribución de nAChRs en SNC (modelo murino y humano), Sistema Inmune (macrófago) y SNP (ganglio de la raíz dorsal) (modificado de Gotti *et al.*, 2006; Zoli *et al.*, 2015 y Giribaldi y Dutertre 2018).

2. nAChRs en la célula cromafín

El modelo utilizado en esta Tesis Doctoral para el estudio de los nAChRs en el SNP es la **célula cromafín humana** (CCH) de la médula de la glándula adrenal de donantes. Estas glándulas son órganos endocrinos que se localizan sobre los riñones y están formadas por dos áreas estructural y funcionalmente bien diferenciadas: la corteza, de origen mesodérmico produce principalmente tres tipos de hormonas: mineralcorticoides, glucocorticoides y andrógenos; y la médula, derivada de la cresta neural, cuyo principal producto de secreción son las catecolaminas (DA, adrenalina y NA) (Simpson, 1937). En su conjunto, este órgano es el responsable de la respuesta sistémica al estrés.

La médula adrenal, donde residen las células cromafines, está considerada como un gran ganglio especializado. Está innervada por fibras preganglionares simpáticas del nervio esplácnico, cuyos somas se localizan en el asta intermediolateral de la región torácica de la médula espinal (Hirano, 1982). Estas neuronas proyectan sus axones a través de los ganglios de la cadena simpática paravertebral, salen del ganglio celíaco sin hacer sinapsis y llegan a la cápsula suprarrenal (**Fig. 9**). Las fibras penetran en la glándula atravesando la corteza, y sus terminaciones axónicas contactan directamente con una o varias células cromafines (Kajiwara *et al.*, 1997), que actuarían como neuronas postsinápticas que, en lugar de inervar un tejido y liberar NTs localmente en éste, vierten sus productos de secreción directamente al torrente sanguíneo.

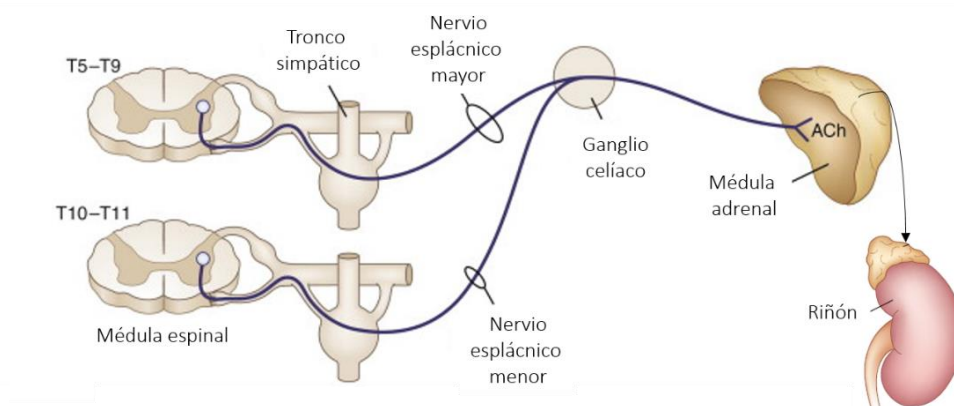


Fig. 9. Eje simpático-adrenal (modificado de Norman y Henry 2015).

La conexión sináptica dependiente de Ca^{2+} entre los terminales del nervio esplácnico y las células cromafines se conoce como "**acoplamiento excitación-secreción**", término

adaptado por Douglas y Rubin (1961) del acuñado por Sandow en 1952) tras sus observaciones en músculo esquelético (**Fig. 10**). La ACh liberada por los terminales del nervio esplácnico se une a receptores nicotínicos (y muscarínicos) de la célula cromafín, activándolos. Los nAChRs cambian su conformación abriendo el poro iónico, dejando pasar a su través iones Na^+ principalmente, aunque también Ca^{2+} en proporciones dependientes del subtipo de receptor. Esta entrada de cargas positivas produce una despolarización en la membrana celular, que a su vez dará lugar a la activación de canales de Na^+ dependientes de voltaje. La entrada de Na^+ por estos canales conduce a una mayor despolarización, incrementando la probabilidad de apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV). Esta entrada de Ca^{2+} que además induce la salida del propio Ca^{2+} almacenado en depósitos intracelulares, es la responsable final de la fusión de las vesículas secretoras maduras con la membrana plasmática mediante un proceso de exocitosis, liberando su carga de catecolaminas al torrente sanguíneo (Norman y Henry, 2015).

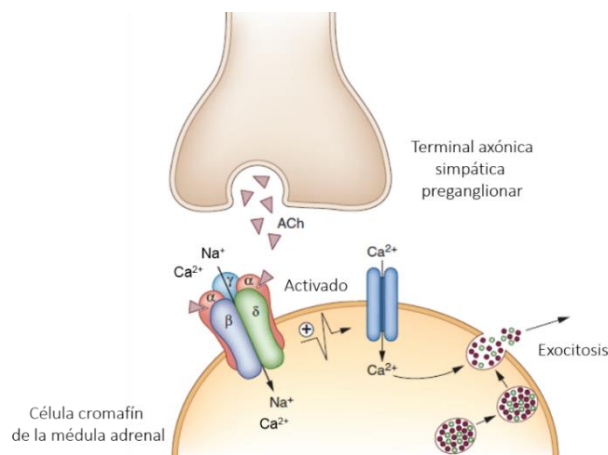


Fig. 10. Secreción estimulada por ACh en CC (modificado de Norman y Henry 2015).

2.1. La célula cromafín como modelo de estudio

Las células cromafines comparten gran cantidad de características funcionales con las neuronas simpáticas, debido a su mismo origen embrionario. Así, poseen vesículas sinápticas o de secreción, presentan receptores nicotínicos (Feldberg *et al.*, 1934; Fenwick *et al.*, 1982a; Role y Perlman, 1983; Inoue y Kuriyama, 1991) y muscarínicos (Douglas y Poisner, 1965; Inoue y Kuriyama, 1990) sobre los que actúa la ACh que libera las terminaciones del nervio esplácnico; disparan potenciales de acción (Biales *et al.*, 1976; Brandt *et al.*, 1976; Kidokoro y Ritchie, 1980), poseen canales de Ca^{2+} , Na^+ y K^+

dependientes de voltaje (Fenwick *et al.*, 1982b; Marty y Neher, 1985), presenta mecanismos de regulación del óxido nítrico (Lu *et al.*, 2008), poseen factores de crecimiento neuronales como NGF, TGF y GDNF (Kriegstein *et al.*, 1996; Unsicker y Kriegstein, 1996), además de tener receptores para otros muchos NTs como GABA, ATP, opioides y neuropéptidos (Bormann y Clapham, 1985; Marley y Livett, 1985). Por todas estas razones, además de por su fácil obtención y mantenimiento en cultivo, las células cromafines se han utilizado frecuentemente como modelo para el estudio de mecanismos básicos de neurofisiología, secreción regulada y farmacología (Bornstein *et al.*, 2012; Tischler, 2002).

2.2. Subtipos de nAChRs en células cromafines

Los primeros estudios realizados en rata y bovino mostraron que el subtipo de nAChR más abundante en las células cromafines era el $\alpha 3\beta 4^*$ (el asterisco indica la posible presencia de otras subunidades). Además, se describió la presencia de otras subunidades como $\alpha 5$ en bovino o $\alpha 9$ y $\beta 2$ en rata (Campos-Caro *et al.*, 1997; Di Angelantonio *et al.*, 2003; Colomer *et al.*, 2010). Numerosos estudios tanto moleculares como funcionales detectaron también el subtipo $\alpha 7$ en ambas especies, así como en la línea celular de feocromocitoma PC12 (García-Guzmán *et al.*, 1995; López *et al.*, 1998; Mousavi *et al.*, 2001; Di Angelantonio *et al.*, 2003; Drisdell y Green, 2000), aunque su actividad funcional en estas especies no está aún del todo esclarecida.

En **células cromafines humanas (CCH)**, Mousavi y colaboradores detectaron en 2001 la presencia del ARN mensajero (ARNm) de las 7 subunidades que estudiaron ($\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 4$) en la médula adrenal de un donante de 42 años (Mousavi *et al.*, 2001). En 2012 además, describimos en nuestro laboratorio la presencia de **$\alpha 7$ -nAChRs** funcionales en CCH mediante técnicas electrofisiológicas, viendo no solo que antagonistas del subtipo $\alpha 7$ como α -BgTx (1 μ M) y MLA (10 μ M) eran capaces de bloquear la corriente evocada por ACh un 7%, sino que además bloqueaban totalmente el componente rápido de la corriente activada por colina (Chol) (Pérez-Alvarez *et al.*, 2012a). Posteriormente, confirmamos la presencia de ARNm de la subunidad $\alpha 7$ tanto en médula adrenal, como en CCH aisladas (Hone *et al.*, 2015).

Para caracterizar los subtipos de nAChRs no- $\alpha 7$ en CCH, el uso de α -Ctx específicas junto con ensayos de biología molecular resultó ser muy relevante. El bloqueo de la corriente nicotínica por la α -Ctx BuIA(T5A,P60) (BuIA, selectiva de $\beta 4^*$ -nAChRs; Azam *et al.*, 2010), la α -Ctx LvIA(N9R,V10A) (LvIA, selectiva de $\beta 2^*$ -nAChRs; Hone *et al.*, 2015) y la α -Ctx TxID (selectiva de $\alpha 3\beta 4^*$ -nAChRs; Luo *et al.*, 2013), confirmó que el subtipo predominantemente expresado en CCH es el **$\alpha 3\beta 4^*$** (bloqueo de un 98% y 99% por BuIA y TxID, respectivamente), a lo que se suma una población minoritaria de $\beta 2^*$ -nAChRs (bloqueo por LvIA de un 7%). Por el contrario, la α -Ctx PeIA(A7V,S90H,V10A,N11R,E14A) (selectiva de $\alpha 6^*$ -nAChRs, Hone *et al.*, 2015) solo fue eficaz a concentraciones muy altas (por encima de 100 μ M), sugiriendo la escasa presencia de estas subunidades en las CCH (Hone *et al.*, 2015).

Confirmamos todos estos datos mediante biología molecular, midiendo los niveles de transcritos mediante RT-qPCR (PCR cuantitativa a tiempo real). Este ensayo, a diferencia del de Mousavi y colaboradores de 2001, se hizo en un mayor número de pacientes, se evaluaron todas las posibles subunidades nicotínicas y se realizó, además de en la médula adrenal, en células cromafines aisladas en cultivo para evitar la posible contaminación de resultados procedente de otras células de la médula. Los resultados de este estudio revelaron que las subunidades más abundantemente transcritas en las CCH eran las **$\alpha 3$, $\alpha 7$ y $\beta 4$** , se encontraron transcritos para **$\alpha 5$ y $\beta 2$** de manera más moderada, y sin embargo la presencia de $\alpha 2$, $\alpha 6$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$ fue prácticamente indetectable (Hone *et al.*, 2015).

Adicionalmente, observamos que mientras que la entrada de Ca^{2+} a través del subtipo $\alpha 7$ es incapaz de producir exocitosis en las CCH (Pérez-Alvarez *et al.*, 2012a), el bloqueo selectivo de $\beta 4^*$ -nAChRs con BuIA reduce este fenómeno en un 94% (Pérez-Alvarez *et al.*, 2012b).

Todos estos estudios llevan a la conclusión de que los nAChRs que expresan las CCH serían fundamentalmente los subtipos **$\alpha 3\beta 4^*$ y $\alpha 7^*$** , pudiendo estar formados además con subunidades regulatorias **$\alpha 5$ y $\beta 2$** .

3. nAChRs en el hipocampo

Para iniciar el estudio de nAChRs en SNC, en esta Tesis Doctoral utilizamos **neuronas aisladas de hipocampo de ratón (nHP)**. Las neuronas de hipocampo en cultivo pasan por una serie de etapas de maduración bien definidas (Dotti *et al.*, 1988), interconectan unas con otras (Bartlett y Banker, 1984) y el patrón de expresión y localización de proteínas neuronales *in vitro* es esencialmente idéntico al que desarrollan en cerebro. Todo ello convierte a los cultivos de hipocampo en un modelo adecuado para el estudio de la función sináptica y sus efectores, en este caso, los nAChRs.

3.1. Estructura del hipocampo y tipos de neuronas

El hipocampo es una estructura cerebral compleja integrada profundamente en el lóbulo temporal. Tiene un papel fundamental en funciones como el aprendizaje y la memoria, dada su elevada plasticidad sináptica. Junto con el hipotálamo y la amígdala, forman el sistema límbico y juntos controlan de manera coordinada diferentes acciones sobre el Sistema Nervioso Autónomo y Sistema Endocrino, así como procesos que desencadenan la motivación o las emociones (Morgane *et al.*, 2005).

El término "hipocampo" se usa indistintamente para definir de manera general la zona anatómica del cerebro situada bajo el ventrículo lateral en cerebro humano, así como para definir una de las entidades citoarquitectónicamente definidas que conforman dicho área (Amaral *et al.*, 2007). Por consenso, el hipocampo "propriadamente dicho" correspondería al conocido como cuerno de Ammón (CA), que comprende los campos CA1, CA2 y CA3 identificados por el neuroanatomista Lorente de Nó (1934). El concepto "formación hipocampal" englobaría además las regiones del giro dentado (GD), el complejo subcubicular y la corteza entorrinal.

Además, las neuronas del hipocampo se estructuran en capas, que fueron detalladamente estudiadas y dibujadas por Santiago Ramón y Cajal (**Fig.11**). En las distintas áreas del hipocampo "propriadamente dicho" se encuentran:

- *Stratum oriens* (o plexiforme) donde residen entre otras células, las dendritas de las **neuronas piramidales**.

- *Stratum pyramidale* (piramidal) que contiene los somas de las neuronas piramidales (principales neuronas excitatorias del hipocampo) además de un gran número de **interneuronas**.
- *Stratum lucidum* que solo se encuentra en la región CA3 y a su través pasan fibras musgosas desde el GD que sinaptan en el *stratum pyramidale*
- *Stratum radiatum* que contiene las fibras colaterales de Schaffer que se proyectan de CA3 a CA1, además de algunos tipos de interneuronas.
- *Stratum lacunosum-moleculare* que también contiene fibras colaterales de Schaffer además de otros tipos de fibras procedentes de la corteza entorrinal.

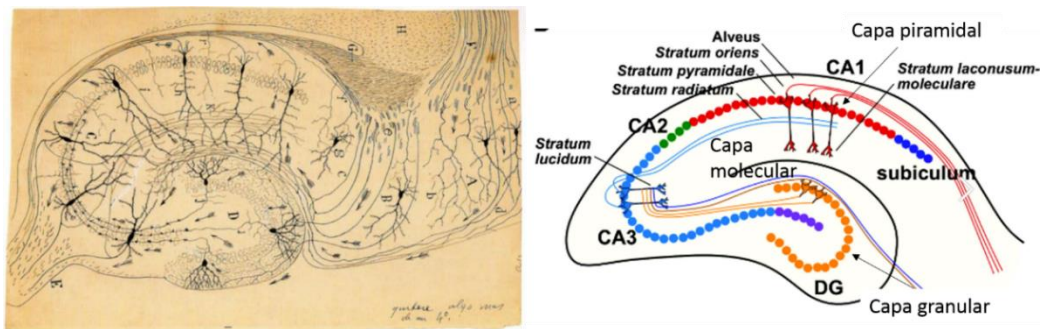


Fig. 11. Hipocampo de ratón. A la izquierda, dibujo original de Santiago Ramón y Cajal, según sus observaciones. A la derecha, esquematización de las distintas capas descritas por Ramón y Cajal, así como las distintas áreas funcionales CA1-3 y GD (Temido-Ferreira *et al.*, 2019).

En cuanto al GD, sus células principales son las **células granulares**, cuyos axones se conocen como fibras musgosas y que sinaptan con las neuronas piramidales de CA3. Está también compuesto por diferentes estratos: la capa polimórfica que contiene diferentes interneuronas, así como los axones de las células granulares; el *stratum granulosum* que contiene los somas de las células granulares y el *stratum moleculare*, donde distintos tipos de fibras sinaptan con las dendritas de las células granulares (Amaral *et al.*, 2007).

3.2. Subtipos de nAChRs en el hipocampo

Los nAChRs se expresan abundantemente en el SNC, como se ha descrito en el apartado 1.5.2., incluyendo en el hipocampo, donde se piensa que están implicados en la regulación de la excitabilidad, la plasticidad y la función cognitiva (Yakel, 2012). Se expresan en localizaciones tanto pre como postsinápticas (Le Novere *et al.*, 2002; Rush

et al., 2002) así como en distintos tipos de neuronas (acetilcolinérgicas, GABAérgicas, dopaminérgicas, adrenérgicas y glutamatérgicas) (Kutlu y Gould, 2015) (**Tabla 2**).

Tabla 2. nAChRs implicados en la liberación de NTs en hipocampo (modificado de Gotti *et al.*, 2006)

Glu	ACh	DA	GABA	NA
$\alpha 7^*$	$\alpha 4\beta 2^*$	$\alpha 3\beta 4^*$	$\alpha 7^*$	$\alpha 3\beta 4^*$
$\alpha 3\beta 4^*$	$\alpha^*\beta 2$		$\alpha 4\beta 2^*$	$\alpha 4\beta 2^*$
				$\alpha 6\beta 4^*$
				$\alpha 7^*$

En el hipocampo los **$\alpha 7$ -nAChRs** se expresan abundantemente, siendo los encargados de modular moléculas y efectores que gobiernan la señalización intracelular que va a dar lugar a la plasticidad sináptica (Jones y Yakel, 1997; Vizi y Lendvai, 1999). En CA1, las interneuronas GABAérgicas que regulan negativamente la actividad de las neuronas piramidales colindantes, expresan estos receptores en terminales presinápticos, mientras que en los compartimentos somato-dendríticos se expresan receptores tanto $\alpha 7$ como **$\alpha 4\beta 2^*$** (Radcliffe *et al.*, 1999; Alkondon y Albuquerque, 2001). En localizaciones presinápticas, la activación de **$\alpha 3\beta 4^*$ -nAChRs** potencia la liberación de glutamato que, junto con la entrada de Ca^{2+} por CCDV, inicia la despolarización y por tanto evoca el incremento de Ca^{2+} intracelular en localizaciones postsinápticas (Ji *et al.*, 2001; Ge y Dani, 2005), regulando la plasticidad de estos contactos (Gray *et al.*, 1996; Ji *et al.*, 2001; Alkondon y Albuquerque, 2002).

En experimentos de comportamiento en rata se vio que el bloqueo selectivo de los nAChRs en CA3 afectaba notablemente a funciones cognitivas superiores, como la codificación de la información y la memoria (Rogers y Kesner, 2003). Se ha descrito que este efecto viene dado por la modulación que ejercen los $\alpha 7$ -nAChRs sobre las oscilaciones de tipo γ (20-80 Hz) de la sincronización neuronal (Wang *et al.*, 2015), y que estos a su vez estarían regulados por diferentes quinasas, siendo potenciados por proteína-quinasas A y C, receptores NMDA, PI_3K y ERK, y abolidos por la Ser/Thr quinasa Akt (Wang, J. *et al.*, 2017). En hipocampo de rata se ha descrito también que al menos un tercio de las neuronas adrenérgicas expresan el subtipo **$\alpha 6\beta 4^*$** (Azam *et al.*, 2010), aunque su función no está aún del todo esclarecida.

En el área del GD, que está descrito como “la puerta reguladora” que controla el flujo de información que llega al hipocampo (Heinemann *et al.*, 1992; Lothman *et al.*, 1992), los $\alpha 7$ -nAChRs somáticos de las interneuronas de la capa molecular juegan un importante papel en la regulación de este flujo de información (Frazier *et al.*, 2003).

4. Fisiopatología de los nAChRs: Enfermedad de Alzheimer

La amplia expresión y distribución de los nAChRs tanto en el Sistema Nervioso como en otros tejidos no neuronales, hace que su mal funcionamiento esté relacionado con diversas patologías, desde desórdenes mentales y diferentes tipos de demencia, hasta cáncer de pulmón, problemas vasculares, inflamación en epitelio intestinal o disautonomía del control de la presión sanguínea (Gotti y Clementi, 2004).

La actividad colinérgica contribuye a la función cognitiva, y el declive o la pérdida de nAChRs se ha observado en la enfermedad de Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, autismo y enfermedad de Parkinson. Además, estudios genéticos han asociado los nAChRs a enfermedades como la epilepsia y la esquizofrenia, así como diversos estudios con ratones transgénicos han comprobado su implicación en desórdenes de ansiedad, depresión y dolor neuropático (Dani y Bertrand, 2007). Por todo ello, existe un interés considerable en el estudio y la posible modulación de los nAChRs para tratar todos estos desórdenes (Taly *et al.*, 2009).

Una de las enfermedades con afectación colinérgica más estudiada y conocida es la **enfermedad de Alzheimer** (EA), en la que la anormalidad neuroquímica más grave y consistente es la pérdida de inervación colinérgica en la corteza cerebral y el hipocampo (Coyle *et al.*, 1983). Fue descrita en 1907 por el psiquiatra y neurólogo Alois Alzheimer y actualmente es la causa de demencia más común. Es un trastorno neurodegenerativo progresivo y crónico, cuyos síntomas principales son: i) alteraciones cognitivas como la pérdida de memoria, dificultad en el lenguaje y la pérdida de coordinación de habilidades intelectuales; ii) trastornos psiquiátricos como apatía y depresión (Rosenberg *et al.*, 2015).

Las formas esporádicas (no hereditarias) de la EA comprenden la mayoría de los casos diagnosticados de la enfermedad. Sin embargo, la identificación de mutaciones genéticas presentes en las formas familiares (hereditarias) han aportado información fundamental sobre alguno de los mecanismos que desencadenan la disfunción sináptica (Dineley *et al.*, 2015). Por un lado, se describieron ciertas mutaciones en el gen que codifica para la **proteína precursora amiloide (APP)** (Hardy y Allsop, 1991). Esta proteína se expresa en diferentes tejidos, pero especialmente en las zonas activas de

sinapsis de las neuronas, donde regula la plasticidad sináptica y juega un papel importante en el transporte del hierro. Su proteólisis aberrante por la acción de diferentes secretasas genera el péptido β -amiloide (β -AP), cuya forma fibrilar agregada ($A\beta$) da lugar a las placas amiloides, descritas en la EA.

Por otro lado, se describió que las lesiones histopatológicas en forma de ovillos neurofibrilares eran causadas por agregaciones de la proteína **tau hiperfosforilada**. Las proteínas solubles tau se encuentran fundamentalmente en los axones de las neuronas y están implicadas en el ensamblaje y estabilización de la red neuronal de microtúbulos. La proteína tau se vuelve patológica cuando su fosforilación se desregula, se vuelve insoluble y se agrega formando los conocidos ovillos neurofibrilares (Crowther, 1990). Esto conduce a una malfunción estructural y regulatoria del citoesqueleto, lo que provoca morfologías, transporte axonal y función sinápticas anormales, causando neurodegeneración (Goedert y Spillantini, 2000). Además, el descubrimiento de distintas mutaciones en el gen que codifica para la proteína tau en la demencia frontotemporal familiar supuso un vínculo directo entre la disfunción de tau y la demencia (Goedert y Spillantini, 2000).

Además de los complejos procesos bioquímicos involucrados en la degeneración neuronal por acumulación de β -AP y el desarrollo de ovillos neurofibrilares de tau, el déficit colinérgico debido a la pérdida de neuronas colinérgicas y la reducción de la producción de ACh contribuye significativamente a la demencia temprana de la EA (Auld *et al.*, 2002). El déficit colinérgico se evidencia en la reducción tanto de la expresión como de la actividad de la enzima colina acetiltransferasa (ChAT) en la corteza y el hipocampo (Reisine *et al.*, 1978; Coyle *et al.*, 1983), así como de la proteína de transporte vesicular de ACh (vAChT). En los terminales presinápticos, ChAT sintetiza ACh, que se transporta a las vesículas sinápticas a través de vAChT, donde se almacena hasta su liberación excitotóxica (Prado *et al.*, 2013), por lo que la reducción de ambas implica una menor disponibilidad de ACh en las sinapsis colinérgicas. Las acetilcolinesterasas (AChE) residentes en la hendidura sináptica hidrolizan ACh rápidamente para regular la disponibilidad de este NT, e impedir así la desensibilización de los nAChRs (**Fig. 12**). Por ello, los inhibidores de AChE fueron los primeros fármacos aprobados para el tratamiento

de los síntomas cognitivos de la EA, y a día de hoy, siguen siendo la primera línea terapéutica en el tratamiento de esta patología.

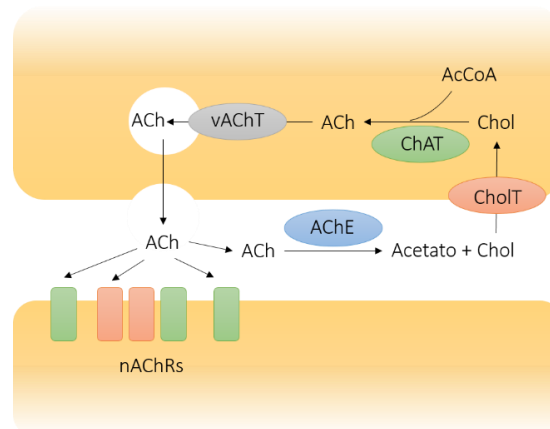


Fig. 12. Esquema de la síntesis y liberación de ACh. La ACh se sintetiza a partir de Chol y acetyl CoA en una reacción catalizada por ChAT y a través de la proteína transportadora vAChT se introduce en las vesículas sinápticas para su liberación. En la hendidura sináptica, las moléculas de ACh se unen a los nAChRs, y una vez han cumplido su función, son rápidamente hidrolizadas por AChE. La Chol resultante de esta reacción se recapta por la célula a través del transportador ChoIT.

4.1. Implicación de los nAChRs en la EA

Existe una pérdida considerable y significativa de nAChRs del SNC en pacientes con EA (Nordberg y Winblad, 1986; Guan *et al.*, 2000, Hernández *et al.*, 2010), que puede detectarse *in vivo* desde etapas tempranas de la enfermedad mediante tomografía de emisión de positrones (PET) (Nordberg, 1999). Este déficit de nAChRs además, correlaciona significativamente con el deterioro cognitivo con el que cursa la EA (Jelic *et al.*, 2000). En concreto, se ha descrito la disminución en los niveles de expresión de proteínas de $\alpha 3$ y $\alpha 4$ en la corteza temporal, así como de $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 7$ en el hipocampo de pacientes con EA (Guan *et al.*, 2000). Se ha observado sin embargo, una mayor cantidad de ARNm de $\alpha 7$ en el hipocampo de estos pacientes (Hellström-Lindhahl *et al.*, 1999) y prácticamente la misma de RNAm de $\alpha 3$ y $\alpha 4$. Es decir, la pérdida de nAChRs no puede ser atribuida a alteraciones a nivel de transcripción génica (Nordberg, 2001). Algunos factores postranscripcionales como la acumulación de β -AP, la hiperfosforilación de tau y otras proteínas, así como el estrés oxidativo y cambios en la membrana plasmática durante el desarrollo de la enfermedad, podrían ser los causantes de la pérdida de nAChRs (Farooqui *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1996).

Distintos subtipos de nAChRs se ven afectados de manera diferencial en la EA. El β -AP se acumula preferentemente en zonas ricas en $\alpha 7^*$ y $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChRs del hipocampo y corteza, y el hecho de que ambos receptores tengan una elevada afinidad por este péptido que actúa como antagonista, podría explicar la gran vulnerabilidad de estas áreas en la EA (Dineley, 2007; Parri *et al.*, 2011). En concreto el β -AP tiene una afinidad excepcionalmente alta por $\alpha 7$ -nAChRs (del rango de picomolar) (Wang *et al.*, 2000), no competitiva y reversible (Liu *et al.*, 2001a) y su interacción contribuye a la disfunción de la transmisión sináptica y la plasticidad (Dineley, 2007; Puzzo *et al.*, 2011; Pirttimaki *et al.*, 2013). La unión de β -AP a $\alpha 7$ -nAChRs no solamente afectaría a la transmisión colinérgica directa en la que éste está implicado, sino que además, modula su actividad metabotrópica, interrumpiendo así las rutas de señalización que conducen a la regulación de la expresión génica, la diferenciación celular y la supervivencia, dependientes de la activación de este receptor (Dineley *et al.*, 2001; Pettit *et al.*, 2001; Abbott *et al.*, 2008).

4.2. Modelo triple transgénico

Los animales transgénicos han sido fundamentales para el estudio de diferentes patologías y procesos fisiológicos en las últimas décadas. En el caso de la EA, sin embargo, y como ocurre con todas las enfermedades esporádicas, los modelos transgénicos tan solo pueden mimetizar algunos de los síntomas de la enfermedad, ya que su etiología no radica en los genes. El modelo triple transgénico (3xTg-AD) incluye las únicas mutaciones descritas para los casos de Alzheimer familiar, y además es el único modelo que desarrolla placas y ovillos neurofibrilares (Oddo *et al.*, 2003a). Las tres mutaciones que dan nombre al modelo son las siguientes:

- Presenilina-1 (PSEN1): gen que codifica para la subunidad PSEN1 de la γ -secretasa, que facilita la proteólisis de (entre otras) la APP.
- APP (Swe): mutación sueca del gen para APP.
- Tau (P301L): este gen produce proteínas tau con facilidad para la hiperfosforilación, que a su vez conllevaría a su insolubilidad y depósito.

Estos ratones presentan alteraciones histopatológicas en regiones relevantes en la EA, como el hipocampo y la corteza cerebral. Las placas de $A\beta$ son las primeras en

aparecer, primero en la zona de la corteza cerebral (sobre los 6 meses) y después en el hipocampo (12 meses), coincidiendo con la aparición de inmunorreactividad para tau, en concreto en las neuronas de CA1, extendiéndose en los meses sucesivos a la corteza cerebral (Oddo *et al.*, 2003b).

Además de estos signos histopatológicos, este modelo presenta carencias en la función sináptica a partir de los 6 meses de edad, así como defectos cognitivos desde los 4 meses, aunque en concreto el déficit en la memoria no empieza a ser patente hasta los 6 meses (Billings *et al.*, 2005).

En cuanto a los nAChRs en este modelo de ratón, está descrito que no presenta cambios significativos en cuanto a la expresión del subtipo $\alpha 4\beta 2$, y sin embargo presenta una clara disminución de los niveles de expresión de $\alpha 7$ -nAChRs en hipocampo, corteza y tálamo a partir de los 6 meses de edad, en comparación con la cepa control (Oddo *et al.*, 2005). A esa edad, el único signo histopatológico de EA patente es el acúmulo intracelular de A β en hipocampo. En este modelo se ha descrito además, una disminución significativa de ChAT en la corteza prefrontal y en el hipocampo (50% y 30% menos, respectivamente) (Orta-Salazar *et al.*, 2014).

Teniendo todos estos datos en cuenta, en el presente trabajo decidimos utilizar ratones 3xTg-AD así como sus controles de más de 12 meses de edad, con el objetivo de estudiar las posibles alteraciones existentes en la enfermedad consolidada. Además, aunque existen diversos estudios sobre el dimorfismo sexual de este modelo respecto a varios aspectos metabólicos y endocrinos, ninguno de ellos hace referencia a la expresión y distribución de los nAChRs, por lo que decidimos examinar ambos sexos para obtener una perspectiva más amplia y estudiar las posibles diferencias entre ellos.

ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En distintos experimentos de nuestro laboratorio, observamos un evidente incremento de la corriente nicotínica en las CCH cuando éstas eran estimuladas repetidamente con pulsos de ACh. Dado que en estas células los únicos nAChRs expresados son $\alpha 7^*$ y $\alpha 3\beta 4^*$ (Pérez-Alvarez *et al.*, 2012a; Hone *et al.*, 2015; Hone *et al.*, 2017), y ante la observación de que este incremento de la corriente nicotínica venía acompañado a su vez de una aceleración en la fase de activación de la misma, nos propusimos como objetivo inicial estudiar este fenómeno bajo una hipótesis preliminar: que la estimulación nicotínica sucesiva promovía el incremento de actividad de receptores del subtipo $\alpha 7$, previniendo su desensibilización. Una vez observado este importante hecho, los mecanismos que conducen a este proceso y su regulación se convirtieron en objeto de estudio de esta Tesis Doctoral.

Nuestra **hipótesis** consiste en que existe una interacción funcional entre los distintos subtipos de nAChRs, la cual es responsable de la modulación de su correspondiente actividad. Esta hipótesis se basa en: i) la importancia que tiene el subtipo $\alpha 3\beta 4$ tanto para la actividad nicotínica de las CCH, como su contribución fundamental en la excitosis (Pérez-Alvarez *et al.*, 2012b; Hone *et al.*, 2015; Hone *et al.*, 2017), en contraposición con la falta de información sobre la función del subtipo $\alpha 7$ en este modelo celular; ii) la co-expresión de dos o más subtipos de nAChRs en todos los tejidos y células en los que éstos se distribuyen (Gotti *et al.*, 2006; Zoli *et al.*, 2015; Giribaldi y Dutertre 2018) y iii) los distintos procesos ya descritos capaces de regular la activación, expresión e inactivación, de los nAChRs.

Para explorar esta hipótesis, así como el abanico de posibilidades que surgirían de ella, nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Estudiar electrofisiológicamente la posibilidad de una modulación recíproca de $\alpha 3\beta 4$ sobre la actividad de $\alpha 7$ y viceversa: mediante la utilización de agonistas y antagonistas selectivos del subtipo $\alpha 7$ para entender la contribución de cada subtipo a la actividad del otro. Así mismo, la evaluación de la dependencia de la actividad de cada uno de ellos al Ca^{2+} , actor principal en la neurotransmisión.

2. Estudiar la expresión de ambos subtipos receptores: mediante la utilización de α -Ctx selectivas de subtipo de receptor unidas a fluoróforos Alexa, para visualizar y cuantificar la expresión de estos nAChRs en diferentes escenarios y tratamientos farmacológicos en SNC y en una célula modelo de SNP, con el objetivo de comprobar si la actividad funcional de los receptores, interfiere o modula su propia expresión en la membrana plasmática.

3. Evaluar la posibilidad de una interacción física entre ambos subtipos: mediante análisis de colocalización e interacción física, para comprobar si la interacción funcional de los $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs viene marcada por la interacción en membrana de ambos receptores.

4. Estudiar si la interacción es dependiente de sexo o edad: una de las ventajas de trabajar con tejido humano es que conociendo datos básicos del donante se puede realizar un estudio poblacional discreto. Uno de los objetivos de este trabajo fue examinar si existen diferencias en la actividad, expresión e interacción de los subtipos de nAChRs en los distintos rangos de edad, así como entre mujeres y hombres.

5. Evaluar la expresión e interacción entre nAChRs en un modelo de enfermedad con afectación colinérgica: para investigar si alguno de los procesos observados en CCH y nHP se ven alterados en una enfermedad con afectación colinérgica, utilizando un modelo de ratón transgénico que muestra signos fisiopatológicos de la EA.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Soluciones, reactivos, fármacos y toxinas empleados

Tabla 3: Soluciones

Solución	Uso	Composición (mM)
Solución Locke (Ringer-Locke)	Preservación y cultivo CCH	154 NaCl, 5,6 KCl, 3,6 NaHCO ₃ , 5 HEPES, 5,6 glucosa (pH 7,2)
Solución Extracelular	Electrofisiología	145 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl ₂ , 2 CaCl ₂ , 10 HEPES, 10 glucosa (pH 7.4)
Solución Extracelular 0 Ca ²⁺	Electrofisiología	145 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl ₂ , 5 EGTA, 10 HEPES, 10 glucosa (pH 7.4)
Solución Intracelular	Electrofisiología	145 K-glutamato, 8 NaCl, 1 MgCl ₂ , 10 HEPES, 0,5 anfotericina B (pH 7.2)
Solución PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	Varios	136 NaCl, 2 KCl, 8 Na ₂ HPO ₄ , 2 KH ₂ PO ₄ (pH 7.4)
HBSS (solución salina balanceada de Hanks)	Preservación y cultivo nHP	138 NaCl, 5,3 KCl, 0,4 KH ₂ PO ₄ , 0,3 Na ₂ HPO ₄ , 1,3 CaCl ₂ , 0,8 MgSO ₄ , 10 HEPES, 5,6 glucosa (pH 7.4)
Solución PB (<i>phosphate buffered</i>)	Tejidos	75 Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O, 25 NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O (pH 7,4)

Tabla 4: Reactivos para cultivos celulares

Reactivo	Uso	Concentración
DMEM, <i>Sigma-Aldrich</i>	Medio de cultivo CCH	500 µL/pocillo
Suero bovino fetal (SBF), <i>LabClinics</i>	Suplemento de cultivo	10%
GlutaMax, <i>Gibco-Invitrogen</i>	Suplemento de cultivo	1%
Penicilina/estreptomicina, <i>Sigma-Aldrich</i>	Suplemento de cultivo	1%
Fungizona, <i>Sigma-Aldrich</i>	Suplemento de cultivo	1%
Proteasa tipo XIV, <i>Sigma-Aldrich</i>	Aislamiento celular	1 mg/mL
Colagenasa tipo I, <i>Sigma-Aldrich</i>	Aislamiento celular	2 mg/mL
Tripsina, <i>Sigma-Aldrich</i>	Aislamiento celular	0,25%
Tampón de lisis de eritrocitos, <i>Sigma-Aldrich</i>	Aislamiento celular	1 mL/ <i>pellet</i>
Poli-L-lisina, <i>Sigma-Aldrich</i>	Adhesión celular	0,1 mg/mL
Neurobasal, <i>Gibco-Invitrogen</i>	Medio de cultivo nHP	500 µL/pocillo
B-27, <i>Gibco-Invitrogen</i>	Suplemento de cultivo	2%
HEPES, <i>Gibco-Invitrogen</i>	Suplemento de cultivo	1 mM
Arabinósido de citosina (AraC), <i>Sigma-Aldrich</i>	Inhibidor de ciclo celular	0,5 µM

Tabla 5: Soluciones y reactivos para rodajas

Solución/ Reactivo	Uso	Concentración
Pentobarbital	Anestesia	1 μ L al 30% en salino/g peso ratón
Paraformaldehído (PFA)	Fijación	4%
Solución de inmersión	Crioprotección	PB 0,1 M, sacarosa 30%
Solución anticongelante	Preservación	28 mM NaH_2PO_4 , 19 mM NaOH, 30% glicerina, 30% etilenglicol

Tabla 6: Reactivos y toxinas para fluorescencia

Reactivo/ toxina	Uso	Concentración
Paraformaldehído (PFA) <i>Sigma-Aldrich</i>	Fijación	2%
Albúmina de suero bovino (BSA) <i>Sigma-Aldrich</i>	Bloqueo	0,1 mg/mL
Leupeptina, <i>Sigma-Aldrich</i>	Inhibidor proteasas	10 μ g/mL
Aprotinina, <i>Sigma-Aldrich</i>	Inhibidor proteasas	10 μ g/mL
Pepstatina A, <i>Sigma-Aldrich</i>	Inhibidor proteasas	10 μ g/mL
Tritón Tx-100, <i>Sigma-Aldrich</i>	Permeabilizante	0,1%
α -BgTx-Alexa488 conjugada, <i>Molecular probes</i>	Marcaje α 1,7,9-nAChR	300 nM
α -BgTx, <i>Sigma-Aldrich</i>	Control negativo	10 μ M
BuIA-Cy3 o 546(T5A,P60), <i>University of Utah</i>	Marcaje β 4*-nAChR	300 nM
BuIA(T5A,P60), <i>University of Utah</i>	Control negativo	10 μ M
Hoechst, <i>SIDI-UAM</i>	Marcaje nuclear	1:2500
anti MAP-2 (rb), <i>Invitrogen</i>	Marcaje nHP	1:500
PeIA-5667, <i>University of Utah</i>	Bloqueo α 6 β 4	10 μ M
Anti-rb Alexa Fluo 647, <i>Invitrogen</i>	Anticuerpo secundario	1:500
ProLong Gold, <i>Sigma-Aldrich</i>	Medio de montaje	5 μ L/cubreobjetos
Pervanadato, <i>Sigma-Aldrich</i>	Pretratamiento	50 μ M
Genisteína, <i>Sigma-Aldrich</i>	Pretratamiento	100 μ M
Ácido Okadaico (AO), <i>Sigma-Aldrich</i>	Pretratamiento	5 nM
Compuesto ITH12680, <i>Instituto Teófilo Hernando</i>	Pretratamiento	10 μ M

Tabla 7: Fármacos y toxinas para electrofisiología

Fármaco/ toxina	Uso	Concentración
Acetilcolina (ACh), <i>Sigma-Aldrich</i>	Agonista nAChRs	300 μ M
Colina (Chol), <i>Sigma-Aldrich</i>	Agonista α 7-nAChR	3 mM
DMPP, <i>Sigma-Aldrich</i>	Agonista sintético nAChRs	100 μ M
PNU-28297, <i>Sigma-Aldrich</i>	Agonista sintético α 7-nAChR	30 μ M
ArIB(V11,V16D), <i>University of Utah</i>	Bloqueo selectivo de α 7-nAChR	100 nM
TxID, <i>University of Utah</i>	Bloqueo selectivo de α 3 β 4-nAChR	300 nM

2. Modelos de estudio

2.1. Células cromafines humanas

2.1.1 Obtención de glándulas adrenales humanas

La obtención de glándulas adrenales humanas utilizadas en esta Tesis Doctoral fue posible gracias a la estrecha colaboración que nuestro laboratorio mantiene desde hace más de una década con diferentes hospitales de la Comunidad de Madrid: el Hospital Universitario Doce de Octubre, la Fundación Jiménez Díaz, el Hospital Clínico San Carlos, el Hospital Universitario Ramón y Cajal, el Hospital Rey Juan Carlos (Móstoles) y el Hospital Universitario Infanta Elena (Valdemoro).

El protocolo de recogida y uso de estas glándulas para investigación, se revisó y aprobó por el Comité de Ética de la UAM, así como por los Comités de Ética de los distintos hospitales colaboradores, contando además con un Consentimiento Informado firmado por los familiares del donante.

En coordinación con los servicios de Urología de los hospitales colaboradores, establecimos un protocolo de actuación temprana activo las 24 horas del día, los 7 días de la semana, consistente en varios puntos:

- Provisión a todos los hospitales de botes con solución Locke de preservación estéril, que debían ser almacenados en las neveras de los quirófanos a 4°C hasta su uso (un máximo de 3 meses).
- Aviso con antelación, por parte del equipo quirúrgico de los trasplantes programados, así como la confirmación de la extracción de las glándulas cuando ésta se produjera.
- Inmediata preservación de las glándulas recién extraídas en los envases provistos por el laboratorio, y conservación en frío hasta su recogida.
- Recogida de las muestras en los hospitales por parte del personal del laboratorio en un período de no más de 8 horas.
- Procesado inmediato de las glándulas en nuestra unidad de cultivo para la obtención y el aislamiento de células cromafines de la médula adrenal.

Para esta Tesis Doctoral hemos utilizado glándulas de 30 donantes, 19 mujeres y 11 hombres, con edades comprendidas entre los 23 y los 82 años. Admitimos para el estudio

tanto fumadores (8) como no fumadores o exfumadores (22), y llevamos a cabo un registro de las causas de la muerte por si pudiesen interferir en el resultado de los experimentos, siendo las más comunes la hemorragia cerebral (HC) y los accidentes cardiovasculares (ACV).

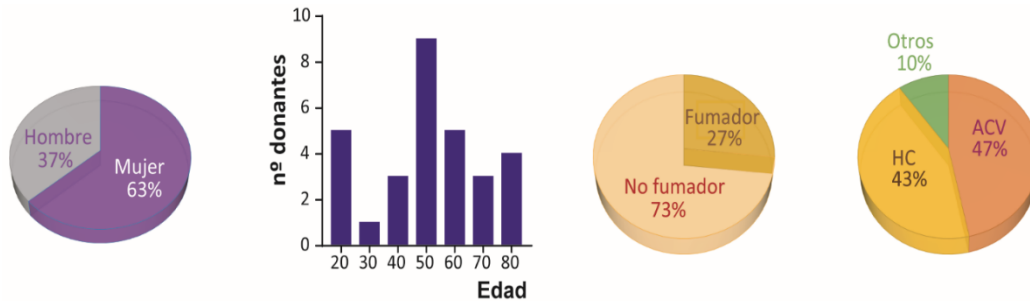


Fig. 13. Distribución muestral de los donantes humanos.

2.1.2 Aislamiento y cultivo de células cromafines humanas

Para el aislamiento de las células cromafines de la médula adrenal, seguimos el protocolo de cultivo establecido por nuestro laboratorio (Pérez-Alvarez y Albillos, 2007; Hone *et al.*, 2015). En la campana de flujo laminar, se extrae la glándula de su envase de preservación y se retira el abundante tejido adiposo que la rodea con la ayuda de tijeras de disección esterilizadas. Tras localizar la vena suprarrenal, se perfunde a través de ella de manera retrógrada solución Locke atemperada, hasta eliminar todos los restos de células sanguíneas. Una vez la glándula está limpia, se perfunde también a través de la vena 5 mL de una solución de proteasa tipo XIV al 1% en Locke. Se introduce la glándula entera en un tubo cónico de 50 mL y se incuba en el baño a 37°C durante 10 min. Tras repetir la perfusión con la solución de proteasa y la incubación una vez más, la glándula se coloca en una placa Petri para proceder a su disección. Con un bisturí, se abre con una incisión sagital. De esta manera, la médula adrenal (de color claro) queda expuesta, entremezclada con tejido de la corteza (de color más oscuro). La extracción de la médula se realiza mediante el raspado con la punta del bisturí, intentando separar las partes más oscuras de tejido, que pertenecen a la corteza.

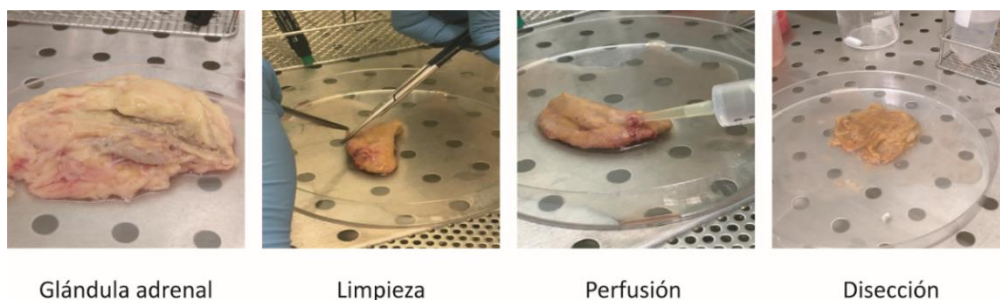


Fig. 14. Procedimiento paso a paso de la disección de una glándula adrenal humana. En primer lugar, se limpia el abundante tejido adiposo. Después se perfunde para limpiar con solución Locke, seguido de una solución enzimática de proteasa para la disgregación del tejido. Finalmente, se abre y se procede al raspado del tejido con bisturí.

Una vez obtenida la masa de tejido medular, se trocea e introduce en un tubo de 50 mL con una solución de colagenasa tipo I (2 mg/mL) en solución Locke, enriquecida con un 0,1% de Ca^{2+} para potenciar la actividad de la enzima. Este tubo se incuba en el baño a 37°C durante 1 h, resuspendiendo la mezcla cada 10 min con una pipeta Pasteur de plástico para facilitar la disgregación del tejido. Finalizada la incubación, se filtra la suspensión obtenida a través de una malla estéril de nylon de 200 μm , y seguidamente por un filtro de 100 μm para descartar los fragmentos más grandes de tejido no digerido. Se centrifuga esta suspensión durante 10 min a 200×*g* y tras descartar el sobrenadante, el pellet se resuspende en 1 mL de tampón de lisis de eritrocitos, que se deja actuar durante 1 min. Pasado este tiempo, se añade solución Locke nueva hasta completar los 50 mL para detener la acción del tampón de lisis, y la suspensión se pasa por un filtro de 40 μm para eliminar los trozos de tejido y restos celulares remanentes. Tras una última centrifugación de 10 min a 200×*g*, se descarta el sobrenadante y el pellet se resuspende en medio de cultivo DMEM completado con un 10% de suero bovino fetal inactivado (SBF), un 1% de GlutaMax y un 1% de cóctel de antibióticos (penicilina/estreptomicina). Se siembra un total de 500 μL de suspensión celular sobre cubreobjetos de cristal de 12 mm de diámetro en una placa de 24 pocillos.

Para facilitar la adhesión celular, los cubreobjetos previamente se tratan con una solución de poli-L-lisina 0,1 mg/mL durante una hora a 37°C. Posteriormente se lavan varias veces con agua *milliQ* estéril y se esterilizan a la luz UV durante al menos 30 min. El cultivo se mantiene a 37°C en el incubador con una atmosfera de saturación de humedad del 95% y 5% de CO_2 hasta un máximo de 7-10 días. El día posterior a la

siembra, se retiran 300 μL de medio y se añaden 500 μL de medio nuevo atemperado a 37°C y a partir de entonces, se reemplazan 500 μL de medio cada 2-3 días.

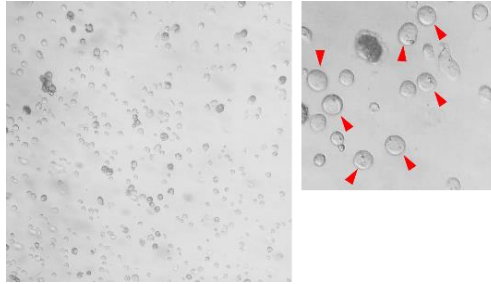


Fig. 15. Aislamiento de células de la médula de la glándula adrenal. A la derecha, ampliación de varias células cromafines, señaladas con puntas de flecha, con sus gránulos densos característicos.

2.2. Neuronas de hipocampo de embriones de ratón

Para los estudios realizados en este trabajo utilizamos embriones de hembras gestantes C57 casi a término (18-19 días tras el cruce, E19). Todos los procedimientos se realizaron bajo las recomendaciones del Comité de Ética de la UAM 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), en el menor número de animales posible. Los animales se criaron en el animalario de la Facultad de Medicina en condiciones controladas de temperatura, con comida y agua *ad libitum* y manteniendo ciclos de luz-oscuridad de 12:12 h, atendidos por personal experto del Gabinete Veterinario.

Para el aislamiento de neuronas de hipocampo de embriones de ratón, seguimos una modificación de los protocolos de cultivo de (Seibenhener y Wooten, 2012; Garrido-García *et al.*, 2019). Un día antes de la siembra, para potenciar la adhesión de las neuronas a los cubreobjetos de cristal, éstos se esterilizan a la llama y se pasan en orden por una mezcla de HCl (60%) y etanol (40%), dos veces por H₂O esterilizada y finalmente acetona pura. Tras dejarlos secar al aire bajo luz UV (unos 15 min), se recubren con poli-L-lisina (0,1 mg/mL), se cierra la placa con parafilm y se guarda en el incubador a 37°C durante al menos 24 h. El día de la siembra, se aclaran tres veces con PBS estéril y se les añade Medio de Plaqueo, que contiene: medio Neurobasal, 10% de SBF para facilitar la adhesión al sustrato, 2% de suplemento B-27, 1% de cóctel de antibióticos, 1% de

fungizona (antifúngico) y 1% de GlutaMax, HEPES 1 mM. Las placas se mantienen a 37°C en el incubador hasta su uso.

Tras sacrificar una gestante por dislocación cervical, se desinfecta el abdomen con abundante etanol (70% v/v) y con la ayuda de unas pinzas y tijeras estériles, se realiza un corte en la zona medio-ventral para descubrir la cavidad abdominal. Se extraen los embriones cortando la unión del útero con el mesometrio, y se ponen en una placa Petri en hielo. Uno a uno, se extraen los embriones del saco embrionario y rápidamente se decapitan. Sujetando la cabeza con una pinza, se realiza un corte desde el final de la espina dorsal hacia el hocico con unas micro-tijeras, y se introduce una espátula en la base del cráneo. Con cuidado, el cerebro se extrae hacia arriba a través del corte fronto-occipital, y se transfiere a una nueva placa Petri con solución salina balanceada de Hanks incompleta fría (HBSS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}). En un estereomicroscopio con fuente de luz fría y con la ayuda de una pinza de punta fina, se separan los dos hemisferios por la línea media del cerebro. Se retiran las meninges para facilitar el acceso al hipocampo, que se extrae separándolo de la corteza con unas micro-tijeras y se transfiere a una nueva placa Petri con HBSS incompleto. Una vez extraídos los hipocampos de todos los embriones, se trocean con las micro-tijeras en una placa Petri con 3 mL de HBSS incompleto y la mezcla se transfiere a un tubo de 15 mL al que se le añade 1,5 mL más de HBSS incompleto y 0,5 mL de tripsina al 2,5%, llegando a un volumen total de 5 mL (tripsina 0,25%). Tras voltear suavemente el tubo evitando formar burbujas, el tejido se incuba 15 min a 37°C, volteando con cuidado cada 5 min aproximadamente. Tras lavar 5 min (dos veces con HBSS incompleto y una última con HBSS completo), los hipocampos se terminan de disgregar mecánicamente en 5 mL de HBSS completo con ayuda de una pipeta Pasteur de cristal con la punta pulida y disminuida a la mitad de su diámetro a la llama del mechero. La suspensión se centrifuga ($200\times g$, 5 min), se descarta el sobrenadante y las células se resuspenden en Medio de Plaqueo. Se cuentan las células obtenidas en cámara de Neubauer y sustrayendo un 20% por la posible muerte celular que pueda ocurrir tras el cultivo, se siembran a una densidad de 30.000 células por cubreobjetos en 0,5 mL de Medio de Plaqueo.

Una vez transcurridas 24 h en el incubador a 37°C y 5% de saturación de CO_2 para permitir la adhesión de las neuronas al sustrato, el Medio de Plaqueo se sustituye por

Medio de Crecimiento (Neurobasal suplementado con un 2% de B27, 1% de mezcla de antibióticos, HEPES 1 mM y 2% de GlutaMax). El mantenimiento de los cultivos requiere el reemplazo cada 4 días de la mitad del Medio de Crecimiento por medio nuevo, y la recuperación del volumen de H₂O que se haya perdido por evaporación. A día 4 *in vitro* (DIV 4), las nHP se tratan con arabinósido de citosina (AraC, 0,5 μM), con la finalidad de inhibir la división celular e impedir el crecimiento de las células gliales.

Realizamos los experimentos a DIV 15-18, cuando el árbol dendrítico está completamente formado.

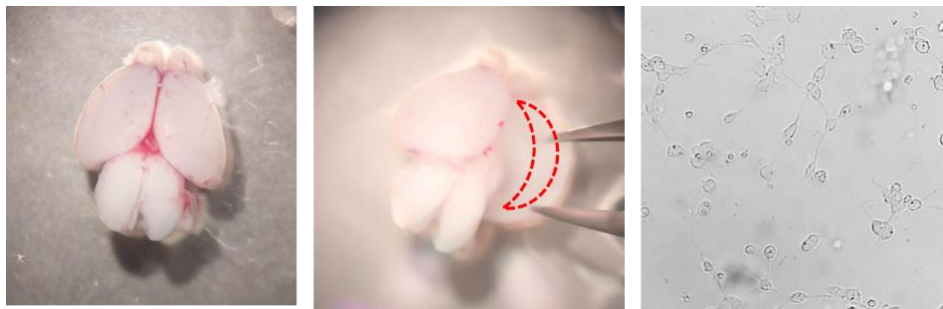


Fig. 16. Cultivo primario neuronas de hipocampo. De izquierda a derecha: cerebro de embrión de ratón (E19). Separación de hemisferio derecho, con hipocampo resaltado en rojo punteado. Células del hipocampo vistas a DIV 3 tras el aislamiento.

2.3. Ratón triple transgénico

Para esta parte del estudio utilizamos ratones machos y hembras B6;129 control (**WT**) y B6;129-Tg PSEN1 M146V, APP_{Swe}, Tau-P301L (**3xTg-AD**) cedidos por el Prof. Gandía y previamente caracterizados por genotipado para las tres mutaciones por Alicia Muñoz-Montero (ambos del laboratorio 7 del Departamento de Farmacología y Terapéutica, UAM). Realizamos los estudios en animales de más de 12 meses de edad, cuando son claramente patentes los cambios histopatológicos y comportamentales característicos de la EA (Oddo *et al.*, 2003a).

2.3.1 Estudios de comportamiento

Para evaluar el nivel de deterioro en la memoria de los ratones 3xTg-AD en comparación con los WT, realizamos el test "NOR" (del inglés, *Novel Object Recognition*, "reconocimiento del objeto nuevo") (Ennaceur y Delacour, 1988). Esta prueba evalúa la

capacidad de los roedores de reconocer un objeto nuevo en su entorno, y está directamente relacionada con la neurobiología de la memoria no espacial.

El procedimiento consiste en tres partes: habituación, familiarización y fase de prueba, realizadas durante 10 min cada una en tres días consecutivos. En la fase de habituación, se permite al animal explorar su ambiente en ausencia de objetos. Para esta Tesis Doctoral, utilizamos una caja de 39x39 cm, con fondo blanco. El siguiente día, en la fase de familiarización, se introducen en la caja dos objetos idénticos en el lado opuesto de la caja por el que se introduce al ratón, exactamente a la misma distancia. De nuevo, se permite al ratón explorarlos durante 10 min. Finalmente, al tercer día en la fase de prueba, uno de los dos objetos usados el día anterior es sustituido por otro diferente en forma, tamaño y color.



Fig. 17. "NOR". De izquierda a derecha, fase de habituación, fase de familiarización y fase de prueba. Cada una con una duración de 10 min de exposición, y realizadas a lo largo de tres días consecutivos.

Consideramos como "tiempo de exploración" el que la cabeza del ratón se aproximase al objeto en un radio de 1 cm. Además, fuimos alterando la posición del objeto nuevo de manera aleatoria en cada experimento (Broadbent *et al.*, 2009). Realizamos el registro de los tiempos con la herramienta "MouBeAT" para Fiji-ImageJ (Bello-Arroyo *et al.*, 2018) para automatizar el análisis y evitar así el sesgo y error humano.

Analizamos la preferencia del objeto nuevo respecto al familiar con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Discriminación (ID)} = \frac{\% T \text{ objeto nuevo} - \% T \text{ objeto familiar}}{\% T \text{ objeto nuevo} + \% T \text{ objeto familiar}}$$

Los valores por encima de 0 indicarían preferencia de los ratones por explorar el objeto nuevo frente al familiar, y al contrario cuando el resultado es negativo.

Como control, analizamos también los vídeos correspondientes a la fase de habituación (prueba conocida como "*open field*" o campo abierto), para establecer valores como la velocidad o la ansiedad de cada ratón del estudio, que pudieran alterar los resultados del mismo.

2.3.2 Cortes de cerebro

Tras realizar los correspondientes estudios de comportamiento, los animales se anestesian (pentobarbital 30%, 1 μ L/gr peso de ratón) por vía intraperitoneal. Una vez comprobado que no existe reflejo en las extremidades, se realiza una incisión en la pared costal y el diafragma hasta dejar el corazón expuesto. Se perfunde PBS a través de la aorta ascendente con la ayuda de una bomba de perfusión, pinchando el ventrículo izquierdo y realizando una pequeña incisión en la orejuela de la aurícula derecha para permitir la salida del flujo sanguíneo al exterior. Para asegurar que la perfusión ha sido correcta, se comprueba la coloración del hígado, observando cómo va perdiendo color paulatinamente. Una vez terminada la perfusión, se decapita al ratón para extraer el cerebro, que se fija por inmersión en PFA al 4% durante dos días. Transcurrido ese tiempo, se cambia a solución de sacarosa al 30% en PB 0,1 M otros dos días más para crioproteger el tejido, pasándolo finalmente a solución anticongelante para su almacenamiento a -20°C en el congelador.

Una vez recopiladas y congeladas todas las muestras del estudio las llevamos al Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la Facultad para su procesamiento. Los cortes coronales seriados de los bloques congelados los realizó la Dra. Nuria García-Magro en un micrótopo de deslizamiento (Leica SM2400, Leica Biosystems, Nussloch, Alemania), con un espesor de 40 μm cada uno.

3. Registro de corrientes nicotínicas y capacitancia de membrana en CCH

3.1. La técnica de "patch-clamp"

Para el estudio y disección de las diferentes **corrientes nicotínicas** (I_{nic}) empleamos la técnica electrofisiológica de "patch-clamp" (Hamill *et al.*, 1981), en la que se introduce la célula de estudio en un circuito eléctrico conectado a un amplificador (modelo EPC-10 USB, controlado por el programa PatchMaster; ambos de HEKA Elektronik, Alemania).

Según la Ley de Ohm:

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

en la modalidad "**fijación de voltaje**" (VC, del inglés *voltage-clamp*), en la que se le indica al amplificador que mantenga fijo el voltaje del circuito, cualquier cambio que se produzca en la resistencia (R) (que corresponderá con la apertura y cierre de canales iónicos y/o receptores de membrana de la célula), se verá reflejada en cambios en la intensidad de la corriente (I).

Para los experimentos de esta Tesis Doctoral, fijamos el voltaje a -60 mV, ya que es el potencial de membrana en reposo (RMP) medio de las CCH, descrito anteriormente en nuestro laboratorio (Hernández-Vivanco *et al.*, 2017). En esta situación ante un estímulo nicotínico, los principales canales iónicos regulados por voltaje se encuentran cerrados y por lo tanto, la corriente registrada se deberá al paso de iones a través del ionóforo de los receptores nicotínicos.

Para la ejecución de la técnica de "patch-clamp", se acerca a la célula de estudio un electrodo conectado al amplificador, inmerso dentro de una pipeta rellena con solución intracelular. Estas pipetas se fabrican a partir de capilares de borosilicato con ayuda de un estirador horizontal (P97, Sutter Instruments, Novato CA, USA) (**Fig. 18A**), y cuya punta, de aproximadamente 1 μm de diámetro, se pule en una microforja (MF-830 Narishige, Japón) para evitar dañar la membrana celular y limpiar además la superficie de vidrio de cualquier impureza (**Fig. 18B**).

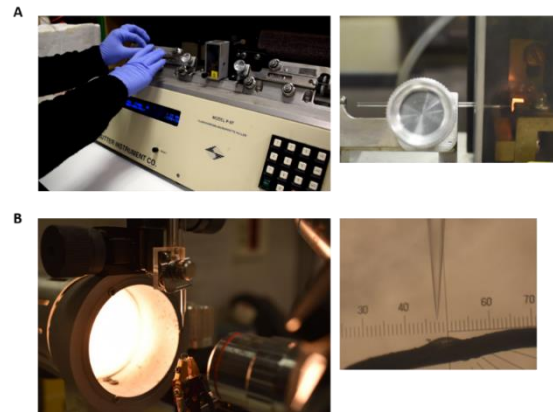


Fig. 18. Fabricación de micropipetas de *patch-clamp*. **A.** Estirador de capilares de borosilicato y ampliación de la cubeta, donde el filamento incandescente hace que el cristal se funda a la temperatura seleccionada, a la vez que los acoples donde va fijado el capilar se van separando también a la velocidad indicada, para cada tipo de punta. **B.** Microforja para el pulido de la punta y punta de micropipeta de *patch-clamp* (aumento 10X).

Una vez la pipeta hace contacto con la membrana celular, se aplica una succión suave para formar un sello de alta resistencia (superior a $1\text{ G}\Omega$), que reduce el ruido del registro (solo admitimos aquellos sellos con fuga de iones por debajo de 20 pA) y aísla eléctricamente el parche de membrana sellado. Esto permite registrar las corrientes que fluyen por los canales localizados en el parche de membrana que se encuentra pinzado en la pipeta. Para tener acceso a la totalidad de la membrana y no solo a los canales y receptores que haya en el parche, se pone en contacto la solución interna de la pipeta con el interior de la célula, perforando para ello el parche pinzado. Es lo que se conoce como configuración de **parche perforado** (Horn y Marty, 1988). Es una modalidad menos invasiva que otras configuraciones como la de "célula entera" (en la que se rompe completamente el parche aplicando más succión), lo que permite obtener registros más estables y de mayor duración (Korn y Horn, 1989). Esta configuración se obtiene al incluir en la solución interna de la pipeta anfotericina B, un agente antifúngico que difunde dentro de la membrana fijada creando pequeñas perforaciones que proveen acceso eléctrico al interior de la célula, pero que no permiten la fuga de metabolitos o segundos mensajeros a su través.

Para los experimentos de esta Tesis Doctoral, registramos las corrientes nicotínicas con una frecuencia de muestreo de 1 kHz y utilizamos un filtro *Bessel* a 10 kHz . Compensamos la resistencia en serie electrónicamente entre un 60-80%.

Como medida indirecta de **exocitosis**, realizamos también registros de la **capacitancia eléctrica de la membrana celular (C_m)**. La membrana plasmática actúa como un condensador, aislando dos superficies conductoras (citosol y solución extracelular del baño) y como tal es capaz de almacenar carga. Esta capacidad es directamente proporcional a la superficie del condensador, en el caso de la célula pues, un aumento en la superficie como el que ocurre de manera transitoria cuando las vesículas secretoras se fusionan con la membrana plasmática durante la exocitosis, se verá reflejado como un aumento en la capacitancia (Neher y Marty, 1982). Para registrar estos cambios, utilizamos la técnica desarrollada por (Lindau y Neher, 1988), incluida en la herramienta "Sine+DC" del software *lock-in* de PatchMaster. Para ello, se aplica una onda sinusoidal de voltaje a la membrana, de una amplitud de 70 mV de pico a pico, a 1 kHz de frecuencia sobre el potencial de fijación.

3.2. Protocolos y tratamientos

Para la realización de los experimentos, las células sembradas en cubreobjetos de cristal se introducen en la camarilla situada en la platina del equipo y se perfunden de manera continua con solución extracelular a través de una pipeta de lavado (un tubo de polietileno situado a unos 10 μm de la célula de interés con un flujo continuo de unos 850 $\mu\text{L}/\text{min}$). El nivel de la solución del baño se mantiene estable durante los experimentos gracias a la acción de una bomba de succión acoplada a un sistema de fibra óptica (SEGAINVEX, UAM, Madrid), que controla el volumen de líquido de la camarilla.

Los pulsos de los diferentes agonistas se aplican usando un controlador de electroválvulas (SEGAINVEX, UAM, Madrid) accionado por el amplificador, a través de una pipeta multicanal de fabricación casera. En esta pipeta de 5 vías, cada solución viaja por su propio canal, evitando así la mezcla de agonistas. Para asegurar el intercambio rápido de soluciones y prevenir la desensibilización de los nAChRs por la acción de los distintos agonistas, la punta de esta pipeta se sitúa lo más cerca posible de la célula de estudio y justo detrás de la misma se coloca la pipeta de lavado (**Fig. 19B**).

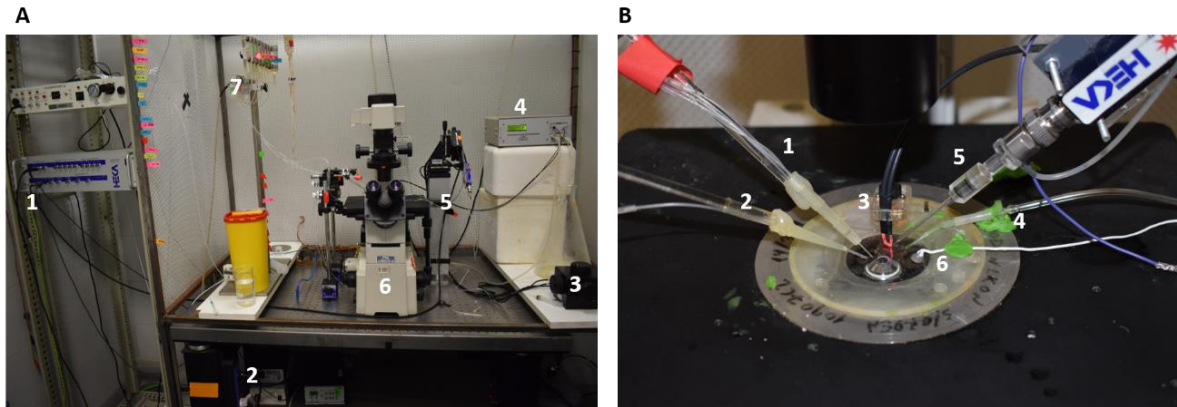


Fig. 19. A. Equipo completo electrofisiología: 1. Amplificador HEKA EPC-10 USB; 2. Controlador de electroválvulas SEGAINVEX; 3. Micromanipulador Burleigh; 4. Controlador de fluido SEGAINVEX; 5. Preamplificador HEKA y macromanipulador Burleigh PCS 5000 series; 6. Microscopio invertido Nikon eclipse TE2000-S; 7. Electroválvulas The Lee Co. Todo ello colocado sobre una mesa antivibratoria y rodeado por una jaula de Faraday, para aislar el equipo. **B. Ampliación del baño:** 1. Pipeta multicanal de agonista; 2. Pipeta de lavado; 3. Fibra óptica del nivel del baño; 4. Succionador del controlador de fluido; 5. Soporte del electrodo; 6. Toma de tierra del electrodo.

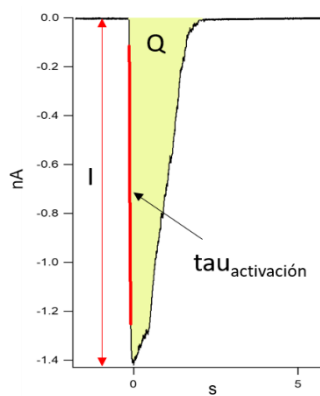
Utilizamos diferentes protocolos y tratamientos para llevar a cabo los experimentos de electrofisiología de esta Tesis Doctoral:

- **Potenciación:** Para mimetizar la estimulación esplácnica fisiológica sobre las CCH, llevamos a cabo un protocolo consistente en la aplicación sucesiva de pulsos de ACh a 300 μ M, concentración a la que se alcanza la mayor amplitud de corriente nicotínica en estas células (Hone *et al.*, 2017), de 500 ms de duración cada 90 s.
- **Desensibilización:** En distintos experimentos, quisimos comprobar la contribución del subtipo $\alpha 7$ a la actividad nicotínica de las CCH. Para ello, aplicamos pulsos sucesivos de Chol 3 mM, lo que reduce la actividad del mismo en más de un 50% (*ver Resultados*).
- **Bloqueo:** Para bloquear $\alpha 7$ -nAChR utilizamos la α -Ctx ArIB a una concentración de 100 nM (Whiteaker *et al.*, 2007; Hone *et al.*, 2010). La toxina se perfunde a través de la pipeta de lavado en lugar de la solución extracelular 5 min antes de comenzar el experimento y durante la realización del mismo de manera continua.
- **0 Ca²⁺:** Para evaluar la participación del Ca²⁺ en los distintos procesos que se estudian en esta Tesis, en algunos experimentos sustituimos la solución extracelular por otra sin Ca²⁺ y con EGTA 5 mM como quelante. En este caso, la

solución de 0 Ca^{2+} se perfunde 20 s antes de cada pulso, durante el pulso y 20 s después. Los agonistas aplicados en estos experimentos, también se disuelven en la misma solución libre de Ca^{2+} .

3.3. Análisis de corrientes nicotínicas

Para el análisis de los diferentes experimentos de electrofisiología, utilizamos el programa IgorPro (WaveMetrics, OR, USA) con el que determinamos los siguientes parámetros (**Fig. 20**):



- Corriente al pico (**I**): medida de la amplitud de la corriente (pA).
- Carga (**Q**): obtenida tras integrar el área bajo la curva de la corriente (pC).
- Activación (**tau_{act}**): ajuste de la activación de la corriente desde t10% a t90% a una exponencial (s).

Fig. 20. Análisis de corriente nicotínica.

4. Medida de la expresión e interacción de los nAChRs por fluorescencia

4.1. Células aisladas

4.1.1 Pretratamientos

Para los estudios de fluorescencia, aplicamos a las células sembradas en cubreobjetos los distintos tratamientos anteriormente descritos: potenciación, desensibilización, bloqueo, retirada de Ca^{2+} , etc.

Además, para evaluar la posible regulación de los nAChRs por procesos de fosforilación y desfosforilación sobre distintos residuos aminoacídicos, llevamos a cabo un estudio utilizando diferentes herramientas farmacológicas:

- Evaluación de la fosforilación sobre residuos de serina o treonina (Ser/Thr): Los compuestos utilizados para esta parte del estudio tienen como diana la fosfatasa PP2A, y se incuban durante 24 h a 37°C.
 - Ácido okadaico (AO) (5 nM): inhibidor de PP2A, lo que promueve la fosforilación en Ser/Thr.
 - Compuesto ITH12680 (10 μM), cedido por el Dr. Cristóbal de los Ríos (Laboratorio 8 del Departamento de Farmacología de la UAM): activador de PP2A (Arribas *et al.*, 2020), lo que promueve la desfosforilación de residuos de Ser/Thr.
- Evaluación de la fosforilación sobre residuos de tirosina (Tyr): Para esta tanda de experimentos utilizamos fármacos con distintas dianas incubados durante 40 min a 37°C (Charpantier *et al.*, 2005):
 - Pervanadato (50 μM): inhibidor de la tirosina-fosfatasa (Tyr-P), lo que promueve la fosforilación en residuos de Tyr.
 - Genisteína (100 μM): inhibidor de la tirosina-quinasa (Tyr-K), lo que promueve la desfosforilación de residuos de Tyr.

Inmediatamente después de cualquier tratamiento, las placas con los cubreobjetos se introducen en hielo para interrumpir todo proceso celular.

4.1.2 Protocolo de marcaje

Tras tratar las células con los diferentes protocolos de interés, las células sembradas en cubreobjetos se fijan rápidamente con PFA al 2% en hielo durante 15 min. Tras lavar

3 veces con PBS, las células se incuban con distintas toxinas selectivas unidas a un fluoróforo para detectar su expresión: para marcar $\alpha 7$ -nAChRs utilizamos α -Bungarotoxina unida a un Alexa 488 (**BgTx-488**) comercial (Molecular Probes), y BuIA(T5A,P60) unida a Cy3 (**BuIA-Cy3**) para marcar subunidades $\beta 4^*$ (Azam *et al.*, 2010). Ambas toxinas se diluyen a 300 nM en una solución con albúmina de suero bovino (BSA) 0,1 mg/mL para bloquear los sitios de unión no específicos, así como un cóctel de inhibidores de proteasas (leupeptina, pepstatina A y aprotinina, todos a 0,1 μ g/mL) para prevenir la degradación del fluorocromo. Las células se incuban en esta solución durante 40 min a 4°C. Como control negativo del experimento, algunos cubreobjetos se preincuban con BgTx y BuIA 10 μ M sin fluoróforo.

En los experimentos de nHP, realizamos algunos pasos adicionales a la incubación de las toxinas: el marcaje diferencial de las neuronas utilizando un anticuerpo específico, y el bloqueo selectivo de los $\alpha 6\beta 4$ -nAChRs presentes en el hipocampo (Azam *et al.*, 2010; Hone *et al.*, 2021), a los que de otro modo se uniría la BuIA-Cy3. Tras lavar el PFA de la fijación, los cubreobjetos se tratan con el detergente Tritón X-100 (TX-100) al 0,1% durante 15 min para permeabilizar la membrana celular. Sin lavar, los cubreobjetos se incuban en una solución compuesta por 2% de BSA y TX-100 0,1% durante 30 min. Finalmente, las células se incuban hasta el día siguiente a 4°C con un anticuerpo de conejo para la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2, 1:500), específica de neuronas. Pasadas 24 h, y tras varios lavados con PBS, las nHP se incuban con la solución de bloqueo con las toxinas con fluoróforo antes descrita, a la que se le añade el anticuerpo secundario anti-conejo unido a Alexa 647 (rb-647, 1:500), así como la toxina selectiva PeIA-5667 (10 μ M) para bloquear los $\alpha 6\beta 4$ -nAChRs (Hone *et al.*, 2021).

Finalmente, tras una incubación corta (5 min) con la sonda nuclear Hoechst 33342 (1:2.500), los cubreobjetos se aclaran secuencialmente en agua destilada, etanol de 96°, y finalmente se dejan secar al aire. Una vez secos, los cubreobjetos se montan sobre portaobjetos limpios, con una gota del medio de montaje ProLong Gold (Invitrogen).

4.1.3 Adquisición de imágenes

Realizamos la inspección visual y adquisición de imágenes en el Laboratorio de Microscopía Confocal del Servicio Interdepartamental de Investigación de la UAM (SidI) utilizando un microscopio confocal espectral Leica TCS SP5.

Por cada cubreobjetos seleccionamos aleatoriamente entre 5 y 10 campos (dependiendo del experimento y densidad celular en cada cubreobjetos), en los que realizamos 4 capturas secuenciales, con el fin de evitar el posible cruce de fluorescencia: para la fluorescencia de Alexa555 (láser DPSS 561 nm), Alexa488 (láser de argón 458-514 nm), Alexa647 (láser de helio-neón 633 nm) y DAPI/Hoechst (láser de diodo azul 405 nm). Adquirimos las imágenes con un objetivo de 63X/1.4-0.6 en un solo plano medial de cada célula en el caso de las CCH o en 5 planos en el caso de las nHP.

4.1.4 Análisis de imágenes

Determinamos la **expresión** de los diferentes subtipos de nAChRs midiendo la densidad integrada (*IntDen*, el producto del área por el valor medio de grises) de cada uno, usando la herramienta "*Measure > IntDen*" del programa FIJI-ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012), en imágenes de alta resolución (1024x1024).

En el caso de las nHP, cuantificamos la *IntDen* de los marcadores en las imágenes resultado de la proyección máxima de los 5 planos adquiridos. Realizamos el análisis por criterio de proximidad al mapa del árbol dendrítico definido por el marcador MAP2, así como de exclusión del núcleo definido por Hoechst (**Fig. 21A**). Para ello, ambas imágenes primero se transforman en binarias, después se resta a la máscara resultante de MAP2 la correspondiente al núcleo y finalmente se mide la *IntDen* de cada subtipo que esté contenida dentro del área de esta última imagen resultado (**Fig. 21B**)

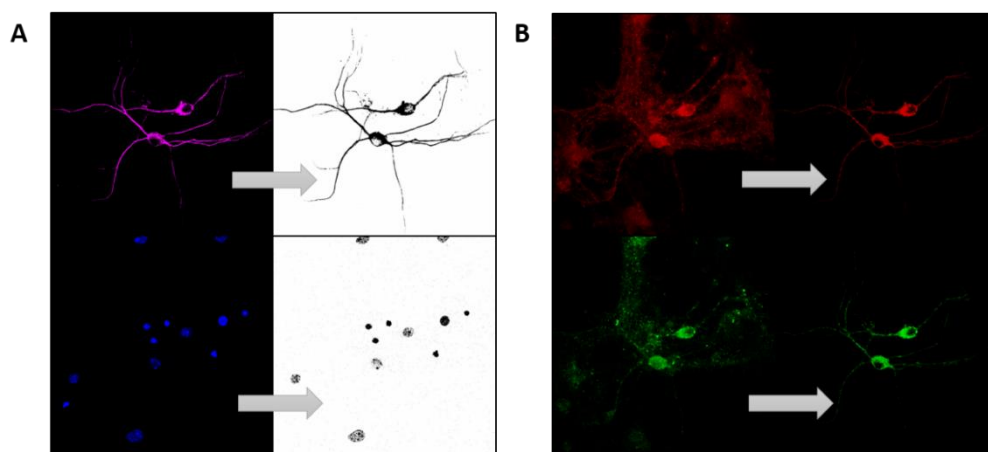


Fig. 21. Tratamiento de las imágenes de fluorescencia para su análisis. **A.** Conversión de las imágenes correspondientes al citoplasma y núcleo de las nHP en máscaras binarias. **B.** Sustracción de la máscara a las imágenes originales del canal rojo (BuIA-546) y verde (BgTx-488) con el objetivo de cuantificar los nAChRs expresados únicamente en neuronas.

Para estudiar la **colocalización** de los distintos subtipos de nAChRs, utilizamos el complemento para FIJI-ImageJ Colocalization Colormap, basado en un algoritmo descrito por primera vez por Jaskolski y colaboradores en 2005. Este método mide la correlación de intensidad entre pares de píxeles individuales en dos canales diferentes en formato de 8 bit (**Fig. 22**). Para este análisis, utilizamos imágenes de un único plano medial, tanto de las CCH como de las nHP.

Los resultados se presentan como un mapa de colocalización por colores, donde colores cálidos representan correlación positiva (colocalización), mientras que los colores fríos representan correlación negativa (exclusión).

Además, calcula el índice nMDP (*normalized mean deviation product*), que representa matemáticamente la correlación de la intensidad entre píxeles pareados de las dos imágenes (valores que oscilan entre -1 y 1), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$nMDP = \frac{(A_i - \bar{A})(B_i - \bar{B})}{(A_{max} - \bar{A})(B_{max} - \bar{B})}$$

Donde A_i , \bar{A} y A_{max} son la intensidad de un píxel concreto en la imagen A, la intensidad media de la imagen A y la intensidad máxima de la imagen A, respectivamente; y lo mismo para la imagen B.

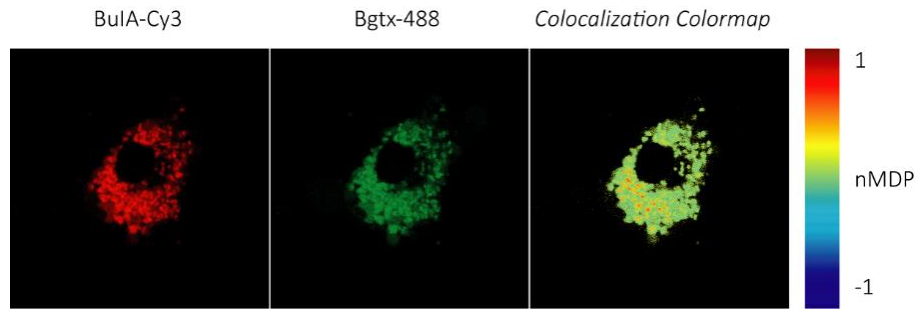


Fig. 22. Análisis de colocación de marcadores en una CCH con la herramienta *Colocalization Colormap*. Los píxeles pareados en el canal rojo y verde, se representan como un mapa de color, donde colores más cálidos indican una mayor colocación.

4.1.5 Medida de interacción física entre subtipos de nAChRs

Para establecer la posible interacción física entre los distintos subtipos de nAChRs utilizamos la técnica de FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*), que se basa en la transferencia de energía entre dos fluorocromos (donador y aceptor), donde el donador excitado transfiere parte de su energía de resonancia al aceptor (Förster, 1948). Para que esta reacción se produzca, se requieren dos condiciones indispensables: i) los dos fluorocromos deben encontrarse a una distancia de entre 10 y 100 Å (Hevekerl *et al.*, 2011); y ii) los espectros de emisión del donador y de excitación del aceptor deben solapar en el espectro de la luz. En base a este fundamento, la destrucción del aceptor producirá un incremento en la fluorescencia emitida por el donador, que no tiene a quién transferir su energía (**Fig. 23**)

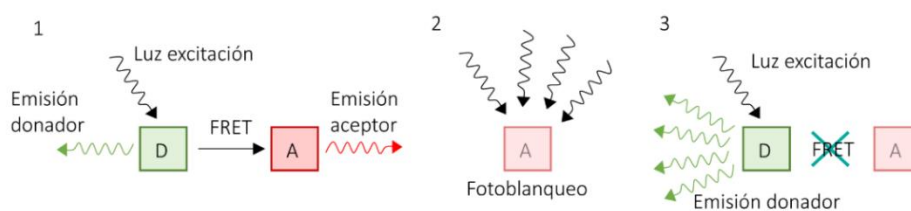


Fig. 23. Técnica de FRET. Esquematización de la modalidad de *Acceptor Photobleaching*, en la que se mide la diferencia de emisión del donador antes (1) y después (3) de la fotodestrucción del aceptor (2).

Para analizar mediante FRET la posible interacción entre $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ en CCH, los marcamos con BgTx-488 4 veces más concentrada (1,2 μM) que BuIA-Cy3 (300 nM), y utilizamos la modalidad de "*Acceptor Photobleaching*" del programa *LAS AF-FRET Acceptor Bleaching* (Leica). En esta modalidad, se captan imágenes confocales antes y después de destruir el aceptor por fotoblanqueo en una región concreta de la célula

(ROI) por medio de 15-20 pulsos del láser DPSS de 561 nm al 75% de potencia (hasta que el aceptor esté “blanqueado” al menos al 80%) (**Fig. 24**).

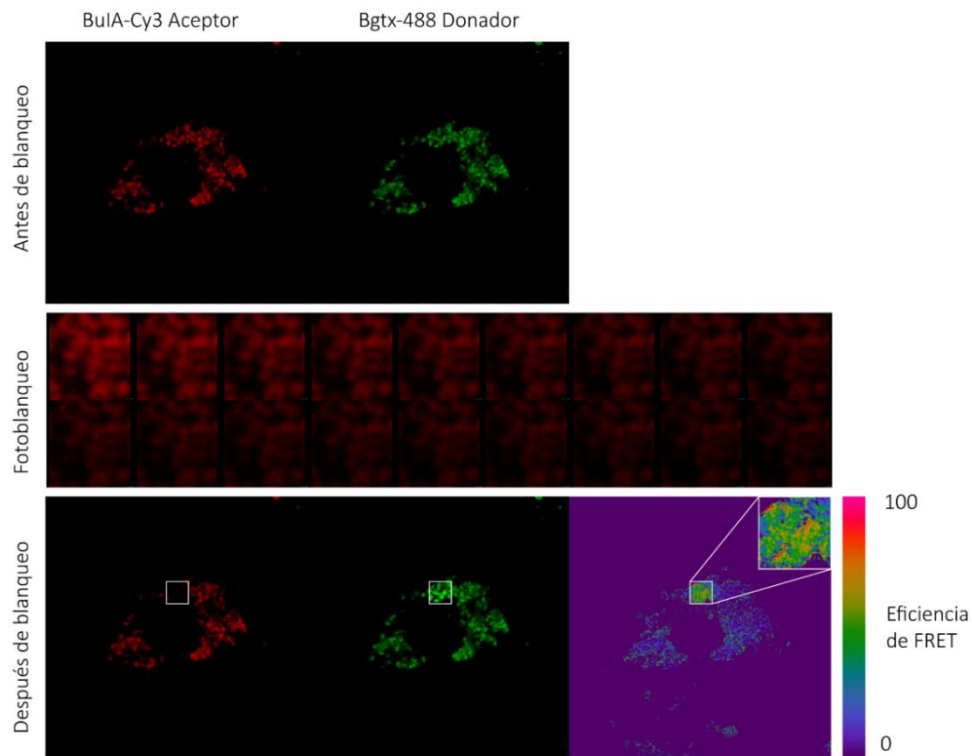


Fig. 24. Técnica de FRET en imágenes. Imágenes originales de FRET en una CCH, antes, durante y después del fotoblanqueo de un ROI.

La eficiencia de FRET que registra el programa se calcula con la siguiente fórmula:

$$FRET_{ef} = 1 - \frac{D_{pre}}{D_{post}}$$

Donde D_{pre} y D_{post} representan la fluorescencia de excitación del donador, antes y después del fotoblanqueo, respectivamente.

4.2. Cortes de tejido

4.2.1 Protocolo de marcaje

El marcaje de los cortes de cerebro para la visualización de la expresión de los receptores $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ en hipocampo lo realizó la Dra. Nuria García-Magro del Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la UAM. Todos los pasos del protocolo se realizan en flotación libre, y las incubaciones en agitación suave.

Brevemente, los cortes se lavan 3 veces durante 5 min cada uno a temperatura ambiente (RT): primero en PB 0,1 M y dos veces más en PBS 0,02 M. Tras los lavados, los cortes se pasan a Solución de Pre-incubación (0,1% TX-100, 10% suero de cabra en PBS) durante 1 h a RT, y se incuban durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario MAP2 (1:500) en esta misma solución. Al día siguiente y tras 3 lavados de 5 min cada uno en PBS, los cortes se incuban con el anticuerpo secundario rb-647 (1:500), las α -Ctx fluorescentes BgTx-488 (100 nM), BuIA-546 (100 nM) y la α -Ctx PeIA (10 μ M) para bloquear $\alpha 6^*$, durante 1 h a RT; y tras un lavado con PBS, en Hoechst (1:2.500) durante 5 min más. Finalmente, los cortes se lavan 2 veces en PB 0,1 M y se estiran sobre los portaobjetos (previamente gelatinados) sumergidos en PB 0,1 M $\frac{1}{3}$. Una vez secas, las preparaciones se montan con ProLong Gold y cubreobjetos de cristal.

4.2.2 Adquisición de imágenes

Para la inspección visual y adquisición de imágenes de tejido utilizamos también el microscopio confocal espectral Leica TCS SP5 del Laboratorio de Microscopía Confocal del SidI (UAM).

En este caso, por cada corte de cerebro tomamos imágenes de 3 áreas de interés del hipocampo: CA1, CA3 y GD. En cada una de ellas, realizamos 4 capturas secuenciales (una por cada canal), para evitar el posible cruce de fluorescencia.

Adquirimos primero imágenes globales del tejido con el objetivo 20X/0.7, y con el objetivo 40X/1.25-0.75 realizamos las capturas para el análisis de las áreas concretas, en ambos casos de 10 secciones cada una.

4.2.3 Análisis de imágenes

Como en el análisis de las neuronas aisladas, en los cortes de tejido usamos las imágenes correspondientes al citoplasma de las neuronas (MAP2) y del núcleo (Hoechst) para crear máscaras de inclusión y exclusión, respectivamente. De la misma manera, utilizamos la herramienta *Measure>IntDen* del programa FIJI-ImageJ para cuantificar la fluorescencia y *Colocalization Colormap* para establecer el índice de colocalización de marcadores.

5. Anál isis estadístico

El número de datos "n" hace referencia al número de células o experimentos, así como "N" al número de pacientes, cultivos de nHP o ratones, indicado en cada experimento individual. Realizamos cada experimento al menos en 5 pacientes, series de neuronas embrionarias o ratones. Expresamos los datos como media \pm error estándar de la media (SEM). Al no tener unidades, normalizamos los datos de fluorescencia (*IntDen*) respecto a la media de los controles de cada experimento, dando los resultados como "número de veces respecto al control".

Para el análisis estadístico y las gráficas correspondientes, utilizamos el programa GraphPad Prism 7 (La Jolla, CA, USA). El análisis comparativo entre dos grupos lo realizamos mediante el test t de Student cuando la distribución de la muestra fue normal, o U de Mann Whitney cuando no lo fue; así como los correspondientes test pareados (t Student pareado, Wilcoxon) cuando los experimentos se realizaron sobre la misma célula. En el caso de comparaciones múltiples, utilizamos el análisis de la varianza ANOVA, seguido de un análisis post-hoc utilizando el test LSD de Fisher en muestras con distribución normal; o el test de Kruskal-Wallis seguido de un test de Dune en caso contrario.

Creamos la base de datos de los pacientes para el análisis poblacional con el programa SPSS *Statistics* 18 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Analizamos las posibles diferencias mediante correlación de Pearson cuando la muestra tenía distribución normal o con *rho* de Spearman en caso contrario.

Aceptamos las diferencias como significativas con un valor p inferior a 0,05 (indicado con un asterisco, (*), 0,01 (**), 0,001 (***) y 0,0001 (****)). Mostramos todos los datos de los experimentos individuales en forma de punto en las gráficas.

RESULTADOS

Resultados previos en nuestro grupo habían descrito: la presencia de transcritos de $\alpha 7$, $\alpha 3$ y $\beta 4$ (así como otras subunidades accesorias) en CCH (Hone *et al.* 2015), que $\alpha 7$ formaba un receptor funcional, aunque no participase en procesos de exocitosis (Pérez-Alvarez *et al.*, 2012a), y que el subtipo que más contribuía a la corriente nicotínica y a la exocitosis evocada por ella, era $\alpha 3\beta 4$ (Pérez-Alvarez *et al.*, 2012b; Hone *et al.*, 2017). Sin embargo, permanecía sin explorar la posibilidad de cooperación entre ambos subtipos, así como el efecto de modulación que ésta interacción podría tener sobre ellos. Diseñamos los siguientes experimentos para dar respuesta a esas cuestiones.

1. Incremento de I_{nic} por estimulación sucesiva

Para mimetizar la actividad de los nAChRs en la situación más fisiológica posible, estimulamos las CCH por pulsos sucesivos de ACh (300 μ M, 500 ms/ 90 s) y registramos las corrientes resultantes mediante la configuración de parche perforado de la técnica de “*patch-clamp*” en su modalidad de fijación de voltaje ($V_h = -60$ mV).

Este protocolo dio como resultado la **potenciación de la corriente nicotínica** tanto en amplitud (I_{ACh}) como en carga (Q_{ACh}), hasta llegar al efecto máximo en el pulso $7,1 \pm 1,1$ ($n=29$) (**Fig. 25A**). Los valores iniciales de I_{ACh} fueron de $813,1 \pm 103,4$ pA en el primer pulso y de $1638 \pm 167,8$ pA tras las 7 aplicaciones sucesivas de ACh, lo que representa un incremento de $2,1 \pm 0,2$ veces respecto a la corriente inicial. Observamos un incremento similar en la Q_{ACh} , cuyos valores ascendieron de $892,2 \pm 176$ pC a $1976 \pm 318,7$ pC, es decir, $2,5 \pm 0,3$ veces más respecto a la carga inicial (**Fig. 25B**). Para descartar que estos resultados pudieran ser un artefacto debido a la técnica de parche perforado (en la que hay que esperar que el agente antifúngico, en este caso la anfotericina B, haga su efecto creando poros en la membrana permitiendo así el acceso eléctrico a toda la célula), llevamos a cabo un registro de la resistencia en series al inicio y al final del experimento. Estos valores variaron de $17,7 \pm 3$ a $16,3 \pm 2$ M Ω , indicando que el acceso a la célula fue prácticamente el mismo durante todo el experimento, lo que nos permitió descartar esa posibilidad.

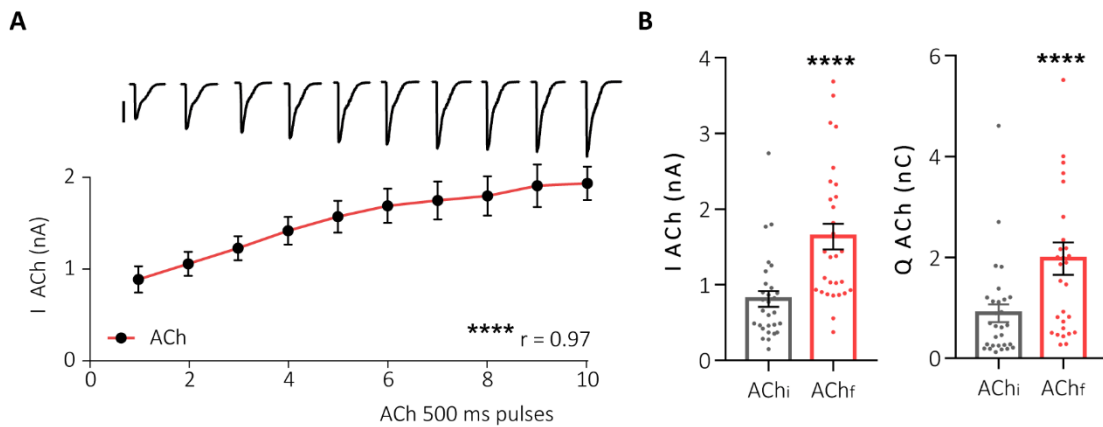


Fig. 25. A. Pulsos sucesivos de ACh incrementan la I_{nic} . **A.** Representación del incremento de la corriente nicotínica en CCH tras 10 pulsos de ACh de 500 ms/ 90s (Pearson, n=29). En la parte superior, registros originales representativos de cada pulso (escala 500 pA) **B.** Incremento de la corriente al pico y la carga desde el primer pulso (ACh_i , gris) al último (ACh_f , coral) (test de Wilcoxon para muestras pareadas, n=29). **** $p < 0,0001$.

Otro de los aspectos que observamos con este protocolo, fue la **disminución del tiempo de activación** de las corrientes con cada pulso sucesivo, como puede verse en la **Fig. 26A**. Medimos este parámetro cinético ajustando la activación de la corriente a una exponencial para hallar la *tau* de activación de cada pulso, y vimos que esta constante disminuía significativamente a lo largo del protocolo de potenciación (**Fig. 26B**).

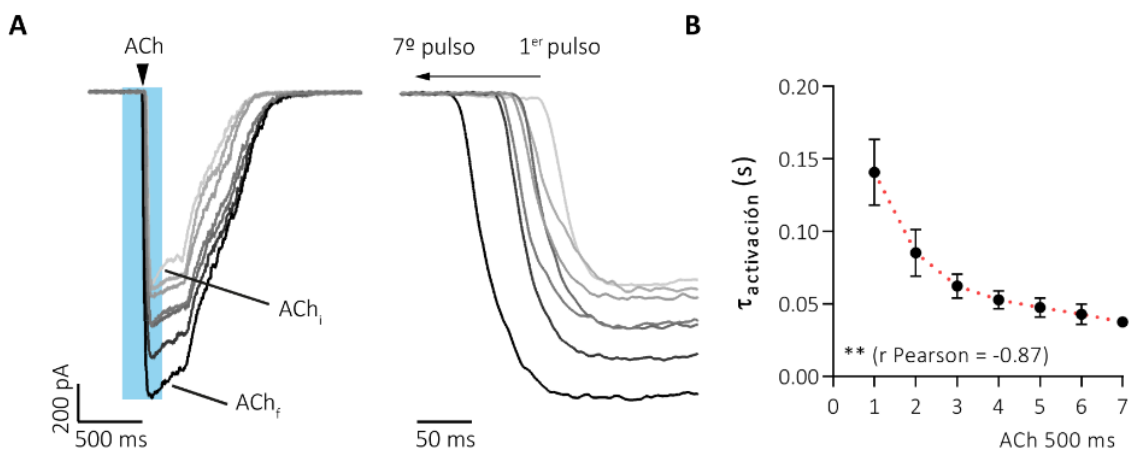


Fig. 26. A. Disminución del tiempo de activación de la I_{nic} . **A.** Registros superpuestos de 7 pulsos de ACh, representados en colores más oscuros según va aumentando el número de pulso y ampliación de la zona sombreada en azul, que corresponde a la activación de la corriente. **B.** Disminución progresiva del tiempo de activación la corriente con cada pulso de ACh (Correlación negativa de Pearson, n=29). ** $p < 0,01$.

2. Modulación recíproca de la actividad $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$

2.1 Incremento de la corriente $\alpha 7$ por estimulación sucesiva con ACh

A la luz de los resultados que obtuvimos en CCH en Fig. 26, en los que se producía un adelanto en la activación de la corriente con cada nuevo pulso, consideramos la posibilidad de que este fenómeno pudiera deberse a la contribución de receptores del subtipo $\alpha 7$, conocidos por su papel crucial en la transmisión sináptica rápida (Zhang *et al.*, 1996; Ullian *et al.*, 1997; Alkondon *et al.*, 1998; Frazier *et al.*, 1998). Para evaluar esta hipótesis, aplicamos pulsos de Chol (3 mM, 500 ms/90 s), agonista de $\alpha 7$ -nAChRs para registrar la actividad de este receptor antes y después del protocolo de potenciación con ACh.

En primer lugar, comprobamos la actividad *per se* del $\alpha 7$ -nAChR, tras pulsos sucesivos únicamente de Chol. Como puede verse en la **Fig. 27A**, la estimulación evocó un primer pico de corriente con cinética de activación e inactivación muy rápida (del orden de ms) que corresponde a la activación total de $\alpha 7$, y un segundo componente más lento debido a la activación parcial de receptores de tipo no- $\alpha 7$ (Pérez-Alvarez *et al.*, 2012a). Además, tras su estimulación por pulsos sucesivos, se produjo la desensibilización del $\alpha 7$ -nAChR, siendo la corriente inicial media de $164,2 \pm 38,4$ pA y la final $60,3 \pm 12,6$, lo que representa una disminución del $51,5 \pm 13,8\%$ en solo tres pulsos (n=11) (**Fig. 27C** "Control").

Sin embargo, aplicando en este experimento el protocolo de potenciación anteriormente descrito, consistente en la estimulación por pulsos sucesivos de ACh (**Fig. 27B**), la corriente evocada por un pulso final de Chol mostró que los $\alpha 7$ -nAChRs al haber sido co-estimulados junto con los $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs no solamente no se desensibilizaron, sino que además su actividad se vio potenciada 2,84 veces respecto a la corriente inicial ($242,2 \pm 78,7$ pA a $689,5 \pm 119,1$, n=26) (**Fig. 27C** "ACh⁺").

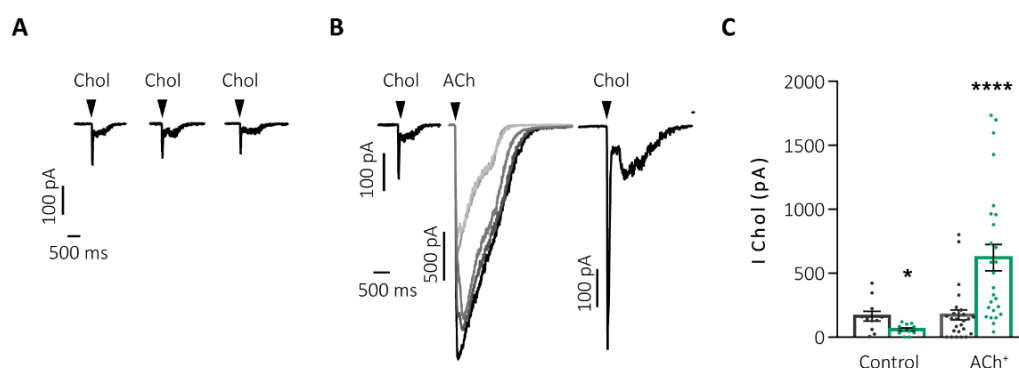


Fig. 27. El $\alpha 7$ -nAChR requiere la activación de los $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs para evitar su desensibilización e incrementar su actividad. **A.** Registros representativos de corrientes de Chol tras estimulación sucesiva por pulsos de 500 ms/90s. **B.** Corrientes de Chol antes y después del protocolo de potenciación por pulsos sucesivos de ACh (500 ms/90 s ambos agonistas). **C.** Representación gráfica de la corriente al pico inicial (gris) y final (verde) de Chol tras los dos protocolos anteriores: control (A) y potenciación por ACh (ACh⁺, B) (t de Student pareado, n=11; test de Wilcoxon, n=26) *p<0,05; ****p<0,0001.

Para comprobar si este proceso se mantenía con diferentes agonistas, realizamos el mismo protocolo con los agonistas sintéticos PNU282987 (PNU, 30 μ M, agonista $\alpha 7$) y 1,1-dimetil-4-fenilpiperazino (DMPP, 10 μ M, agonista no selectivo), con resultados similares. La aplicación sucesiva de pulsos de PNU dio como resultado la desensibilización del receptor, con valores que disminuyeron de $348,3 \pm 93,3$ a $172,2 \pm 51,4$ pA ($66,6 \pm 8,1$ %, n=20) (**Fig. 28A y C "Control"**), y este fenómeno se previno con la aplicación sucesiva de pulsos de DMPP, lo que incrementó la actividad de $\alpha 7$ -nAChR en 2,8 veces respecto al control (de $256,8 \pm 88,4$ a $720 \pm 123,8$ pA, n=17) (**Fig. 28B y C "DMPP⁺"**).

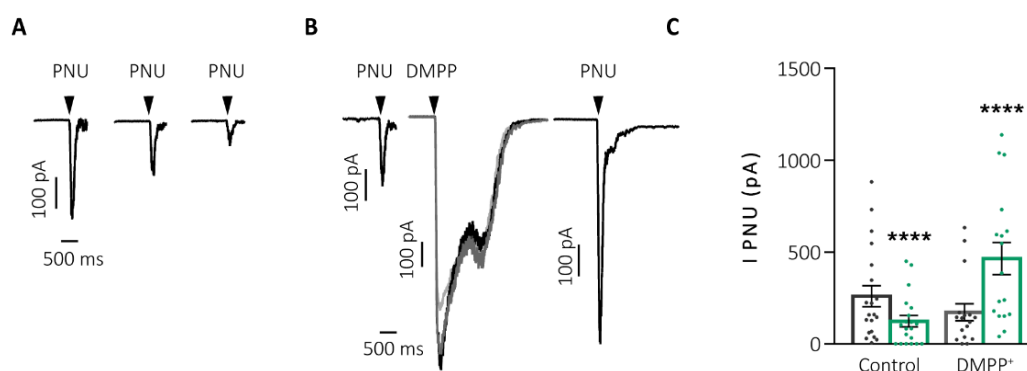


Fig. 28. Caracterización de la potenciación de la I_{nic} y su efecto sobre los $\alpha 7$ -nAChRs con los agonistas sintéticos DMPP y PNU. **A-B.** Repetición del experimento anterior sustituyendo los agonistas Chol y ACh, por PNU282987 y DMPP, respectivamente **C.** Representación gráfica de la corriente al pico inicial (gris) y final (verde) de PNU tras los dos protocolos anteriores: control (A) y potenciación por DMPP (DMPP⁺, B) (test de Wilcoxon, n=20; 17) ****p<0,0001.

Finalmente, quisimos comprobar la efectividad de esa potenciación intercalando un único pulso de ACh en la estimulación por pulsos sucesivos de Chol durante 20 min. Como control realizamos el mismo experimento sin intercalar pulsos de ACh, lo que dio como resultado una reducción de la corriente $\alpha 7$ del 90%; desde $271,9 \pm 49,1$ pA al inicio del experimento a 27 ± 14 pA tras 20 min de estimulación con Chol cada 90 s ($n=16$) (**Fig. 29A**). Esta desensibilización se previno alternando en el protocolo pulsos de ACh (**Fig. 29B**), consiguiendo no solo la potenciación de hasta 3 veces de la actividad $\alpha 7$ (de $305,8 \pm 127$ a $992,3 \pm 354,8$ pA, $n=6$), sino también la potenciación en 1,5 veces de la corriente nicotínica general evocada por los pulsos de ACh (de $1057,6 \pm 255,7$ a $1626,6 \pm 441,3$ pA, $n=6$), de manera correlacionada.

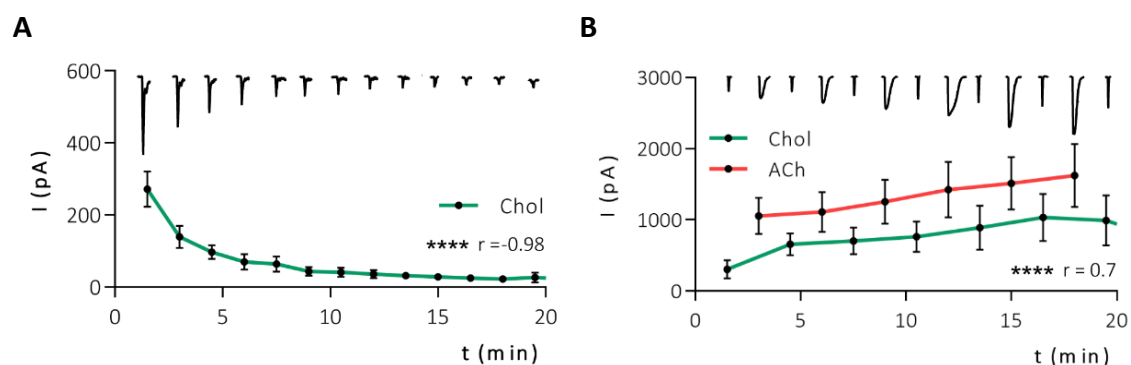


Fig. 29. Cursos temporales de la aplicación de agonistas. A-B. Registros originales de corrientes de Chol y ACh (la escala es la misma que el eje Y de la gráfica) correspondiendo con sus respectivas curvas temporales (Spearman, $n=16$; 6) **** $p < 0,0001$.

Estos resultados sugieren que la activación conjunta del subtipo $\alpha 3\beta 4$ es imprescindible para prevenir la desensibilización de los $\alpha 7$ -nAChRs, lo que habitualmente ocurre, teniendo en cuenta que el agonista fisiológico en las terminales colinérgicas es ACh, agonista no selectivo.

2.2 Modulación de la I_{nic} por los $\alpha 7$ -nAChRs

Teniendo en cuenta el importante efecto que parece tener la co-activación de $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs junto a $\alpha 7$ -nAChRs para la actividad de este último subtipo en CCH, quisimos comprobar si a la inversa también podía observarse; es decir, si la actividad $\alpha 7$ modulaba de alguna manera la actividad $\alpha 3\beta 4$. Para ello, diseñamos dos aproximaciones:

1) Desensibilizar el receptor $\alpha 7$: para ello, como se pudo ver en los paneles A de las Figs. 27 y 29, basta con aplicar pulsos sucesivos de Chol, hasta que el receptor pierde

casi completamente su actividad. Una vez desensibilizado, realizamos el protocolo de potenciación habitual mediante pulsos sucesivos de ACh.

2) Bloquear el receptor $\alpha 7$: en este caso perfundimos ArIB 100 nM, α -Ctx selectiva del subtipo $\alpha 7$ (Whiteaker *et al.*, 2007; Hone *et al.*, 2015), 5 min antes y durante todo el experimento de potenciación por pulsos sucesivos de ACh.

En ambos casos, y a diferencia del perfil de potenciación que se veía en la Fig. 25A, la corriente al pico no solo no aumentó tras los pulsos sucesivos, si no que disminuyó, siendo esta disminución significativa desde el pulso 5 en el protocolo de desensibilización, y aún más patente en el protocolo de bloqueo, en el que los cambios fueron notables desde el pulso 3 (Fig. 30A-B).

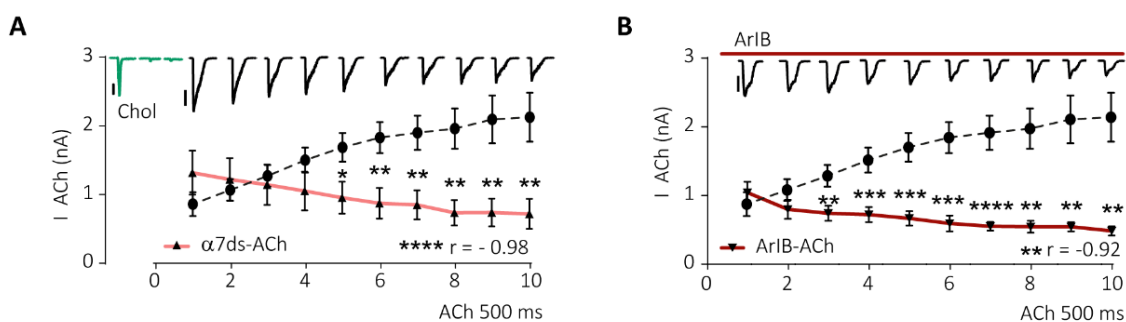


Fig. 30. $\alpha 3\beta 4$ requiere la activación $\alpha 7$ para potenciar su actividad. **A.** Desensibilización de $\alpha 7$ por pulsos de Chol (verde) y correspondiente curso temporal de los pulsos sucesivos de ACh ($\alpha 7$ ds-ACh, rosa) (t de Student no pareado entre puntos control y $\alpha 7$ ds-ACh, n=10; correlación de Pearson entre $\alpha 7$ ds-ACh y número de pulsos). **B.** Bloqueo de $\alpha 7$ por perfusión continua de ArIB, desde 5 min antes de empezar el experimento (t de Student no pareado entre puntos control y ArIB-ACh, n=12; correlación de Pearson entre ArIB-ACh y número de pulsos). En cada panel, la curva punteada corresponde al experimento control mostrado en Fig. 25A, para facilitar su comparación. (*) en cada pulso indica diferencias significativas entre ese punto temporal concreto y su correspondiente punto en control; (*)r indica la correlación entre la corriente al pico y el número de pulsos. Escalas: Chol 100 pA; ACh 500 pA. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

Analizando la cinética de activación de estas corrientes en las que el receptor $\alpha 7$ está o bien desensibilizado o bien directamente bloqueado, observamos también cambios importantes. En este caso, las corrientes no se hacen más rápidas tras los pulsos sucesivos (Fig. 31A-B), lo que indicaría que el reclutamiento de los $\alpha 7$ -nAChRs rápidos es esencial para la disminución de la tau de activación.

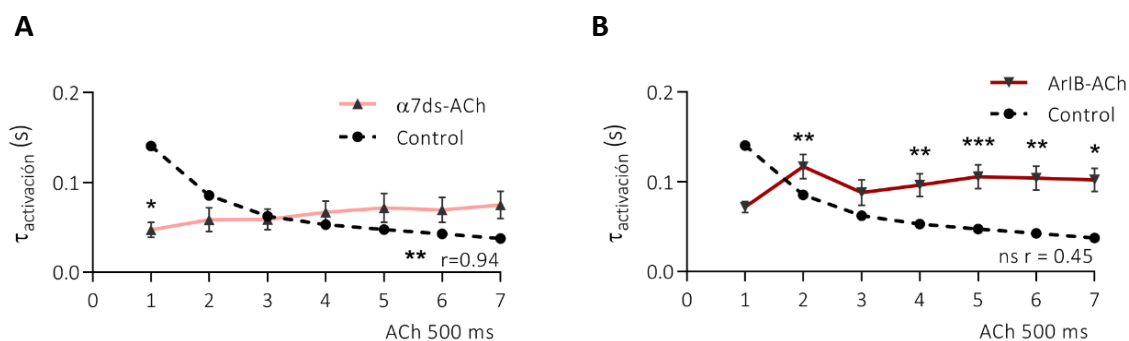


Fig. 31. $\alpha 7$ es imprescindible para disminuir el tiempo de activación. A-B. Representación gráfica del tiempo de activación de las corrientes de ACh donde $\alpha 7$ está desensibilizado ($\alpha 7$ ds-ACh) y bloqueado (ArIB-ACh), respectivamente (t de Student no pareado entre puntos control y $\alpha 7$ ds-ACh (n=4) o ArIB-ACh (n=11); correlación de Pearson entre $\alpha 7$ ds-ACh/ArIB-ACh y número de pulsos). En cada panel, la curva punteada corresponde al experimento control mostrado en Fig. 25B para facilitar su comparación. (*) en cada pulso indica diferencias significativas entre ese punto temporal concreto y su correspondiente punto en control; (*r) indica la correlación entre la tau de activación y el número de pulsos. ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En conjunto, estos resultados indican que para la potenciación y el mantenimiento de una corriente nicotínica estable en las CCH, los $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs también requieren la activación completa y funcional de los $\alpha 7$ -nAChRs.

2.3 Consecuencias funcionales de la potenciación de $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs

Quisimos comprobar si la potenciación de la I_{nic} iba asociada a un aumento también de la exocitosis, ya que una de las principales funciones de las CCH como parte del sistema neuroendocrino es la de secretar catecolaminas (entre otros compuestos) al torrente sanguíneo (Norman y Henry, 2015) mediante este mecanismo.

Realizamos para ello registros de capacitancia de membrana como medida indirecta de la exocitosis. En primer lugar, registramos la exocitosis evocada por Chol antes y después de potenciar la corriente $\alpha 7$ (Fig. 32A-C). Como ya se había visto previamente en nuestro laboratorio (Pérez-Alvarez *et al.*, 2012a), la entrada de Ca^{2+} a través de este receptor evoca una exocitosis escasa ($20,13 \pm 13,7$ fF) que no aumenta de forma significativa tras la potenciación de la corriente ($43,51 \pm 24,4$ fF, n=6). Probamos entonces a medir los cambios en la capacitancia evocada por ACh durante el protocolo de potenciación y tras el protocolo de bloqueo del subtipo $\alpha 7$. La potenciación de la corriente dio como resultado un incremento de la C_m de 1,8 veces respecto al control (de

271,3±69,3 a 492,8±104,9 fF, n=9), proceso que no ocurría si esta potenciación se realizaba en presencia de ArIB (137,2±74,2 fF, n=3) (**Fig. 32B-D**).

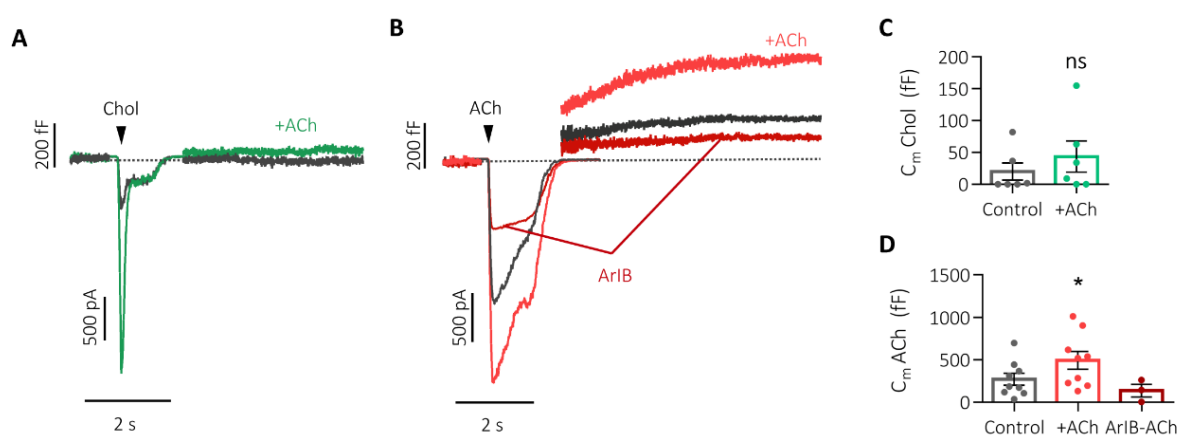


Fig. 32. Medidas de capacitancia de membrana en CCH. A. Exocitosis evocada por un pulso de Chol (gris) y por Chol tras protocolo de potenciación (verde, +ACh). **B.** Exocitosis evocada por ACh (gris), tras protocolo de potenciación (coral, +ACh) y tras bloquear $\alpha 7$ (marrón, ArIB). **C-D.** Cuantificación de la exocitosis calculando la diferencia entre la C_m basal (antes del pulso) y final (estabilizada después del pulso). **C:** Exocitosis evocada por un pulso de Chol (gris, control) en comparación con la evocada por Chol después de protocolo de potenciación (verde, +ACh: test de Wilcoxon, n=6). **D.** Exocitosis evocada por ACh (gris, control), tras potenciación (coral, +ACh: t Student pareado, n=9) y tras bloqueo $\alpha 7$ (marrón, ArIB-ACh: test de Wilcoxon, n=3) ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$.

Estos resultados resultaron muy interesantes ya que, aunque corroboramos que la actividad $\alpha 7$ *per se* evoca una escasa exocitosis, observamos que sin embargo su activación resulta fundamental para incrementar la I_{nic} y con ello, potenciar también la actividad exocitótica de la CCH.

2.4 Expresión de los nAChRs en las CCH

El aumento de la corriente nicotínica podría deberse a una mayor expresión de estos receptores en membrana, así como a una mejor disposición en ella, teniendo una configuración más activable (Colombo *et al.*, 2013). Para explorar ambas posibilidades, diseñamos una serie de experimentos que combinaron la especificidad de las α -Ctx por cada subtipo de nAChRs con técnicas de imagen.

En primer lugar, para determinar la expresión y disponibilidad de los nAChRs, aplicamos a las CCH los protocolos antes mencionados: potenciación, desensibilización y bloqueo (tanto de $\alpha 7$ -nAChRs con ArIB, como de $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs con TxID (Hone *et al.*, 2017) y después las incubamos con las α -Ctx unidas a fluoróforos BgTx-488 y BuIA-Cy3,

específicas de $\alpha 7$ y $\beta 4^*$, respectivamente (**Fig. 33A**). Analizamos la fluorescencia resultante en cada protocolo y normalizamos los resultados respecto a la *IntDen* de células del mismo cultivo sin tratar (**Fig. 33B-C**).

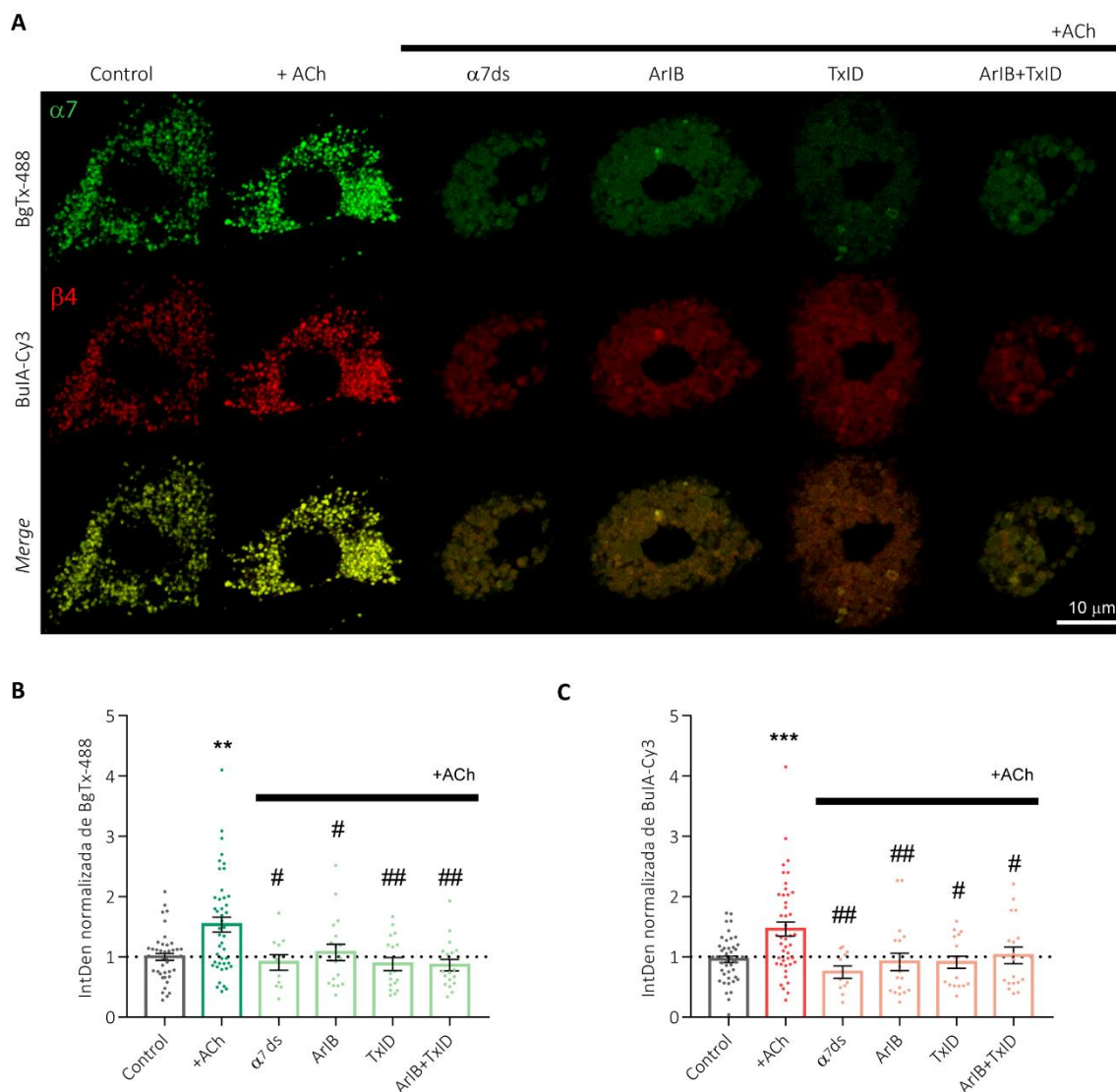


Fig. 33. Expresión de $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs. **A.** Imágenes de microscopía confocal de CCH incubadas con las α -Ctx fluorescentes BgTx-488 ($\alpha 7$, verde) y BuIA-Cy3 ($\beta 4$, rojo) después de los diferentes protocolos estudiados por electrofisiología: potenciación, desensibilización y bloqueo. Fila inferior, combinación (*merge*) de ambos canales. **B-C.** Cuantificación de la expresión normalizada respecto a la fluorescencia en control. (U de Mann-Whitney para muestras independientes, n de cada grupo detallado en Tabla 8). (*) indica diferencias significativas respecto a las células sin tratar (Control); (#) indica diferencias significativas respecto a la fluorescencia de células potenciadas (+ACh). #p<0,05; ##, **p<0,01; ***p<0,001.

En las células “potenciadas”, se produjo un aumento significativo de la fluorescencia tanto de BgTx-488 como de BuIA-Cy3 ($1,5 \pm 0,12$ y $1,46 \pm 0,11$ veces más, respectivamente; n=44). Este aumento sin embargo, dejó de producirse si el subtipo $\alpha 7$ había sido

desensibilizado o bloqueado por ArIB, o si los $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs habían sido bloqueados por TxID (**Tabla 8**), reflejando la importancia de la cooperación entre ambos receptores para modular su propia expresión.

Tabla 8. Valores de *IntDen* normalizados respecto a su control

	Control n=46	+ACh n=44	$\alpha 7$ ds-ACh n=11	ArIB-ACh n=18	TxID- ACh n=17	ArIB+TxID- ACh n=18
BgTx-488 ($\alpha 7$)	1 \pm 0,06	1,54 \pm 0,12**	0,91 \pm 0,13	1,07 \pm 0,14	0,88 \pm 0,11	0,86 \pm 0,09
BuIA-Cy3 ($\alpha 3\beta 4$)	1 \pm 0,06	1,46 \pm 0,11***	0,75 \pm 0,19	0,92 \pm 0,16	0,91 \pm 0,1	1,02 \pm 0,14

U de Mann-Whitney. **p<0,01; ***p<0,001.

Estos resultados, en conjunto con los anteriores obtenidos con técnicas de electrofisiología, podrían indicar que la potenciación de la actividad nicotínica podría deberse a una mayor expresión de nAChRs en la membrana plasmática.

2.5 Dependencia de Ca^{2+}

Dado que para que se produzca el acoplamiento estímulo-secreción el mecanismo de exocitosis requiere Ca^{2+} , quisimos investigar si el flujo de este ión a través de los $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs podría estar afectando a estos procesos de modulación conjunta. Para ello, repetimos el protocolo de potenciación utilizando una solución extracelular libre de Ca^{2+} , en la que diluimos también los agonistas. En estas condiciones, como se puede ver en la **Fig. 34A**, el perfil de potenciación de la corriente nicotínica presentó algunos cambios respecto a la obtenida en el protocolo control. En primer lugar, aunque el pico de corriente aumentó paulatinamente con el número de pulsos, esta correlación no fue estadísticamente significativa ($r=0,15$, $n=10$). Es más, al final del experimento, la corriente en 0 Ca^{2+} fue significativamente menor que en el control en 2 mM de Ca^{2+} . Para ver de qué manera afectaba esta "no-potenciación" de la corriente nicotínica a la corriente $\alpha 7$, repetimos también el experimento del apartado 2.1, en el que aplicamos Chol antes y después del protocolo de potenciación, como medidor de la corriente $\alpha 7$. En este caso, los resultados fueron sorprendentes ya que, aún sin haber potenciación significativa en la corriente evocada por ACh en 0 Ca^{2+} (de 1.223 \pm 208,9 a 1.387 \pm 217,6 pA, $n=21$), la corriente $\alpha 7$ evocada por Chol sí se vio ampliamente potenciada (de 220,4 \pm 58,6 a 783,4 \pm 169,1 pA, $n=14$) (**Fig. 34B-C**).

Comparando estos resultados con los obtenidos en el protocolo control de 2 mM Ca^{2+} (**Fig. 34D**), corroboramos que el aumento de corriente nicotínica evocada por ACh que se producía en 2 Ca^{2+} ($33,3 \pm 5,6\%$, $n=21$), no ocurre en 0 Ca^{2+} ($4,2 \pm 5\%$, $n=23$), mientras que la corriente evocada por Chol se ve potenciada en ambas situaciones ($59,61 \pm 6,3\%$, $n=14$; $65,5 \pm 7\%$, $n=30$, en 0 y 2 mM de Ca^{2+} , respectivamente).

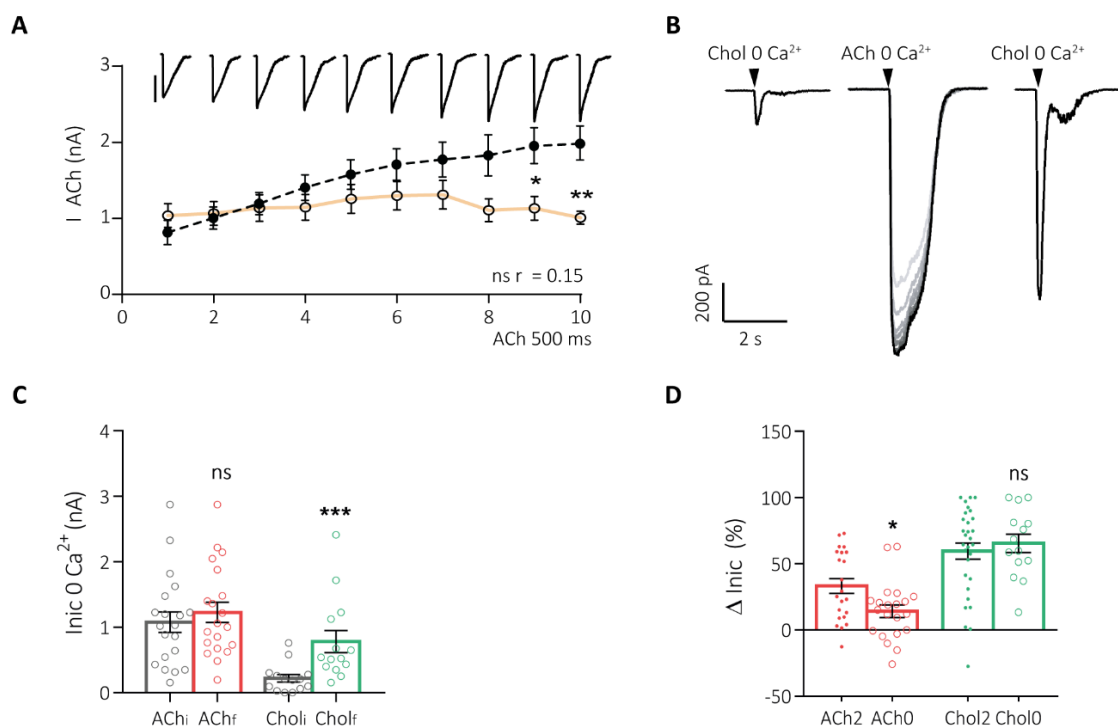


Fig. 34. Dependencia de Ca^{2+} de las corrientes nicotínicas en CCH. **A.** Registros originales del protocolo de potenciación en 0 Ca^{2+} respecto a su curso temporal (color salmón). En punteado, la curva del protocolo control en 2 mM de Ca^{2+} para facilitar su comparación (t de Student no pareado entre puntos control y 0 Ca^{2+} , $n=10$; correlación de Pearson entre 0 Ca^{2+} -ACh y número de pulsos). **B.** Registros originales del protocolo de potenciación en 0 Ca^{2+} de la corriente de ACh y de Chol. **C.** Cuantificación de la corriente al pico inicial (gris) y final (ACh coral, $n=20$; Chol verde; $n=14$; test de Wilcoxon). **D.** Comparación del incremento de corriente con los distintos agonistas en 2 mM (puntos, ACh coral, $n=22$; Chol verde, $n=30$) y 0 Ca^{2+} (círculos vacíos, ACh coral, $n=21$; Chol verde, $n=14$) (t Student no pareado en ambos casos) ns $p>0,05$; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

Estos experimentos nos llevaron a la conclusión de que mientras el Ca^{2+} parece ser un requisito indispensable para que los $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs aumenten su flujo de corriente, el aumento de actividad de $\alpha 7$ debía estar regulado por otro mecanismo no dependiente del Ca^{2+} .

3. Interacción física $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs

Observando las imágenes de los experimentos de fluorescencia de las CCH (Fig. 33), vimos que parecía haber una gran colocalización entre los $\alpha 7$ -nAChRs y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs. Habiendo descrito tantos procesos en los que parece haber una clara interacción funcional, quisimos ver si ésta venía acompañada también de interacción física. Para ello, hicimos en primer lugar un análisis de colocalización de marcadores (Fig. 35A) y comprobamos que, efectivamente, existía un nivel muy alto de coincidencia, que además se mantenía con las diferentes maniobras farmacológicas ya descritas (Fig. 35B; Tabla 9).

En segundo lugar, y para comprobar si existía interacción física (proximidad en los receptores entre 10-100 Å) realizamos la técnica de fotoblanqueo de un área pequeña de interés (ROI) en el marcador Cy3 (aceptor) para medir la eficiencia de FRET (ganancia de energía de emisión del donador, 488). Los resultados, incluso con aquellas maniobras farmacológicas que disminuían la intensidad de fluorescencia en la expresión de nAChRs, fueron positivos en todos los casos (22,5-27,2 % de eficiencia, Tabla 9), mostrando que: i) efectivamente, existe interacción física entre los $\alpha 7$ -nAChRs y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs en las CCH; y ii) esta interacción es independiente de los procesos de potenciación, desensibilización o bloqueo, que sí intervienen en la interacción funcional.

Tabla 9. Valores de colocalización y FRET.

	Control	+ACh	$\alpha 7$ ds-ACh	ArIB-ACh	TxID-ACh	ArIB+TxID-ACh
I_{corr} (nMDP)	0,82±0,02	0,85±0,01	0,79±0,05	0,76±0,03	0,80±0,02	0,80±0,02
n	43	42	6	13	13	13
FRET (%)	22,6±1,5	23,3±1,3	27,2±1,1	25,7±2,1	26,4±2,2	22,5±3,1
n	25	23	5	8	8	8

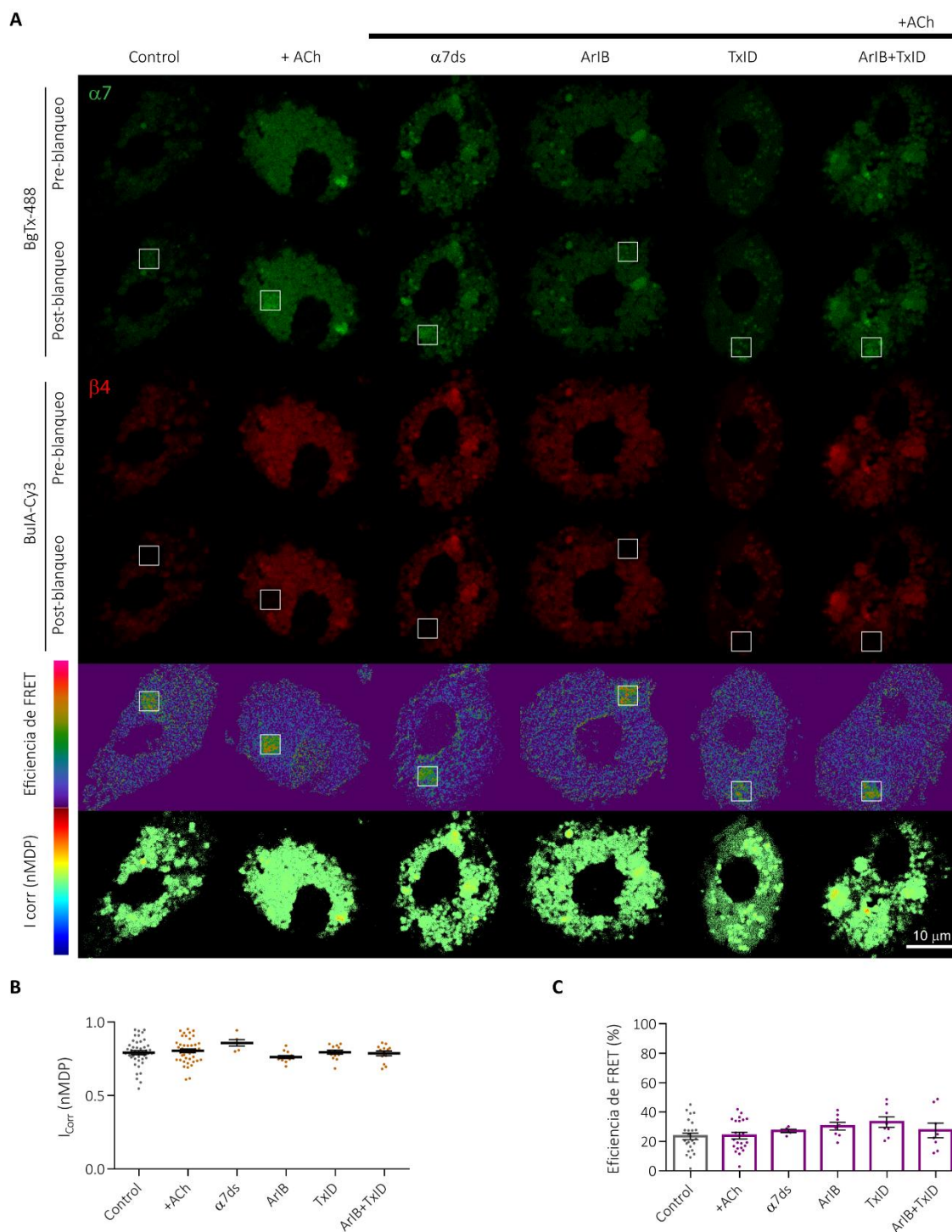


Fig. 35. Interacción $\alpha 7$ - $\beta 4$ en CCH. **A.** Imágenes confocales de CCH incubadas con las α -Ctx fluorescentes BgTx-488 ($\alpha 7$, verde. Donador) y BuIA-Cy3 ($\beta 4$, rojo. Aceptor) tras los protocolos de potenciación, desensibilización y bloqueo; antes y después de fotoblanqueo. Resultado de eficiencia de FRET en fila 5. Mapa de color para medir índice de colocalización en fila 6 (Escala 10 μ m). **B.** Cuantificación de la colocalización de marcadores, medida como índice de correlación (I_{corr}) (t Student no pareado) **C.** Comparación de valores de eficiencia de FRET (%) (t Student no pareado). n de cada grupo detallado en Tabla 9, diferencias no significativas en ambos paneles.

3.1. Regulación de la interacción física entre $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs

Dado el alto nivel de colocalización e interacción de $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs en las CCH, quisimos conocer los mecanismos que regulan ese proceso. Previamente se había descrito en otros modelos celulares que la fosforilación sobre residuos de Tyr disminuía la expresión en membrana de los $\alpha 7$ -nAChRs (Cho *et al.*, 2005). Para comprobar si estos procesos estaban también mediando en la interacción física con $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs y asegurar que ocurrían en nAChRs humanos nativos, repetimos el experimento de FRET. Para ello tratamos las células esta vez con fármacos específicamente dirigidos a enzimas que actúan sobre residuos de Tyr (**Fig. 36A**).

Incubando las células con pervanadato (40 min, 50 μ M), inhibidor de la enzima Tyr-P, observamos una reducción significativa no solo de la expresión de los $\alpha 7$ -nAChRs, como ya estaba descrito en otros modelos, sino también de los $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs (**Tabla 10, Fig. 36B-C**). Esta maniobra, que mantiene fosforilados los residuos de Tyr de la cadena citoplasmática de los nAChRs, además dio como resultado una disminución significativa de la interacción física (**Fig. 36D**), hecho que no ocurría con los tratamientos anteriormente explicados que sí reducían la expresión.

Tratando las células con genisteína (50 min, 200 μ M), inhibidor de Tyr-K, no observamos un incremento en la expresión de los $\alpha 7$ -nAChRs, los $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs, ni de la interacción física entre ellos. Sin embargo, incubando esta molécula 10 min antes del tratamiento con pervanadato, el efecto de este último se revirtió significativamente, tanto en la expresión de los $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs, como en la interacción física entre ellos.

Estos resultados sugieren que, además de la regulación por Ca^{2+} explicada en el apartado 2.5., los procesos de fosforilación y desfosforilación podrían ejercer también un papel importante en la regulación de los nAChRs en CCH, no solo en cuanto a su expresión en membrana, sino también regulando la interacción física entre ellos.

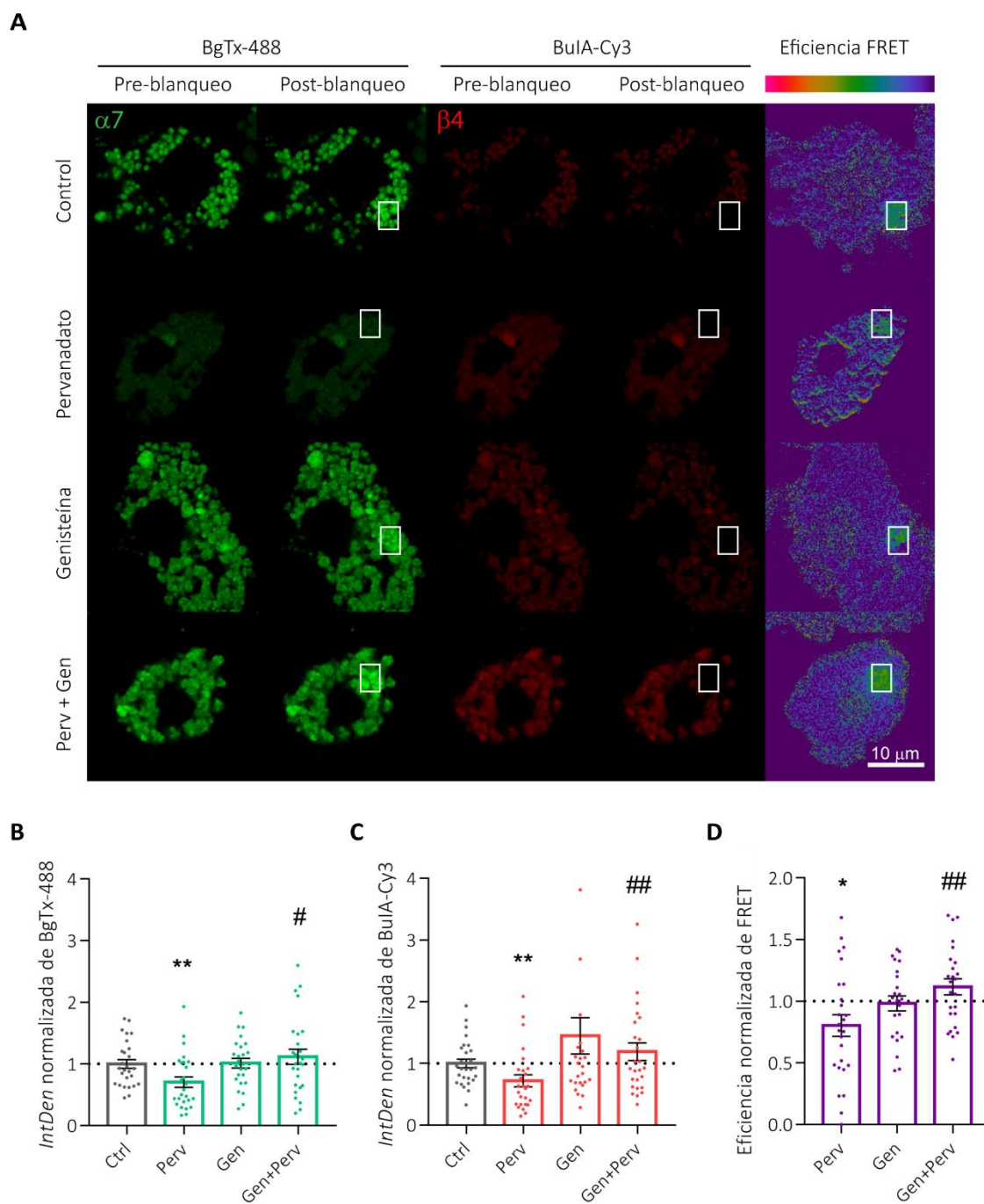


Fig. 36. Regulación de la expresión e interacción física por fosforilación en CCH. A. Imágenes confocales de CCH incubadas con las α -Ctx fluorescentes BgTx-488 (α 7, verde. Donador) y BuIA-Cy3 (β 4 rojo. Aceptor) tras incubación con los diferentes fármacos; antes y después de fotoblanqueo. Resultado de eficiencia de FRET en la columna 5 (Escala 10 μ m). **B-C-D.** Cuantificación de fluorescencia normalizada de BgTx-488, BuIA-Cy3 y eficiencia normalizada de FRET, respectivamente (t de Student no pareado, U de Mann-Whitney, n de cada grupo detallado en Tabla 10). (*) indica diferencias significativas respecto a las células sin tratar (Control); (#) indica diferencias significativas (recuperación) respecto al tratamiento con Pervanadato. #, * $p < 0,05$, ##, ** $p < 0,01$.

Tabla 10. Intensidad de fluorescencia y eficiencia normalizada de FRET: regulación.

	Control n=28	Pervanadato n=26	Genisteína n=25	Gen+Perv n=26
<i>IntDen</i> BgTx-488 (α7)	1±0,07	0,71±0,09**	1,01±0,08	1,12±0,12 [#]
<i>IntDen</i> BuIA-Cy3(α3β4)	1±0,07	0,66±0,08**	0,88±0,08	1,11±0,12 ^{##}
FRET (%)	26,4±1,6	18,8±1,9*	23,2±1,2	25±1,6 ^{##}

(*) indica diferencias significativas respecto a control; (#) indica recuperación tras pervanadato. T de Student no pareado, U de Mann-Whitney. #, *p<0,05, ##, **p<0,01.

4. Expresión y colocalización de $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs en neuronas de hipocampo

Sabiendo que procesos de desfosforilación estaban mediando en la expresión e interacción física de los nAChRs en CCH, quisimos investigar la posibilidad de que estos mismos mecanismos estuviesen regulando los nAChRs a nivel del SNC. Como primera aproximación, escogimos estudiarlo en hipocampo por varias razones: expresa los subtipos $\alpha 3\beta 4^*$ y $\alpha 7$ (Gotti *et al.*, 2006), es una de las áreas implicadas en enfermedades neurodegenerativas con afectación colinérgica (Ferreira-Vieira *et al.*, 2016), y la hiperfosforilación es uno de los mecanismos descritos en este tipo de enfermedades (Goedert *et al.*, 1992).

4.1. Regulación a nivel de Tyr

Incubamos las nHP con el inhibidor de Tyr-P pervanadato, y el inhibidor de Tyr-K genisteína. Durante la incubación con las toxinas fluorescentes BgTX-488 y BuIA-546, añadimos además la toxina sin fluoróforo PeIA para bloquear los $\alpha 6\beta 4$ -nAChRs, presentes también en este área para asegurar así que BuIA solo se uniera a los $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs (**Fig. 37A**). Mientras que la inhibición de la desfosforilación de Tyr mediante pervanadato provocó una clara reducción de la expresión de los $\alpha 7$ -nAChRs (un $20,04 \pm 0,06\%$ menos, $n=21$), la inhibición de la fosforilación por medio de genisteína indujo la potenciación de la expresión de los $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs ($34,6 \pm 0,06\%$, $n=3$) (**Fig. 37B-C**). Sin embargo, ambas maniobras condujeron a una reducción en la colocalización de ambos receptores, indicando que, aunque pudieran estar mediando en la expresión de los mismos, la fosforilación/desfosforilación descompensada sobre residuos de Tyr no estaría modulando su interacción física en la membrana (**Fig. 37D, Tabla 11**).

Tabla 11. Intensidad de fluorescencia y colocalización en nHP: regulación sobre Tyr

	Control n=11	Pervanadato n=21	Genisteína n=8	Gen+Perv n=20
IntDen BgTx-488 ($\alpha 7$)	1 \pm 0,03	0,8 \pm 0,06*	1,03 \pm 0,03	0,8 \pm 0,07
IntDen BuIA-Cy3 ($\alpha 3\beta 4$)	1 \pm 0,09	0,93 \pm 0,09	1,35 \pm 0,06**	0,95 \pm 0,08
I_{corr} normalizado	1 \pm 0,02	0,87 \pm 0,03**	0,76 \pm 0,03****	0,86 \pm 0,08

(*) indica diferencias significativas respecto a control. t de Student no pareado, U de Mann-Whitney. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

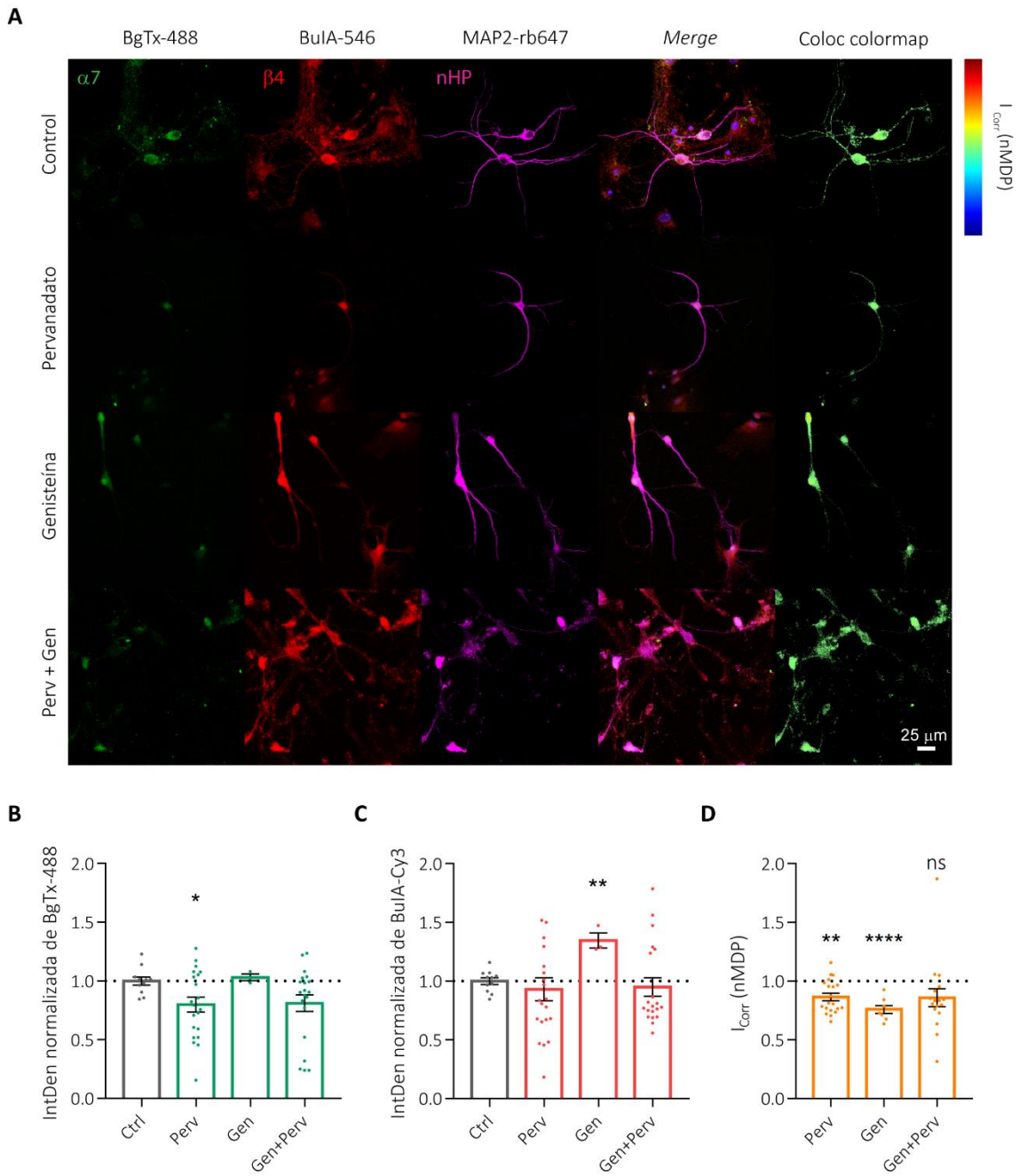


Fig. 37. Regulación por fosforilación de Tyr de la expresión y colocalización en nHP. A. Imágenes confocales de nHP incubadas con las α -Ctx fluorescentes BgTx-488 ($\alpha 7$, verde) y BuIA-546 ($\beta 4$, rojo), MAP2-rb647 (neuronas, magenta), *merge* con Hoechst (núcleos, azul) y mapa de colocalización tras el tratamiento con Pervanadato, Genisteína o con ambos a la vez (Escala 25 μ m). **B-C-D.** Cuantificación de la fluorescencia normalizada de BgTx-488, BuIA-546 y del índice de colocalización, respectivamente (t de Student no pareado, U de Mann-Whitney). (*) *indica diferencias significativas respecto a las células sin tratar (Control)* ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

4.2. Regulación a nivel de Ser/Thr

Otro de los residuos aminoácidos fosforilables muy abundante en la cadena citoplasmática de nAChRs es la Ser. Teniendo en cuenta el efecto estudiado sobre Tyr, quisimos comprobar si existía alguna modulación mediada a través de este aminoácido. Para ello, incubamos las nHP durante 24 h con AO, inhibidor de proteína-fosfatasa, a baja concentración (5 nM) para focalizar su efecto sobre PP2A. Para conseguir el efecto opuesto, utilizamos el compuesto ITH12680 (24 h, 10 μ M), una molécula novel desarrollada por el grupo del Dr. Cristóbal de los Ríos (Laboratorio 8, Departamento de Farmacología y Terapéutica, ITH, UAM) cuya diana también es PP2A, con efecto activador en este caso (**Fig. 38A**).

Con este procedimiento observamos que mediante la inhibición de PP2A, que mantendría los residuos de Ser fosforilados (entre otros procesos), también disminuía la expresión de los $\alpha 7$ -nAChRs ($29,47 \pm 0,1\%$, $n=11$) como ocurría con la fosforilación de Tyr. Por el contrario su activación, mediada por la molécula ITH12680, no solamente aumentaba la expresión de los $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs ($19,7 \pm 0,09\%$, $n=6$) como se vio en el experimento anterior, sino que además revertía el efecto inhibitorio del AO sobre los $\alpha 7$ -nAChRs (**Fig. 38B-C**).

De la misma manera que en el experimento sobre los residuos de Tyr, la desregulación de los procesos de fosforilación/desfosforilación tuvo un efecto negativo sobre la colocalización de ambos receptores en la membrana plasmática; indicando que este proceso a nivel del hipocampo debe estar siendo regulado además por otros mecanismos (**Fig. 38D, Tabla 12**).

Tabla 12. Intensidad de fluorescencia y colocalización en nHP: regulación sobre Ser/Thr

	Control n=11	AO n=11	ITH12680 n=6	AO+ITH12680 n=14
IntDen BgTx-488 ($\alpha 7$)	1 \pm 0,03	0,7 \pm 0,1*	0,87 \pm 0,09	0,96 \pm 0,08 [#]
IntDen BuIA-Cy3 ($\alpha 3\beta 4$)	1 \pm 0,03	0,85 \pm 0,1	1,2 \pm 0,09*	1,27 \pm 0,1 [#]
I_{corr} normalizado	1 \pm 0,02	0,84 \pm 0,06**	0,86 \pm 0,03***	0,98 \pm 0,06

(*) indica diferencias significativas respecto a control, (#) indica recuperación tras AO. t de Student no pareado, U de Mann-Whitney. #, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

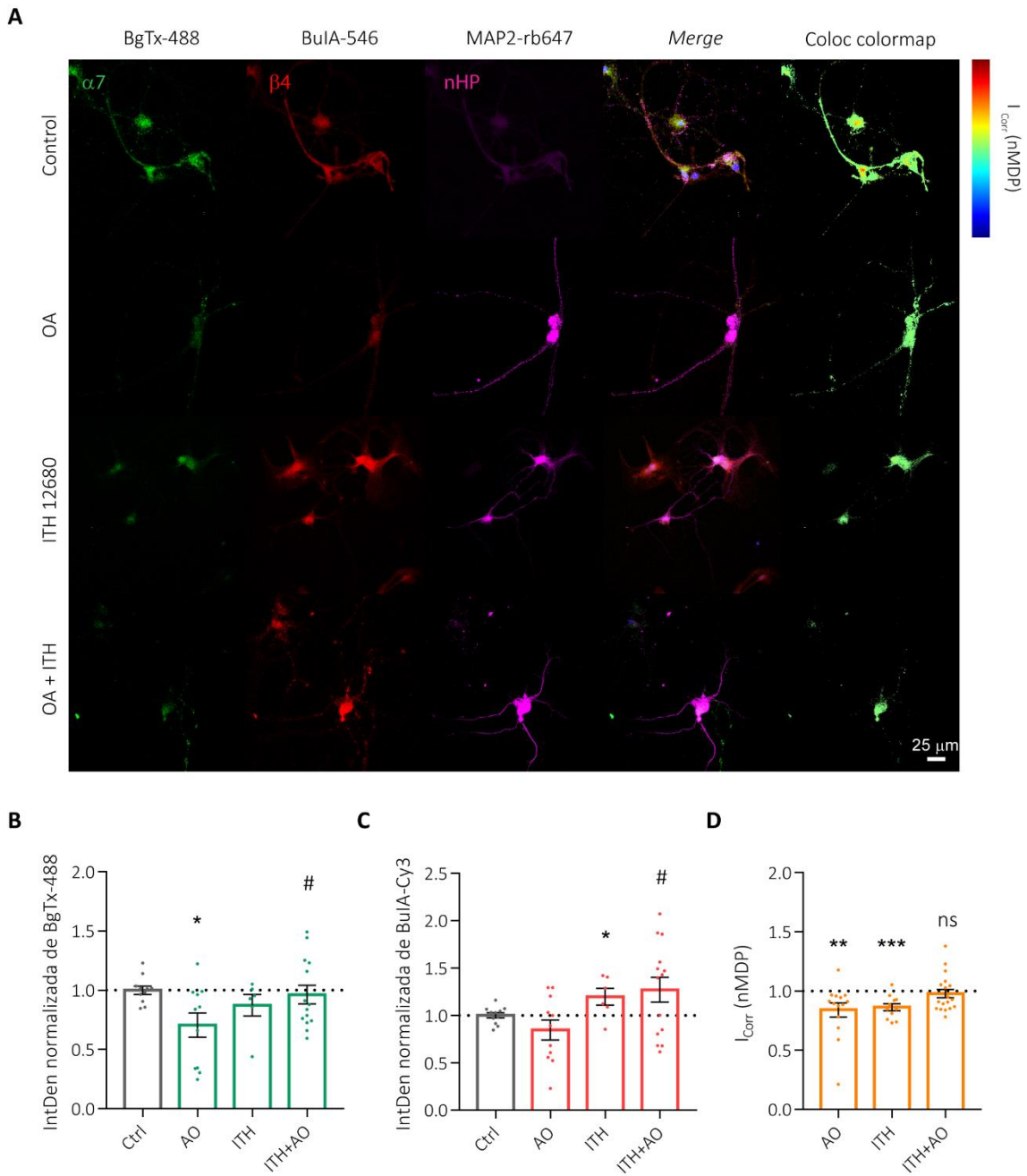


Fig. 38. Regulación por fosforilación de Ser/Thr de la expresión y colocalización en nHP . A. Imágenes confocales de nHP incubadas con las α -Ctx fluorescentes BgTx-488 (α 7, verde) y BuIA-546 (β 4, rojo), MAP2-rb647 (neuronas, magenta), *merge* con Hoechst (azul, núcleos) y mapa de colocalización tras tratamiento con AO, molécula ITH12680 o con ambos a la vez (Escala 25 μ m). **B-C-D.** Cuantificación de la fluorescencia normalizada de BgTx-488, BuIA-546 y del índice de colocalización, respectivamente (t de Student no pareado, U de Mann-Whitney). (*) indica diferencias significativas respecto a las células sin tratar (Control); (#) indica diferencias significativas respecto a AO (recuperación). ns $p > 0,05$; #, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5. Diferencias poblacionales: sexo y edad

Quisimos comprobar si alguno de los hallazgos de este estudio se veía alterado según el rango de edad o el sexo de los donantes humanos. Para ello, diseñamos una base de datos utilizando el programa SPSS en la que introdujimos cada dato obtenido en los distintos experimentos de electrofisiología, fluorescencia e interacción, enlazado al paciente del que procedía el tejido. A su vez, introdujimos los datos de sexo y edad aportados por los hospitales colaboradores sobre cada uno de los donantes.

En cuanto a la edad, separamos a los donantes en dos grupos: menores y mayores de 50 años. Escogimos este rango de edad tras un estudio de correlación preliminar en el que vimos que a partir de esta edad las diferencias eran más notables.

En primer lugar, observamos una disminución significativa de la eficiencia de interacción física entre $\alpha 7$ -nAChRs y $\beta 4$ -nAChRs (de $30,6 \pm 2,7\%$, $n=8$, $N=2$ en donantes menores de 50 años a $21,6 \pm 1,5\%$, $n=27$, $N=10$, en los mayores de 50) (**Fig. 39A-B**). Es interesante mencionar también que, a pesar de esta reducción de la interacción, la expresión individual de cada uno de los receptores no se vio afectada.

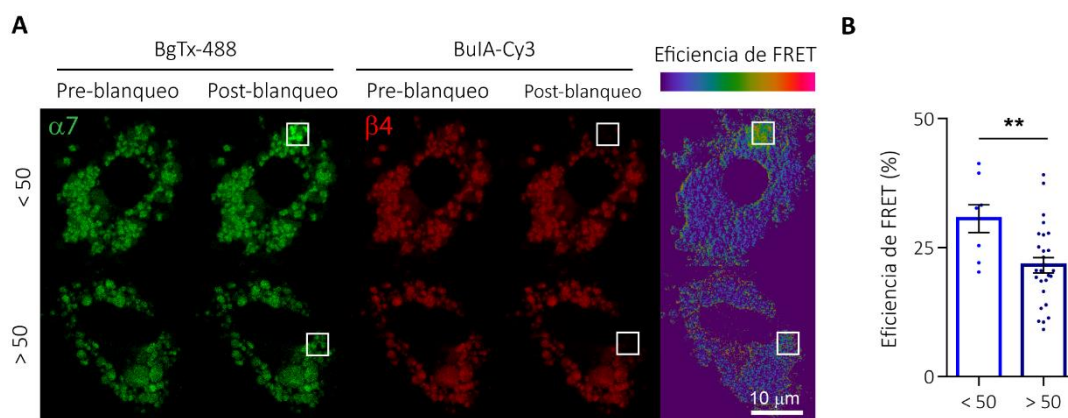


Fig. 39. Resultados por edad de los donantes. **A.** Imágenes confocales de CCH incubadas con las α -Ctx fluorescentes BgTx-488 ($\alpha 7$, verde. Donador) y BuIA-Cy3 ($\beta 4$, rojo. Aceptor) antes; después de fotoblanqueo y eficiencia de FRET (Escala 10 μm). **B.** Cuantificación de la eficiencia de FRET por edades (t Student no pareado, <50: $n=8$, $N=2$; >50: $n=27$, $N=10$). ** $p < 0,01$.

En segundo lugar, la caída de la I_{nic} tras el protocolo de desensibilización mediante la aplicación de pulsos de Chol fue mucho más notable en las células procedentes de donantes mayores de 50 años ($45,3 \pm 5,8\%$, $n=7$, $N=3$), que en las de los menores de 50 ($10,7 \pm 8,4$, $n=8$, $N=2$) (**Fig. 40A-B**).

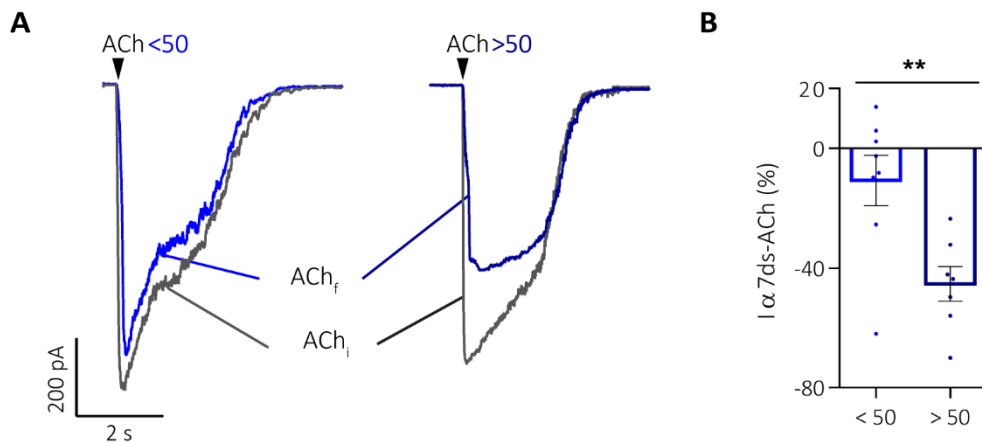


Fig. 40. Desensibilización de I_{nic} en el envejecimiento. **A.** Corrientes evocadas por ACh tras el protocolo de desensibilización de $\alpha 7$ -nAChR por pulsos de Chol. En gris, corriente inicial, en azul corriente final; en menores y mayores de 50 años. **B.** Cuantificación de la disminución de la I_{nic} por desensibilización de $\alpha 7$ -nAChR (t Student no pareado, <50: n=8, N=2; >50: n=7, N=3). **p<0,01.

En lo referente al sexo, encontramos grandes diferencias en cuanto a la expresión de ambos subtipos de receptores. La fluorescencia total de BgTx y BuIA en hombres (n=16, N=4) fue 4,3 y 2,1 veces mayor que en mujeres (n=27, N=9), respectivamente (**Fig. 41A-B**), indicando que los hombres expresan una mayor cantidad de receptores nicotínicos que las mujeres en las CCH. Curiosamente, tanto el nivel de interacción física, como todas las pruebas funcionales de las corrientes nicotínicas, no se vieron afectadas por esta diferencia cuantitativa.

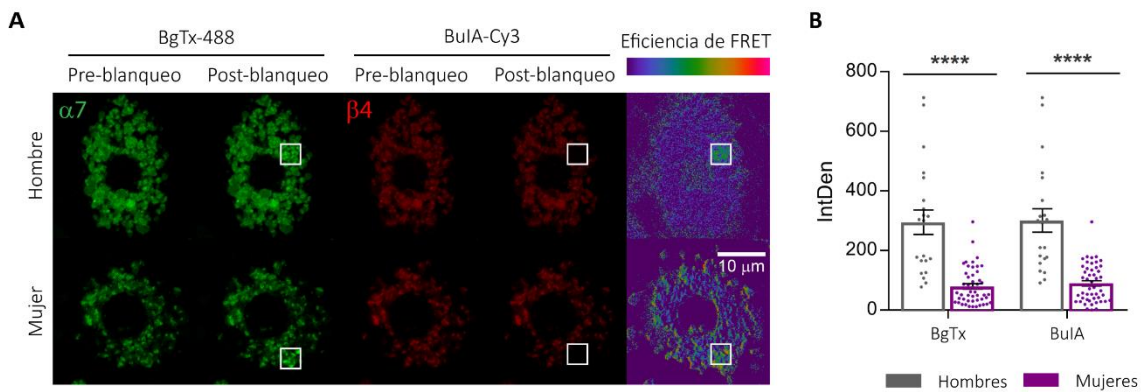


Fig. 41. Resultados por sexo de los donantes. **A.** Imágenes confocales de CCH incubadas con las α -Ctx fluorescentes BgTx-488 ($\alpha 7$, verde. Donador) y BuIA-Cy3 ($\beta 4$, el rojo se ha sustituido por magenta. Aceptor) antes; después de fotoblanqueo y eficiencia de FRET (Escala 10 μ m). **B.** Cuantificación de la densidad integrada de fluorescencia de BgTx-488 y BuIA-Cy3 en hombres (gris) y mujeres (morado) (U Mann-Whitney, ♂n=16, N=4; ♀n=27, N=9) ****p>0,0001.

6. nAChRs en ratón modelo de enfermedad de Alzheimer

Una vez descritos los procesos de modulación recíproca por activación de los nAChRs en las CCH y la importancia que parece tener su regulación tanto para su propia expresión como para la colocalización e interacción física entre ellos también en las nHP, quisimos comprobar si algunos de estos hallazgos estarían alterados en un modelo traslacional.

Elegimos para ello estudiar los nAChRs en ratones 3xTg-AD modelo de EA, basándonos en los siguientes aspectos: i) es una enfermedad con afectación colinérgica, ii) los $\alpha 7$ -nAChRs se encuentran muy disminuidos o inactivos, iii) median procesos de hiperfosforilación; iv) tiene una mayor prevalencia en mujeres; v) la edad avanzada es uno de los mayores factores de riesgo.

6.1 Estudio fenotípico

Para este estudio, utilizamos ratones machos y hembras mayores de 12 meses de edad, cuando la fisiopatología de la enfermedad está plenamente desarrollada (Oddo *et al.*, 2003a). Tras el genotipado de los ratones de estudio por parte de Alicia Muñoz-Montero (Laboratorio 7, Departamento de Farmacología y Terapéutica, UAM) para asegurar que las tres mutaciones (PSEN1 M146V, APP_{Swe}, Tau-P301L) se hallaban presentes, hicimos un estudio fenotípico del comportamiento previo a la parte experimental.

Para establecer el nivel del posible deterioro cognitivo realizamos el test NOR. Analizamos también el comportamiento de los ratones el primer día de entrenamiento, la prueba conocida como campo abierto, para detectar posibles diferencias entre los grupos por causas ajenas a la EA, como pudieran ser los niveles de estrés y ansiedad.

Los resultados obtenidos en la prueba de campo abierto, en la que se establece el ratio de tiempo en el que el ratón abandona el borde del campo relacionándolo con su nivel de ansiedad, reflejaron que no había diferencias significativas entre los distintos grupos (N=8; 5) (**Fig. 42A**). Sin embargo, midiendo la velocidad de movimiento de los ratones en esta misma prueba, las hembras transgénicas fueron con diferencia el grupo

que mayor nivel de ansiedad mostró en comparación tanto con sus controles, como con los machos (**Fig. 42B**).

En cuanto al test de reconocimiento de objetos, ninguno de los grupos obtuvo un índice de discriminación bueno pero fue notablemente peor tanto en hembras como machos 3xTg-AD, que obtuvieron una menor puntuación que sus controles. Esta diferencia fue significativa únicamente en el caso de las hembras. (**Fig. 42C**).

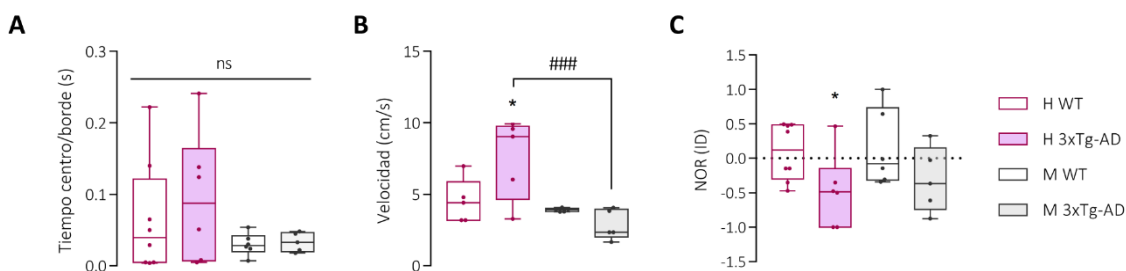


Fig. 42. Estudio de comportamiento. A. Análisis de la prueba de campo abierto en hembras (H) y machos (M); control (WT) y 3xTg-AD **B.** Análisis de la velocidad en la prueba de campo abierto. **C.** Análisis del test NOR (ANOVA, test LSD de Fisher; N=8; 5 en todos los paneles). (*) *Diferencias entre WT y 3xTg-AD*; (#) *diferencias entre machos y hembras*. ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ### $p < 0,001$.

6.2 Expresión y colocalización de nAChRs en hipocampo de ratón 3xTg-AD

Para cuantificar la expresión de $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs, así como su colocalización en cortes de cerebro de ratón, realizamos el mismo procedimiento de marcaje utilizado para las nHP, bloqueando previamente los $\alpha 6\beta 4$ -nAChRs con PeIA (**Fig. 43A**).

Como ya habíamos observado en células cromafines de donantes humanos, la expresión de nAChRs es significativamente menor en hembras que en machos de los dos grupos de estudio. La expresión de $\alpha 7$ -nAChR está aún más disminuida en hembras 3xTg-AD respecto a sus controles, lo que no ocurre con los machos (**Fig. 43B, Tabla 11**). Por el contrario, la expresión de $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs, se encuentra incrementada en el transgénico tanto en machos como en hembras (**Fig. 43C, Tabla 11**).

En cuanto al índice de colocalización, se mantiene en valores bastante similares en todos los grupos, con la excepción de hembras transgénicas, donde es significativamente menor que en el resto (**Fig. 43D, Tabla 13**).

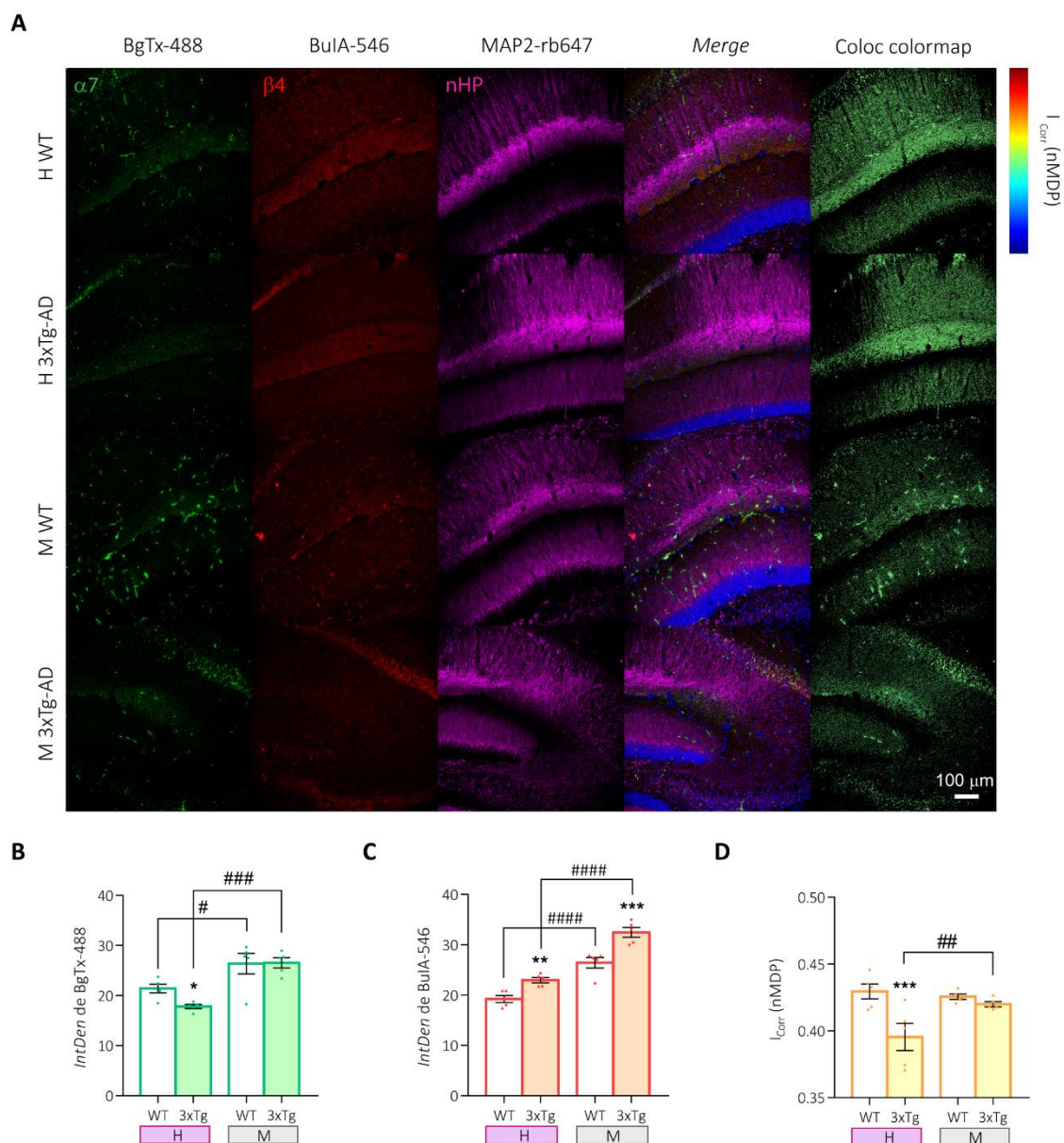


Fig. 43. Expresión y colocalización de $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs en cortes de cerebro de ratón WT y 3xTg-AD. **A.** Imágenes confocales de cortes de cerebro de ratón: BgTx-488 ($\alpha 7$, verde), BuIA-546 ($\beta 4$, rojo), MAP2-rb647 (neuronas, magenta), *merge* con Hoechst (núcleo, azul) y mapa de colocalización (Escala 100 μm). **B-C-D.** Cuantificación de la fluorescencia normalizada de BgTx-488, BuIA-546 y del índice de colocalización, respectivamente en hembras (H, morado) y machos (M, gris); control (WT, barras blancas) y 3xTg-AD (barras sombreadas). (ANOVA, test LSD de Fisher; N=5 ratones de cada grupo). (*) *Diferencias entre WT y 3xTg-AD*; (#) *diferencias entre machos y hembras*. #, * $p < 0,05$; ##, ** $p < 0,01$; ###, *** $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$.

Tabla 13. *IntDen* y colocalización de $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs en hipocampo de ratón 3xTg-AD

	H WT	H 3xTg-AD	M WT	M 3xTg-AD
<i>IntDen</i> BgTx-488 ($\alpha 7$)	21,41 \pm 0,87 [#]	17,81 \pm 0,41 ^{####}	26,38 \pm 2,06	26,55 \pm 1,00
<i>IntDen</i> BuIA-546($\alpha 3\beta 4$)	19,24 \pm 0,70 ^{####}	22,98 \pm 0,53 ^{#####}	26,45 \pm 1,04	32,49 \pm 0,98 ^{***}
<i>I_{corr}</i> (nMDP)	0,43 \pm 0,0051	0,39 \pm 0,01 ^{####}	0,43 \pm 0,002	0,42 \pm 0,002

(*) Diferencias entre WT y 3xTg-AD; (#) diferencias entre machos y hembras. ANOVA, test LSD de Fisher; N=5 ratones de cada grupo). #, *p<0,05; ##, **p<0,01; ###, ***p<0,001; ####p<0,0001.

Estos resultados sugieren que, como ya estaba descrito previamente (Oddo *et al.*, 2005), hay una clara reducción de $\alpha 7$ -nAChRs en el hipocampo en este ratón modelo de EA. Sin embargo, lo que hemos visto es que esta pérdida parece ser dependiente del sexo, ya que solo ocurre en hembras. Por otro lado, el aumento en ambos sexos de $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs en el ratón 3xTg-AD con respecto a los controles podría deberse a un efecto de compensación ante la pérdida funcional de $\alpha 7$ (que en el caso de los machos no va acompañada de una pérdida de expresión). Cabe destacar también el menor grado de colocalización de nAChRs en hembras 3xTg-AD, que también son el grupo con peor puntuación en el test cognitivo, pudiendo estos dos hechos estar relacionados.

6.3 Expresión y colocalización de nAChRs: CA1, CA3 y GD

Para analizar la expresión y colocalización de nAChRs en detalle en el hipocampo, y las posibles diferencias existentes entre los grupos de estudio, tomamos imágenes ampliadas de las áreas de interés CA1, CA3 y GD (**Fig. 44**) que analizamos por separado (**Fig. 45**).

El sexo parece ser un factor clave en cuanto a la expresión de nAChRs, como vimos en CCH. En ratones transgénicos, $\alpha 7$ -nAChR se expresa en mayor proporción en machos en todas las áreas estudiadas; mientras que $\alpha 3\beta 4$ -nAChR se encuentra aumentado en ratones tanto control como transgénicos. Este factor sin embargo, no afecta al grado de colocalización de ambos receptores. El único área en el que hay una diferencia significativa entre sexos en este aspecto, es CA3. Cabe destacar sin embargo, que de las tres áreas estudiadas, es en la que encontramos un mayor índice de colocalización de nAChRs.

En cuanto a la EA, como vimos en los cortes de hipocampo completo, parece afectar de manera exclusiva a las hembras, ya que las únicas diferencias significativas encontradas entre los ratones control y los 3xTg-AD se dan en este sexo, estando disminuidos los niveles de $\alpha 7$ -nAChRs en CA3 y GD; así como los de $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs en GD. De nuevo, este factor no parece influir en el patrón de colocalización de los marcadores, siendo CA1 el único área afectada por la enfermedad.

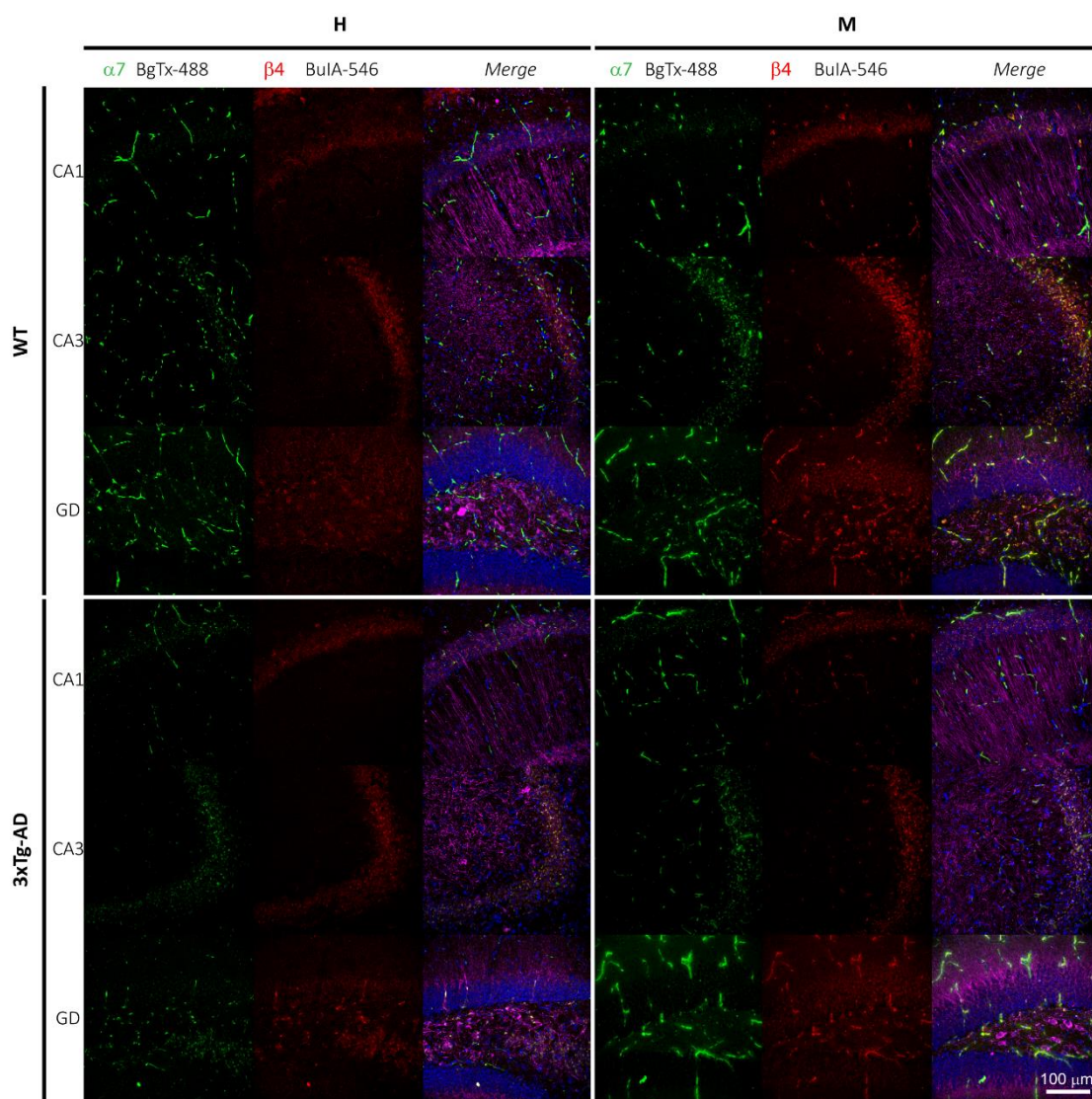


Fig. 44. Expresión y colocalización de $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs en las distintas áreas del hipocampo de ratón WT y 3xTg-AD. Imágenes confocales de las distintas áreas del hipocampo en cortes de cerebro de ratón: BgTx-488 ($\alpha 7$, verde), BuIA-546 ($\beta 4$, rojo) y *merge* con Hoechst (núcleo, azul) y MAP2-rb647 (neuronas, magenta). Panel superior izquierdo, hembras control; inferior 3xTg-AD. Panel superior derecho machos control; inferior 3xTg-AD. (Escala 100 μ M).

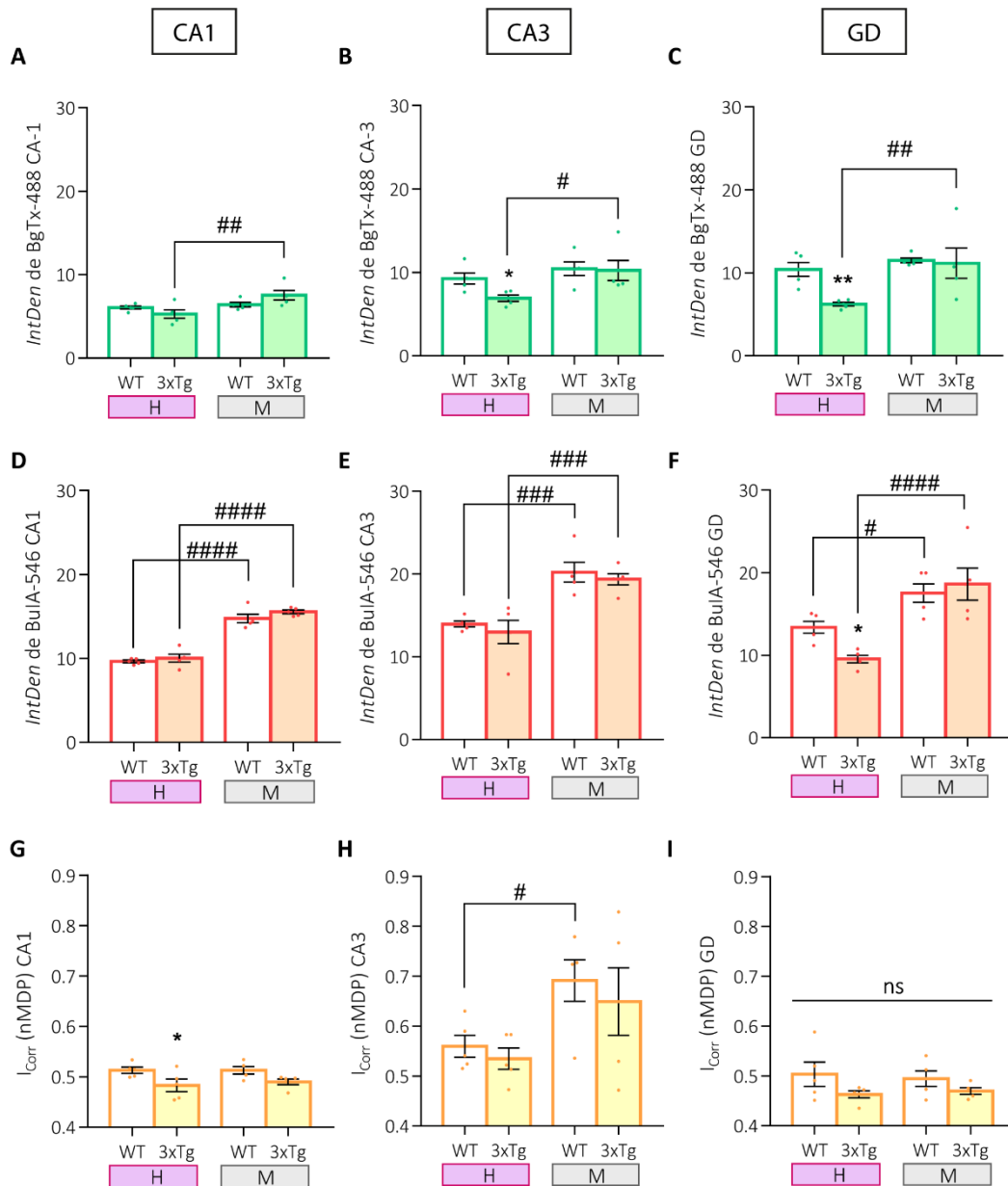


Fig. 45. Cuantificación de la expresión y colocalización de $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs en las distintas áreas del hipocampo de ratón WT y 3xTg-AD. Cuantificación de fluorescencia normalizada de BgTx-488, BuIA-546 e índice de colocalización en hembras (H, morado) y machos (M, gris); control (WT, barras blancas) y 3xTg-AD (barras sombreadas). (ANOVA, test LSD de Fisher; N=5 ratones de cada grupo): **A-D-G CA1. B-E-H. CA3. C-F-I. GD.** (*) *Diferencias entre WT y 3xTg-AD;* (#) *diferencias entre machos y hembras.* #, * $p < 0,05$; ##, ** $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$.

DISCUSIÓN

Los nAChRs constituyen una familia de receptores formada por diferentes subtipos dependiendo de la composición de sus subunidades, que también confieren a cada uno distintas propiedades funcionales, sensibilidad por distintos agonistas y permeabilidad al Ca^{2+} . Al menos dos subtipos diferentes se expresan en las diferentes áreas del SNC y SNP, y sin embargo la finalidad de esta co-expresión aún se desconoce. Nuestra hipótesis es que los distintos subtipos de receptores podrían estar cooperando para modular su función y para explorar esta idea, hemos estudiado los subtipos $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ en la CCH, así como en hipocampo de ratón, tanto en neuronas aisladas como en cortes del tejido cerebral.

Pese a la dificultad de la obtención de glándulas de donantes, más aún desde que se inició la pandemia mundial por COVID-19, trabajar en células cromafines humanas tiene una serie de claras ventajas. Principalmente, estudiar directamente una célula nativa humana evitando así la extrapolación desde otras especies. Como se ha descrito en la Introducción, las células cromafines constituyen un buen modelo de estudio, ya que poseen canales y receptores debido a su origen simpático. Sin embargo, la proporción de expresión de estos canales y receptores varía según las especies estudiadas. Así por ejemplo, está descrita la distinta proporción de subtipos de CCDV en células cromafines bovinas (Albillos *et al.*, 1993), de rata (Gandía *et al.*, 1995), de ratón (Albillos *et al.*, 2000; Aldea *et al.*, 2002; Pérez-Alvarez *et al.*, 2011) y humanas (Pérez-Alvarez *et al.*, 2008); distintas poblaciones de células cromafines de rata que expresan el subtipo nicotínico $\alpha 3\beta 2\beta 4^*$, aún no descrito en la célula cromafín humana (Hone *et al.*, 2020), incluso distinta sensibilidad a los mismos agonistas y antagonistas nicotínicos entre células cromafines de rata, bovinas y humanas (Hone *et al.*, 2017, Jiménez-Pompa *et al.*, 2021). Además, las CCH únicamente expresan dos subtipos de nAChRs: $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ (Pérez-Alvarez *et al.*, 2012a; Hone *et al.*, 2015; Hone *et al.*, 2017), haciendo más fácil el estudio de interacción entre ellos.

Resultados previos en nuestro grupo habían descrito que el **$\alpha 7$ -nAChR** es un receptor funcional en las CCH (Pérez-Alvarez *et al.*, 2012a), y que el subtipo que más

contribuía a la corriente nicotínica en este tipo celular era el $\alpha 3\beta 4$ (Hone *et al.*, 2015; Hone *et al.*, 2017). En esta Tesis Doctoral, mostramos que tras activar los nAChRs en estas células con la máxima eficacia ya sea con ACh, agonista fisiológico, o con uno sintético como DMPP (Hone *et al.*, 2017; Jiménez-Pompa *et al.*, 2021), la corriente nicotínica se ve potenciada, y se previene la desensibilización de ambos subtipos de nAChRs (Figs. 25-29). Este mecanismo sin embargo, depende de que ambos subtipos sean activados, ya que si solo se estimula el $\alpha 7$ -nAChR (Fig. 29), éste se desensibiliza rápidamente; y tanto en ese estado como bloqueado por la α -Ctx Ar1B, el subtipo $\alpha 3\beta 4$ no es capaz por sí solo de alcanzar la máxima corriente nicotínica (Fig. 30), ni de evocar por tanto la máxima secreción que alcanzaría al ser ambos subtipos estimulados a la vez (Fig. 32). Esto es interesante, ya que se estima que la concentración de Chol extracelular es 3-5 μ M (Dani y Bertrand, 2007) llegando hasta los 20 μ M en situaciones patológicas (Alkondon y Albuquerque, 2006). Es decir, Chol estaría desensibilizando los $\alpha 7$ -nAChRs y por tanto limitando la actividad de los $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs, controlando así el incremento de las corrientes activadas por ACh. Es relevante resaltar, que mientras la activación del $\alpha 7$ -nAChR por Chol potenciada por la activación de $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs en las CCH solo produce un leve incremento no significativo en la capacitancia de la membrana celular (Fig. 32), en las células cromafines bovinas esta activación produce la secreción de catecolaminas, aunque ésta correspondería tan solo al 10 % de la secreción total evocada por ACh (Fuentelba *et al.*, 2004). Es probable que la discrepancia en estos resultados se deba en primer lugar, a la diferencia de distribución de nAChRs que existe entre las dos especies; en segundo lugar, a la distinta concentración de Chol utilizada en ambos experimentos, y en tercer lugar y quizá el motivo más relevante, a la diferencia de la metodología empleada, ya que en los experimentos en células cromafines bovinas se registró la secreción de catecolaminas mediante la técnica de amperometría en poblaciones, mientras que en nuestro caso hemos determinado la exocitosis mediante la medida de los cambios en la C_m .

Una de las primeras preguntas que surgen a la luz de estos resultados es si el **aumento de la corriente nicotínica** en las CCH se debe a una mayor expresión de nAChRs en la membrana plasmática (Harkness y Millar, 2002), o a que los ya disponibles adquieren una conformación más fácilmente activable (Buisson y Bertrand, 2001). El

proceso ocurre en una escala de segundos (Fig. 29B), luego puede descartarse que la potenciación venga dada por un aumento de la síntesis *de novo* de estas proteínas. Los experimentos de marcaje con α -Ctx selectivas de subtipos unidas a fluoróforos Alexa, muestran que tras la potenciación con ACh, se produce un aumento de la expresión tanto de los $\alpha 7$ como de los $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs (Fig. 33). De la misma manera que en los experimentos de actividad, este incremento no se produce si alguno de los dos subtipos está desensibilizado o bloqueado, lo que refuerza la idea de la modulación conjunta de estos dos subtipos. La sobreexpresión de nAChRs mediada por la incubación prolongada de un agonista nicotínico como la propia nicotina, es un proceso que ya había sido descrito anteriormente (St John, 2009), pero la particularidad de nuestro hallazgo es que el aumento de expresión ocurre de manera inmediata, tras la aplicación de una serie de pulsos cortos de ACh (500 ms cada 90 s).

Este experimento no esclarece sin embargo si hay un aumento del tráfico de nAChRs hacia la membrana o un cambio conformacional que los haga más activables, ya que ambos escenarios darían como resultado una mayor unión de BgTx a las subunidades $\alpha 7$ y de BuIA a las $\beta 4^*$. Está descrito que la activación de los $\alpha 7$ -nAChRs en las espinas somáticas de las neuronas induce un tráfico rápido Ca^{2+} -dependiente de estos mismos receptores, a través de secreción mediada por proteínas SNARE (Liu *et al.*, 2005). En nuestro modelo, retirando el Ca^{2+} de la solución extracelular, la potenciación de la corriente nicotínica se abole (Fig. 34), lo que podría hacer pensar que tanto este proceso, como la sobreexpresión de nAChRs en la membrana, viene dado por la exocitosis. Sin embargo, aún en ausencia de Ca^{2+} , la activación de ambos receptores es capaz de prevenir la desensibilización de los mismos, e incluso de potenciar la corriente $\alpha 7$, es decir, que el incremento de actividad y expresión de los nAChRs debe estar regulado, en parte, por otro mecanismo independiente del Ca^{2+} extracelular.

Nuestros resultados también mostraron un elevado índice de **colocalización e interacción física** de los marcadores para $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs, siendo ésta independiente de actividad, ya que ninguna de las maniobras anteriormente descritas (potenciación, desensibilización, bloqueo) afectó a la interacción (Fig. 35). Surge la pregunta de si esta interacción responde a la posible conformación de un receptor heteromérico mixto, o a la interacción de receptores independientes en una sola unidad funcional. Las

subunidades de tipo $\alpha 7$ forman predominantemente receptores homoméricos y sin embargo, se ha visto que también pueden formar receptores heteroméricos funcionales al combinarse de manera estable con subunidades $\beta 3$, $\beta 2$ y $\beta 4$ (Palma *et al.*, 1999; Khiroug *et al.*, 2002; Criado *et al.*, 2012) en sistemas de expresión heteróloga como oocitos de *Xenopus* e incluso se han logrado expresar de manera estable y funcional en cultivo primario de células cromafines bovinas (Criado *et al.*, 2012). La combinación con $\beta 2$, además, se ha encontrado y descrito en neuronas de la corteza cerebral (Moretti *et al.*, 2014; Thomsen *et al.*, 2015). En células cromafines bovinas ya se ha discutido previamente la posibilidad de que exista un receptor heteromérico mixto $\alpha 3\alpha 7\beta 4$, al observar las notables diferencias cinéticas de las corrientes nicotínicas evocadas en estas células, respecto a las obtenidas en oocitos de *Xenopus* que expresaban los $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs de manera independiente (Maneu *et al.*, 2002; González-Rubio *et al.*, 2006).

La posible formación de un receptor mixto $\alpha 7$ y no- $\alpha 7$ tendría un gran interés. A nivel fisiológico, se modificarían los sitios de unión al agonista (Mazzaferro *et al.*, 2011) lo que conferiría diferentes propiedades cinéticas y funcionales a este nuevo receptor. Dada la poca eficiencia del tráfico hasta la membrana plasmática del subtipo $\alpha 7$, la posible interacción con otras subunidades podría también facilitar este proceso, aumentando así su presencia en membrana (Millar y Harkness, 2008; Colombo *et al.*, 2013; Crespi *et al.*, 2018). La inclusión de una subunidad $\alpha 5$, así como de una $\beta 3$, aumenta la sensibilidad y la desensibilización de los receptores heteroméricos $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 3\beta 2$ (Ramírez-Latorre *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996; Gerzanich *et al.*, 1998; Boorman *et al.*, 2000), como ocurre también con el subtipo $\alpha 4\beta 2$ (Nelson *et al.*, 2003; Moroni *et al.*, 2006).

No se puede descartar sin embargo, dada la gran variedad de tejidos en los que los $\alpha 7$ -nAChRs se encuentran colocalizando con otros nAChRs (Fig. 8) (Gotti *et al.*, 2006; Zoli *et al.*, 2015; Giribaldi y Dutertre, 2018), que otra posibilidad que explicaría nuestros resultados de interacción sea la de una unión reversible receptor-receptor. Este tipo de uniones ya se han descrito en el SNP (Conroy *et al.*, 2003; Parker *et al.*, 2004), donde gracias a la interacción de subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ con proteínas de andamiaje como PSD95, se forman agrupaciones funcionales o *clusters* de $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs que potencian la transmisión de la señal. En hipocampo, los $\alpha 7$ -nAChRs forman este tipo de agrupaciones en interneuronas GABAérgicas, reguladas positivamente por neuroleuquinas, neurotrofinas

e incrementos en la actividad de receptores NMDA (Conroy *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001b; Kawai *et al.*, 2002), y negativamente por la proteína de andamiaje PICK1 (Baer *et al.*, 2007). En los ganglios ciliares, serían los microdominios formados en las balsas lipídicas los que regularían esta agregación, mientras que en receptores musculares estarían reguladas por procesos de fosforilación/desfosforilación dependientes de enzimas de la familia Src (Wiesner y Fuhrer, 2006). No obstante hasta la fecha, no se han descrito agrupaciones funcionales mixtas conformadas por distintos subtipos de nAChRs, ni la posible cooperación o funcionalidad que tendrían las mismas.

Según nuestros resultados, esta interacción y la propia expresión de los nAChRs que la conforman, al menos en parte está regulada en las CCH por mecanismos de fosforilación/desfosforilación sobre residuos de **Tyr** de sus bucles citoplasmáticos por la familia de enzimas Src. Así, la inhibición de Tyr-P por pervanadato, disminuye tanto la disponibilidad en membrana de los $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs, como la interacción física entre ellos (Fig. 36). En SNC en cambio, la regulación de expresión y la colocalización no parecen ir acopladas de la misma manera. Mientras que la fosforilación de residuos de Tyr también produce una disminución de la expresión de los $\alpha 7$ -nAChRs de las nHP, la desfosforilación de estos mismos residuos evocada por la inhibición de Tyr-K produce un incremento en la expresión de $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs. Sin embargo, cualquiera de los dos desequilibrios induce el desacoplamiento de la colocalización (Fig. 37).

Que el mismo proceso bioquímico tenga como resultado distintas respuestas fisiológicas sobre los nAChRs según el subtipo y la localización de los mismos, es algo que ya se conoce. La fosforilación de $\alpha 7$ -nAChRs en SNC, por ejemplo, juega un papel muy importante respecto a su tipo de respuesta, ya que aunque en su estado desfosforilado sus propiedades como ionóforo y conductor de Ca^{2+} se ven claramente potenciadas, es en su estado fosforilado cuando se desencadenan respuestas metabotrópicas relacionadas con la neuroprotección (Chrestia *et al.*, 2021).

En cuanto a la regulación de los $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs, está descrito que en células cromafines bovinas la fosforilación de estos receptores potencia la exocitosis y con ello la secreción de catecolaminas al torrente sanguíneo (Wang *et al.*, 2004). Esta observación, contradice en parte nuestros resultados, ya que en CCH, aunque no hemos hecho

experimentos de actividad ni de secreción, la fosforilación de residuos de Tyr promovida por pervanadato reduce significativamente la expresión de estos receptores en membrana, por lo que en principio, no parecería muy probable que hubiese un aumento de la actividad secretora. Esta discrepancia puede explicarse en parte por la distinta distribución de nAChRs que existe en ambas especies. En las glándulas adrenales bovinas, las células cromafines que expresan $\alpha 7$ -nAChRs están restringidas en la zona externa de médula que está en contacto con la corteza (entre las cuales existe una clara separación), y colocalizan con la enzima feniletanolamina N-metil transferasa (PNMT), es decir se expresan únicamente en células adrenérgicas (Criado *et al.*, 1997). Tanto la expresión de PNMT, como la transcripción del gen que codifica para las subunidades $\alpha 7$, están activadas por glucocorticoides, producto de secreción de la corteza adrenal (Wurtman y Axelrod, 1965; Carrasco-Serrano y Criado, 2004). En las glándulas adrenales humanas en cambio, la corteza y la médula están entremezcladas (Albillos y McIntosh, 2018), el 99% de todas las células cromafines son adrenérgicas (Pérez-Alvarez *et al.*, 2008) y expresan $\alpha 7$ -nAChRs (Pérez-Alvarez *et al.*, 2012a; Hone *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta el claro efecto modulador que según nuestros resultados ejerce este receptor sobre los $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs, y que su actividad se ve disminuida por porcesos de fosforilación (Charpantier *et al.*, 2005), no es de extrañar que nuestros resultados no coincidan con los obtenidos en células cromafines bovinas, ya que en CCH la fosforilación de $\alpha 7$ -nAChRs estaría regulando negativamente la actividad de $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs.

La **modulación** de los nAChRs de las nHP por la fosforilación de sus residuos de **Ser/Thr** dio resultados similares a los obtenidos con la familia Src. La inducción de la fosforilación de estos residuos mediante la inhibición de PP2A por AO redujo de manera significativa la expresión de los $\alpha 7$ -nAChRs, mientras que la activación de esta fosfatasa por el compuesto ITH12680 incrementó significativamente la expresión de los $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs. Ambos desequilibrios redujeron significativamente la colocalización de estos receptores (Fig. 38). Modelos animales de EA presentan niveles elevados de inhibidores endógenos de esta proteín-fosfatasa (Tanimukai *et al.*, 2005; Sontag y Sontag, 2014), que también se encuentra inactivada o inhibida en cerebros post-mortem de pacientes de EA (Sontag *et al.*, 2004). PP2A no solo está modulando la fosforilación de los residuos de Ser/Thr de los nAChRs, sino toda una compleja cascada de señalización de

fosforilación/desfosforilación que va a dar lugar (entre otros) a la activación de GSK3 β , principal quinasa responsable de la hiperfosforilación de tau (Grimes y Jope, 2001; Hooper *et al.*, 2008). En experimentos realizados en GD de hipocampo de rata se vio que la activación de los α 7-nAChRs desencadenaba la vía de señalización neuroprotectora a través de PI3K/Akt, que inhibe la actividad GSK3 β (Bitner *et al.*, 2009), mostrando lo íntimamente relacionados que están todos estos procesos.

En esta Tesis Doctoral, escogimos como sustrato para comprobar la modulación de la fosforilación de los residuos de Ser de los nAChRs la inhibición de PP2A. Sin embargo, no es la única capaz de llevar a cabo esa función. En estudios realizados en interneuronas corticales, se vio que la activación de receptores dopaminérgicos D1/D5 disminuía considerablemente las corrientes α 7, por medio de la activación de PKA, que a su vez fosforila residuos de Ser de los bucles citoplasmáticos de estos receptores (Komal *et al.*, 2015). De cualquier manera, queda patente la relevancia que tiene la modulación de los nAChRs por mecanismos de fosforilación/desfosforilación, y la necesidad de mantener estos procesos estrechamente regulados.

Es importante resaltar en este punto la acción del compuesto novel **ITH12680**. Además de su efectividad revirtiendo los efectos del AO, molécula ampliamente validada como modelo *in vitro* de EA (Kamat *et al.*, 2013), su incubación durante 24 h dio como resultado *per se* el aumento significativo de los α 3 β 4-nAChRs expresados en las nHP. Este subtipo de nAChR juega un papel imprescindible en la regulación de la plasticidad sináptica del hipocampo (Alkondon y Albuquerque, 2002) potenciando la liberación de glutamato (Ji *et al.*, 2001; Ge y Dani, 2005), luego su propia sobreexpresión abriría una interesante vía de investigación en relación a la posible acción beneficiosa de este compuesto en enfermedades con afectación colinérgica.

En este estudio, otro de los aspectos que quisimos investigar fueron los posibles cambios que podrían darse con la **edad** en cuanto a la actividad, expresión e interacción de α 7 y α 3 β 4-nAChRs en CCH. Ya se había descrito previamente la disminución de la transcripción de nAChRs en cerebro humano (Tohgi *et al.*, 1998), así como el déficit de marcadores colinérgicos (ChAT, liberación de ACh) en cerebro de roedores (Araujo *et al.*, 1990). Encontramos que la eficiencia de la interacción física entre los receptores α 7 y

$\alpha 3\beta 4$ disminuye significativamente en los donantes mayores de 50 años y sin embargo, la expresión de ambos receptores se mantiene más o menos estable con la edad (Fig. 39). Además, la desensibilización $\alpha 7$ afecta de manera mucho más significativa a las corrientes nicotínicas de las CCH procedentes de donantes mayores de 50 años (Fig. 40). Dado que estos donantes han perdido parte de la interacción física entre los receptores $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$, la desensibilización de los $\alpha 7$ -nAChRs comprometerá también la actividad $\alpha 3\beta 4$. Este es un hallazgo relevante, ya que ayudaría a comprender el declive funcional de la actividad colinérgica durante el envejecimiento, entre otros mecanismos (Schliebs y Arendt, 2011).

Nuestros datos constituyen también el primer estudio en el que la expresión y la actividad de $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs se han determinado de manera diferencial en hombres y mujeres en CCH. Lamentablemente, existe poca literatura respecto al **dimorfismo sexual** en cuanto a la expresión y actividad de los nAChRs. Históricamente el estudio de las hembras de los distintos modelos animales está infrarrepresentado en la investigación preclínica, siendo tan solo el 15% de todos los estudios publicados en el área de neurociencia desde el año 2017 los que utilizan ambos sexos para su experimentación (Mamlouk *et al.*, 2020). Nuestro estudio muestra que las CCH procedentes de mujeres expresan significativamente menor cantidad de ambos subtipos de receptores (Fig. 41). Este singular hallazgo podría relacionarse con la evidente producción diferencial de hormonas sexuales, algunas de las cuales interaccionan de manera no alostérica con los nAChRs (Léna y Changeux, 1993). De hecho, a nivel molecular los esteroides neuroactivos pueden actuar a nivel intracelular como factores de transcripción regulando la expresión génica de la mayoría de LGICs, incluidos los nAChRs (Zheng, 2009), lo que explicaría los resultados que observamos en nuestro estudio. Por otro lado, la unión de esteroides como la progesterona desensibiliza de manera muy potente los nAChRs que contienen subunidades $\alpha 3$ y $\alpha 7$ (Ke y Lukas, 1996; Stitzel *et al.*, 1996). Sin embargo, en nuestro estudio mostramos que aunque la expresión de nAChRs está notablemente reducida en mujeres, éstos son capaces de mantener la misma actividad nicotínica que se registra en las CCH procedentes de hombres.

Una vez descritos los procesos de modulación recíproca tanto de la actividad como de la expresión e interacción de los subtipos $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs, así como sus

propiedades diferenciales dependientes de sexo y edad en sendos modelos celulares de SNP y SNC, quisimos comprobar si algunos de esos hallazgos serían también relevantes en un modelo de ratón de enfermedad con afectación colinérgica, como es la **EA**. El ratón 3xTg-AD desarrolla placas de A β desde los 6 meses de edad en la corteza cerebral, coincidiendo en el tiempo con la aparición temprana de déficit en la función sináptica, así como en la memoria (Billings *et al.*, 2005). Sin embargo, este signo histopatológico, así como la aparición de inmunorreactividad para tau, no es patente en el hipocampo hasta llegados los 12 meses de edad (Oddo *et al.*, 2003b); por este motivo, decidimos establecer la fase de prueba de nuestros ratones, machos y hembras, a partir de esta edad.

Las pruebas de comportamiento realizadas mostraron una gran dispersión en los resultados de las hembras 3xTg-AD, además de diferencias significativas en cuanto a su velocidad de movimiento en la prueba de campo abierto, la cual da idea del nivel de ansiedad de los sujetos. Esto concuerda con los estudios que describen que las hembras muestran una elevada secreción de corticosterona tras las pruebas de comportamiento, lo que determinaría que padecen más estrés (Clinton *et al.*, 2007). En cuanto a la prueba de reconocimiento de objetos, que evalúa la memoria de los ratones, tanto los machos como las hembras transgénicos obtuvieron peores puntuaciones que los animales control, aunque estas diferencias solo fueron estadísticamente significativas en el caso de las hembras (Fig. 42). Éstas expresan menor cantidad de nAChRs (*ver más adelante*), y en este modelo se ha descrito una disminución en concreto de la expresión de los $\alpha 7$ -nAChRs en hipocampo, corteza y tálamo a partir de los 6 meses de edad, en comparación con la cepa control (Oddo *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta que el bloqueo selectivo de receptores nicotínicos en hipocampo afecta negativamente a la codificación de la información y a la memoria espacio-temporal (Rogers y Kesner, 2003), estos resultados son los esperables.

Los niveles de expresión de $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs en la formación hipocampal son inferiores en hembras en comparación con los machos, tanto en los ratones WT como en los 3xTg-AD. Tal y como describen Oddo y colaboradores (2005), la expresión de $\alpha 7$ -nAChRs disminuye significativamente en el modelo de EA, aunque en nuestro estudio hemos observado que esta reducción se produce únicamente en las hembras (Fig. 43).

Por el contrario, la expresión de $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs se ve aumentada en nuestro estudio en los ratones transgénicos, independientemente del sexo. Está descrito que en los modelos murinos de EA, A β interacciona con una afinidad excepcionalmente elevada (del orden pM) con los $\alpha 7$ -nAChRs (Wu *et al.*, 2004), lo que impediría la unión tanto del agonista en estado fisiológico, como en nuestros experimentos de la α -BgTx marcada. Se ha propuesto que la sobreexpresión de nAChRs no- $\alpha 7$ en zonas con acumulación de placas de A β se deba a un mecanismo compensatorio por la pérdida de funcionalidad de los $\alpha 7$ -nAChRs (Bednar *et al.*, 2002), aunque los mecanismo que regulan este proceso aún no están del todo esclarecidos (Perry *et al.*, 2000; Zamani y Allen, 2001).

La colocalización de ambos receptores resultó ser significativamente menor también en las hembras 3xTg-AD, en comparación tanto con las hembras WT, como con los machos transgénicos. Hay estudios que describen que la unión de A β a los $\alpha 7$ -nAChRs induce un incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular que activaría quinasas dependientes de Ca²⁺, responsables del incremento de la fosforilación de las proteínas tau (Dineley *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003). La hiperfosforilación de las proteínas tau las hace insolubles, dando lugar a la desestabilización de los microtúbulos y con ello a la disrupción de todo el sistema de andamiaje proteico de la célula. Teniendo en cuenta que las hembras 3xTg-AD son el grupo con menor expresión de $\alpha 7$ -nAChRs, y asumiendo que parte de la disminución que se observa se deba a la interacción de este subtipo con A β , la disminución de la colocalización con $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs podría estar relacionada con la disrupción de las proteínas de andamiaje provocada por la hiperfosforilación de tau, que como se ha discutido previamente, podrían estar mediando en la formación de agrupaciones funcionales de estos receptores.

Quisimos además evaluar en detalle áreas concretas de interés de la formación hipocampal en este modelo de ratón transgénico. Una rica red de fibras colinérgicas inervan el hipocampo “propriadamente dicho” y el GD, estableciendo contactos sinápticos en células piramidales, células granulares e interneuronas de las diferentes capas. Además, hay un contenido colinérgico elevado no asociado a sinapsis, que regula el volumen de la secreción de otros NTs (Dani y Bertrand, 2007).

Como hemos ido describiendo, el sexo parece ser un factor clave en cuanto a la **expresión** diferencial de los nAChRs. La expresión de los $\alpha 7$ -nAChRs se encuentra disminuida respecto a los machos en las hembras transgénicas de las 3 áreas estudiadas (CA1, CA3 y GD), mientras que los $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs se expresan en menor cantidad tanto en hembras WT como 3xTg-AD.

En cuanto la EA, en nuestro modelo parece ser un factor relevante únicamente en dos aspectos: i) la disminución de la expresión de los $\alpha 7$ -nAChRs en hembras en CA3 y GD, y ii) la disminución de los $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs en hembras en GD.

En CA3, y como se ha comentado anteriormente, existe una estrecha regulación de la función de los $\alpha 7$ -nAChRs a través de un numeroso grupo de quinasas. Se ha descrito que los $\alpha 7$ -nAChRs que modulan las oscilaciones de tipo γ y de la sincronización neuronal en esta zona (Wang *et al.*, 2015) estarían potenciados por proteín-quinasa A y C, receptores NMDA, PI₃K y ERK, y abolidos por la Ser/Thr quinasa Akt (Wang *et al.*, 2017). No es de extrañar que en una enfermedad que cursa precisamente con un aumento de la fosforilación, la desregulación de este mecanismo afecte negativamente a los receptores expresados en este área, ya que como se ha visto, la fosforilación de este subtipo no solamente interrumpe su función, sino también su propia expresión (Cho *et al.*, 2005). Además, en experimentos en rata se vio que el bloqueo selectivo de los nAChRs de CA3, afectaba notablemente a funciones cognitivas superiores, como la codificación de la información y la memoria (Rogers y Kesner, 2003), síntomas también de la EA.

En cuando al GD, que regula el flujo de información que llega al hipocampo (Heinemann *et al.*, 1992; Lothmann *et al.*, 1992) y donde la plasticidad sináptica está directamente implicada en la EA (Palop *et al.*, 2003), es interesante resaltar que ambos subtipos se encuentren disminuidos precisamente en el grupo de animales que obtuvieron la peor puntuación en el test de reconocimiento.

En cuanto al análisis de **colocalización de los $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs**, es interesante comentar que en CA1, donde está descrito que receptores $\alpha 7$ y no- $\alpha 7$ conviven en la misma célula (Alkondon y Albuquerque, 2001) y donde además los $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs juegan un papel relevante en la regulación de la plasticidad sináptica (Alkondon y Albuquerque, 2002), es el único área en el que hemos encontrado diferencias significativas entre WT y

transgénicos en cuanto a la colocalización, de nuevo en el grupo de las hembras. Esto podría indicar que la interacción de ambos receptores precisamente en este área juega un papel importante, y se ve interrumpido en la EA.

Por otro lado, y aunque no hay evidencia estadística, llama la atención la gran dispersión de datos que existe en el área CA3. En los experimentos de nHP aisladas, describimos que la desregulación de la fosforilación tanto en las Tyr como en Ser/Thr, tenía un efecto negativo sobre la colocalización de los nAChRs estudiados. Podría ser que la desregulación endógena de estos procesos, inherente a la EA, esté afectando también a la interacción en esta área.

CONCLUSIONES

El objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar la posible interacción funcional entre los $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs, así como los posibles mecanismos implicados en dicha interacción y su regulación, tanto en SNP como en SNC, en situación fisiológica y en la EA. 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. La activación con máxima eficacia de los $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs por el agonista fisiológico ACh incrementa la expresión de ambos subtipos en la membrana plasmática y previene su desensibilización debido a su cooperación mutua en las CCH.
2. La activación con máxima eficacia de los $\alpha 7$ -nAChRs y parcial de los $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs induce la desensibilización de los dos subtipos en las CCH. Así Chol actúa como limitador de la potenciación de la actividad nicotínica.
3. Otro factor limitante de la actividad es el Ca^{2+} ya que en su ausencia, aunque se previene la desensibilización de los $\alpha 7$ -nAChRs, la actividad nicotínica de las CCH no se ve incrementada tras la estimulación repetida con ACh.
4. Los $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs interaccionan físicamente en las CCH. Esta interacción es independiente de la actividad de los nAChRs, es dependiente de la edad y está regulada por procesos de fosforilación/desfosforilación sobre residuos de Tyr.
5. La expresión, pero no la interacción física ni la actividad de los nAChRs, varía con el sexo en CCH, siendo significativamente menor en las mujeres que en los hombres.
6. Los $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs colocalizan en el hipocampo, tanto en nHP aisladas como en cortes de cerebro de ratón.

7. El AO, ampliamente utilizado como modelo *in vitro* de EA, disminuye significativamente tanto la expresión como la colocalización entre los dos subtipos de nAChRs estudiados en nHP. El compuesto ITH12680, activador de PP2A no solo es capaz de revertir este efecto, sino que además incrementa *per se* la expresión del subtipo $\alpha 3\beta 4$.
8. En cortes de cerebro de la formación hipocampal de ratón existe un claro dimorfismo sexual en cuanto a la expresión de $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs, siendo significativamente menor en hembras que en machos. Este dimorfismo sin embargo, es únicamente patente en el transgénico en cuanto a la colocalización de ambos receptores y al deterioro cognitivo establecido por las pruebas de comportamiento.
9. En la formación hipocampal del modelo de ratón 3xTg-AD respecto a la cepa de ratón control, hay una clara disminución de la expresión de $\alpha 7$ -nAChRs así como de la colocalización de $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs en las hembras. Sin embargo, los $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs están aumentados respecto al ratón WT en ambos sexos.
10. La afectación de la expresión y colocalización de $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ -nAChRs en el modelo de ratón 3xTg-AD, depende de cada área concreta del hipocampo, afectando en todas ellas únicamente a las hembras. Mientras que $\alpha 7$ se encuentra disminuido en CA3 y GD, $\alpha 3\beta 4$ solo está afectado en GD y la colocalización de ambos subtipos se encuentra disminuida en CA1.

En conjunto, estos hallazgos muestran que la interacción funcional entre distintos subtipos de nAChRs contribuye a modular su propia actividad y expresión, y que puede venir acompañada de una interacción física, regulada a su vez por procesos de fosforilación/desfosforilación. Todo ello abre una nueva línea de investigación con varias dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos encaminados a modular su función en patologías con afectación colinérgica, como la enfermedad de Alzheimer.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, J.J., Howlett, D.R., Francis, P.T. y Williams, R.J. (2008). A β 1–42 modulation of Akt phosphorylation via α 7 nAChR and NMDA receptors. *Neurobiology of Aging*, 29(7): 992-1001.
- Akondi, K.B., Muttenthaler, M., Dutertre, S., Kaas, Q., Craik, D.J., Lewis, R. J., y Alewood, P.F. (2014). Discovery, synthesis, and structure–activity relationships of conotoxins. *Chemical reviews*, 114(11), 5815-5847.
- Albillos, A., García, A.G. y Gandía, L. (1993). ω -Agatoxin-IVA-sensitive calcium channels in bovine chromaffin cells. *FEBS Letters*, 336(2): 259-262.
- Albillos, A., Neher, E. y Moser, T. (2000). R-Type Ca²⁺ channels are coupled to the rapid component of secretion in mouse adrenal slice chromaffin cells. *Journal of Neuroscience*, 20(22), 8323-8330.
- Albillos, A. y McIntosh, J.M. (2018). Human nicotinic receptors in chromaffin cells: characterization and pharmacology. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 470(1): 21-27.
- Albuquerque, E.X., Alkondon, M., Pereira, E.F., Castro, N.G., Schrattenholz, A., Barbosa, C.T., Bonfante-Cabarcas, R., Aracava, Y., Eisenberg, H.M. y Maelicke, A. (1997). Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological characterization and modulation of synaptic function. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280(3): 1117-1136.
- Albuquerque, E.X., Pereira, E.F., Alkondon, M. y Rogers, S.W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews*, 89(1): 73-120.
- Aldea, M., Jun, K., Shin, H.S., Andrés-Mateos, E., Solís-Garrido, L.M., Montiel, C., García, A.G. y Albillos, A. (2002). A perforated patch-clamp study of calcium currents and exocytosis in chromaffin cells of wild-type and α 1A knockout mice. *Journal of neurochemistry*, 81(5), 911-921.
- Alexander, J.K., Sagher, D., Krivoshein, A.V., Criado, M., Jefford, G. y Green, W.N. (2010). Ric-3 promotes α 7 nicotinic receptor assembly and trafficking through the ER subcompartment of dendrites. *Journal of Neuroscience*, 30(30): 10112-10126.
- Alexander, S.P., Mathie, A. y Peters, J.A. (2011). Guide to receptors and channels (GRAC). *British Journal of Pharmacology*, 164: S1-S2.
- Alkondon, M., Pereira, E.F. y Albuquerque, E.X. (1998). α -Bungarotoxin-and methyllycaconitine-sensitive nicotinic receptors mediate fast synaptic transmission in interneurons of rat hippocampal slices. *Brain Research*, 810(1-2): 257-263.
- Alkondon, M. y Albuquerque, E.X. (2001). Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 and alpha4beta2 subtypes differentially control GABAergic input to CA1 neurons in rat hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, 86(6): 3043-3055.
- Alkondon, M. y Albuquerque, E.X. (2002). A non- α 7 nicotinic acetylcholine receptor modulates excitatory input to hippocampal CA1 interneurons. *Journal of Neurophysiology*, 87(3): 1651-1654.
- Alkondon, M. y Albuquerque, E.X. (2006). Subtype-specific inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by choline: a regulatory pathway. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318(1): 268-275.
- Amaral, D., Andersen, P., O'Keefe, J. y Morris, R. (2007). *The hippocampus book*. Oxford University Press.
- Andersen, N., Corradi, J., Sine, S.M. y Bouzat, C. (2013). Stoichiometry for activation of neuronal α 7 nicotinic receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(51): 20819-20824.

- Araud, T., Graw, S., Berger, R., Lee, M., Neveu, E., Bertrand, D. y Leonard, S. (2011). The chimeric gene *CHRFAM7A*, a partial duplication of the *CHRNA7* gene, is a dominant negative regulator of $\alpha 7^*$ nAChR function. *Biochemical Pharmacology*, 82(8): 904-914.
- Araujo, D.M., Lapchak, P.A., Meaney, M.J., Collier, B. y Quirion, R. (1990). Effects of aging on nicotinic and muscarinic autoreceptor function in the rat brain: relationship to presynaptic cholinergic markers and binding sites. *Journal of Neuroscience*, 10(9): 3069-3078.
- Arribas, R.L., Bordas, A., Domènech Omella, J., Cedillo, J.L., Janssens, V., Montiel, C. y de Los Ríos, C. (2020). An okadaic acid fragment analogue prevents nicotine-induced resistance to cisplatin by recovering PP2A activity in non-small cell lung cancer cells. *Bioorganic Chemistry*, 100: 103874.
- Auld, D.S., Kornecook, T.J., Bastianetto, S. y Quirion, R. (2002). Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to β -amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Progress in Neurobiology*, 68(3): 209-245.
- Azam, L., Maskos, U., Changeux, J., Dowell, C.D., Christensen, S., De Biasi, M. y McIntosh, J.M. (2010). α -Conotoxin BuIA [T5A; P6O]: a novel ligand that discriminates between $\alpha 6\beta 4$ and $\alpha 6\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors and blocks nicotine-stimulated norepinephrine release. *The FASEB Journal*, 24(12): 5113.
- Baer, K., Bürli, T., Huh, K., Wiesner, A., Erb-Vögtli, S., Göckeritz-Dujmovic, D., Moransard, M., Nishimune, A., Rees, M.I., Henley, J.M., Frisetsch, J. y Fuhrer, C. (2007). PICK1 interacts with $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptors and controls their clustering. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 35(2): 339-355.
- Barnard, E.A., Coates, V., Dolly, J.O. y Mallick, B. (1977). Binding of α -bungarotoxin and cholinergic ligands to acetylcholine receptors in the membrane of skeletal muscle. *Cell Biology International Reports*, 1(1): 99-106.
- Bartlett, W.P. y Banker, G.A. (1984). An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. I. Cells which develop without intercellular contacts. *Journal of Neuroscience*, 4(8): 1944-1953.
- Bednar, I., Paterson, D., Marutle, A., Pham, T.M., Svedberg, M., Hellström-Lindahl, E., Mousavi, M., Court, J., Morris, C., Perry, E., Mohammed, A., Zhang, X. y Nordberg, A. (2002). Selective nicotinic receptor consequences in APPSWE transgenic mice. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 20(2): 354-365.
- Bekbossynova, A., Zharylgap, A. y Filchakova, O. (2021). Venom-Derived Neurotoxins Targeting Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Molecules*, 26(11): 3373.
- Bello-Arroyo, E., Roque, H., Marcos, A., Orihuel, J., Higuera-Matas, A., Desco, M., Caiolfa, V.R., Ambrosio, E., Lara-Pezzi, E. y Gómez-Gaviro, M.V. (2018). MouBeAT: A New and Open Toolbox for Guided Analysis of Behavioral Tests in Mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12: 201.
- Bertrand, D., Valera, S., Bertrand, S., Ballivet, M. y Rungger, D. (1991). Steroids inhibit nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroreport*, 2(5): 277-280.
- Biales, B., Dichter, M. y Tischler, A. (1976). Electrical excitability of cultured adrenal chromaffin cells. *The Journal of Physiology*, 262(3): 743-753.
- Billings, L.M., Oddo, S., Green, K.N., McGaugh, J.L. y LaFerla, F.M. (2005). Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*, 45(5): 675-688.
- Bitner, R.S., Nikkel, A.L., Markosyan, S., Otte, S., Puttfarcken, P. y Gopalakrishnan, M. (2009). Selective $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor activation regulates glycogen synthase kinase3 β and decreases tau phosphorylation in vivo. *Brain Research*, 1265: 65-74.
- Boorman, J.P., GrootKormelink, P.J. y Sivilotti, L.G. (2000). Stoichiometry of human recombinant neuronal nicotinic receptors containing the $\beta 3$ subunit expressed in *Xenopus* oocytes. *The Journal of Physiology*, 529(3): 565-577.

- Bormann, J. y Clapham, D.E. (1985). gamma-Aminobutyric acid receptor channels in adrenal chromaffin cells: a patch-clamp study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(7): 2168-2172.
- Bornstein, S.R., Ehrhart-Bornstein, M., Androutsellis-Theotokis, A., Eisenhofer, G., Vukicevic, V., Licinio, J., Wong, M., Calissano, P., Nistico, G., Preziosi, P. y Levi-Montalcini, R. (2012). Chromaffin cells: the peripheral brain. *Molecular Psychiatry*, 17(4): 354-358.
- Brandt, B.L., Hagiwara, S., Kidokoro, Y. y Miyazaki, S. (1976). Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *The Journal of Physiology*, 263(3): 417-439.
- Briggs, C.A. y Gopalakrishnan, M. (2007). 2.22 - Ion Channels – Ligand Gated. En: Taylor, J.B. y Triggle, D.J. (Eds.), *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Elsevier, Oxford, pp. 877-918.
- Broadbent, N.J., Gaskin, S., Squire, L.R. y Clark, R.E. (2009). Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learning & Memory*, 17(1): 5-11.
- Buisson, B. y Bertrand, D. (2001). Chronic exposure to nicotine upregulates the human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor function. *Journal of Neuroscience*, 21(6): 1819-1829.
- Campos-Caro, A., Smillie, F.I., Dominguez del Toro, E., Rovira, J.C., Vicente-Agullo, F., Chapuli, J., Juiz, J.M., Sala, S., Sala, F., Ballesta, J.J. y Criado, M. (1997). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors on bovine chromaffin cells: cloning, expression, and genomic organization of receptor subunits. *Journal of Neurochemistry*, 68(2): 488-497.
- Carrasco-Serrano, C. y Criado, M. (2004). Glucocorticoid activation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit gene: involvement of transcription factor Egr-1. *FEBS Letters*, 566(1-3): 247-250.
- Cartier, G.E., Yoshikami, D., Gray, W.R., Luo, S., Olivera, B.M. y McIntosh, J.M. (1996). A new-conotoxin which targets $\alpha 3\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 271(13): 7522-7528.
- Champtiaux, N., Gotti, C., Cordero-Erausquin, M., David, D.J., Przybylski, C., Léna, C., Clementi, F., Moretti, M., Rossi, F.M., Le Novere, N., McIntosh, J.M., Gardier, A.M. y Changeux, J. (2003). Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *Journal of Neuroscience*, 23(21): 7820-7829.
- Chang, C.C. (1962). Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their modes of neuromuscular blocking action. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, 144: 241-257.
- Changeux, J. (2010). Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(6): 389-401.
- Charpantier, E., Wiesner, A., Huh, K., Ogier, R., Hoda, J., Allaman, G., Raggenbass, M., Feuerbach, D., Bertrand, D. y Fuhrer, C. (2005). $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptors are negatively regulated by tyrosine phosphorylation and Src-family kinases. *Journal of Neuroscience*, 25(43): 9836-9849.
- Cheng, Q. y Yakel, J.L. (2015). Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors increases intracellular cAMP levels via activation of AC1 in hippocampal neurons. *Neuropharmacology*, 95: 405-414.
- Cho, C., Song, W., Leitzell, K., Teo, E., Meleth, A.D., Quick, M.W. y Lester, R.A. (2005). Rapid upregulation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors by tyrosine dephosphorylation. *Journal of Neuroscience*, 25(14): 3712-3723.
- Chrestia, J.F., Bruzzone, A., del Carmen Esandi, M. y Bouzat, C. (2021). Tyrosine phosphorylation differentially fine-tunes ionotropic and metabotropic responses of human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1-15.
- Clinton, L.K., Billings, L.M., Green, K.N., Caccamo, A., Ngo, J., Oddo, S., McGaugh, J.L. y LaFerla, F.M. (2007). Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiology of Disease*, 28(1): 76-82.
- Colombo, S.F., Mazzo, F., Pistillo, F. y Gotti, C. (2013). Biogenesis, trafficking and up-regulation of nicotinic ACh receptors. *Biochemical Pharmacology*, 86(8): 1063-1073.

- Colomer, C., Olivos-Oré, L.A., Vincent, A., McIntosh, J.M., Artalejo, A.R. y Guérineau, N.C. (2010). Functional characterization of alpha9-containing cholinergic nicotinic receptors in the rat adrenal medulla: implication in stress-induced functional plasticity. *The Journal of Neuroscience*, 30(19): 6732-6742.
- Conroy, W.G., Ogden, L.F. y Berg, D.K. (2000). Cluster formation of $\alpha 7$ -containing nicotinic receptors at interneuronal interfaces in cell culture. *Neuropharmacology*, 39(13): 2699-2705.
- Conroy, W.G., Liu, Z., Nai, Q., Coggan, J.S. y Berg, D.K. (2003). PDZ-containing proteins provide a functional postsynaptic scaffold for nicotinic receptors in neurons. *Neuron*, 38(5): 759-771.
- Corradi, J. y Bouzat, C. (2016). Understanding the Bases of Function and Modulation of alpha7 Nicotinic Receptors: Implications for Drug Discovery. *Molecular Pharmacology*, 90(3): 288-299.
- Coyle, J.T., Price, D.L. y DeLong, M.R. (1983). Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*, 219(4589): 1184-1190.
- Craik, D. J., y Adams, D. J. (2007). Chemical modification of conotoxins to improve stability and activity. *ACS Chemical Biology*, 2(7), 457-468.
- Crespi, A., Colombo, S.F. y Gotti, C. (2018). Proteins and chemical chaperones involved in neuronal nicotinic receptor expression and function: an update. *British Journal of Pharmacology*, 175(11): 1869-1879.
- Criado, M., del Toro, E.D., Carrasco-Serrano, C., Smillie, F.I., Juárez, J.M., Viniegra, S. y Ballesta, J.J. (1997). Differential expression of α -bungarotoxin-sensitive neuronal nicotinic receptors in adrenergic chromaffin cells: A role for transcription factor Egr-1. *Journal of Neuroscience*, 17(17): 6554-6564.
- Criado, M., Valor, L.M., Mulet, J., Gerber, S., Sala, S. y Sala, F. (2012). Expression and functional properties of alpha7 acetylcholine nicotinic receptors are modified in the presence of other receptor subunits. *Journal of Neurochemistry*, 123(4): 504-514.
- Crowther, R.A. (1990). Structural aspects of pathology in Alzheimer's disease. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1096(1): 1-9.
- Dajas-Bailador, F. y Wonnacott, S. (2004). Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(6): 317-324.
- Daly, J.W. (2005). Nicotinic agonists, antagonists, and modulators from natural sources. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(3-4): 513-552.
- Dani, J.A. (2001). Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biological Psychiatry*, 49(3): 166-174.
- Dani, J.A. y Bertrand, D. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47: 699-729.
- Darsow, T., Booker, T.K., Piña-Crespo, J.C. y Heinemann, S.F. (2005). Exocytic trafficking is required for nicotine-induced up-regulation of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 280(18): 18311-18320.
- Di Angelantonio, S., Matteoni, C., Fabbretti, E. y Nistri, A. (2003). Molecular biology and electrophysiology of neuronal nicotinic receptors of rat chromaffin cells. *European Journal of Neuroscience*, 17(11): 2313-2322.
- Dineley, K.T., Westerman, M., Bui, D., Bell, K., Ashe, K.H. y Sweatt, J.D. (2001). β -Amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors: in vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 21(12): 4125-4133.
- Dineley, K.T. (2007). Beta-amyloid peptide–nicotinic acetylcholine receptor interaction: the two faces of health and disease. *Frontiers in Bioscience*, 12: 5030-5038.
- Dineley, K.T., Pandya, A.A. y Yakel, J.L. (2015). Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(2): 96-108.

- Dotti, C.G., Sullivan, C.A. y Banker, G.A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *Journal of Neuroscience*, 8(4): 1454-1468.
- Douglas, W.W. y Rubin, R.P. (1961). The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *The Journal of Physiology*, 159(1): 40-57.
- Douglas, W.W. y Poisner, A.M. (1965). Preferential release of adrenaline from the adrenal medulla by muscarine and pilocarpine. *Nature*, 208(5015): 1102-1103.
- Drisdell, R.C., y Green, W.N. (2000). Neuronal α -bungarotoxin receptors are $\alpha 7$ subunit homomers. *Journal of Neuroscience*, 20(1), 133-139.
- Ennaceur, A. y Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31(1): 47-59.
- Fairclough, R.H., Josephs, R. y Richman, D.P. (1993). Imaging Ligand Binding Sites on the Torpedo Acetylcholine Receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 681(1): 113-125.
- Farooqui, A.A., Wells, K. y Horrocks, L.A. (1995). Breakdown of membrane phospholipids in Alzheimer disease. *Molecular and Chemical Neuropathology*, 25(2): 155-173.
- Feldberg, W., Minz, B. y Tsudzimura, H. (1934). The mechanism of the nervous discharge of adrenaline. *The Journal of Physiology*, 81(3): 286-304.
- Fenwick, E.M., Marty, A. y Neher, E. (1982a). A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *The Journal of Physiology*, 331(1): 577-597.
- Fenwick, E.M., Marty, A. y Neher, E. (1982b). Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *The Journal of Physiology*, 331(1): 599-635.
- Fernandes, C.C., Berg, D.K. y Gómez-Varela, D. (2010). Lateral mobility of nicotinic acetylcholine receptors on neurons is determined by receptor composition, local domain, and cell type. *Journal of Neuroscience*, 30(26): 8841-8851.
- Ferreira-Vieira, T., M Guimaraes, I., R Silva, F. y M Ribeiro, F. (2016). Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system. *Current Neuropharmacology*, 14(1): 101-115.
- Fertuck, H.C. y Salpeter, M.M. (1974). Localization of acetylcholine receptor by 125I-labeled α -bungarotoxin binding at mouse motor endplates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(4): 1376-1378.
- Ficklin, M.B., Zhao, S. y Feng, G. (2005). Ubiquitin-1 regulates nicotine-induced up-regulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40): 34088-34095.
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Annalen Der Physik*, 437(1-2): 55-75.
- Frazier, C.J., Buhler, A.V., Weiner, J.L. y Dunwiddie, T.V. (1998). Synaptic potentials mediated via α -bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal interneurons. *Journal of Neuroscience*, 18(20): 8228-8235.
- Frazier, C.J., Strowbridge, B.W. y Papke, R.L. (2003). Nicotinic receptors on local circuit neurons in dentate gyrus: a potential role in regulation of granule cell excitability. *Journal of Neurophysiology*, 89(6): 3018-3028.
- Fuentealba, J., Olivares, R., Alés, E., Tapia, L., Rojo, J., Arroyo, G., Aldea, M., Criado, M., Gandía, L. y García, A.G. (2004). A choline-evoked $[Ca^{2+}]_c$ signal causes catecholamine release and hyperpolarization of chromaffin cells. *The FASEB Journal*, 18(12): 1468-1470.
- Gaimarri, A., Moretti, M., Riganti, L., Zanardi, A., Clementi, F. y Gotti, C. (2007). Regulation of neuronal nicotinic receptor traffic and expression. *Brain Research Reviews*, 55(1): 134-143.
- Gandia, L., Borges, R., Albillos, A. y Garcia, A.G. (1995). Multiple calcium channel subtypes in isolated rat chromaffin cells. *Pflügers Archiv*, 430(1), 55-63.
- García-Guzmán, M., Sala, F., Sala, S., Campos-Caro, A., Stühmer, W., Gutiérrez, L.M. y Criado, M. (1995). α -Bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors on bovine chromaffin cells: molecular cloning, functional expression and alternative splicing of the $\alpha 7$ subunit. *The European Journal of Neuroscience*, 7(4): 647-655.

- Garrido-García, A., de Andrés, R., Jiménez-Pompa, A., Soriano, P., Sanz-Fuentes, D., Martínez-Blanco, E. y Díez-Guerra, F.J. (2019). Neurogranin expression is regulated by synaptic activity and promotes synaptogenesis in cultured hippocampal neurons. *Molecular Neurobiology*, 56(11): 7321-7337.
- Ge, S. y Dani, J.A. (2005). Nicotinic acetylcholine receptors at glutamate synapses facilitate long-term depression or potentiation. *Journal of Neuroscience*, 25(26): 6084-6091.
- Gerzanich, V., Wang, F., Kuryatov, A. y Lindstrom, J. (1998). $\alpha 5$ subunit alters desensitization, pharmacology, Ca permeability and Ca modulation of human neuronal $\alpha 3$ nicotinic receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 286(1): 311-320.
- Giribaldi, J. y Dutertre, S. (2018). α -Conotoxins to explore the molecular, physiological and pathophysiological functions of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroscience Letters*, 679: 24-34.
- Glushakov, A.V., Glushakova, H.Y. y Skok, V.I. (1999). Modulation of nicotinic acetylcholine receptor activity in submucous neurons by intracellular messengers. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 75(1): 16-22.
- Goedert, M., Cohen, E.S., Jakes, R. y Cohen, P. (1992). p42 MAP kinase phosphorylation sites in microtubule-associated protein tau are dephosphorylated by protein phosphatase 2A1. Implications for Alzheimer's disease. *FEBS Letters*, 312(1): 95-99.
- Goedert, M. y Spillantini, M.G. (2000). Tau mutations in frontotemporal dementia FTDP-17 and their relevance for Alzheimer's disease. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1502(1): 110-121.
- González-Rubio, J.M., Rojo, J., Tapia, L., Maneu, V., Mulet, J., Valor, L.M., Criado, M., Sala, F., García, A.G. y Gandía, L. (2006). Activation and blockade by choline of bovine $\alpha 7$ and $\alpha 3\beta 4$ nicotinic receptors expressed in oocytes. *European Journal of Pharmacology*, 535(1-3): 53-60.
- Gotti, C. y Clementi, F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Progress in Neurobiology*, 74(6): 363-396.
- Gotti, C., Moretti, M., Clementi, F., Riganti, L., McIntosh, J.M., Collins, A.C., Marks, M.J. y Whiteaker, P. (2005). Expression of nigrostriatal $\alpha 6$ -containing nicotinic acetylcholine receptors is selectively reduced, but not eliminated, by $\beta 3$ subunit gene deletion. *Molecular Pharmacology*, 67(6): 2007-2015.
- Gotti, C., Zoli, M. y Clementi, F. (2006). Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(9): 482-491.
- Gray, R., Rajan, A.S., Radcliffe, K.A., Yakehiro, M. y Dani, J.A. (1996). Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature*, 383(6602): 713-716.
- Grimes, C.A. y Jope, R.S. (2001). The multifaceted roles of glycogen synthase kinase $\beta 3$ in cellular signaling. *Progress in Neurobiology*, 65(4): 391-426.
- Guan, Z., Zhang, X., Ravid, R. y 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(1): 237-243.
- Halevi, S., McKay, J., Palfreyman, M., Yassin, L., Eshel, M., Jorgensen, E. y Treinin, M. (2002). The *C. elegans* ric-3 gene is required for maturation of nicotinic acetylcholine receptors. *The EMBO Journal*, 21(5): 1012-1020.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. y Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv*, 391(2): 85-100.
- Hardy, J. y Allsop, D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12: 383-388.
- Harkness, P.C. y Millar, N.S. (2002). Changes in conformation and subcellular distribution of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors revealed by chronic nicotine treatment and expression of subunit chimeras. *Journal of Neuroscience*, 22(23): 10172-10181.

- Heinemann, U., Beck, H., Dreier, J.P., Ficker, E., Stabel, J. y Zhang, C.L. (1992). The dentate gyrus as a regulated gate for the propagation of epileptiform activity. *Epilepsy Research.Supplement*, 7: 273-280.
- Hellström-Lindahl, E., Mousavi, M., Zhang, X., Ravid, R. y Nordberg, A. (1999). Regional distribution of nicotinic receptor subunit mRNAs in human brain: comparison between Alzheimer and normal brain. *Molecular Brain Research*, 66(1-2): 94-103.
- Hernández, C.M., Kaye, R., Zheng, H., Sweatt, J.D., y Dineley, K.T. (2010). Loss of $\alpha 7$ nicotinic receptors enhances β -amyloid oligomer accumulation, exacerbating early-stage cognitive decline and septohippocampal pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 30(7), 2442-2453.
- Hernández, S.C., Vicini, S., Xiao, Y., Dávila-García, M.I., Yasuda, R.P., Wolfe, B.B. y Kellar, K.J. (2004). The nicotinic receptor in the rat pineal gland is an $\alpha 3\beta 4$ subtype. *Molecular Pharmacology*, 66(4): 978-987.
- Hernández-Vivanco, A., Sanz-Lázaro, S., Jiménez-Pompa, A., García-Magro, N., Carmona-Hidalgo, B., Pérez-Alvarez, A., Caba-González, J.C., Tabernero, A., y Gregorio, S.A., Passas, J., Blázquez, J., González-Enguita, C., de Castro-Guerín, C. y Albillos, A. (2017). Human native Cav1 channels in chromaffin cells: contribution to exocytosis and firing of spontaneous action potentials. *European Journal of Pharmacology*, 796: 115-121.
- Hevekerl, H., Spielmann, T., Chmyrov, A. y Widengren, J. (2011). Förster resonance energy transfer beyond 10 nm: exploiting the triplet state kinetics of organic fluorophores. *The Journal of Physical Chemistry.B*, 115(45): 13360-13370.
- Hirano, T. (1982). Neural regulation of adrenal chromaffin cell function in the mouse—Stress effect on the distribution of [3H] dopamine in denervated adrenal medulla. *Brain Research*, 238(1): 45-54.
- Hone, A.J., Whiteaker, P., Mohn, J.L., Jacob, M.H. y McIntosh, J.M. (2010). Alexa Fluor 546-Ar1B[V11L;V16A] is a potent ligand for selectively labeling alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Neurochemistry*, 114(4): 994-1006.
- Hone, A.J., McIntosh, J.M., Azam, L., Lindstrom, J., Lucero, L., Whiteaker, P., Passas, J., Blázquez, J. y Albillos, A. (2015). alpha-Conotoxins Identify the alpha3beta4* Subtype as the Predominant Nicotinic Acetylcholine Receptor Expressed in Human Adrenal Chromaffin Cells. *Molecular Pharmacology*, 88(5): 881-893.
- Hone, A.J., Michael McIntosh, J., Rueda-Ruzafa, L., Passas, J., de Castro-Guerín, C., Blázquez, J., González-Enguita, C. y Albillos, A. (2017). Therapeutic concentrations of varenicline in the presence of nicotine increase action potential firing in human adrenal chromaffin cells. *Journal of Neurochemistry*, 140(1): 37-52.
- Hone, A.J., Rueda-Ruzafa, L., Gordon, T.J., Gajewiak, J., Christensen, S., Dyhring, T., Albillos, A. y McIntosh, J.M. (2020). Expression of $\alpha 3\beta 2\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors by rat adrenal chromaffin cells determined using novel conopeptide antagonists. *Journal of Neurochemistry*, 154(2): 158-176.
- Hone, A.J., Kaas, Q., Kearns, I., Hararah, F., Gajewiak, J., Christensen, S., Craik, D.J. y McIntosh, J.M. (2021). Computational and functional mapping of human and rat $\alpha 6\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors reveals species-specific ligand-binding motifs. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(3): 1685-1700.
- Hooper, C., Killick, R. y Lovestone, S. (2008). The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 104(6): 1433-1439.
- Horn, R. y Marty, A. (1988). Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *The Journal of General Physiology*, 92(2): 145-159.
- Hu, M., Liu, Q., Chang, K.T. y Berg, D.K. (2002). Nicotinic regulation of CREB activation in hippocampal neurons by glutamatergic and nonglutamatergic pathways. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 21(4): 616-625.

- Huganir, R.L., Miles, K. y Greengard, P. (1984). Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor by an endogenous tyrosine-specific protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(22): 6968-6972.
- Huganir, R.L., Delcour, A.H., Greengard, P. y Hess, G.P. (1986). Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor regulates its rate of desensitization. *Nature*, 321(6072): 774-776.
- Inoue, M. y Kuriyama, H. (1990). Muscarine induces two distinct current responses in adrenal chromaffin cells of the guinea-pig. *The Japanese Journal of Physiology*, 40(5): 679-691.
- Inoue, M. y Kuriyama, H. (1991). Properties of the nicotinic-receptor-activated current in adrenal chromaffin cells of the guinea-pig. *Pflügers Archiv*, 419(1): 13-20.
- Jaskolski, F., Mülle, C. y Manzoni, O.J. (2005). An automated method to quantify and visualize colocalized fluorescent signals. *Journal of Neuroscience Methods*, 146(1): 42-49.
- Jelic, V., Johansson, S.E., Almkvist, O., Shigeta, M., Julin, P., Nordberg, A., Winblad, B. y Wahlund, L.O. (2000). Quantitative electroencephalography in mild cognitive impairment: longitudinal changes and possible prediction of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 21(4): 533-540.
- Ji, D., Lape, R. y Dani, J.A. (2001). Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, 31(1): 131-141.
- Jiménez-Pompa, A., Sanz-Lázaro, S., Hone, A.J., Rueda-Ruzafa, L., Polo, J.M., González-Enguita, C., Blázquez, J., de Los Ríos, C., McIntosh, J.M. y Albillos, A. (2021). Therapeutic concentrations of varenicline increases exocytotic release of catecholamines from human and rat adrenal chromaffin cells in the presence of nicotine. *Neuropharmacology*. 108632.
- Jones, S. y Yakel, J.L. (1997). Functional nicotinic ACh receptors on interneurons in the rat hippocampus. *The Journal of Physiology*, 504(3): 603-610.
- Kajiwara, R., Sand, O., Kidokoro, Y., Barish, M.E. y Iijima, T. (1997). Functional organization of chromaffin cells and cholinergic synaptic transmission in rat adrenal medulla. *The Japanese Journal of Physiology*, 47(5): 449-464.
- Kamat, P. K., Rai, S. y Nath, C. (2013). Okadaic acid induced neurotoxicity: an emerging tool to study Alzheimer's disease pathology. *Neurotoxicology*, 37, 163-172.
- Katz, B. y Thesleff, S. (1957). A study of the 'desensitization' produced by acetylcholine at the motor end-plate. *The Journal of Physiology*, 138(1): 63-80.
- Kawai, H., Zago, W. y Berg, D.K. (2002). Nicotinic $\alpha 7$ receptor clusters on hippocampal GABAergic neurons: regulation by synaptic activity and neurotrophins. *Journal of Neuroscience*, 22(18): 7903-7912.
- Ke, L. y Lukas, R.J. (1996). Effects of steroid exposure on ligand binding and functional activities of diverse nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Journal of Neurochemistry*, 67(3): 1100-1112.
- Khiroug, S.S., Harkness, P.C., Lamb, P.W., Sudweeks, S.N., Khiroug, L., Millar, N.S. y Yakel, J.L. (2002). Rat nicotinic ACh receptor $\alpha 7$ and $\beta 2$ subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels. *The Journal of Physiology*, 540(2): 425-434.
- Kidokoro, Y. y Ritchie, A.K. (1980). Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. *The Journal of Physiology*, 307(1): 199-216.
- King, J.R., Nordman, J.C., Bridges, S.P., Lin, M. y Kabbani, N. (2015). Identification and characterization of a G protein-binding cluster in $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 290(33): 20060-20070.
- Komal, P., Estakhr, J., Kamran, M., Renda, A. y Nashmi, R. (2015). cAMP-dependent protein kinase inhibits $\alpha 7$ nicotinic receptor activity in layer 1 cortical interneurons through activation of D1/D5 dopamine receptors. *The Journal of Physiology*, 593(16): 3513-3532.
- Korn, S.J. y Horn, R. (1989). Influence of sodium-calcium exchange on calcium current rundown and the duration of calcium-dependent chloride currents in pituitary cells, studied with

- whole cell and perforated patch recording. *The Journal of General Physiology*, 94(5): 789-812.
- Kriegelstein, K., Deimling, F., Suter-Crazzolara, C. y Unsicker, K. (1996). Expression and localization of GDNF in developing and adult adrenal chromaffin cells. *Cell and Tissue Research*, 286(2): 263-268.
- Kutlu, M.G. y Gould, T.J. (2015). Nicotinic receptors, memory, and hippocampus. *The Neurobiology and Genetics of Nicotine and Tobacco*: 137-163.
- Le Novère, N., Grutter, T. y Changeux, J. (2002). Models of the extracellular domain of the nicotinic receptors and of agonist-and Ca^{+2} -binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(5): 3210-3215.
- Léna, C., Changeux, J. y Mulle, C. (1993). Evidence for "preterminal" nicotinic receptors on GABAergic axons in the rat interpeduncular nucleus. *Journal of Neuroscience*, 13(6): 2680-2688.
- Léna, C. y Changeux, J. (1993). Allosteric modulations of the nicotinic acetylcholine receptor. *Trends in Neurosciences*, 16(5): 181-186.
- Letchworth, S.R. y Whiteaker, P. (2011). Progress and challenges in the study of $\alpha 6$ -containing nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology*, 82(8): 862-872.
- Lindau, M. y Neher, E. (1988). Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells. *Pflügers Archiv*, 411(2): 137-146.
- Liu, Q., Kawai, H. y Berg, D.K. (2001a). β -Amyloid peptide blocks the response of $\alpha 7$ -containing nicotinic receptors on hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(8): 4734-4739.
- Liu, Y., Ford, B., Mann, M.A. y Fischbach, G.D. (2001b). Neuregulins increase $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors and enhance excitatory synaptic transmission in GABAergic interneurons of the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 21(15): 5660-5669.
- Liu, Z., Tearle, A.W., Nai, Q. y Berg, D.K. (2005). Rapid activity-driven SNARE-dependent trafficking of nicotinic receptors on somatic spines. *Journal of Neuroscience*, 25(5): 1159-1168.
- López, M.G., Fonteriz, R.I., Gandía, L., de la Fuente, M., Villarroya, M., García-Sancho, J. y García, A.G. (1993). The nicotinic acetylcholine receptor of the bovine chromaffin cell, a new target for dihydropyridines. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*, 247(2): 199-207.
- López, M.G., Montiel, C., Herrero, C.J., García-Palomero, E., Mayorgas, I., Hernández-Guijo, J.M., Villarroya, M., Olivares, R., Gandía, L., McIntosh, J.M., Olivera, B.M. y García, A.G. (1998). Unmasking the functions of the chromaffin cell $\alpha 7$ nicotinic receptor by using short pulses of acetylcholine and selective blockers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(24): 14184-14189.
- Lorente de Nó, R. (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *Journal Für Psychologie Und Neurologie*.
- Lothman, E.W., Stringer, J.L. y Bertram, E.H. (1992). The dentate gyrus as a control point for seizures in the hippocampus and beyond. *Epilepsy Research. Supplement*, 7: 301-313.
- Lu, L., Shimizu, T., Nakamura, K. y 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(1-3): 177-184.
- Luetje, C.W. y Patrick, J. (1991). Both alpha-and beta-subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Neuroscience*, 11(3): 837-845.
- Luo, S., Zhangsun, D., Zhu, X., Wu, Y., Hu, Y., Christensen, S., Harvey, P.J., Akcan, M., Craik, D.J., y McIntosh, J. M. (2013). Characterization of a novel α -conotoxin TxID from *Conus textile* that potently blocks rat $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of medicinal chemistry*, 56(23), 9655-9663.

- Mamlouk, G.M., Dorris, D.M., Barrett, L.R. y Meitzen, J. (2020). Sex bias and omission in neuroscience research is influenced by research model and journal, but not reported NIH funding. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 57: 100835.
- Maneu, V., Rojo, J., Mulet, J., Valor, L.M., Sala, F., Criado, M., García, A.G. y Gandía, L. (2002). A single neuronal nicotinic receptor $\alpha 3\alpha 7\beta 4^*$ is present in the bovine chromaffin cell. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 971(1): 165-167.
- Marley, P. y Livett, B.G. (1985). Neuropeptides in the autonomic nervous system. *CRC Critical Reviews in Clinical Neurobiology*, 1(3): 201-283.
- Martín-Sánchez, C., Alés, E., Balseiro-Gómez, S., Atienza, G., Arnalich, F., Bordas, A., Cedillo, J.L., Extremera, M., Chávez-Reyes, A. y Montiel, C. (2021). The human-specific duplicated $\alpha 7$ gene inhibits the ancestral $\alpha 7$, negatively regulating nicotinic acetylcholine receptor-mediated transmitter release. *The Journal of Biological Chemistry*, 296: 100341.
- Marty, A. y Neher, E. (1985). Potassium channels in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *The Journal of Physiology*, 367(1): 117-141.
- Mazzaferro, S., Benallegue, N., Carbone, A., Gasparri, F., Vijayan, R., Biggin, P.C., Moroni, M. y Bermudez, I. (2011). Additional acetylcholine (ACh) binding site at $\alpha 4/\alpha 4$ interface of $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 4$ nicotinic receptor influences agonist sensitivity. *Journal of Biological Chemistry*, 286(35): 31043-31054.
- McGehee, D.S., Heath, M.J., Gelber, S., Devay, P. y Role, L.W. (1995). Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science*, 269(5231): 1692-1696.
- McIntosh, J.M., Santos, A.D. y Olivera, B.M. (1999). Conus peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Annual Review of Biochemistry*, 68(1): 59-88.
- McIntosh, J.M., Absalom, N., Chebib, M., Elgoyhen, A.B. y Vincler, M. (2009). Alpha9 nicotinic acetylcholine receptors and the treatment of pain. *Biochemical Pharmacology*, 78(7): 693-702.
- Millar, N.S. y Harkness, P.C. (2008). Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholine receptors. *Molecular Membrane Biology*, 25(4): 279-292.
- Moretti, M., Zoli, M., George, A.A., Lukas, R.J., Pistillo, F., Maskos, U., Whiteaker, P. y Gotti, C. (2014). The novel $\alpha 7\beta 2$ -nicotinic acetylcholine receptor subtype is expressed in mouse and human basal forebrain: biochemical and pharmacological characterization. *Molecular Pharmacology*, 86(3): 306-317.
- Morgane, P.J., Galler, J.R. y Mokler, D.J. (2005). A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Progress in Neurobiology*, 75(2): 143-160.
- Morley, B.J. y Mervis, R.F. (2013). Dendritic spine alterations in the hippocampus and parietal cortex of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor knockout mice. *Neuroscience*, 233: 54-63.
- Moroni, M., Zwart, R., Sher, E., Cassels, B.K. y Bermudez, I. (2006). $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors with high and low acetylcholine sensitivity: pharmacology, stoichiometry, and sensitivity to long-term exposure to nicotine. *Molecular Pharmacology*, 70(2): 755-768.
- Mousavi, M., Hellström-Lindahl, E., Guan, Z., Bednar, I. y Nordberg, A. (2001). Expression of nicotinic acetylcholine receptors in human and rat adrenal medulla. *Life Sciences*, 70(5): 577-590.
- Mulle, C., Léna, C. y Changeux, J. (1992). Potentiation of nicotinic receptor response by external calcium in rat central neurons. *Neuron*, 8(5): 937-945.
- Neff, R.A., Gomez-Varela, D., Fernandes, C.C. y Berg, D.K. (2009). Postsynaptic scaffolds for nicotinic receptors on neurons. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(6): 694-701.
- Neher, E. y 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*, 79(21): 6712-6716.
- Nelson, M.E., Kuryatov, A., Choi, C.H., Zhou, Y. y Lindstrom, J. (2003). Alternate stoichiometries of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *Molecular Pharmacology*, 63(2): 332-341.

- Nordberg, A. y Winblad, B. (1986). Reduced number of [3H] nicotine and [3H] acetylcholine binding sites in the frontal cortex of Alzheimer brains. *Neuroscience Letters*, 72(1): 115-120.
- Nordberg, A. (1999). PET studies and cholinergic therapy in Alzheimer's disease. *Revue Neurologique*, 155: 53.
- Nordberg, A. (2001). Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Biological psychiatry*, 49(3), 200-210.
- Norman, A.W. y Henry, H.L. (2015). Chapter 11 - Hormones of the Adrenal Medulla. En: Norman, A.W. y Henry, H.L. (Eds.), *Hormones (Third Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 239-253.
- Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B.P. y LaFerla, F.M. (2003a). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 24(8): 1063-1070.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y. y LaFerla, F.M. (2003b). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3): 409-421.
- Oddo, S., Caccamo, A., Green, K.N., Liang, K., Tran, L., Chen, Y., Leslie, F.M. y LaFerla, F.M. (2005). Chronic nicotine administration exacerbates tau pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(8): 3046-3051.
- Orta-Salazar, E., Aguilar-Vázquez, A., Martínez-Coria, H., Luquín-De Anda, S., Rivera-Cervantes, M., Beas-Zarate, C., Feria-Velasco, A. y Díaz-Cintra, S. (2014). REST/NRSF-induced changes of ChAT protein expression in the neocortex and hippocampus of the 3xTg-AD mouse model for Alzheimer's disease. *Life Sciences*, 116(2): 83-89.
- Palma, E., Maggi, L., Barabino, B., Eusebi, F. y Ballivet, M. (1999). Nicotinic acetylcholine receptors assembled from the $\alpha 7$ and $\beta 3$ subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 274(26): 18335-18340.
- Palop, J.J., Jones, B., Kikonius, L., Chin, J., Yu, G.Q., Raber, J., Masliah, E. y Mucke, L. (2003). Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(16), 9572-9577.
- Parker, M.J., Zhao, S., Bredt, D.S., Sanes, J.R. y Feng, G. (2004). PSD93 regulates synaptic stability at neuronal cholinergic synapses. *Journal of Neuroscience*, 24(2): 378-388.
- Parri, H.R., Hernandez, C.M. y Dineley, K.T. (2011). Research update: Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor mechanisms in Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology*, 82(8): 931-942.
- Peng, X., Gerzanich, V., Anand, R., Wang, F. y Lindstrom, J. (1997). Chronic nicotine treatment up-regulates $\alpha 3$ and $\alpha 7$ acetylcholine receptor subtypes expressed by the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Molecular Pharmacology*, 51(5): 776-784.
- Pereira, E.F., Reinhardt-Maelicke, S., Schrattenholz, A., Maelicke, A. y Albuquerque, E.X. (1993). Identification and functional characterization of a new agonist site on nicotinic acetylcholine receptors of cultured hippocampal neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 265(3): 1474-1491.
- Pérez-Alvarez, A. y Albillos, A. (2007). Key role of the nicotinic receptor in neurotransmitter exocytosis in human chromaffin cells. *Journal of Neurochemistry*, 103(6): 2281-2290.
- Pérez-Alvarez, A., Hernández-Vivanco, A., Cano-Abad, M. y Albillos, A. (2008). Pharmacological and biophysical properties of Ca⁺² channels and subtype distributions in human adrenal chromaffin cells. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 456(6): 1149-1162.
- Pérez-Alvarez, A., Hernández-Vivanco, A., Caba-González, J.C. y Albillos, A. (2011). Different roles attributed to Cav1 channel subtypes in spontaneous action potential firing and fine tuning of exocytosis in mouse chromaffin cells. *Journal of Neurochemistry*, 116(1): 105-121.

- Pérez-Alvarez, A., Hernández-Vivanco, A., Alonso y Gregorio, S., Tabernero, A., McIntosh, J.M. y Albillos, A. (2012a). Pharmacological characterization of native $\alpha 7$ nicotinic ACh receptors and their contribution to depolarization-elicited exocytosis in human chromaffin cells. *British Journal of Pharmacology*, 165(4): 908-921.
- Pérez-Alvarez, A., Hernández-Vivanco, A., McIntosh, J.M. y Albillos, A. (2012b). Native $\alpha 6\beta 4^*$ nicotinic receptors control exocytosis in human chromaffin cells of the adrenal gland. *The FASEB Journal*, 26(1): 346-354.
- Perry, E., Martin-Ruiz, C., Lee, M., Griffiths, M., Johnson, M., Piggott, M., Haroutunian, V., Buxbaum, J.D., Näslund, J., Davis, K., Gotti, C., Clementi, F., Tzartos, S., Cohen, O., Soreq, H., Jaros, E., Perry, R., Ballard, C., McKeith, I. y Court, J. (2000). Nicotinic receptor subtypes in human brain ageing, Alzheimer and Lewy body diseases. *European Journal of Pharmacology*, 393(1-3): 215-222.
- Pettit, D.L., Shao, Z. y Yakel, J.L. (2001). β -amyloid peptide directly modulates nicotinic receptors in rat hippocampal slices. *Journal of Neurochemistry*, 76: 9-10.
- Pirttimäki, T.M., Codadu, N.K., Awni, A., Pratik, P., Nagel, D.A., Hill, E.J., Dineley, K.T. y Parri, H.R. (2013). $\alpha 7$ Nicotinic receptor-mediated astrocytic gliotransmitter release: A β effects in a preclinical Alzheimer's mouse model. *PloS One*, 8(11): e81828.
- Prado, V.F., Roy, A., Kolisnyk, B., Gros, R. y Prado, M.A. (2013). Regulation of cholinergic activity by the vesicular acetylcholine transporter. *Biochemical Journal*, 450(2): 265-274.
- Puzzo, D., Privitera, L., Fa', M., Staniszewski, A., Hashimoto, G., Aziz, F., Sakurai, M., Ribe, E.M., Troy, C.M., Mercken, M., Jung, S.S., Palmeri, A. y Arancio, O. (2011). Endogenous amyloid- β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Annals of Neurology*, 69(5): 819-830.
- Quik, M. y McIntosh, J.M. (2006). Striatal $\alpha 6^*$ nicotinic acetylcholine receptors: potential targets for Parkinson's disease therapy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 316(2): 481-489.
- Radcliffe, K.A., Fisher, J.L., Gray, R. y Dani, J.A. (1999). Nicotinic modulation of glutamate and GABA synaptic transmission in hippocampal neurons. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 868(1): 591-610.
- Ramírez-Latorre, J., Yu, C.R., Qu, X., Perin, F., Karlin, A. y Role, L. (1996). Functional contributions of $\alpha 5$ subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature*, 380(6572): 347-351.
- Reisine, T.D., Yamamura, H.I., Bird, E.D., Spokes, E. y Enna, S.J. (1978). Pre- and postsynaptic neurochemical alterations in Alzheimer's disease. *Brain Research*, 159(2): 477-481.
- Rezvani, K., Teng, Y., Pan, Y., Dani, J.A., Lindstrom, J., Gras, E.A.G., McIntosh, J.M. y De Biasi, M. (2009). UBXD4, a UBX-containing protein, regulates the cell surface number and stability of $\alpha 3$ -containing nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Neuroscience*, 29(21): 6883-6896.
- Rezvani, K., Teng, Y. y De Biasi, M. (2010). The ubiquitin-proteasome system regulates the stability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Molecular Neuroscience*, 40(1): 177-184.
- Rogers, J.L. y Kesner, R.P. (2003). Cholinergic modulation of the hippocampus during encoding and retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80(3): 332-342.
- Role, L.W. y Perlman, R.L. (1983). Both nicotinic and muscarinic receptors mediate catecholamine secretion by isolated guinea-pig chromaffin cells. *Neuroscience*, 10(3): 979-985.
- Rollema, H., Bertrand, D. y Hurst, R.S. (2010). Nicotinic Agonists and Antagonists. En: Stolerman, I.P. (Ed.), *Encyclopedia of Psychopharmacology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 887-899.
- Rosenberg, P.B., Nowrangi, M.A. y Lyketsos, C.G. (2015). Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: what might be associated brain circuits? *Molecular Aspects of Medicine*, 43: 25-37.

- Rush, R., Kuryatov, A., Nelson, M.E. y Lindstrom, J. (2002). First and second transmembrane segments of $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 2$, and $\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptor subunits influence the efficacy and potency of nicotine. *Molecular Pharmacology*, 61(6): 1416-1422.
- Sandow, A. (1952). Excitation-contraction coupling in muscular response. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 25(3): 176.
- Sargent, P.B. (1993). The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annual Review of Neuroscience*, 16(1): 403-443.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. y Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7): 676-682.
- Schliebs, R. y Arendt, T. (2011). The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behavioural Brain Research*, 221(2): 555-563.
- Séguéla, P., Wadiche, J., Dineley-Miller, K., Dani, J.A. y Patrick, J.W. (1993). Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *Journal of Neuroscience*, 13(2): 596-604.
- Seibenhener, M.L. y Wooten, M.W. (2012). Isolation and culture of hippocampal neurons from prenatal mice. *Journal of Visualized Experiments*, (65): e3634.
- Simpson, S.L. (1937). Physiology of the Adrenal Gland. *British Medical Journal*, 1(3969): 229-232.
- Sine, S.M. (2002). The nicotinic receptor ligand binding domain. *Journal of Neurobiology*, 53(4): 431-446.
- Sine, S.M. y Engel, A.G. (2006). Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature*, 440(7083): 448-455.
- Smith, M.A., Sayre, L.M., Monnier, V.M. y Perry, G. (1996). Oxidative post-translational modifications in Alzheimer disease. *Molecular and Chemical Neuropathology*, 28(1): 41-48.
- Sontag, E., Hladik, C., Montgomery, L., Luangpirom, A., Mudrak, I., Ogris, E. y White III, C.L. (2004). Downregulation of protein phosphatase 2A carboxyl methylation and methyltransferase may contribute to Alzheimer disease pathogenesis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 63(10), 1080-1091.
- Sontag, J.M. y Sontag, E. (2014). Protein phosphatase 2A dysfunction in Alzheimer's disease. *Frontiers in molecular neuroscience*, 7, 16.
- St John, P.A. (2009). Cellular trafficking of nicotinic acetylcholine receptors. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(6): 656-662.
- Stitzel, J.A., Farnham, D.A. y Collins, A.C. (1996). Chronic corticosterone treatment elicits dose-dependent changes in mouse brain α -bungarotoxin binding. *Neuroscience*, 72(3): 791-799.
- Taly, A., Corringer, P., Guedin, D., Lestage, P. y Changeux, J. (2009). Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(9): 733-750.
- Tanimukai, H., Grundke-Iqbal, I. y Iqbal, K. (2005). Up-regulation of inhibitors of protein phosphatase-2A in Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology*, 166(6): 1761-1771.
- Tansey, E.M. (2006). Henry Dale and the discovery of acetylcholine. *Comptes Rendus Biologies*, 329(5-6), 419-425.
- Tapia, L., Kuryatov, A. y Lindstrom, J. (2007). Ca²⁺ permeability of the ($\alpha 4$)₃($\beta 2$)₂ stoichiometry greatly exceeds that of ($\alpha 4$)₂($\beta 2$)₃ human acetylcholine receptors. *Molecular Pharmacology*, 71(3): 769-776.
- Temido-Ferreira, M., Coelho, J.E., Pousinha, P.A. y Lopes, L.V. (2019). Novel players in the aging synapse: impact on cognition. *Journal of Caffeine and Adenosine Research*, 9(3): 104-127.

- Thomsen, M.S., Zwart, R., Ursu, D., Jensen, M.M., Pinborg, L.H., Gilmour, G., Wu, J., Sher, E. y Mikkelsen, J.D. (2015). $\alpha 7$ and $\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor subunits form heteromeric receptor complexes that are expressed in the human cortex and display distinct pharmacological properties. *PLoS One*, 10(6): e0130572.
- Tischler, A.S. (2002). Chromaffin cells as models of endocrine cells and neurons. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 971(1), 366-370.
- Tohgi, H., Utsugisawa, K., Yoshimura, M., Nagane, Y. y Mihara, M. (1998). Age-related changes in nicotinic acetylcholine receptor subunits $\alpha 4$ and $\beta 2$ messenger RNA expression in postmortem human frontal cortex and hippocampus. *Neuroscience Letters*, 245(3): 139-142.
- Turner, T.J. (2004). Nicotine enhancement of dopamine release by a calcium-dependent increase in the size of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Journal of Neuroscience*, 24(50): 11328-11336.
- Ullian, E.M., McIntosh, J.M. y Sargent, P.B. (1997). Rapid synaptic transmission in the avian ciliary ganglion is mediated by two distinct classes of nicotinic receptors. *Journal of Neuroscience*, 17(19): 7210-7219.
- Unsicker, K. y Kriegstein, K. (1996). Growth factors in chromaffin cells. *Progress in Neurobiology*, 48(4-5): 307-324.
- Unwin, N. (1993). Neurotransmitter action: opening of ligand-gated ion channels. *Cell*, 72: 31-41.
- Vizi, E.S. y Lendvai, B. (1999). Modulatory role of presynaptic nicotinic receptors in synaptic and non-synaptic chemical communication in the central nervous system. *Brain Research Reviews*, 30(3): 219-235.
- Wanamaker, C.P. y Green, W.N. (2007). Endoplasmic reticulum chaperones stabilize nicotinic receptor subunits and regulate receptor assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 282(43): 31113-31123.
- Wang, F., Gerzanich, V., Wells, G.B., Anand, R., Peng, X., Keyser, K. y Lindstrom, J. (1996). Assembly of human neuronal nicotinic receptor $\alpha 5$ subunits with $\alpha 3$, $\beta 2$, and $\beta 4$ subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 271(30): 17656-17665.
- Wang, F., Nelson, M.E., Kuryatov, A., Olale, F., Cooper, J., Keyser, K. y Lindstrom, J. (1998). Chronic nicotine treatment up-regulates human $\alpha 3\beta 2$ but not $\alpha 3\beta 4$ acetylcholine receptors stably transfected in human embryonic kidney cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273(44): 28721-28732.
- Wang, H., Lee, D.H., Davis, C.B. y Shank, R.P. (2000). Amyloid peptide A β 1-42 binds selectively and with picomolar affinity to $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Neurochemistry*, 75(3): 1155-1161.
- Wang, H., Li, W., Benedetti, N.J. y Lee, D.H. (2003a). $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors mediate β -amyloid peptide-induced tau protein phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(34): 31547-31553.
- Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amella, C.A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J.H., Wang, H., Yang, H., Ulloa, L., Al-Abed, Y., Czura, C.J. y Tracey, K.J. (2003b). Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, 421(6921): 384-388.
- Wang, K., Cox, M.E., Parsons, S.J., Hackett, J.T., van Hoek, M. y Lindstrom, J.M. (2004). Regulation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor by SRC family tyrosine kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10): 8779-8786.
- Wang, J., He, X., Guo, F., Cheng, X., Wang, Y., Wang, X., Feng, Z., Vreugdenhil, M. y Lu, C. (2017). Multiple Kinases Involved in the Nicotinic Modulation of Gamma Oscillations in the Rat Hippocampal CA3 Area. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11: 57.
- Wang, J. y Lindstrom, J. (2018). Orthosteric and allosteric potentiation of heteromeric neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *British Journal of Pharmacology*, 175(11): 1805-1821.
- Wang, Y., Wang, Z., Wang, J., Wang, Y., Henderson, Z., Wang, X., Zhang, X., Song, J. y Lu, C. (2015). The modulation of nicotinic acetylcholine receptors on the neuronal network oscillations in rat hippocampal CA3 area. *Scientific Reports*, 5: 9493.

- Welsby, P.J., Rowan, M.J. y Anwyl, R. (2009). Intracellular mechanisms underlying the nicotinic enhancement of LTP in the rat dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience*, 29(1): 65-75.
- Whiteaker, P., Peterson, C.G., Xu, W., McIntosh, J.M., Paylor, R., Beaudet, A.L., Collins, A.C. y Marks, M.J. (2002). Involvement of the $\alpha 3$ subunit in central nicotinic binding populations. *Journal of Neuroscience*, 22(7): 2522-2529.
- Whiteaker, P., Christensen, S., Yoshikami, D., Dowell, C., Watkins, M., Gulyas, J., Rivier, J., Olivera, B.M. y McIntosh, J.M. (2007). Discovery, synthesis, and structure activity of a highly selective $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor antagonist. *Biochemistry*, 46(22): 6628-6638.
- Wiesner, A. y Fuhrer, C. (2006). Regulation of nicotinic acetylcholine receptors by tyrosine kinases in the peripheral and central nervous system: same players, different roles. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(23): 2818-2828.
- Williams, B.M., Temburni, M.K., Levey, M.S., Bertrand, S., Bertrand, D. y Jacob, M.H. (1998). The long internal loop of the $\alpha 3$ subunit targets nAChRs to subdomains within individual synapses on neurons in vivo. *Nature Neuroscience*, 1(7): 557-562.
- Williams, D.K., Wang, J. y Papke, R.L. (2011). Positive allosteric modulators as an approach to nicotinic acetylcholine receptor-targeted therapeutics: advantages and limitations. *Biochemical Pharmacology*, 82(8): 915-930.
- Wittenberg, R.E., Wolfman, S.L., De Biasi, M. y Dani, J.A. (2020). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotine addiction: A brief introduction. *Neuropharmacology*, 177: 108256.
- Wu, J., Kuo, Y., George, A.A., Xu, L., Hu, J. y Lukas, R.J. (2004). β -Amyloid directly inhibits human $\alpha 4\beta 2$ -nicotinic acetylcholine receptors heterologously expressed in human SH-EP1 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(36): 37842-37851.
- Wu, J., Liu, Q., Tang, P., Mikkelsen, J.D., Shen, J., Whiteaker, P. y Yakel, J.L. (2016). Heteromeric $\alpha 7\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors in the brain. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(7): 562-574.
- Wurtman, R.J. y Axelrod, J. (1965). Adrenaline synthesis: control by the pituitary gland and adrenal glucocorticoids. *Science*, 150(3702): 1464-1465.
- Yakel, J.L. (2012). Nicotinic ACh receptors in the hippocampus: role in excitability and plasticity. *Nicotine & Tobacco Research*, 14(11): 1249-1257.
- Zamani, M.R. y Allen, Y.S. (2001). Nicotine and its interaction with beta-amyloid protein: a short review. *Biological Psychiatry*, 49(3): 221-232.
- Zhang, Z., Coggan, J.S. y Berg, D.K. (1996). Synaptic currents generated by neuronal acetylcholine receptors sensitive to α -bungarotoxin. *Neuron*, 17(6): 1231-1240.
- Zhao, C.J., Noack, C., Brackmann, M., Gloveli, T., Maelicke, A., Heinemann, U., Anand, R. y Braunewell, K.H. (2009). Neuronal Ca^{+2} sensor VILIP-1 leads to the upregulation of functional $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors in hippocampal neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 40(2): 280-292.
- Zheng, P. (2009). Neuroactive steroid regulation of neurotransmitter release in the CNS: action, mechanism and possible significance. *Progress in Neurobiology*, 89(2): 134-152.
- Zoli, M., Pistillo, F. y Gotti, C. (2015). Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. *Neuropharmacology*, 96: 302-311.
- Zoli, M., Pucci, S., Vilella, A. y Gotti, C. (2018). Neuronal and extraneuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Current Neuropharmacology*, 16(4): 338-349.

ARTÍCULOS PUBLICADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS

2017

Hernández-Vivanco, A., Sanz-Lázaro, S., Jiménez-Pompa, A., García-Magro, N., Carmona-Hidalgo, B., Pérez-Álvarez, A., Caba-González, J. C., Taberner, A., Alonso y Gregorio, S., Passas, J., Blázquez, J., González-Enguita, C., Castro-Guerín, C. y Albillos, A. (2017). Human native Cav1 channels in chromaffin cells: contribution to exocytosis and firing of spontaneous action potentials. *European Journal of Pharmacology*, 796, 115-121. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.12.009

2019

Sanz-Lázaro, S.* , Jiménez-Pompa, A.* , Carmona-Hidalgo, B., Úbeda, M., Muñoz, L., Caba-González, J. C., Hernández-Vivanco, A., López-García, S., Albillos, A. y Albillos, A. (2019). The firing frequency of spontaneous action potentials and their corresponding evoked exocytosis are increased in chromaffin cells of CCl₄-induced cirrhotic rats with respect to control rats. *Journal of Neurochemistry*, 148(3), 359-372. doi: 10.1111/jnc.14618

(*) *ambos autores contribuyeron lo mismo en este trabajo*

Garrido-García, A., de Andrés, R., Jiménez-Pompa, A., Soriano, P., Sanz-Fuentes, D., Martínez-Blanco, E. y Díez-Guerra, F. J. (2019). Neurogranin expression is regulated by synaptic activity and promotes synaptogenesis in cultured hippocampal neurons. *Molecular Neurobiology*, 56(11), 7321-7337. doi: 10.1007/s12035-019-1593-3

2021

Jiménez-Pompa, A., Sanz-Lázaro, S., Hone, A. J., Rueda-Ruzafa, L., Medina-Polo, J., González-Enguita, C., Blázquez, J., de los Ríos, C., McIntosh, J. M. y Albillos, A. (2021). Therapeutic concentrations of varenicline increases exocytotic release of catecholamines from human and rat adrenal chromaffin cells in the presence of nicotine. *Neuropharmacology*, 108632. doi: 10.1016/j.neuropahrm.2021.108632

2022

Jiménez-Pompa, A., Sanz-Lázaro, S., Ewere-Omodolor, R., Medina-Polo, J., González-Enguita, C., Blázquez, J., McIntosh, J.M. y Albillos, A. (2022). Crosstalk between $\alpha 7$ and $\alpha 3\beta 4$ nicotinic receptors prevents their desensitization in human chromaffin cells. *Journal of Neuroscience*, 42(7), 1173-1183. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1115-21.2021