



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Doctorado en Ciencias
Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

**AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE P2X2 INDUCIDO
POR EL PÉPTIDO A β , SU IMPACTO EN LA
ENDOCITOSIS DE APP Y EN LA DISTRIBUCIÓN DE
FE65 EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

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

PAMELA ANDREA GODOY RIVERA
CONCEPCIÓN-CHILE
2021

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

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

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

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

Dra. Roxana Pincheira Barrera
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Juan Pablo Henríquez Hohmman
Facultad de Ciencias Biológicas

Dra. Alejandra Álvarez Rojas
Profesora Evaluadora Externa
Pontificia Universidad Católica de Chile

Dr. Ariel Castro Alma
Director
Programa Doctorado en Ciencias
Biológicas Área Biología Celular y
Molecular

AGRADECIMIENTOS

Luego de finalizado este trabajo puedo decir con total certeza que sus frutos son parte del trabajo colectivo. Esta tesis no podría estar siendo publicada sin la ayuda y participación de muchas personas que de una u otra manera han aportado a ella.

En primer lugar, no puedo dejar de mencionar a Daniela Mennickent, quien durante su tesis de bioquímica aportó de gran manera en los experimentos y resultados que dan forma a esta tesis doctoral. De esta misma manera, debo agradecer a mi profesor Guía Dr. Jorge Fuentealba, quien me ha permitido trabajar en su laboratorio desde la unidad de investigación de bioquímica, donde he podido ir desarrollando mis habilidades como investigadora. También quiero mencionar al Dr. Francisco Sáez, quien fue el primero en aventurarse a estudiar los receptores purginérgicos en nuestro laboratorio, con quien siempre pasamos extensas jornadas de discusión científica e incluso fue un apoyo en la revisión final del escrito de esta tesis.

Quiero agradecer al laboratorio del Instituto de Neurociencias de Alicante, donde estuve un semestre, aprendí mucho y obtuve resultados importantes para este trabajo, gracias por la simpatía y por recibirme con los abrazos abiertos, en especial al Dr. Javier Sáez Valero, quien me dio la oportunidad de trabajar en su laboratorio y a la Dra. Inmaculada Cuchillo, quien me guió directamente durante el trabajo. También quiero agradecer al Dr. Ariel Castro y al Laboratorio de Transducción de señales, ya que gracias a su apoyo y colaboración se pudo obtener el plásmido codificante para FLAG-P2X2a y además, con ellos aprendí la técnica de co-inmunoprecipitación.

De esta misma manera quiero mencionar a todas y todos quienes se han desempeñado en nuestro Laboratorio de Screening de Compuestos Neuroactivos, que han estado ahí para ayudar en experimentos, enseñando técnicas, discutiendo evidencia científica, aclarando dudas y un largo etcétera, Oscar Ramírez, Jessica Panes, Caro Castillo, Javi Gavilán, Tiare Silva-Grecchi, y muchas más excelentes personas que tuve el agrado de conocer en todos estos años. Asimismo quiero agradecer al resto del departamento de Fisiología, profesores, estudiantes de pre y postgrado, personal técnicos y funcionarios, quienes desde sus distintas posiciones siempre han sido de ayuda y apoyo para el desarrollo del trabajo de todas y todos quienes nos desempeñamos en ese espacio físico.

También quiero agradecer a amigas y amigos que han sido un apoyo externo fundamental, porque no todo en la vida puede ser trabajo y si queremos cambiar el mundo debe ser también fuera del laboratorio, Nico, Pancha, Yohanna, Pilar y todas esas compañeras y compañeros con quienes compartí

visiones de mundo durante este proceso. En este mismo contexto quiero mencionar a mis compañeras y compañeros de CIPRES, con quienes nos consideramos jóvenes de ciencia y queremos aportar en el cambio necesario del cómo y para qué se desarrolla la actividad científica en nuestro país.

Quiero agradecer también a los integrantes de esta comisión evaluadora, Dra. Roxana Pincheira, Dr. Juan Pablo Henríquez y Dra. Alejandra Álvarez, quienes desde la defensa del proyecto de tesis han aportado a mejorar este trabajo.

Al financiamiento otorgado por los proyectos Fondecyt 1161078, 1200908 y CONICYT 21160392.

Finalmente y de manera más importante quiero agradecer a mis padres porque sin ellos jamás habría llegado hasta acá, gracias por dar todo de ustedes para que yo fuera profesional, gracias por apoyarme siempre en este arduo camino que elegí, no tengo palabras para expresar lo agradecida que estoy.

Y por último, no puedo dejar de mencionar el contexto en el que se ha finalizado esta tesis, primero un estallido social que develó al mundo las desigualdades que vivimos día a día y la necesidad de cambios profundos en nuestro país, razón por la que seguiremos trabajando desde todas nuestras esferas. Y luego, una pandemia que retrasó la finalización de esta tesis, pero que demostró al mundo la importancia de la investigación científica y de la comunicación global entre sus distintos actores para dar resoluciones a las problemáticas que enfrentamos como humanidad. El conocimiento se debe sociabilizar, para que sea una semilla en terreno fértil que dé frutos.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT.....	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
Enfermedad de Alzheimer	1
Diagnóstico de la EA	5
Péptido β -amiloide.....	8
Disfunción mitocondrial como elemento clave de la toxicidad amiloide....	13
ATP, receptores purinérgicos y su rol en neuroinflamación.....	14
Receptor P2X2 y su rol fisiológico en el Sistema Nervioso	17
Consecuencias de la interacción de Fe65 con P2X2 y APP.....	21
II. HIPÓTESIS.....	27
III. OBJETIVOS.....	28
Objetivo general:	28
Objetivos generales:	28
Objetivo específico 1:	28
Objetivo específico 2:	28
Objetivo específico 3:	28
Objetivo específico 4:	28
IV. METODOLOGÍA.....	29
1. Células PC12 y HEK-293	29
2. Células hipocampales.....	29
3. Obtención de extractos de cerebro humano.....	30
4. Agregación del péptido $A\beta_{1-40}$	31
5. Transfección	31
6. Western blot	32
7. Microfluorimetría de Ca^{2+} citosólico	33
8. Electrofisiología	34
9. Inmunocitoquímica.....	34
10. Análisis de co-localización y distribución subcelular.....	35

11. Co-Inmunoprecipitación (Co-IP)	36
12. RT-qPCR	37
13. Análisis de datos.....	37
V. RESULTADOS	38
1. CAMBIOS EN NIVELES DE EXPRESIÓN Y EN LA FUNCIONALIDAD DE LAS ISOFORMAS DE P2X2R EN CÉLULAS EXPUESTAS A A β o.....	38
1.1 La isoforma P2X2a aumenta luego de tratamientos con A β o.....	38
1.2 Aumento de la neurotransmisión purinérgica producto del incremento de P2X2a en neuronas tratadas con A β o.....	45
2. IMPACTO DE LOS CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE P2X2 SOBRE FE65, APP Y SU PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO.....	49
2.1. La sobreexpresión de P2X2 genera un receptor funcional en líneas celulares.....	49
2.2. Evaluación de la posible interacción del receptor P2X2a con Fe65 y de la formación de un complejo con APP.....	53
2.3 Evaluación del impacto del aumento de P2X2 en la co-localización entre Fe65 y APP.	57
2.4 Impacto del tratamiento con A β o en la interacción de APP con factores claves de la endocitosis: Rab5	61
2.5 Incremento en los niveles de A β tras la sobreexpresión de P2X2R: posible impacto en la endocitosis de APP.....	64
3. IMPACTO EN LA DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE FE65 Y LOS NIVELES DE PGC-1 α FRENTE A UN AUMENTO DE P2X2	67
3.1 A β o disminuye la razón núcleo/citosol de Fe65	67
3.2 P2X2a disminuye la razón núcleo/citosol de Fe65	69
3.3 A β o y sobreexpresión de P2X2a disminuyen la inmunorreactividad de PGC-1 α	71
4. P2X2 AUMENTA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	74
VI. DISCUSIÓN.....	79
VII. CONCLUSIÓN.....	90
VIII. REFERENCIAS	91
IX. ANEXOS.....	99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: FLAG-P2X2a mantiene una constante de desensibilización similar a la observada para P2X2a	53
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías de procesamiento de APP.	4
Figura 2. Estadios de clasificación de la EA de acuerdo a los marcadores histopatológicos.	7
Figura 3. Señalización de PGC-1 α normal y en presencia de A β o.	14
Figura 4. Activación del Inflamasoma NLRP3 mediada por ATP y el receptor purinérgico P2X7.	15
Figura 5. Esquema de una subunidad de P2XR.	19
Figura 6. Isoformas de P2X2.	21
Figura 7. Fe65 interacciona con P2X2 y APP.	23
Figura 8. Detección de las isoformas de P2X2 mediante western blot.	40
Figura 9. El tratamiento con A β o aumenta los niveles de P2X2a en células PC12.	42
Figura 10. El tratamiento con A β o aumenta los niveles de P2X2a en células hipocampales.	43
Figura 11. El tratamiento con A β o aumenta la intensidad de inmunofluorescencia de P2X2R en neuronas hipocampales.	44
Figura 12. El tratamiento con A β o aumenta la amplitud de las corrientes evocadas por ATP en células PC12.	46
Figura 13. El tratamiento con A β o aumenta la amplitud de las corrientes evocadas por ATP en neuronas hipocampales	47
Figura 14. El tratamiento con A β o incrementa la respuesta de Ca ²⁺ evocada por ATP en neuronas hipocampales.	48
Figura 15. Isoformas de P2X2R sobreexpresadas en células PC12.	50
Figura 16. Isoformas de P2X2 expresadas por transfección en HEK-293 expresan receptores funcionales	52
Figura 17. Estudio de co-inmunoprecipitación y co-inmunoprecipitación inversa de FLAG-P2X2a y Fe65.	55
Figura 18. Estudio de co-inmunoprecipitación de FLAG-P2X2a y APP.	57
Figura 19. Co-localización entre APP y Fe65 luego de tratamientos con A β o.	59

Figura 20. Análisis de la co-localización entre Fe65 y APP en presencia de la sobreexpresión de P2X2.....	61
Figura 21. Análisis de la co-localización entre APP y Rab5.....	63
Figura 22. Aβo aumenta la co-localización entre APP y Rab5 observado por microscopía superresolución.	64
Figura 23. La sobreexpresión de P2X2 incrementa los niveles de Aβ en células PC12.....	66
Figura 24. Aβo disminuye la razón N-C de Fe65 en neuronas hipocampales.	68
Figura 25. La sobreexpresión de P2X2a disminuye la razón N-C de Fe65 en células PC12.....	70
Figura 26. Aβo disminuye la intensidad de la inmunorreactividad de PGC-1α en neuronas hipocampales.....	72
Figura 27. La sobreexpresión de P2X2a. pero no de P2X2b, disminuye la intensidad de la inmunorreactividad de PGC-1α en células PC12.....	73
Figura 28. P2X2 aumenta sus niveles en el cerebro de personas con EA. .	76
Figura 29. Los niveles de ARNm de P2X2 aumentan en el cerebro de personas con EA.	78
Figura 30. Modelo de la relación funcional entre Aβo, P2X2a, Fe65 y APP.	89

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es el principal tipo de demencia que afecta a la población adulta mayor y se postula que el principal agente tóxico en la patología de esta enfermedad neurodegenerativa es el péptido β -amiloide ($A\beta$). Específicamente, serían los oligómeros solubles del péptido ($A\beta$) los que provocan los principales efectos neurotóxicos como son la falla sináptica y disfunción mitocondrial. Además, se ha propuesto que estos oligómeros son capaces de formar un poro no selectivo en la membrana plasmática, lo que genera entre otras cosas, la dishomeostasis del Ca^{2+} intracelular. En nuestro grupo se pudo establecer que este poro también permite la salida de ATP al medio extracelular, potenciando el rol de esta molécula como neurotransmisor, y por ese motivo, en este trabajo quisimos estudiar el impacto que ese incremento tendría en la señalización purinérgica.

Es conocido que los receptores purinérgicos cumplen diferentes roles en la comunicación celular en el sistema nervioso central, y en particular, los receptores ionotrópicos P2XR, han sido descritos en roles tan relevantes como la neuroinflamación (P2X7R), en esta misma familia se encuentra el P2X2R, asociado a una función principalmente neuronal, y cuyas dos isoformas principales son P2X2a y P2X2b. La primera contiene la secuencia completa de la proteína, mientras que la segunda no tiene 69 aminoácidos del extremo C-terminal; cabe señalar que por este motivo solo P2X2a interacciona con Fe65, proteína adaptadora que transloca al núcleo donde activa la transcripción del coactivador 1 α del receptor activado por proliferadores de peroxisoma (PGC-1 α), regulador maestro de la biogénesis mitocondrial, entre otros. En paralelo, Fe65 puede interaccionar adicionalmente, con la proteína precursora amiloide (APP), y se postula que regula el tráfico y procesamiento proteolítico de esta. APP puede ser proteolizada por la vía amiloidogénica (que da origen al péptido $A\beta$) y no amiloidogénica. Ambos procesamientos ocurren en distintos compartimentos celulares; la vía amiloidogénica ocurre principalmente en compartimentos con pH más ácido, como endosomas, mientras que la no amiloidogénica ocurre principalmente en la membrana

plasmática. Por este motivo, el tráfico y endocitosis de APP son eventos celulares relevantes para la producción del péptido A β , que podrían condicionar la toxicidad amiloide y la fisiopatología de la EA.

Este trabajo se basa en la evidencia previa del laboratorio, donde se ha demostrado la sobreexpresión de P2X2R tras la exposición a A β , y se enfocó en estudiar posibles consecuencias celulares y moleculares, asociadas a este aumento de la expresión de P2X2R. De los resultados obtenidos, confirmamos que P2X2R aumenta en modelos celulares tratados con A β y en el cerebro de pacientes con la EA. Específicamente, nuestros estudios en modelos celulares, nos sugieren que la isoforma P2X2a se expresa principalmente. Además, observamos que tanto la exposición a A β como la sobreexpresión de P2X2a, generan una disminución de la razón núcleo-citosol (N-C) de Fe65 y en los niveles totales de PGC-1 α . Finalmente, en neuronas hipocampales expuestas a A β observamos un aumento en la co-localización de APP con Rab5, un marcador de endosomas tempranos, que sugiere un aumento en la endocitosis de esta proteína. Mientras que en células PC12 observamos un aumento en los niveles de A β luego de la sobreexpresión de P2X2R.

En resumen, nuestros resultados nos permiten plantear la participación del P2X2R, y de la neurotransmisión purinérgica, como elementos relevantes en los mecanismos fisiopatológicos desencadenados por A β en la EA, que involucran cambios en reguladores de la función mitocondrial, y del proceso endocítico de APP, con lo cual el P2X2R, se presenta como una nueva e interesante diana farmacológica para el desarrollo de nuevas estrategias experimentales, que reduzcan la toxicidad del péptido amiloide, o frenen el ciclo de toxicidad mediado por la mayor producción de A β . Se requerirá avanzar en estudios adicionales, que profundicen en los mecanismos que activan la sobreexpresión de los receptores purinérgicos, y los elementos involucrados en la activación de la vía amiloidogénica.

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) is the main type of dementia that affects the elderly and it is postulated that the main toxic agent in the pathology of this neurodegenerative disease is the amyloid- β peptide ($A\beta$). Specifically, it would be the soluble oligomers of the peptide ($A\beta_o$) which induce the main neurotoxic effects such as synaptic failure and mitochondrial dysfunction. Besides, it has been proposed that the oligomers are capable to form a non-selective pore in the plasma membrane, which generates among others, the intracellular Ca^{2+} dyshomeostasis. In our group, it has been established that this pore also allows the efflux of ATP to the extracellular milieu, potentiating the role of this molecule as a neurotransmitter and thus, in this work we aimed to study the impact that this increment in the extracellular ATP levels would have in the purinergic signaling.

It is known that the purinergic receptors fulfill different roles in the cellular communication in the central nervous system, and in particular the ionotropic receptors P2XR, have been described in roles as relevant such as neuroinflammation (P2X7R). Part of the same family of receptors is P2X2R, mainly associated to a neuronal function, and which two main isoforms are P2X2a and P2X2b. The former contains the complete sequence of the protein, while the second lacks 69 amino acids in the C-terminus; it is noteworthy that for this reason P2X2a interacts with Fe65, adaptor protein that translocates to the nucleus where it activates the transcription of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α (PGC-1 α), a master regulator of the mitochondrial biogenesis, among others. In parallel, Fe65 can additionally interact with the amyloid precursor protein (APP), and it is postulated that regulates the trafficking and proteolytic cleavage of this protein. APP can be proteolysed by the amyloidogenic (which origins $A\beta$ peptide) and the non-amyloidogenic pathway. Both type of cleavages occur in different cellular compartments; the amyloidogenic pathway take place mainly in more acidic compartment, such as endosomes, while the non-amyloidogenic occurs mainly in the plasma membrane. For this reason, the trafficking and

endocytosis of APP are relevant cellular events for the production of A β peptide that could condition the amyloid toxicity and physiopathology of AD.

This work is founded in the previous evidence from our laboratory, where it has been demonstrated the overexpression of P2X2R after exposition to A β , and it was focused in studying the posible cellular and molecular consequences associated to the increase in the P2X2R expression. We confirmed that P2X2R increases in cellular models treated with A β and in the brain of patients with AD. Specifically, our studies in cellular models suggest that the P2X2a isoform is the one that is mainly expressed. Furthermore, we observed that the exposition to A β and the overexpression of P2X2a, generate a decrease in the nucleus-cytosol (N-C) ratio of Fe65 and the total levels of PGC-1 α . Finally, in hippocampal neurons exposed to A β we observed an increment in the co-localization of APP with Rab5, an early endosome marker, which suggests an increase in this protein endocytosis. Whereas in PC12 cells we observe an increase in the A β levels after P2X2R overexpression.

In summary, our results allow us to propose the involvement of P2X2R, and purinergic neurotransmission, as relevant elements in the physiopathology mechanisms triggered by A β in AD, which involved changes in mitochondrial function regulators and APP endocytic process, which introduce P2X2R as a new and interesting pharmacological target to the development of new experimental strategies that reduce the amyloid peptide toxicity or stop the toxicity cycle mediated by the enhanced production of A β . It will be needed to move forward with additional studies that deepen in the mechanisms that activate the purinergic receptors overexpression and the elements involved in the amyloid pathway activation.

I. INTRODUCCIÓN

Enfermedad de Alzheimer

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es el principal tipo de demencia, que abarca entre un 60% a un 70% de los casos [1]. La alta incidencia de las demencias las convierte en un problema de salud pública mundial. En el año 2019, se estimaba que alrededor de 50 millones de personas en el mundo padecían de demencia, y se espera que este número siga creciendo hasta casi triplicarse para el año 2050 [1]. La EA se caracteriza por afectar de forma mayoritaria a la población adulta a partir de los 65 años, en más del 90% de los casos los síntomas no aparecen hasta después de esa edad. La incidencia de esta enfermedad es progresiva y exponencial, duplicándose su incidencia cada 5 años después de los 65 años de edad [2]. Se estima que en Estados Unidos, 1 de cada 9 personas mayores de 65 años tiene Alzheimer, 6.2 millones de personas viven con esta enfermedad y el 72% son personas mayores de 75 años [3].

La EA es una enfermedad neurodegenerativa de avance progresivo, donde se estima que los primeros eventos celulares de la enfermedad ocurrirían 20 años antes de que aparezcan los primeros síntomas [4]. La primera etapa de la enfermedad se denomina Alzheimer preclínico [3], y en ella hay cambios detectables en el cerebro de los pacientes, pero no se presentan síntomas [3]. Las primeras regiones cerebrales en ser afectadas son la corteza entorrinal y el hipocampo, áreas esenciales en la formación de nuevos recuerdos y fuertemente vinculados a la memoria de trabajo [5]. A nivel clínico, los

principales síntomas de la EA son la pérdida de memoria y trastorno del lenguaje [4]. En una primera etapa, los pacientes presentan síntomas leves que pueden ser identificados sólo por amigos o familiares, ya que no interfieren en las actividades diarias de los individuos [3]. Esta etapa se conoce como deterioro cognitivo leve (MCI, por sus siglas en inglés), y aproximadamente un tercio de estos pacientes desarrollan demencia por Alzheimer dentro de 5 años [3]. La demencia se caracteriza por notables problemas en la memoria, el pensamiento o el comportamiento, presentando síntomas que interfieren en la vida diaria. Otros síntomas que se presentan comúnmente son confusión, problemas visuales y alucinaciones [4, 6]. A su vez, la demencia por Alzheimer se subdivide en tres etapas clínicas: demencia leve, moderada y severa [3]. En esta última etapa, por el daño en áreas cerebrales involucradas en el movimiento, las personas terminan postradas, lo que hace que estos pacientes sean vulnerables a otras condiciones como coágulos o infecciones de la piel, que pueden llevar a sepsis y falla orgánica [3]. La duración promedio de la fase clínica de la EA es entre 8 y 10 años [6].

La EA ha sido caracterizada por dos marcadores histopatológicos clásicos, que se encuentran en el cerebro de los pacientes. Los ovillos neurofibrilares, que son agregados intraneuronales de la proteína tau hiperfosforilada, y las placas amiloides, agregados extracelulares cuyo componente principal es el péptido β -amiloide ($A\beta$) [7]. Si bien el mecanismo fisiopatológico de la EA aún no se conoce en detalle, especialmente la cronología de los eventos; la hipótesis mayormente estudiada durante las últimas décadas es la hipótesis amiloide. Esta plantea que el péptido $A\beta$ sería el principal causante de la

enfermedad [8-11]. En principio, se planteó que los ovillos neurofibrilares, el daño vascular y la demencia son el resultado directo de la formación de los depósitos de A β [12]. Las placas seniles consisten de un núcleo de fibras amiloides, rodeadas de neuritas distróficas, células microgliales activadas y astrocitos [13]. Una de las evidencias que apuntó hacia el péptido A β fue su correlación con el Síndrome de Down. Este péptido proviene de la proteína precursora amiloide (APP), cuyo gen se encuentra codificado en el cromosoma 21. Las personas con Síndrome de Down, trisomía 21, presentan EA alrededor de los 50 años de edad [12]. Otro de los sustentos para esta hipótesis fue el descubrimiento de mutaciones en el gen de *APP*, ya que fue descrito que estas mutaciones llevan a la formación de depósitos de A β y EA a edades más tempranas [13]. Este tipo de Alzheimer se conoce como EA familiar (EAF) o de inicio temprano (EOAD, por su sigla en inglés), y corresponde sólo a entre 1% y 5% de los casos totales [6]. En estas personas la EA se produce entre los 40 y 50 años de edad, y es causada por mutaciones en genes relacionados a la producción del péptido A β [14]. Estos genes son los que codifican para APP y para las presinilinas 1 y 2 (*PSN1*, *PSN2*), proteínas que forman el sitio activo de γ -secretasa, enzima que realiza el segundo clivaje en APP, el paso final en la generación del péptido A β (Fig. 1) [8, 14].

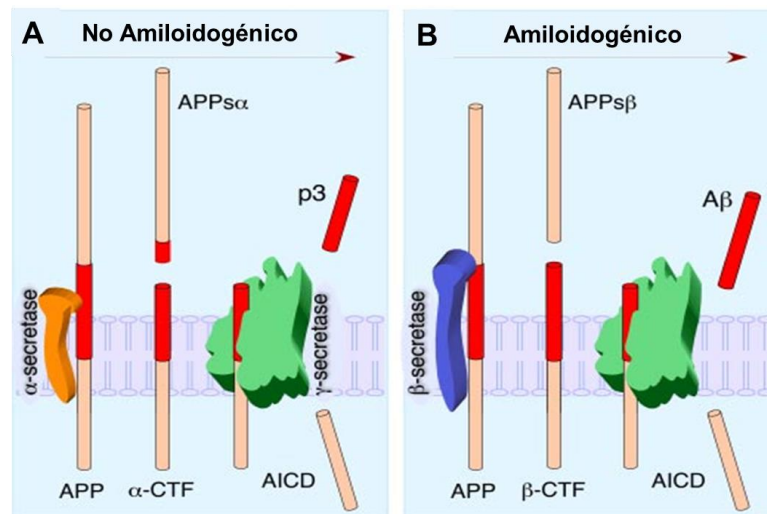


Figura 1. Vías de procesamiento de APP.

El esquema muestra las dos vías principales de procesamiento proteolítico de APP. **A.** Vía no amiloidogénica, donde participan las enzimas α-secretasa, que cliva parte de la secuencia del péptido Aβ (en rojo) y γ-secretasa. **B.** Vía amiloidogénica, donde las enzimas β-secretasa y γ-secretasa dan origen al péptido Aβ. *Esquema modificado de Thinakaran and Koo, 2008, J. of Biol. Chem. [15]*

Para la EA de inicio tardío (LOAD, por sus siglas en inglés) se han realizado estudios de asociación del genoma completo, los que han permitido la descripción de variantes genéticas que son factor de riesgo para la EA. La primera variante descrita fue Apolipoproteína E4 (ApoE4), esta participa en el metabolismo de lipoproteínas y sería el principal factor de riesgo para desarrollar la EA [16]. En estos estudios genómicos, tres procesos han sido descritos como importantes en la patogénesis de la enfermedad: metabolismo de colesterol, inflamación y su relación con el sistema inmune innato, y el

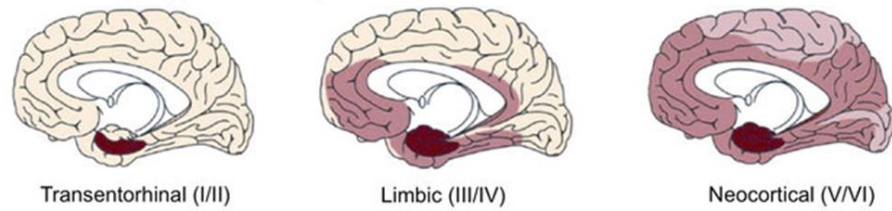
reciclaje de vesículas [17]. Por ejemplo, variantes genéticas de *SORL1* han sido descritas como factor de riesgo para la EA [18]. Esto se debería a que *SORL1* interacciona directamente con APP, dirigiendo su transporte intracelular hacia el Golgi, lo que disminuye su procesamiento amiloidogénico [19].

Diagnóstico de la EA

De acuerdo a la evidencia clínica y bibliográfica, la EA se describe como una enfermedad multifactorial, ya que, no depende de una causa en particular, lo que induce una mayor complejidad diagnóstica, y a su vez dificulta la posibilidad de diferenciarla de otros tipos de demencias y enfermedades neurodegenerativas [20]. Esto obliga a reconocer ciertos signos y síntomas, con el fin de identificar acertadamente quienes padecen de EA. Es por esto que, en el año 1986 se creó el Consorcio para Establecer un Registro para la EA (CERAD), con el objetivo de desarrollar, estandarizar y validar métodos para la evaluación de la EA [21]. En el año 1991 se describió un sistema de estadios histopatológicos que se utiliza ampliamente para establecer la severidad de la neuropatología de la EA en el cerebro *post-mortem* de los pacientes [8]. Esta clasificación se denomina Braak y se basa en la ubicación de los ovillos neurofibrilares (Fig. 2A); en los estadios I y II se encuentran principalmente en la región transentorrinal, en los estadios III y IV se encuentran en la región entorrinal y regiones límbicas como el hipocampo, mientras que en los estadios V y VI la neocorteza se encuentra extensamente afectada [7]. Otra clasificación utilizada es la de Estadios Amiloides de la EA, descritas por Braak & Braak, de acuerdo a la ubicación en la que se observan

los depósitos amiloides. En ella se pueden describir 3 estadios, en las que va en aumento el número de depósitos y las áreas del cerebro en las que estos se encuentran [7]. En el estadio A se observan los depósitos en porciones basales de la neocorteza, en el Estadio B en todas las áreas de asociación isocortical y levemente en hipocampo y en el Estadio C en todas las áreas de la isocorteza incluyendo los campos sensoriales y motores [7]. Por otra parte, en el año 2002 se describió una nueva metodología de clasificación de estadios de acuerdo a la presencia de placas amiloides, donde se distinguieron cinco fases (Fig. 2B), desde la fase 1 donde sólo se observan depósitos de A β en la neocorteza, hasta la fase 5 donde también se observan en cerebelo y núcleos del tronco encefálico [22]. Finalmente, desde el año 2012, se recomienda un protocolo de estadiaje "ABC" para los cambios neuropatológicos de la EA, basados en estas tres características neuromorfológicas de la enfermedad: A: placas amiloide, B: ovillos neurofibrilares y C: placas neuríticas, en donde cada uno de estos parámetros puede ser puntuado desde 0 a 3 [23].

A Estadios Braak



B Estadios Amiloides

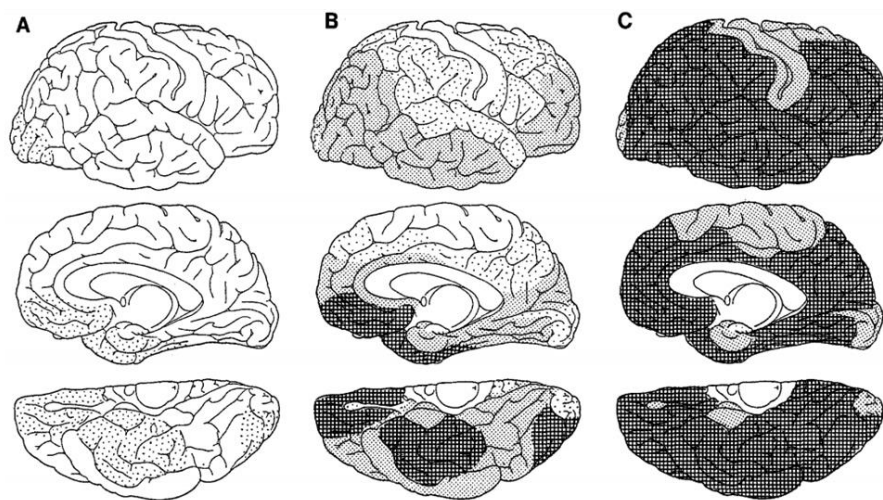


Figura 2. Estadios de clasificación de la EA de acuerdo a los marcadores histopatológicos.

A. Esquema representativo de Estadios Braak de la EA que son descritos de acuerdo a la ubicación en la que se observan los ovillos neurofibrilares. Estadios I y II en la corteza entorrinal, Estadios III y IV en la corteza inferolateral temporal y partes del lóbulo parietal medial y Estadios V y VI en la corteza de asociación. **B.** Esquema representativo de los Estadios amiloides de la EA, descritos de acuerdo a la ubicación en la que se observan los depósitos amiloides. Estadio A en porciones basales de la neocorteza, Estadio B en todas las áreas de asociación isocortical y levemente en hipocampo y Estadio C en todas las áreas de la isocorteza incluyendo los

campos sensoriales y motores (Aumento en la densidad del sombreado indica un aumento en el número de depósitos). *Modificado de Schöll et al. 2019, Mol. and Cel. Neurosc. y Braak & Braal. 1991, Acta Neuropathologica [7, 24].*

Péptido β -amiloide.

El péptido A β se origina a partir de APP, proteína transmembrana clase 1 altamente conservada, de expresión ubicua y codificada por el gen *APP* que se encuentra en el cromosoma 21 [25]. El dominio N-terminal se encuentra hacia el medio extracelular y un corto dominio C-terminal hacia el medio intracelular [26]. Existen tres isoformas principales de APP, APP751, APP770 y APP695, esta última es la que se expresa principalmente en el cerebro [27].

Adicionalmente, en humanos se encuentran *APP like protein 1* y *2* (APLP1, APLP2), proteínas que comparten dominios altamente conservados con APP, sin embargo, no presentan la región del péptido A β [28]. Estas tres proteínas participan como moléculas de adhesión sináptica con un rol en la formación de sinapsis y migración neuronal cortical durante el desarrollo [29]. El ratón triple *knockout* para APP, APLP1 y APLP2 muere rápidamente después del nacimiento [30], lo mismo sucede con los ratones doble *knockout* APP/APLP2 y APLP1/APLP2. Sin embargo, los ratones transgénicos *knockout* para solo una de estas proteínas son viables [28]. Esto permite deducir que estas 3 proteínas cumplen funciones parcialmente redundantes.

En términos generales, APP puede ser proteolizada por dos vías, la vía no amiloidogénica y la vía amiloidogénica. En la vía no amiloidogénica, primero

es clivada por la enzima α -secretasa, generando el fragmento C-terminal α (α -CTF) o C83 y el fragmento APP soluble α (sAPP α). Posteriormente, como se muestra en la figura 1, el fragmento C83 es clivado por γ -secretasa, produciendo el dominio intracelular amiloide (AICD) y el péptido p3 (A β ₁₇₋₄₀/A β ₁₇₋₄₂) [31]. Por otra parte, en la vía amiloidogénica APP es clivada por la enzima β -secretasa (BACE1), generando el β -CTF o C99 y el fragmento APP soluble β (sAPP β). Luego de esto, C99 es clivado por la enzima γ -secretasa generando también el fragmento AICD y el péptido A β de distinta longitud [32]. El péptido A β existe en distintos tamaños, desde los 38 a 43 aminoácidos. Las dos formas mayormente generadas, son A β ₁₋₄₀ (A β 40) y A β ₁₋₄₂ (A β 42). Esta última contiene dos aminoácidos más en el extremo C terminal que aumenta su hidrofobicidad y su capacidad de agregación, siendo esta la forma más tóxica del péptido A β [33].

Para algunos productos generados en ambas vías de procesamiento de APP, se ha descrito funciones fisiológicas [34, 35]. Por ejemplo, sAPP α promueve la viabilidad neuronal, la neurogénesis en adultos y la plasticidad sináptica [29]. En el caso de monómeros del péptido A β , se ha descrito que participan en el desarrollo cerebral, tienen efectos neuroprotectores y que modulan la actividad sináptica [29].

Un aspecto clave en el procesamiento de APP es la ubicación subcelular de esta proteína, ya que el clivaje por las dos principales vías de procesamiento ocurren en diferentes compartimentos subcelulares [36]. Se postula que la vía no amiloidogénica ocurre principalmente en la membrana plasmática [15],

pero evidencia reciente muestra que esta también se produciría en la red de trans-Golgi (TGN) [37]. Por lo tanto, no se puede descartar que el clivaje por esta vía de procesamiento ocurra también en otros compartimentos subcelulares. El clivaje de APP por BACE1 es el paso limitante en la producción de A β , y se propone que este sucede principalmente en el aparato de Golgi y compartimentos endosomales, los que tienen pH levemente ácido que favorece la actividad enzimática de esta secretasa [36, 38]. La evidencia existente muestra que cuando la convergencia de APP y BACE1 aumenta en un compartimento intracelular, aumenta el procesamiento amiloidogénico de esta proteína [36]. Lo que sugiere que esta convergencia pudiese ser un punto de partida para un mecanismo neurotóxico que inicia la formación del péptido A β y el mecanismo de patogénesis de la EA.

APP y BACE1 son internalizadas a través de endocitosis mediada por clatrina, y ambas convergen en endosomas tempranos (EE, por sus siglas en inglés). Desde allí, APP sigue predominantemente la vía lisosomal mientras que BACE1 es reciclada de vuelta a la membrana plasmática vía endosomas de reciclaje [39, 40]. En células CHO que expresan establemente APP695 (CHO-APP) se expresó una variante de BACE1, que posterior a la endocitosis viaja retrógradamente hacia el TGN. En estas células los niveles de péptido A β se triplicaron en comparación a las células que expresan BACE1 *wild type* [39]. Esto sugiere que en las células que expresan la variante de BACE1 aumentaría la convergencia de esta secretasa con APP en el TGN,

promoviendo el procesamiento amiloidogénico y la producción de A β en estas células.

Trabajos publicados recientemente, han demostrado que una reducción en la endocitosis de APP aumenta la producción de sAPP α , mientras que disminuye la producción de A β [41, 42]. Por otra parte, una reducción en la expresión de SORL1, proteína que como se mencionó previamente interacciona directamente con APP y participa en su tráfico hacia vías de reciclaje [43], promueve que APP se transporte hacia la vía endosomal, aumentando la producción de A β [43]. Estos resultados indicarían que un aumento en la endocitosis de APP y su tráfico hacia la vía endosomal aumentarían el procesamiento amiloidogénico y la subsecuente producción del péptido A β .

En la EA, por razones aún desconocidas, se produce un desequilibrio entre la producción, degradación y *clearance* del péptido A β [33, 44], que genera la acumulación y agregación de este péptido, y ha sido indicado como el mecanismo tóxico principal de A β .

Se postula que los oligómeros solubles del péptido A β (A β _o) son los principales agentes causantes del daño sináptico en el cerebro de pacientes con la EA [45-47]. Como se mencionó previamente el principal componente de las placas amiloides es el péptido A β . Esto se produce debido a la capacidad de agregación que tiene este péptido, la que se ha descrito varía según la longitud del péptido y condiciones como la concentración, temperatura, fuerza iónica y el pH [48, 49]. La cinética de agregación del péptido muestra que, en primer lugar se forman agregados globulares del

péptido [50]. Se ha observado que los A β o son suficientes para producir muerte neuronal y daño cognitivo en ausencia de placas amiloides [33]. Por ejemplo, en un ratón transgénico para APP que presenta placas amiloides a los 30 meses de edad, fue posible observar problemas en aprendizaje espacial y memoria a los 12 meses de edad, cuando solo es posible detectar A β o en el cerebro de estos ratones [51]. Esto sugiere que la formación de A β o en el cerebro de las personas estaría asociada al daño cognitivo, y no así las placas amiloides.

Se ha descrito que los A β o inducen sus efectos tóxicos mediante distintos mecanismos. Por ejemplo, son capaces de interactuar con proteínas y receptores de membrana, influyendo en su función [52]. También se ha demostrado la interacción directa de estos oligómeros con la membrana plasmática, donde además se describe su capacidad para formar poros inespecíficos que permiten el paso de distintos cationes, como el ión calcio (Ca $^{2+}$), y moléculas de mayor tamaño como el ATP [53, 54]. Uno de los efectos tóxicos causados por A β o es la dishomeostasis del Ca $^{2+}$ intracelular, generando una sobrecarga mitocondrial de este catión, que produce la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la apertura prolongada del poro de transición mitocondrial, que permite la liberación de citocromo c, factor pro apoptótico que activa caspasas e inicia la señalización de muerte celular [55, 56]. Relacionado a esto, se ha descrito que la disfunción mitocondrial es un rasgo clave y temprano en la patogénesis de la EA y diversos estudios han

observado que los A β o son capaces de inducir efectos tóxicos en la mitocondria [57-59].

Disfunción mitocondrial como elemento clave de la toxicidad amiloide

La disfunción mitocondrial se produce por una desregulación de la biogénesis y dinámica mitocondrial. En nuestro grupo de laboratorio, hemos descrito que los A β o generan un desbalance en los procesos de fisión y fusión mitocondrial, favoreciendo la fisión y, por lo tanto, generando mitocondrias de fenotipo granular o fraccionado [57]. Esta red mitocondrial fragmentada las hace menos eficientes para tamponar el Ca²⁺, favoreciendo la dishomeostasis de este catión [60]. Por otra parte, también se ha descrito que en la EA se produce una disminución de la biogénesis mitocondrial [61]. Este proceso es importante para mantener la homeostasis mitocondrial, y es regulado por el coactivador 1 α del receptor activado por proliferadores de peroxisoma (PGC-1 α), un coactivador transcripcional que activa la transcripción de los factores nucleares 1 y 2 (NRF 1, NRF 2) y del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) [61]. PGC-1 α disminuye en el cerebro de pacientes con EA [62], y en nuestro laboratorio hemos observado que disminuye sus niveles y distribución núcleo-citosol luego de la exposición a A β o, lo que afectaría su rol como regulador transcripcional [57], afectando finalmente la biogénesis mitocondrial (Fig. 3).

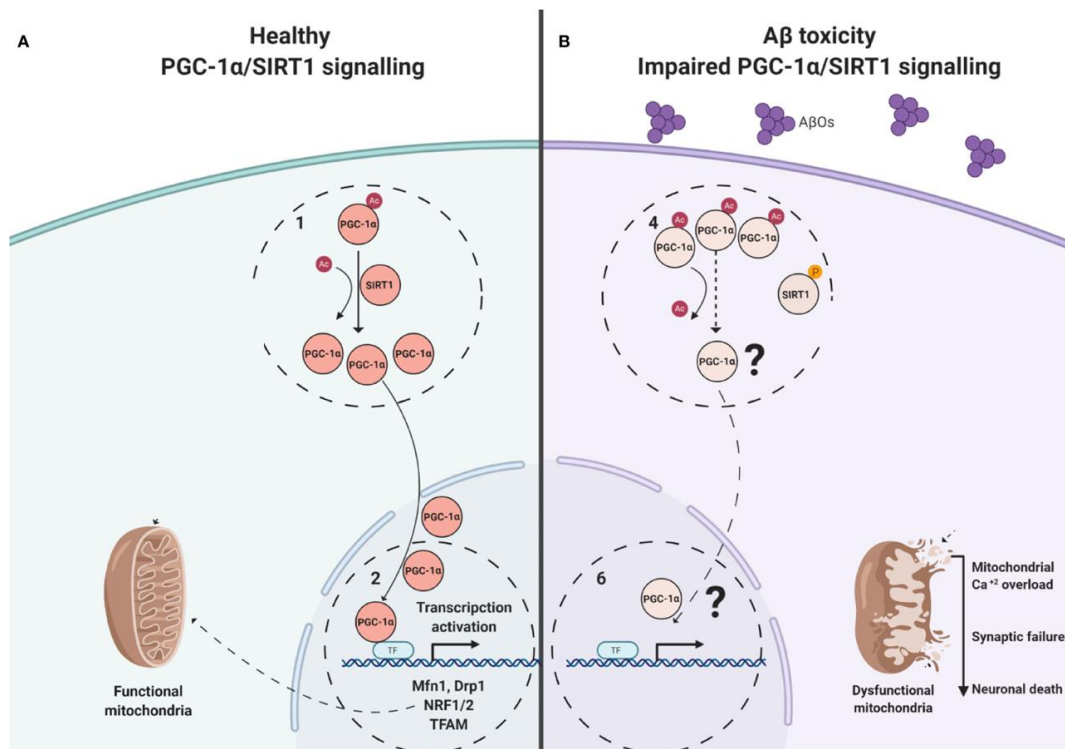


Figura 3. Señalización de PGC-1α normal y en presencia de Aβo.

A. Esquema representativo del metabolismo mitocondrial en una célula normal. PGC-1α es desacetilado por SIRT-1, lo que permite su translocación al núcleo y su función transcripcional, favoreciendo la biogénesis mitocondrial.

B. Esquema representativo del metabolismo mitocondrial en presencia de Aβo. Disminuye la desacetilación por SIRT-1 y los niveles de PGC-1α nucleares, disminuyendo su función transcripcional y consecuentemente la biogénesis mitocondrial. *Modificado de Panes J. D. et al. 2020, Front. Pharmacol. [57]*

ATP, receptores purinérgicos y su rol en neuroinflamación

Otros de los eventos centrales observados en la EA es la neuroinflamación [63]. Diversos autores han sugerido que el ATP participa en el proceso de neuroinflamación asociado a la EA [64, 65]. En este proceso, el ATP se

encuentra presente extracelularmente, allí funciona como ligando para receptores purinérgicos que se encuentran en la superficie celular, activando vías de señalización asociadas a inflamación como la del inflamasoma NLRP3 [66, 67] (Fig. 4). Este es un complejo proteico que en respuesta a variados estímulos de daño provoca la activación de caspasa 1, que proteolisa las formas no activas de IL-1 β e IL-18, permitiendo la liberación de estas citoquinas pro-inflamatorias [67].

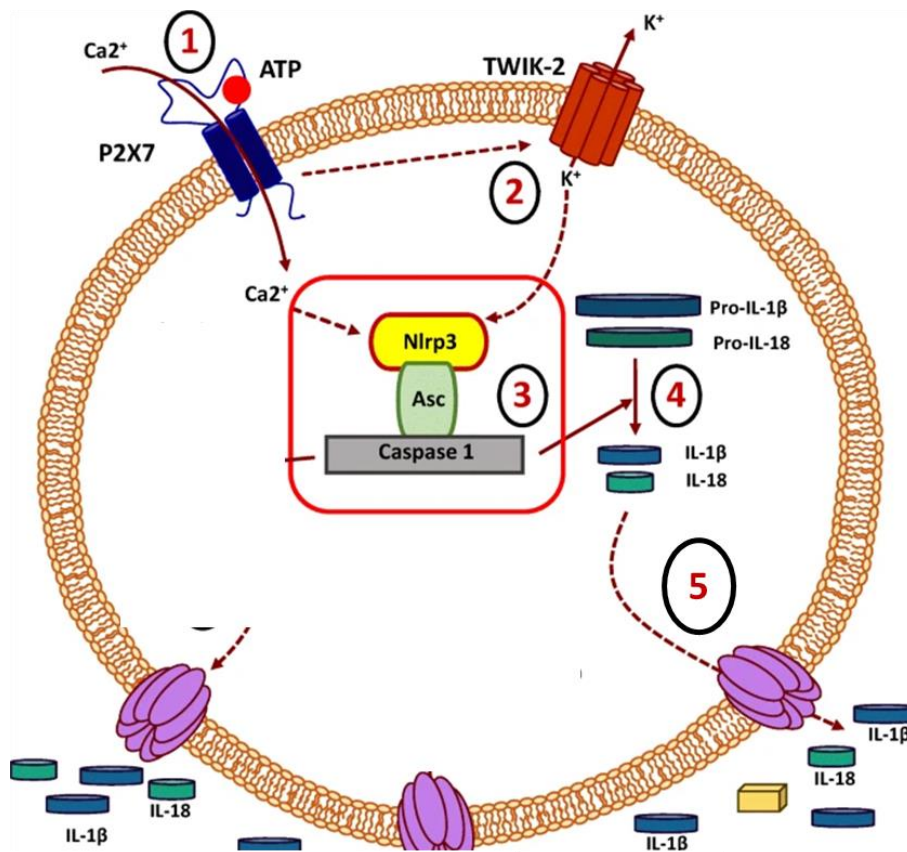


Figura 4. Activación del Inflamasoma NLRP3 mediada por ATP y el receptor purinérgico P2X7.

El ATP extracelular activa al P2X7R (1) generando el influjo de Ca²⁺ y la activación de un canal de K⁺ que permite la salida de este ión (2). Estos dos

procesos activan al inflammasoma NLRP3 **(3)** y en respuesta a esto caspasa 1 cliva los promotores no activos de las IL-1 β e IL-18 **(4)**, y la subsecuente salida de estas citoquinas al medio extracelular **(5)**. *Modificado de Ratajczak et al., 2019, Stem Cell Rev. and Rep. [68]*

Como se mencionó previamente, el ATP activa receptores de membrana denominados receptores purinérgicos, las principales familias son los receptores P2Y y P2X (P2XR). Los receptores P2Y son receptores acoplados a proteína G, de los cuales existen 8 subunidades diferentes. Por su parte, los P2XR son canales iónicos activados por ligando (LGIC, por sus siglas en inglés), de los cuales se han descrito 7 subunidades diferentes en mamíferos, P2X1-7 [69]. Cuando estos receptores son activados por ATP permiten el paso no selectivo de cationes, con una alta permeabilidad a Ca²⁺ [70]. Se ha descrito que el receptor P2X7 participa en diferentes procesos inflamatorios [71], incluidos aquellos presentes en enfermedades neurodegenerativas como la EA [72, 73]. La sobreexpresión de P2X7 fue observada en ratones transgénicos Tg2567, que expresan APP con la mutación *Swedish*, especialmente en las zonas alrededor de las placas amiloides [74]. Incluso se ha observado un aumento en la expresión de este receptor en microglías y astrocitos de cerebro de pacientes con la EA [75, 76]. También se han observado cambios en los niveles de los receptores P2X4 en pacientes con la EA, donde se describió una disminución en el giro temporal y frontal de la corteza cerebral de estos individuos [77]. Mientras que en neuronas hipocámpales en cultivo tratadas con agregados del péptido A β ₁₋₄₂ se observó

un aumento en los niveles de P2X4R y además, el silenciamiento de este receptor disminuyó la muerte celular generada por estos agregados tóxicos de A β [77]. Finalmente, en nuestro grupo hemos reportado que el incremento de calcio intracelular observado en neuronas hipocampales de rata luego de la exposición a A β , disminuye significativamente cuando se utiliza apirasa (3U/mL), una enzima que degrada ATP; o PPADS (10 μ M), un inhibidor de los receptores purinérgicos P2, que tiene una mayor selectividad por P2XR [78, 79]. Lo mismo se observó para el incremento en la frecuencia y amplitud de las corrientes excitatorias registradas luego de la exposición al péptido A β durante 1 hora [78]. Por otra parte, efectos observados luego de la exposición crónica a A β por 24 horas, como la disminución de las proteínas sinápticas SV2 y PSD95, o la disminución en la viabilidad celular, también fueron prevenidos mediante el uso de PPADS (10 μ M) [80]. Por lo tanto, esto demuestra que los P2XR participan en el mecanismo de toxicidad generado por los A β en neuronas hipocampales.

Finalmente, mediante qRT-PCR, Western Blot e inmunocitoquímica se observó un aumento en los niveles del receptor P2X2 (P2X2R) luego del tratamiento con A β en cultivos celulares, proponiendo que el aumento en la expresión de este receptor purinérgico puede estar relacionado con los efectos tóxicos inducidos por A β [80].

Receptor P2X2 y su rol fisiológico en el Sistema Nervioso

El P2X2R fue descrito por primera vez en la línea celular de feocromocitoma de rata PC12 [81]. Posteriormente se ha descrito su amplia expresión en el

Sistema Nervioso Central (SNC). Por ejemplo, se ha observado una densa inmunorreactividad en el bulbo olfatorio, corteza cerebral, amígdala e hipocampo [82]. Células piramidales de CA1 a CA4 y células granulares del giro dentado expresan altos niveles de P2X2R y el inmunomarcaje se observa principalmente en somas y dendritas [82]. Además, se describió su presencia específicamente en la membrana postsináptica en cerebelo y la región CA1 del hipocampo [83], y también en densidades presinápticas de hipocampo [84]. En general, se ha descrito una fuerte expresión de este receptor en diferentes neuronas del SNC. Su presencia en espinas dendríticas apoya la idea de que el ATP puede actuar como un neurotransmisor excitatorio, mientras que la expresión pre-sináptica es consistente con una función moduladora en la liberación de neurotransmisores [82]. Estas evidencias sugieren que este receptor purinérgico regula la transmisión sináptica rápida y que pudiese modular la plasticidad neuronal.

Al igual que la mayor parte de las subunidades de esta familia, P2X2 puede formar canales homo o heterotriméricos. Cada subunidad consiste de dos dominios transmembrana (TM1 y 2) conectados por un *loop* extracelular y sus extremos N y C terminal hacia el medio intracelular [70].

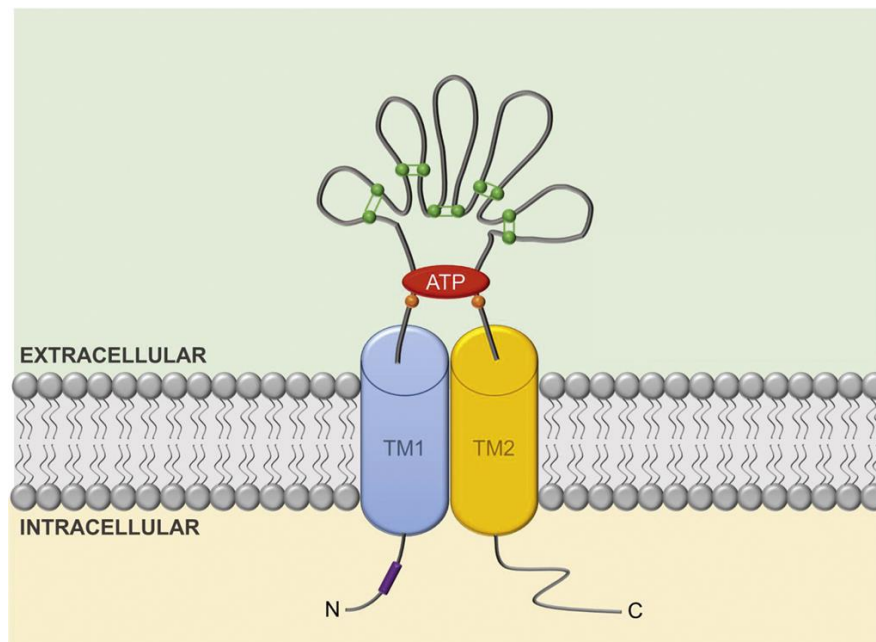


Figura 5. Esquema de una subunidad de P2XR.

En el esquema se observan los dos dominios transmembrana (TM1 y TM2), el gran loop extracelular con el sitio de unión a ATP, y los dominios N y C terminal hacia el medio intracelular. *Modificado de Saez-Orellana, 2015, Pharm. Res. [85]*

Los P2XR comparten similitudes en su estructura, sin embargo, existen diferencias en su sensibilidad a ATP y en la respuesta observada [86]. Existen residuos conservados entre las distintas subunidades responsables de la unión a ATP, sin embargo, aminoácidos no conservados contribuyen a esta diversidad en sus propiedades farmacológicas [86]. Por ejemplo, estos receptores pueden ser divididos de acuerdo a su desensibilización, ya sea rápida (P2X1 y P2X3) o lenta (P2X2, P2X4, P2X5 y P2X7) [86]. Esto es importante porque condiciona la conductancia a cationes en presencia

sostenida de ATP, pues establece el paso de la configuración abierta a, probablemente, una configuración cerrada unida a ligando [86]. Este mecanismo al parecer está controlado por varias regiones del receptor, por ejemplo, la sustitución de los extremos N o C terminal es suficiente para modificar esta propiedad [86]. Las diferentes variantes por *splicing* del P2X2R presentan cambios en la cinética de desensibilización a ATP. P2X2a, que contiene la secuencia completa de este receptor, tiene una desensibilización más lenta que las variantes que pierden parte del dominio C terminal, P2X2b y P2X2e [87]. La isoforma P2X2b no contiene 69 aminoácidos del dominio C terminal, en esta secuencia se encuentra una región rica en residuos de serina y prolina, específica de P2X2, que no se encuentra en ninguna otra subunidad de los P2XR [88]. Estas secuencias han demostrado regular ciertas características, como el ensamble o la desensibilización del receptor; y le permiten la interacción con proteínas citosólicas que pudiesen afectar la localización del receptor, aunque esto no ha sido aún descrito [88].

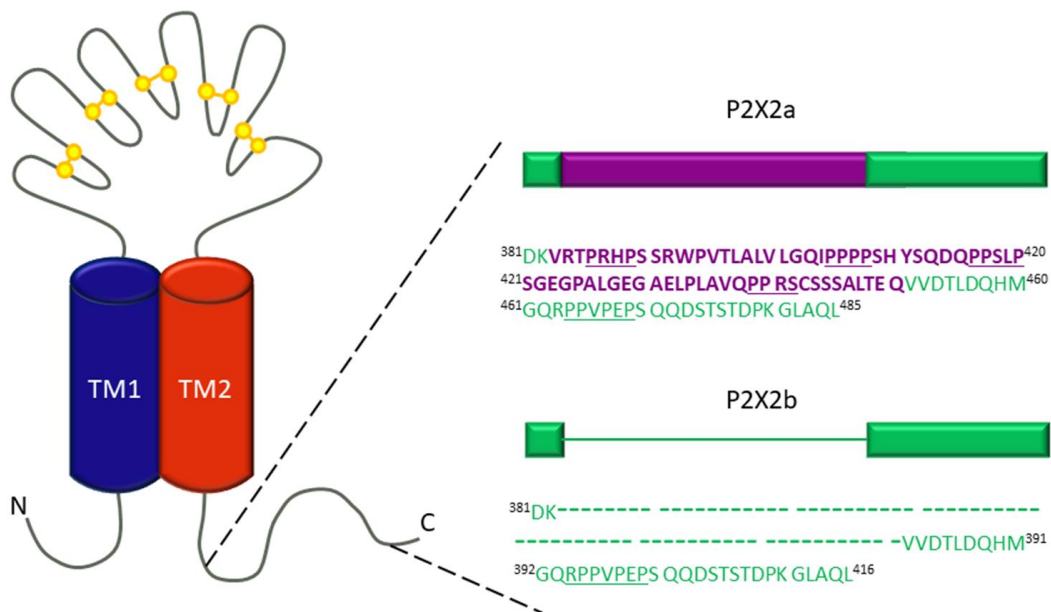


Figura 6. Isoformas de P2X2.

El esquema muestra las diferencias en el extremo C terminal de las isoformas P2X2a y P2X2b. En morado se observan los 69 aminoácidos que se pierden por *splicing* alternativo en la isoforma 2b y subrayado se muestran las secuencias ricas en prolina de este segmento de P2X2a.

Consecuencias de la interacción de Fe65 con P2X2 y APP

Fe65 es una proteína adaptadora altamente conservada, ya que su secuencia en humano, ratón y rata presenta un 95% de similitud [89]. Contiene 3 dominios de interacción proteína-proteína: WW, dominio en el que se encuentran dos residuos de triptófano separados por 20 a 22 aminoácidos que reconoce secuencias ricas en prolina, y dos dominios de unión a fosfotirosina (PTB1 y PTB2) (Fig. 7) [90, 91]. Esta proteína interactúa mediante el dominio WW, con la secuencia presente en el extremo C-terminal de P2X2a

(Fig. 7), y no con otras isoformas como P2X2b [92]. En el mismo trabajo de Masin y col. se describió que P2X2R y Fe65 se encuentran en las densidades post sinápticas excitatorias en hipocampo y que esta interacción induce un cambio en la funcionalidad del P2X2R. Luego de la exposición prolongada a ATP se produce una dilatación en el poro del canal, lo que se visualiza en el aumento de la permeabilidad a cationes orgánicos y colorantes fluorescentes, sin embargo, cuando se expresa P2X2R junto a Fe65 no se observa este efecto [92].

La mayor expresión de Fe65 se observa en derivados de la cresta neural, estructuras ganglionares de los órganos sensoriales y del sistema nervioso autónomo, en la corteza y, particularmente, a nivel de hipocampo [91]. En esta zona es posible determinar su presencia en células piramidales de la región CA1 y CA3, allí su inmunomarcaje fue observado desde el soma hasta las dendritas más distales [92].

El dominio WW de Fe65 es caracterizado como grupo II, es decir, que reconoce una secuencia de prolina interrumpida por un residuo de leucina (PPLP) [93]. Mediante este dominio, Fe65 es capaz de interactuar con c-Abl, Nek6 y Mena, entre otras proteínas [94, 95]. El dominio PTB1 es responsable de la unión de Fe65 a factores de transcripción como CP2/LSF/LBP1, a la histona acetiltransferasa Tip60, y también a integrantes de la familia de receptores de lipoproteína [90, 96]. Por su parte, el dominio PTB2 es responsable de la interacción con el extremo C-terminal de APP (Fig. 7) [91].

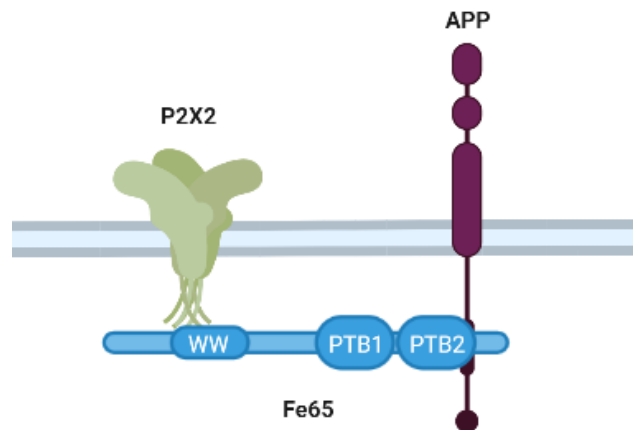


Figura 7. Fe65 interacciona con P2X2 y APP.

El esquema muestra los dominios de interacción presentes en Fe65: WW, PTB1 y PTB2. Mediante el dominio WW interacciona con el extremo C terminal de P2X2a, mientras que con el dominio PTB2 interacción con el AICD de APP.

El dominio AICD de APP contiene motivos que le permiten la interacción con distintas proteínas [15]. Por ejemplo, allí se encuentra el motivo $_{682}YENPTY_{687}$ que interacciona con diferentes proteínas adaptadoras citosólicas con motivos PTB, como Fe65 [15]. Este motivo ha sido denominado como el dominio de endocitosis de APP, ya que mutaciones en esta secuencia disminuyen la internalización de APP y por ende los niveles de $A\beta$ [97]. Incluso, la fosforilación del residuo Y682, presente en este motivo, afecta la interacción de APP con proteínas adaptadoras como Fe65, y también la endocitosis de APP [98, 99].

La interacción de Fe65 con APP ha sido ampliamente estudiada durante las últimas décadas [89, 91, 98, 100]. Existe evidencia contradictoria respecto del efecto que esta interacción tiene en el procesamiento de APP [101, 102]. Sin embargo, varios reportes de los últimos años apuntan a que Fe65 aumenta la producción de A β , aunque el mecanismo por el que esto ocurre tampoco ha sido del todo dilucidado. Por ejemplo, evidencia reciente muestra que la interacción entre estas dos proteínas estimula el procesamiento amiloidogénico de APP [103]. Los investigadores sugieren que esta interacción disminuye la degradación de ambas proteínas, aumentando el tiempo de vida media de APP, lo que llevaría a un aumento en la producción de A β [103]. En la misma línea se describió que el residuo T579 de Fe65 es fosforilado por GSK3 β , lo que potencia la interacción con APP y aumenta la producción de A β [104]. De manera importante, también se ha visto que proteínas que interaccionan con Fe65 influyen en el metabolismo de APP mediado por la interacción con Fe65. Por ejemplo, LRP1 mediante su interacción con el dominio PTB1 de Fe65, forma un complejo trimérico con APP y regula su procesamiento [105]. Por otra parte, el uso de un péptido que se une de manera específica al dominio WW de Fe65, en ratones transgénicos APP/PS1, provocó una disminución en los niveles de péptido A β . Además, el uso de este péptido presentó mejorías en los procesos inflamatorios, de memoria y aprendizaje de los ratones transgénicos [106]. Los autores hipotetizan que la interacción de este péptido con el dominio WW puede generar un cambio en la conformación de Fe65, lo que pudiese disminuir la interacción con APP y la producción de A β [106].

También se ha descrito la capacidad de Fe65 de formar un complejo con AICD [107], sin embargo, su mecanismo de formación y función tampoco está del todo dilucidado. El consenso de los últimos años ha sido que Fe65 se une a AICD y estabiliza a este fragmento, posteriormente ambas proteínas translocan al núcleo, donde regularían cooperativamente la transcripción de algunos genes [107, 108]. Distintos dominios de Fe65 han sido descritos como importantes para su translocación al núcleo o para su función transcripcional [109]. Ha sido propuesto que Fe65 transloca al núcleo de manera independiente de AICD, sin embargo, evidencia reciente muestra que la localización nuclear de esta proteína adaptadora se ve disminuida cuando se inhibe las actividades de α - y γ -secretasa, o se hace una delección del dominio PTB2 [109]. Esto permite sugerir que la interacción con APP y la liberación de AICD son procesos importantes para la translocación nuclear de Fe65.

Uno de los genes que puede ser regulado transcripcionalmente por este complejo es el de PGC-1 α , [110]. Como ya se mencionó previamente, este co-activador ha sido descrito como un regulador maestro de la función y biogénesis mitocondrial [111], por lo que una disminución en sus niveles afecta directamente la función mitocondrial.

Debido a que resultados previos de nuestro grupo de trabajo muestran que tratamientos crónicos con A β producen un incremento en los niveles de la proteína y ARNm de la subunidad P2X2, nos proponemos estudiar el impacto de este aumento en la fisiopatología neuronal. La diferencia estructural presente en el extremo C terminal de las isoformas de P2X2 y la interacción

específica de P2X2a con Fe65, presentan un potencial mecanismo diferencial para las distintas isoformas luego de su sobreexpresión y posible participación en los mecanismos tóxicos asociados a A β en la EA. Los mecanismos de interacción descritos pudiesen condicionar la localización de Fe65 y APP, lo que tendría un impacto en los mecanismos neurotóxicos de la EA.

Por lo tanto, el objetivo de esta tesis es estudiar el rol del receptor purinérgico P2X2 y su participación en el mecanismo de toxicidad de A β en EA.

II. HIPÓTESIS

“El incremento del receptor P2X2 inducido por A β , promueve la formación de un complejo con Fe65 y APP, modificando el tráfico y procesamiento proteolítico de APP, alterando la distribución subcelular de Fe65 y su función reguladora de la transcripción de PGC-1 α .”

III. OBJETIVOS

Objetivo general: Estudiar cómo el incremento producido por A β o del receptor P2X2 y su interacción con Fe65, genera cambios en el procesamiento proteolítico de APP y la función transcripcional de Fe65 sobre PGC-1 α .

Objetivos generales:

Objetivo específico 1: Evaluar cambios en niveles de expresión y funcionalidad de las isoformas de P2X2 en células expuestas a A β o.

Objetivo específico 2: Estudiar el impacto de los cambios en la expresión de P2X2 sobre Fe65, APP y su procesamiento proteolítico.

Objetivo específico 3: Determinar si el aumento de P2X2 induce cambios en la distribución subcelular de Fe65 y su impacto en niveles de PGC1- α .

Objetivo específico 4: Correlacionar el aumento de P2X2 observado en los experimentos *in vitro* con lo observado en muestras de pacientes con EA.

IV. METODOLOGÍA

1. Células PC12 y HEK-293

La línea celular de feocromocitoma de rata PC12 (ATCC CRL-1721, USA) fue cultivada en medio de Eagle modificado por Dulbecco 1X Corning, que contiene 4,5 g/L de glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio; suplementado con suero fetal bovino (5%), suero de caballo (5%) y penicilina-estreptomicina (1%). La línea celular HEK-293 (ATCC CRL-1573, USA) fue cultivada en medio de Eagle modificado por Dulbecco 1X Corning, que contiene 4,5 g/L de glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio; suplementado con suero fetal bovino (10%). Los cultivos se mantuvieron a 37°C y 5% CO₂ y las células fueron utilizadas a un 60-70% de confluencia.

2. Células hipocampales

Los cultivos primarios de hipocampo se obtuvieron a partir de embriones de ratón C57BL/6J, de 18 días de gestación (E18). Las células obtenidas se sembraron a una densidad de 320.000 células/ml. Durante las primeras 24 horas, las células se mantuvieron en medio DMEM suplementado con suero de caballo (10%), DNasa (4 µg/ml) y L-Glutamina (2 mM). Una vez transcurrido este tiempo, se cambió el medio de cultivo por medio DMEM enriquecido con suero de caballo (5%), FBS (5%), y N3 (0,5%), un suplemento que tiene BSA (1 mg/ml), Apo-transferrina (20 mg/ml), putrescina (4 mg/ml), insulina (1,25 mg/ml), selenito de sodio (1 µg/ml), TH3 (2 µg/ml), progesterona (1,25 µg/ml) y corticosterona (4 µg/ml). Los cultivos se mantuvieron a 37°C y 5% CO₂ y las células fueron utilizadas entre los días 9 y 10 *in vitro*.

3. Obtención de extractos de cerebro humano

El uso de estas cortezas fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Miguel Hernández de Elche (Alicante, España) y se realizó de acuerdo a la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Las muestras de corteza frontal fueron obtenidas desde el Banco de tejidos neurológicos del Instituto de Neuropatología, Hospital Universitario de Bellvitge (Barcelona, España). Casos de EA esporádico fueron selecciones en base a su historial clínica de demencia y diagnóstico neuropatológico CERAD [112]. Las muestras fueron categorizadas de acuerdo al Estadio Braak de patología de ovillos neurofibrilares [7] (12 mujeres, 18 hombres; edad promedio \pm sd, 75 ± 10 años): estadio Braak I–II, $n = 10$; estadio Braak III–IV, $n = 10$; y estadio Braak V–VI, $n = 10$, o alternativamente, mediante una clasificación de estadios de $A\beta$ [7]. Cuidado especial se tomó para no incluir casos con otras patologías para evitar cualquier tipo de error en los resultados. Las muestras de pacientes control sin EA (ND) (2 mujeres, 7 hombres; edad promedio \pm sd, 53 ± 5 años) corresponden a individuos sin demencia clínica y sin evidencia de patología en el cerebro. El promedio de intervalo postmortem del tejido fue de aproximadamente 8 horas para todos los casos, sin diferencia significativa entre los distintos grupos.

La corteza frontal (0.1 g) fue homogenizada (10% p/v) en Tris-HCl (50 mM, pH 7.4), NaCl (150 mM), Triton X-100 (0.5% p/v), Nonidet P-40 (1% p/v), y un cocktail de inhibidores de proteasas (1:25 v/v, MilliporeSigma). Los homogenados fueron sonicados en hielo usando un disruptor celular ultrasónico (Misonix) y centrifugados por 1h a 43,000 rpm y 4°C. Las

fracciones de sobrenadante fueron recuperadas para el análisis mediante Western blot.

4. Agregación del péptido A β ₁₋₄₀

El péptido A β ₁₋₄₀ liofilizado (GenicBio, Shanghai, China) fue reconstituido en DMSO, generando una solución stock 2,3 mM. De dicho stock se tomó una alícuota de 2 μ l, la que se diluyó en PBS 1X estéril hasta alcanzar una concentración de 80 μ M. Esta solución fue sometida a un proceso de agregación por agitación vertical, a temperatura ambiente y 500 rpm, en un agitador magnético por 4 horas. El péptido, agregado a la forma de oligómeros solubles, fue utilizado a una concentración final de 0,5 μ M en el medio de cultivo.

5. Transfección

Se utilizó 1,5 μ l de Lipofectamina-2000 (Invitrogen, CA, USA) por cada μ g de plásmido a utilizar. Se utilizaron plásmidos codificantes para P2X2a y P2X2b, FLAG-P2X2a (P2X2a con el tag FLAG en el extremo N-terminal) y la proteína de fusión P2X2b-GFP; como reporteros se utilizó mCherry o GFP. Se preparó la solución de transfección con Lipofectamina y los plásmidos a utilizar, y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Esta solución se agregó a las células HEK-293 o PC12, se incubó a 37°C y 5% CO₂ por 4 horas, y luego de esto se realizó un cambio de medio. Las células fueron utilizadas 24 h post transfección.

6. Western blot

Las células provenientes de las distintas muestras fueron lisadas en hielo con buffer de composición [mM]: Tris 10, EDTA 10, NaCl 100, Tritón 0,5%, inhibidor de proteasas (complete Mini EDTA free, Sigma Aldrich, USA), Glicerol 10%, pH 7.4 e inhibidor de fosfatasa. El lisado celular o los extractos de corteza humana fueron mezclados con buffer de carga. Las muestras fueron incubadas a 37°C por 30 minutos o a 95°C por 10 minutos, luego fueron cargadas en un gel de poliacrilamida (10%). La electroforesis se realizó a 100 V por 100 minutos. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 250 mA por 120 minutos.

La membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% en TBS Tween 1X o con Buffer de bloqueo Odyssey (Li-COR) durante 1 hora y se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-P2X2 (conejo, 1:500, Alomone Labs; 1:2000, NBP2-19655 Novus), anti- β -actina (ratón, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology), anti-G β (conejo, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology), anti-Fe65 (cabra, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology; ratón 1:1000, Abcam) anti-FLAG M2 (ratón, 1:1000, Sigma), anti-APP (conejo, 1:1000, Sigma; 1:1000, Abcam), anti-A β MOAB-2 (ratón, 1:1000, Novus), y anti-GAPDH (ratón, 1:3000, Abcam).

Se realizaron 5 lavados de 3 minutos con TBS Tween 1X o Buffer de bloqueo Tween 1X, y cada membrana se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a HRP (1:5000) anti-IgG de conejo, anti-IgG de ratón o anti-IgG de cabra (Santa Cruz, Biotechnology); o conjugado a IRDye

(1:8000) anti-conejo IRDye 800CW, anti-ratón IRDye 680 (Li-COR Biosciences) por 1 hora a temperatura ambiente.

Finalmente, se realizaron 5 lavados y se reveló utilizando el kit Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) y el sistema de detección Odyssey FC o el sistema Odyssey CLxInfrared Imaging (Li-COR). Las imágenes fueron cuantificadas utilizando la herramienta Image Studio (Image Studio Inc).

7. Microfluorimetría de Ca²⁺ citosólico

Células hipocampales sembradas sobre cubreobjetos de 18mm en las condiciones control y tratadas con A β o (0.5 μ M, 24 h), fueron incubadas con la sonda de calcio Fluo4-AM[®] (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante (5 μ M en 1 mL de DPBS). Tras esto, se lavó dos veces con DPBS y se incubó durante 20 minutos con DPBS en oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo se hicieron dos lavados rápidos con solución externa normal, de composición (en mM): 150 NaCl, 5,4 KCl, 2 CaCl₂ 2, 1 MgCl₂; 10 HEPES, 10 Glucosa (pH 7,4, 320 mOsm), se llevó el pocillo a un microscopio de epifluorescencia Nikon TE-2000 y la sonda fue excitada a una longitud de onda de 480 nm, y la emisión se observó a 535 nm.

Los cambios intracelulares de los niveles de Ca²⁺, luego de exponer las células a ATP 200 μ M (SIGMA) mediante un sistema de perfusión (AutoMate Scientific), se registraron utilizando un microscopio de fluorescencia invertido Nikon TE-2000-U acoplado a una cámara EM-CCD iXon ANDOR de 16 bit. Los resultados se analizaron con el software Imaging Workbench 6.0 (INDEC Biosystems).

8. Electrofisiología

Patch Clamp de célula completa se realizó según los protocolos descritos por Fuentealba y col. [113, 114], usando Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments), en modo de voltage clamp (manteniendo un potencial de -60 mV). Las células se mantuvieron en solución externa normal (SEN, en mM: 150 NaCl, 5.4 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂; 10 HEPES, 10 Glucosa, pH 7,35 - 7,4, 320 mOsm). La pipeta se rellenó con solución interna normal de potasio (SIN, en mM: K, 120 KCl, 4 MgCl₂, 10 HEPES, 2 ATP, 0,5 GTP, 10 BAPTA (pH 7,4, 300 mOsm). Las células fueron perfundidas con ATP 200 μ M por 5 o 10 segundos. Los análisis se realizaron usando Clampfit 10.7 (Axon Instruments, USA).

9. Inmunocitoquímica

Las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% en PBS 1X por 15 minutos, se bloquearon las uniones inespecíficas con HS 10% y se permeabilizó con 0.1% Tritón X-100 por 30 minutos. Posteriormente, se incubó con los anticuerpos primarios anti-P2X₂ (conejo, 1:400, Alomone Labs), anti-MAP1B (cabra, 1:400, Santa Cruz Biotechnologies), anti-FLAG M2 (ratón, 1:400, Sigma), anti-Fe65 (cabra, 1:400, Santa Cruz Biotechnologies), anti-APP [Y188] (conejo, 1:400, Abcam), anti-Rab5 (ratón, 1:400, Sigma) o anti-PGC-1 α (rabbit 1:400, Novus Biologicals) por una hora a temperatura ambiente. Luego se incubó con los anticuerpos secundarios correspondientes (anti-rabbit Alexa Fluor 488, Jackson ImmunoResearch Labs; anti-goat Cy3, Jackson ImmunoResearch Labs; anti-goat Alexa Fluor 647, Jackson ImmunoResearch Labs; anti-mouse Cy3, Jackson ImmunoResearch Labs;

and anti-mouse Alexa Fluor 647, Jackson ImmunoResearch Labs) por 45 min. Finalmente, se incubó con tinción nuclear DAPI (Tocris) 300 μ M, por 10 min a temperatura ambiente. El montaje se realizó en portaobjetos usando Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako). Las imágenes se obtuvieron en el Microscopio Confocal Espectral LSM780 NLO Zeiss con el aumento de 63x, el microscopio Nikon TE-200-U inverted (Nikon), o el microscopio de superresolución SIM ELYRA S.1 (Zeiss). La deconvolución, análisis y cuantificación de las imágenes fueron realizadas en el programa ImageJ. Para la cuantificación de la inmunorreactividad se seleccionaron regiones de interés de 10x10 píxeles en áreas aleatorias del soma neuronal utilizando la inmunorreactividad de MAP1B para evitar sesgos.

10. Análisis de co-localización y distribución subcelular

Se utilizaron imágenes obtenidas mediante microscopía confocal y de súper resolución. Las imágenes fueron deconvolucionadas con el software ImageJ (NIH) utilizando los siguientes parámetros: índice de refracción del aceite de inmersión a 23°C (1,518), apertura numérica del objetivo 63x (1,4) y longitud de onda de excitación (λ Alexa Fluor 488: 493; λ Alexa Fluor 647: 651; λ CY3: 550; y λ DAPI: 358).

Los análisis de colocalización fueron realizados de acuerdo a lo descrito por Dunn y col. [115]. La región de interés fue delimitada utilizando el canal de MAP1B en neuronas y de APP en células PC12, considerando o no el núcleo, según el par de proteínas a analizar. Se utilizó la herramienta Coloc2 de ImageJ ("Coloc 2", 2017) para obtener los coeficientes de Manders M1

(colocalización del canal 1 sobre el canal 2) y M2 (colocalización del canal 2 sobre el canal 1). Con el fin de excluir falsos positivos, estos valores se contrastaron con coeficientes obtenidos para el mismo par de imágenes, pero rotando en 90° la correspondiente al segundo canal.

Para los análisis de distribución subcelular, se consideraron regiones de interés de 10x10 píxeles en neuronas, y de 6x6 píxeles en células PC12. Las regiones del núcleo fueron tomadas con el canal de DAPI, y las del citoplasma con el canal de MAP1B o APP, según el tipo celular. Finalmente, se calculó la razón núcleo/citoplasma utilizando 3 regiones de interés por célula.

11. Co-Inmunoprecipitación (Co-IP)

Para el estudio de co-inmunoprecipitación entre P2X2, Fe65 y APP se utilizaron células HEK-293 transfectadas con FLAG-P2X2, GFP o el vector vacío como control. Las células fueron lisadas y la concentración de proteínas fue igualada en las diferentes muestras. Luego se realizó el pre-lavado con 10µL de proteína A/G PLUS agarosa (Santa Cruz Biotechnology) durante 1 h a 4°C. Posteriormente, se incubó con 0.5 mg de anticuerpo monoclonal anti-FLAG (ratón, Sigma), anti-Fe65 (cabra, Santa Cruz Biotechnologies), 0.5 mg de IgG de conejo (Sigma-Aldrich) o de cabra (Santa Cruz Biotechnologies) como control, por cada mg de proteína durante 1 h. Finalmente, se añadió 50 µl de Proteína A/G de agarosa a cada condición y se incubó durante la noche. Las proteínas se eluyeron a 100°C durante 8 min en tampón de carga 2X, se analizaron por SDS-PAGE y se visualizaron por Western-Blot.

12. RT-qPCR

La extracción de ARN total se realizó utilizando TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific) en el sistema de purificación PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA (Life Technologies) según las instrucciones del fabricante. La pureza y cuantificación del ARN se evaluó mediante lecturas de absorbancia a 260/280 nm. La transcripción inversa se realizó utilizando SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Life Technologies) para sintetizar cDNA a partir de ARN total (2 µg) usando partidores aleatorios de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El cDNA total fue analizado por qPCR usando StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) con sondas TaqMan específicas para P2X2 humano (ID: Hs04176268_g1, Thermo Fisher) y GAPDH humano (Applied Biosystems), como control endógeno. La cuantificación de P2X2 se realizó utilizando la curva estándar relativa normalizada con GAPDH de la misma preparación de cDNA.

13. Análisis de datos

Todos los experimentos se realizaron en al menos tres repeticiones biológicas independientes. El análisis estadístico se realizó aplicando t-test Student o ANOVA de una vía, en aquellos grupos de datos con distribución normal, o la prueba de Mann-Whitney y pruebas de Kruskal-Wallis en el caso de datos con distribución no normal, con el programa GraphPadPrism 8.0 (GraphPad Prism). Se consideró significancia estadística si $p < 0,05$. Datos mostrados como promedio \pm SEM.

V. RESULTADOS

1. CAMBIOS EN NIVELES DE EXPRESIÓN Y EN LA FUNCIONALIDAD DE LAS ISOFORMAS DE P2X2R EN CÉLULAS EXPUESTAS A A β

Previamente, resultados de nuestro laboratorio han demostrado la participación de P2X2R en la toxicidad producida por A β [78]. Esto nos llevó a estudiar las subunidades de P2X2R que podrían estar implicadas en la toxicidad del péptido, dirigiéndonos hacia P2X2R. Por este motivo nos planteamos en primer lugar, estudiar la principal isoforma de P2X2R que estaría implicada en este posible mecanismo de toxicidad.

1.1 La isoforma P2X2a aumenta luego de tratamientos con A β

Debido a que no existen anticuerpos específicos para detectar las isoformas del P2X2R, se realizaron aproximaciones experimentales alternativas para poder identificarlas y diferenciarlas. Lo primero que se realizó, fue utilizar la técnica de western blot para correlacionar el tamaño de bandas desde lisados de células HEK-293 transfectadas con las isoformas 2a y 2b, y desde lisados de células PC12 que expresan P2X2R endógenamente (Fig. 8A). Estas fueron detectadas con el anticuerpo anti-P2X2 que reconoce ambas isoformas del receptor. En las condiciones control (células no transfectadas y transfectadas con mCherry como control de transfección), no se observaron bandas con el anticuerpo anti-P2X2, lo que nos asegura que cualquier cambio en la inmunorreactividad se debe a la sobreexpresión de alguna de las isoformas. Así, los lisados de células transfectadas con P2X2a muestran dos bandas

alrededor de los 70kDa, mientras que con P2X2b aparecen alrededor de 60kDa. En este resultado es posible observar dos bandas, especialmente para la isoforma P2X2a, estas pueden deberse a modificaciones post-traduccionales presentes en la proteína como fosforilaciones o glicosilaciones. Especialmente ha sido descrito que P2X2 posee distintos sitios de glicosilación, los que son necesarios para la correcta expresión de este receptor en la membrana plasmática [116], por lo tanto, diferentes patrones de glicosilaciones podrían estar causando las diferentes bandas observadas en este resultado. Por su parte, también se evaluó el tamaño de la proteína FLAG-P2X2a, obtenida mediante subclonamiento en el trabajo previo que dio inicio a esta tesis de doctorado (Anexo 1) [117]. Se puede ver que esta proteína aparece levemente por encima de la señal correspondiente a P2X2a, lo que es consecuente con la presencia del tag FLAG unido a la secuencia aminoacídica de la proteína. En paralelo, cuando se transfectaron las células HEK-293 con el plásmido que codifica para la proteína de fusión P2X2b-GFP, se pudo observar que la eficiencia de transfección fue más baja, por lo que se necesitó un mayor tiempo de exposición para evaluar la presencia del receptor. Además, fue posible observar una banda cercana a 80 kDa (Fig. 8B), lo que se condice con la fusión de esta isoforma a GFP, proteína cuyo tamaño es de aprox. 27KDa [118]. Finalmente, para comparar con el tamaño de la proteína nativa de P2X2, se utilizó un lisado de células PC12, donde se observaron dos bandas cercanas a 70kDa, lo que se correlaciona con el tamaño de las bandas correspondientes a la isoforma 2a en las células HEK-293 transfectadas. Es importante mencionar que de acuerdo a lo observado

en la hoja de datos del anticuerpo, la banda esperada para P2X2 en células PC12 es de alrededor de 50KDa, mientras que en lisados de cerebro de rata es de aprox. 60KDa. Esto indica, que en las condiciones experimentales utilizadas en nuestros experimentos las bandas obtenidas para las distintas isoformas de P2X2 son de mayor tamaño que las bandas esperadas. Sin embargo, debido a la comparación con los lisados obtenidos de las células HEK-293 transfectadas, podemos establecer que las células PC12 expresan fundamentalmente la isoforma P2X2a, lo que representa una importante condición para el estudio de los siguientes objetivos, ya que esta es la isoforma que interacciona con Fe65.

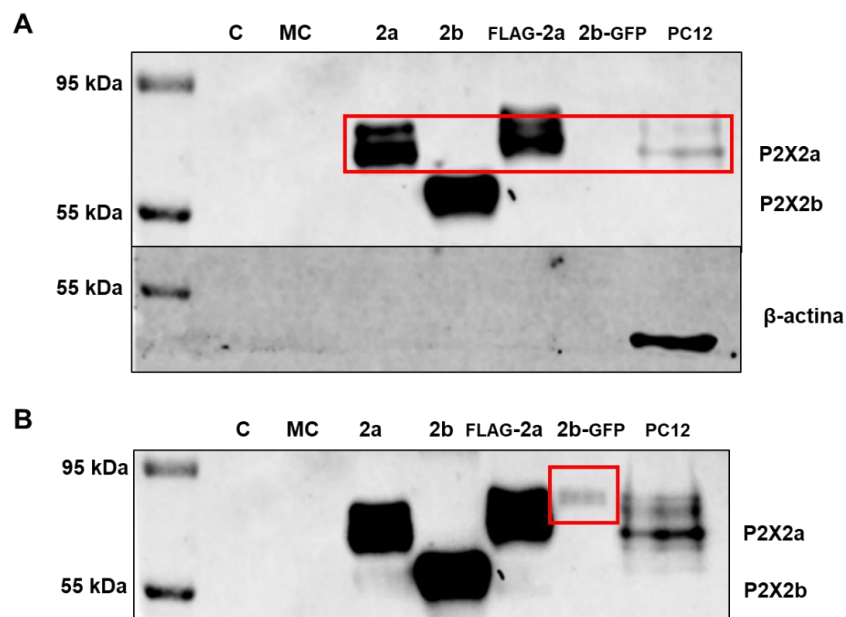


Figura 8. Detección de las isoformas de P2X2 mediante western blot.

A. Western blot representativo de P2X2R en células HEK-293: control (C), transfectadas con mCherry (MC), P2X2a (2a), P2X2b (2b), FLAG-P2X2a (FLAG-2a) y P2X2b-GFP (2b-GFP), en el último carril se utilizó lisado de

células PC12 control. Se utilizó β -actina como control de carga. **B.** Western blot de la Figura A sometido a un mayor tiempo de exposición para observar la banda correspondiente a P2X2b-GFP. *Nota:* Del lisado de PC12 se cargó 3 veces más proteína que de los lisados de HEK-293 con el fin de poder detectar la expresión endógena de P2X2 en estas células.

Posteriormente, se quiso evaluar si la presencia de A β o por 24h en células PC12, podría producir cambios en los niveles de P2X2R, lo cual se realizó mediante la misma técnica de western blot (Fig. 9A). Esta aproximación experimental, nos permitió establecer un aumento significativo en P2X2 luego del tratamiento con A β o (Fig. 2B, C = $100,0 \pm 4,2\%$, A β o = $141,7 \pm 16,6\%$). Considerando el resultado de la Fig. 8, la intensidad de las bandas para P2X2 obtenidas en el gel de la Fig. 9A y su cuantificación relativa a la proteína de control de carga β -actina, nos permiten determinar que A β o induce un incremento en la isoforma 2a de aprox. un 40% sobre el control (Fig. 9B).

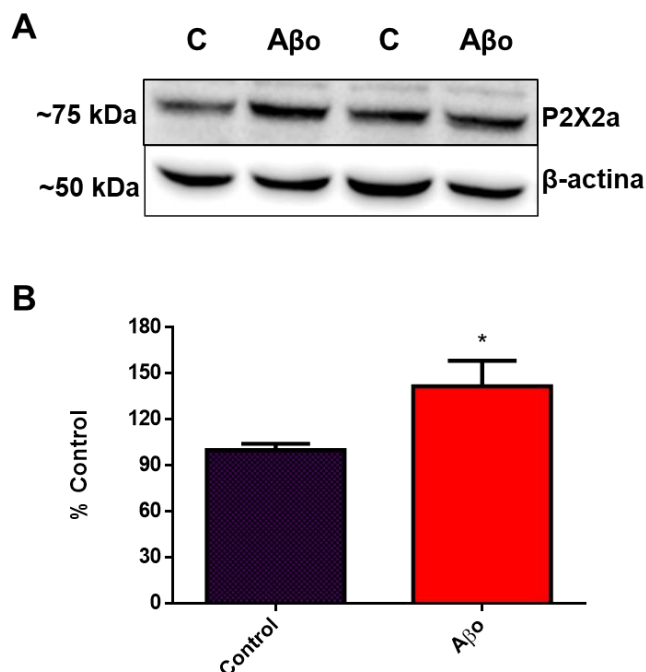


Figura 9. El tratamiento con Aβ₀ aumenta los niveles de P2X2a en células PC12.

A. Western blot representativo de P2X2R en células PC12 control (C) y tratadas con Aβ₀ 0,5 μM por 24 h (Aβ₀). Se utilizó β-actina como control de carga. **B.** Cuantificación de la banda inmunoreactiva de P2X2a respecto de la banda de β-actina, expresada en % del control. Control = 100,0 ± 4,2%, Aβ₀ = 141,7 ± 16,6%; * = p<0,05, n = 4.

Una vez establecida la capacidad de Aβ₀ para inducir cambios en los niveles de P2X2R en células PC12, quisimos corroborar estos hallazgos en un modelo nativo de neuronas hipocampales de ratón. El cultivo hipocampal fue expuesto a Aβ₀ (0,5 μM por 24 h), luego de lo cual las neuronas fueron lisadas y de este lisado se evaluó mediante western blot la inmunorreactividad de

P2X2 y β -actina (Fig. 10A). En el western blot representativo, es posible observar que las células hipocampales también expresan una banda de alrededor de 70kDa, sugiriendo que estas células expresarían principalmente la isoforma P2X2a. La exposición de estas células al tratamiento con A β también indujo un incremento significativo del receptor P2X2a, cercano al 30% respecto de las células control (Fig. 10B, C = 100,0 \pm 6,4%, A β = 130,1 \pm 10,7%). Esto nos confirma que la presencia de A β induce cambios en los niveles de expresión de receptores purinérgicos, específicamente P2X2a, lo que tendría una consecuencia funcional en las neuronas, lo que discutiremos más adelante.

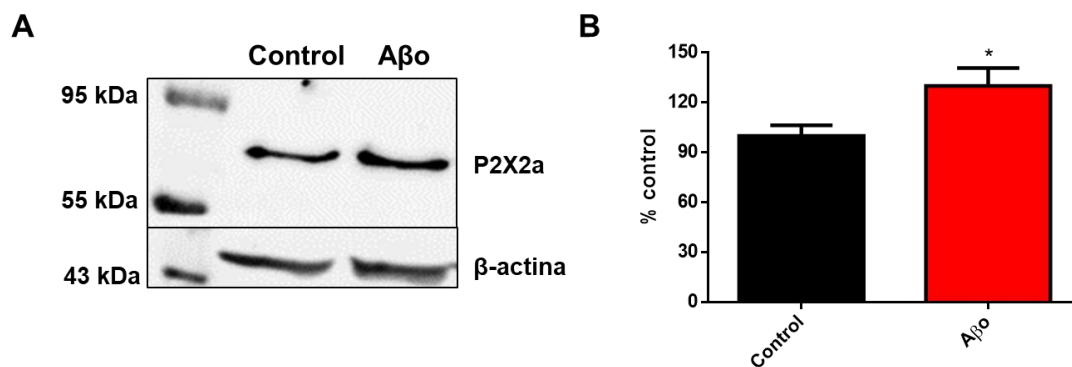


Figura 10. El tratamiento con A β aumenta los niveles de P2X2a en células hipocampales.

A. Western blot representativo de P2X2 en células hipocampales control y tratadas con A β 0,5 μ M por 24 h. Se utilizó β -actina como control de carga.

B. Cuantificación de la banda inmunorreactiva para P2X2a respecto de la banda de β -actina, expresada en % del control. Control = 100,0 \pm 6,4%, A β = 130,1 \pm 10,7%; * = p<0,05, n = 5.

Para poder confirmar este cambio en los niveles de P2X2R, se utilizó otra estrategia experimental; mediante el uso de inmunofluorescencia evaluamos la inmunorreactividad de este receptor en neuronas hipocampales (Fig. 11A, Anexo 2); para identificar las neuronas se utilizó un anticuerpo contra la proteína de microtúbulos MAP1B. Al cuantificar se pudo determinar que la inmunofluorescencia de P2X2 en las neuronas hipocampales presenta un aumento significativo luego del tratamiento con A β respecto de la situación control (Fig. 11B, C = 100,0 \pm 5,3%, A β = 133,1 \pm 11,8%).

Todos estos resultados nos indican que tanto en células PC12 como en neuronas hipocampales, se expresa principalmente la isoforma P2X2a y esta se ve incrementada en su expresión ante la presencia crónica de A β .

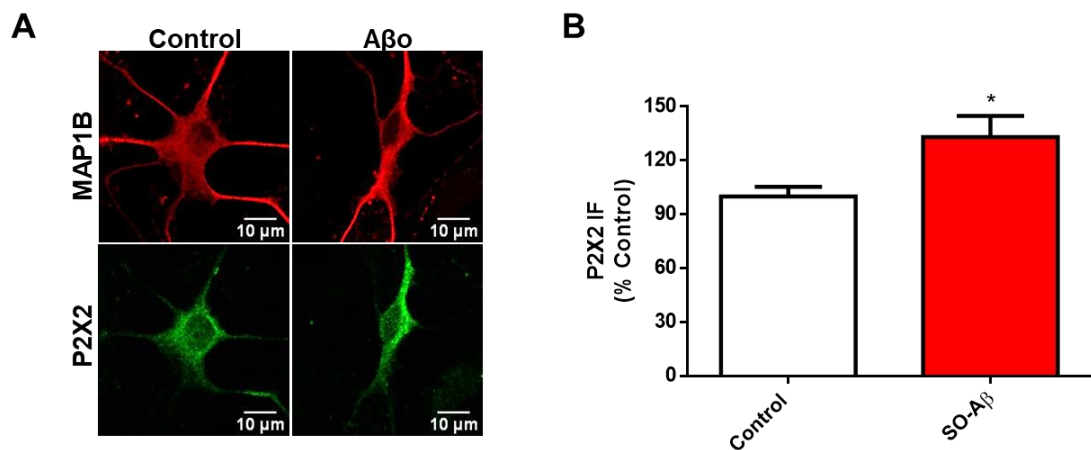


Figura 11. El tratamiento con A β aumenta la intensidad de inmunofluorescencia de P2X2R en neuronas hipocampales.

A. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de la inmunofluorescencia de MAP1B (arriba, rojo) y P2X2 (abajo, verde) en neuronas hipocampales con

y sin tratamiento con A β o 0,5 μ M por 24 h. Barra blanca indica 10 μ m. **B.** Cuantificación de la inmunofluorescencia de P2X2 expresada en % del control. Control = 100,0 \pm 5,3%, A β o = 133,1 \pm 11,8%; * = p<0,05, n (repeticiones independientes) = 5, N (número de neuronas) = 13.

1.2 Aumento de la neurotransmisión purinérgica producto del incremento de P2X2a en neuronas tratadas con A β o

Luego de haber descrito un aumento en los niveles de P2X2a posterior a la exposición con A β o, quisimos evaluar si este aumento podía impactar en la transmisión purinérgica de las células. Utilizando la técnica de patch clamp estudiamos los cambios electrofisiológicos en células PC12 tratadas con A β o (0,5 μ M por 24 h, Fig. 12). Esta primera aproximación experimental, confirmó nuestros datos previos y nos permitió establecer preliminarmente, que las corrientes evocadas por ATP 200 μ M durante 10 s, mostraron un aumento en su amplitud (Fig. 12A, C = 100 \pm 33%, A β o = 247 \pm 39%). Aunque en este resultado se observa una clara tendencia al incremento, el número de datos de esta aproximación preliminar no permite establecer una significancia estadística en esta diferencia, pero sí, este resultado está adecuadamente alineado con lo observado previamente en este trabajo y las publicaciones del grupo [80]. La cuantificación de las corrientes muestra que el tratamiento con A β o incrementaría la conductancia de cationes mediada por este receptor. Esto, sumado a datos previos del grupo y los resultados descritos previamente, nos permiten afirmar que el incremento en la corriente

purinérgica está relacionado con un incremento en el P2X2R. Dado lo anterior, nuestro esfuerzo se concentró en establecer los eventuales cambios en las corrientes purinérgicas evocadas por ATP en neuronas hipocampales tratadas con A β bajo las mismas condiciones de la Fig. 12. Es así que, en neuronas hipocampales fue posible observar que las corrientes evocadas por ATP se mostraron fuertemente incrementadas en aquellas células previamente tratadas con A β (Fig. 13A), lo que se traduce en un incremento cercano al 230% de sus corrientes máximas (Fig. 13B).

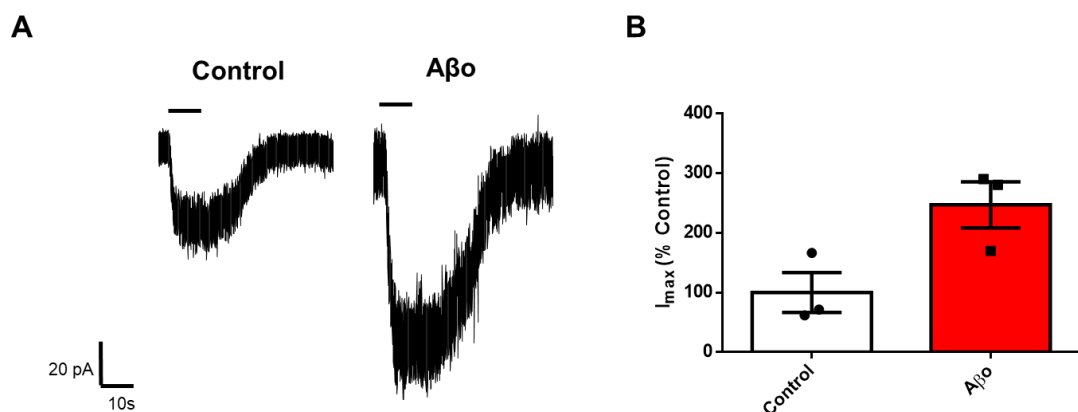


Figura 12. El tratamiento con A β aumenta la amplitud de las corrientes evocadas por ATP en células PC12.

A. Trazos representativos de corrientes evocadas por ATP 200 μ M durante 10 s en células PC12 control y tratadas con A β 0,5 μ M por 24 h. **B.** Cuantificación de la amplitud máxima de las corrientes evocadas, expresadas como porcentaje del control. Control = 100,0 \pm 33,4%, A β = 247,0 \pm 38,7%; n = 3.

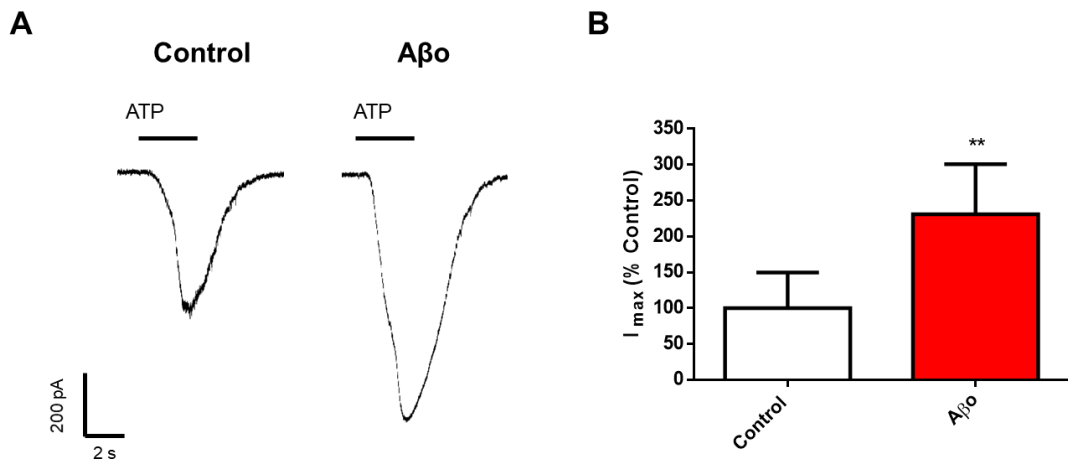


Figura 13. El tratamiento con Aβ0 aumenta la amplitud de las corrientes evocadas por ATP en neuronas hipocampales

A. Trazos representativos de corrientes evocadas por ATP 200 μM durante 10 s en neuronas hipocampales control y tratadas con Aβ0 0,5 μM por 24 h. **B.** Cuantificación de la amplitud de las corrientes evocadas, expresadas en porcentaje del control. Control = 100,0 ± 49,7%, Aβ0 = 230,8 ± 70,0%; **p<0,01, n = 9.

Finalmente, como una manera de reforzar estas observaciones respecto de la funcionalidad de los receptores purinérgicos, se utilizó la técnica de microfluorimetría de calcio en neuronas hipocampales tratadas con Aβ0 bajo las mismas condiciones de la Fig. 13 (Fig. 14A). Así, pudimos evaluar los incrementos de calcio inducidos por una aplicación exógena de ATP 200 μM utilizando una solución alta en K⁺ (60mM) como estímulo depolarizante global. La amplitud de los incrementos de calcio evocados por los pulsos de ATP fue normalizada respecto de la respuesta máxima inducida por K⁺; con esto,

observamos que la presencia de A β induce un incremento de la señal evocada por ATP cercana al doble del control, lo que en conjunto con la evidencia previa descrita, nos permite correlacionar el aumento en la expresión de P2X2a con el incremento en la neurotransmisión purinérgica en neuronas tratadas con A β (Fig. 14B, C = 100,0 \pm 11,8%, A β = 193,5 \pm 24,3%).

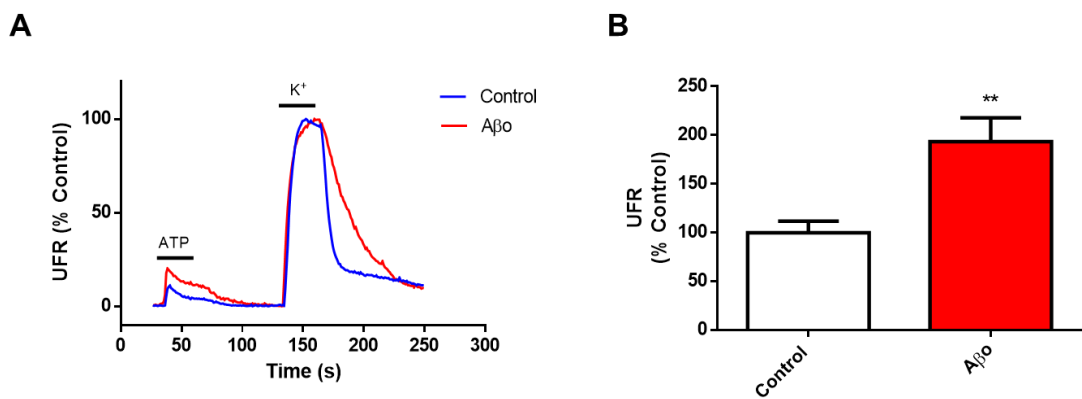


Figura 14. El tratamiento con A β incrementa la respuesta de Ca $^{2+}$ evocada por ATP en neuronas hipocampales.

A. Trazos representativos de la fluorescencia de calcio evocada por ATP 200 μ M y K $^{+}$ 60 mM en neuronas hipocampales control (azul) y tratadas con A β 0,5 μ M (rojo) por 24 h. **B.** Cuantificación de la amplitud de la fluorescencia de Ca $^{2+}$, normalizada por la fluorescencia en respuesta a K $^{+}$, expresada en porcentaje del control. Control = 100,0 \pm 11,8%, A β = 193,5 \pm 24,3%; **p<0,01 n = 5.

2. IMPACTO DE LOS CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE P2X2 SOBRE FE65, APP Y SU PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO.

Debido a que la isoforma P2X2a interacciona con Fe65 [92], es importante determinar el impacto que tendría el aumento de la expresión de este receptor sobre la proteína adaptadora. Además, considerando que Fe65 interacciona con APP [91], se hace relevante el poder establecer si esto tiene algún efecto sobre esta proteína y su procesamiento proteolítico, paso clave en la producción del péptido A β .

2.1. La sobreexpresión de P2X2 genera un receptor funcional en líneas celulares

Un resultado importante para nuestros estudios utilizando la sobreexpresión de las distintas isoformas de P2X2, era corroborar que este receptor se expresa correctamente y de manera funcional; para esto lo primero que realizamos fue inmunocitoquímica en células PC12 transfectadas con FLAG-P2X2a y P2X2b-GFP (Fig. 15, Anexo 3). De las imágenes de microscopía confocal, se puede observar que tanto el marcaje con el anticuerpo anti-FLAG, como la fluorescencia de GFP, aparecen en las células transfectadas, donde destaca la distribución marcadamente anular, que sugiere la presencia de este receptor en la membrana plasmática o estructuras subcelulares cercanas a la membrana.

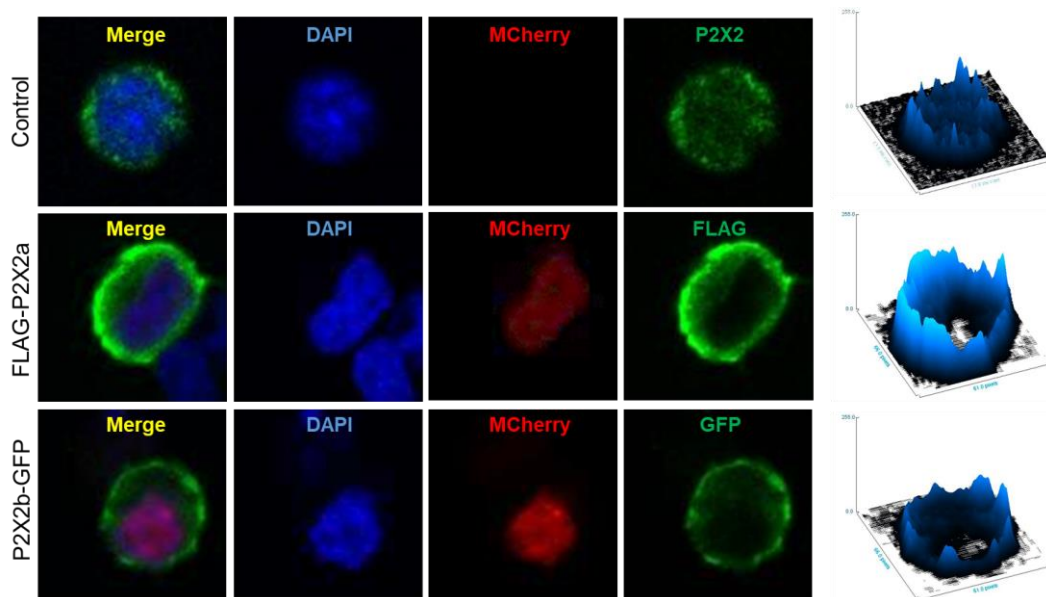


Figura 15. Isoformas de P2X2R sobreexpresadas en células PC12.

Imágenes confocales representativas de inmunocitoquímica en células PC12 control y transfectadas con FLAG-P2X2a y P2X2b-GFP. En azul se observa la tinción nuclear DAPI, en rojo mCherry utilizada como control de transfección y en verde se observa el anti-P2X2, anti-FLAG y GFP, respectivamente. A la derecha se observan los gráficos de superficie de la fluorescencia verde.

Para poder confirmar la presencia y funcionalidad de P2X2R en la membrana plasmática, a través de la técnica de patch clamp evaluamos cambios en las corrientes evocadas por ATP. Para ello células HEK-293 fueron transfectadas con P2X2a, FLAG-P2X2a y P2X2b, las que luego fueron perfundidas agudamente con ATP 200 μ M durante 10s. Como se desprende de los registros de la Fig. 16A se obtuvo una corriente purinérgica en las 3 condiciones experimentales mencionadas, lo que demuestra que la proteína se está expresando de manera correcta y permite la formación de receptores

triméricos funcionales en la membrana plasmática. En forma paralela, del análisis de sus respectivas cinéticas, la cuantificación de la constante de desensibilización (Fig.16B, Tabla 1) mostró ser más rápida en las células transfectadas con P2X2b, lo que se correlaciona adecuadamente con lo descrito en literatura [87, 119]. Mientras que la cinética de respuesta del FLAG-P2X2a obtenido por subclonamiento, es similar a la del P2X2a sin modificaciones.

Con estas aproximaciones experimentales, pudimos establecer y verificar que la sobreexpresión de P2X2 representa un modelo válido para el estudio del efecto que el aumento de este receptor tendría sobre las proteínas de interés Fe65 y APP.

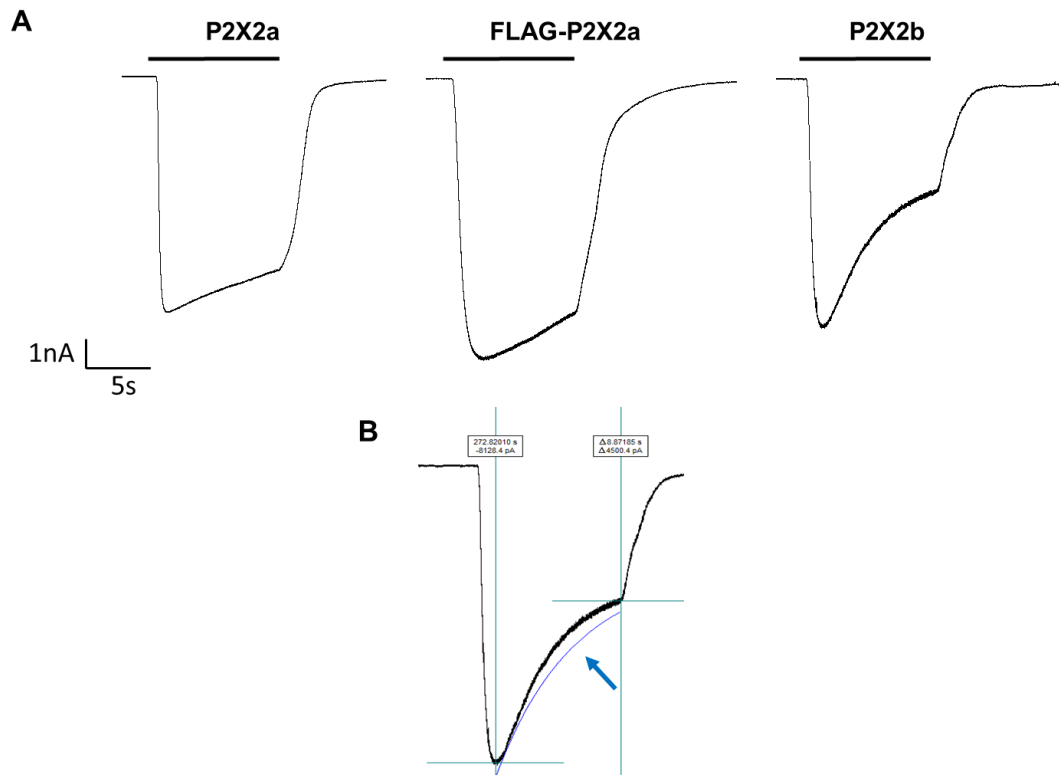


Figura 16. Isoformas de P2X2 expresadas por transfección en HEK-293 expresan receptores funcionales

A. Trazos representativos de corrientes evocadas por ATP 200 μ M por 10 s en células HEK-293 transfectadas con P2X2a, FLAG-P2X2a y P2X2b, respectivamente. **B.** Esquema representativo de cómo se obtuvo la constante de desensibilización, línea azul indicada por la flecha.

Tabla 1. FLAG-P2X2a mantiene una constante de desensibilización similar a la observada para P2X2a.

Isoforma de P2X2	Rokic M., <i>et al.</i> 2018 HEK-293, ATP 100 μ M, 40s	Constante de desensibilización HEK-293, ATP 200 μ M, 10s
P2X2a	14,6 \pm 1,7 s	19,2 \pm 8,8 s
P2X2b	6,8 \pm 1,1	3,9 \pm 0,7 s
FLAG-P2X2a	-	15,2 \pm 2,4 s

Cuantificación de la constante de desensibilización de las diferentes isoformas de P2X2 transfectadas en células HEK-293, medida en respuesta a ATP 200 μ M por 10 s. Se utilizan datos publicados por Rokic y col, para comparar lo descrito en literatura para P2X2a y P2X2b.

2.2. Evaluación de la posible interacción del receptor P2X2a con Fe65 y de la formación de un complejo con APP

Masin y col. describieron que solo la isoforma P2X2a es capaz de interaccionar con Fe65, no así P2X2b [92]. Considerando esto, en una primera instancia quisimos corroborar este antecedente en nuestro modelo experimental, para lo cual utilizamos células HEK-293 transfectadas con FLAG-P2X2a y realizamos estudios de co-inmunoprecipitación para determinar si Fe65 co-inmunoprecipita con el receptor. Se utilizó un anticuerpo anti-FLAG para inmunoprecipitar el receptor, y determinamos que en ese proceso la proteína Fe65 co-inmunoprecipita con él (Fig. 17A, cuadro rojo). De estos resultados es posible confirmar que la proteína Fe65 interacciona con P2X2a, lo que se ve corroborado en los resultado negativos de los

controles utilizados en este experimento, donde el vector vacío y lisados en los que se utilizó IgG no mostraron esta señal de co-inmunoprecipitación. Para robustecer y confirmar estos resultados, se realizó una aproximación experimental definida como inmunoprecipitación inversa, es decir, se utilizó un anticuerpo anti-Fe65 para inmunoprecipitar (Fig. 17B) y en este caso observar si la co-inmunoprecipitación era positiva para FLAG-P2X2a. El resultado positivo de este experimento nos permite establecer que nuestro modelo responde a los patrones de interacción descritos en literatura para P2X2a y Fe65.

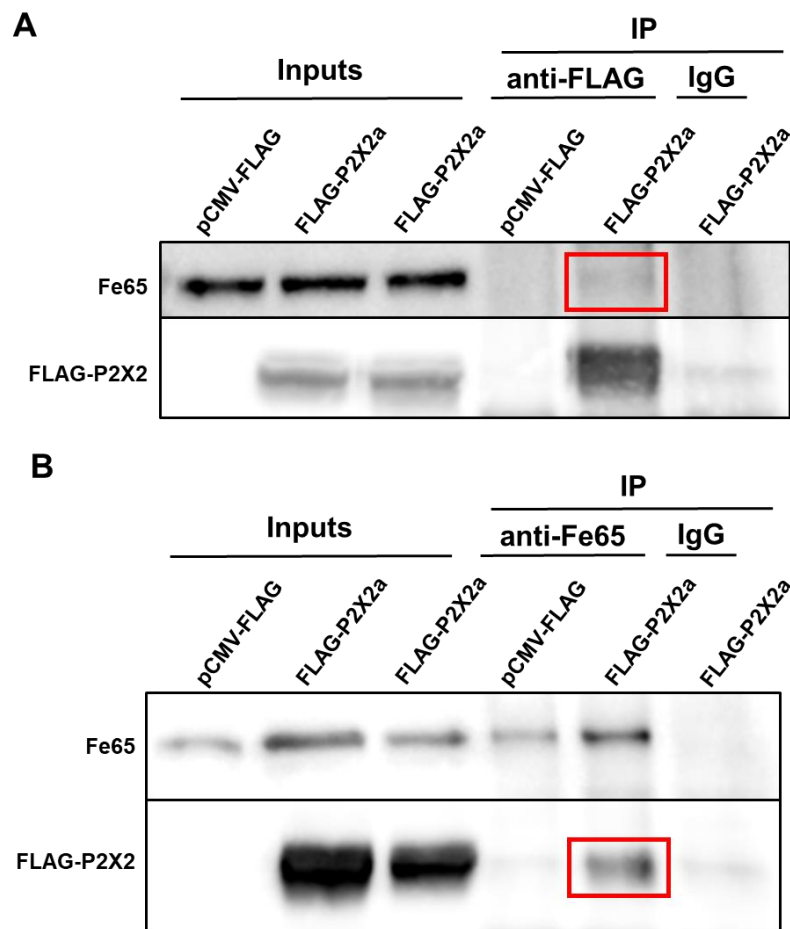


Figura 17. Estudio de co-inmunoprecipitación y co-inmunoprecipitación inversa de FLAG-P2X2a y Fe65.

A. Western blot representativo de la co-inmunoprecipitación de Fe65 en lisados de células HEK-293 transfectadas con FLAG-P2X2a. En orden: inputs o lisados totales de células transfectadas con el plásmido vacío y con FLAG-P2X2a, luego la inmunoprecipitación donde se utilizó un anticuerpo anti-FLAG e IgG de ratón como control negativo. **B.** Western blot representativo de la co-inmunoprecipitación inversa en lisados de células HEK-293 transfectadas. En orden: inputs o lisados totales de células transfectadas con el plásmido vacío

y con FLAG-P2X2a, y luego la inmunoprecipitación donde se utilizó un anticuerpo anti-Fe65 e IgG de conejo como control negativo.

Utilizando esta misma aproximación experimental, quisimos establecer si la otra parte de nuestro paradigma se cumplía, es decir, si APP y P2X2a podrían formar parte de un complejo proteico. Para ello estudiamos si la inmunoprecipitación de P2X2a lleva consigo a la proteína APP (Fig. 18). Utilizando el anticuerpo anti-FLAG descrito previamente (Fig. 17) fue posible determinar ahora que en la inmunoprecipitación de este receptor se detectó la presencia de la proteína APP en el inmunoprecipitado (cuadro rojo Fig. 18B). Considerando que este inmunomarcaje no fue posible observarlo en los controles utilizados (células transfectadas con GFP, o inmunoprecipitadas con el IgG control), este resultado nos sugiere que P2X2a y APP estarían formando parte de un mismo complejo, que de acuerdo con las condiciones experimentales disponibles en nuestro laboratorio y lo establecido en la literatura podría estar mediado por la interacción de ambas proteínas con Fe65.

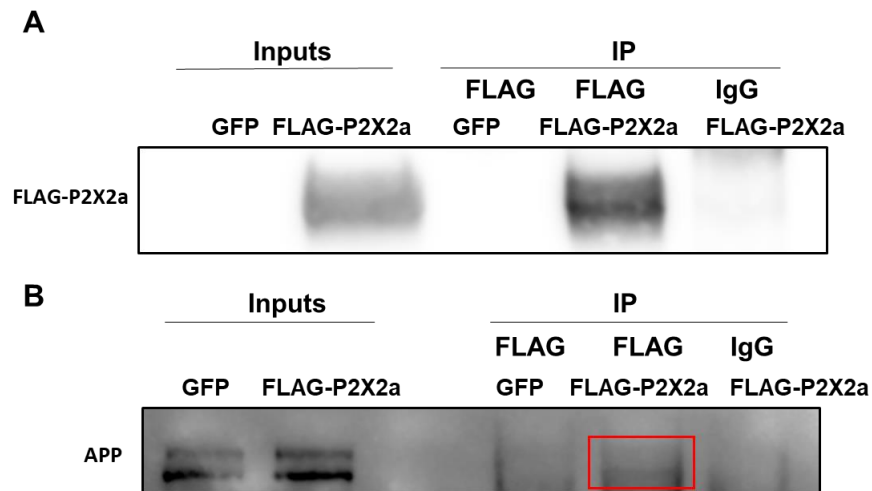


Figura 18. Estudio de co-inmunoprecipitación de FLAG-P2X2a y APP.

A. Western blot representativo de la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-FLAG o el control IgG en lisados de células HEK-293 transfectadas con FLAG-P2X2a. En orden: inputs o lisados totales de células transfectadas con GFP y FLAG-P2X2a, y luego la inmunoprecipitación donde se utilizó un anticuerpo anti-FLAG e IgG de ratón como control negativo. **B.** Western blot representativo de la co-inmunoprecipitación de APP en lisados de células HEK-293 transfectadas. En orden: inputs o lisados totales de células transfectadas con GFP y con FLAG-P2X2a, y luego la co-inmunoprecipitación.

2.3 Evaluación del impacto del aumento de P2X2 en la co-localización entre Fe65 y APP.

Como hemos establecido en los resultados previos discutidos en esta tesis, el receptor P2X2a forma un complejo con Fe65, quien a su vez interacciona con APP, por este motivo quisimos estudiar si la sobreexpresión del receptor P2X2a podría afectar la interacción entre estas proteínas. Para ello, mediante

inmunocitoquímica evaluamos la co-localización de APP y Fe65 luego de tratamientos con A β o (0,5 μ M, 24 h) (Fig. 19A, Anexo 4). En primer lugar, la exposición de neuronas hipocampales a tratamientos crónicos con A β o no mostró cambios significativos en la inmunofluorescencia total de Fe65 (Fig. 19B, C = 100,0 \pm 8,0%, A β o = 102,3 \pm 14,3%), pero sí se observó un aumento en la inmunofluorescencia para APP (Fig. 19C, C = 100,0 \pm 7,0%, A β o = 147,2 \pm 15,5), lo que podría significar, entre otras cosas, una eventual potenciación de la vía amiloidogénica. Posterior a esto, se estudió la co-localización entre estas dos proteínas mediante el uso del coeficiente de superposición de Manders (Fig. 19D, C= 0,32 \pm 0,05, A β o = 0,22 \pm 0,02). Este resultado indica que en nuestros experimentos existe una baja superposición entre los inmunomarcajes de Fe65 y APP, lo que no se ve afectado por el tratamiento con A β o. Esto revela que esta aproximación experimental no es lo suficientemente sensible para estudiar si el incremento en los niveles del receptor P2X2a puede afectar la interacción de Fe65 con APP.

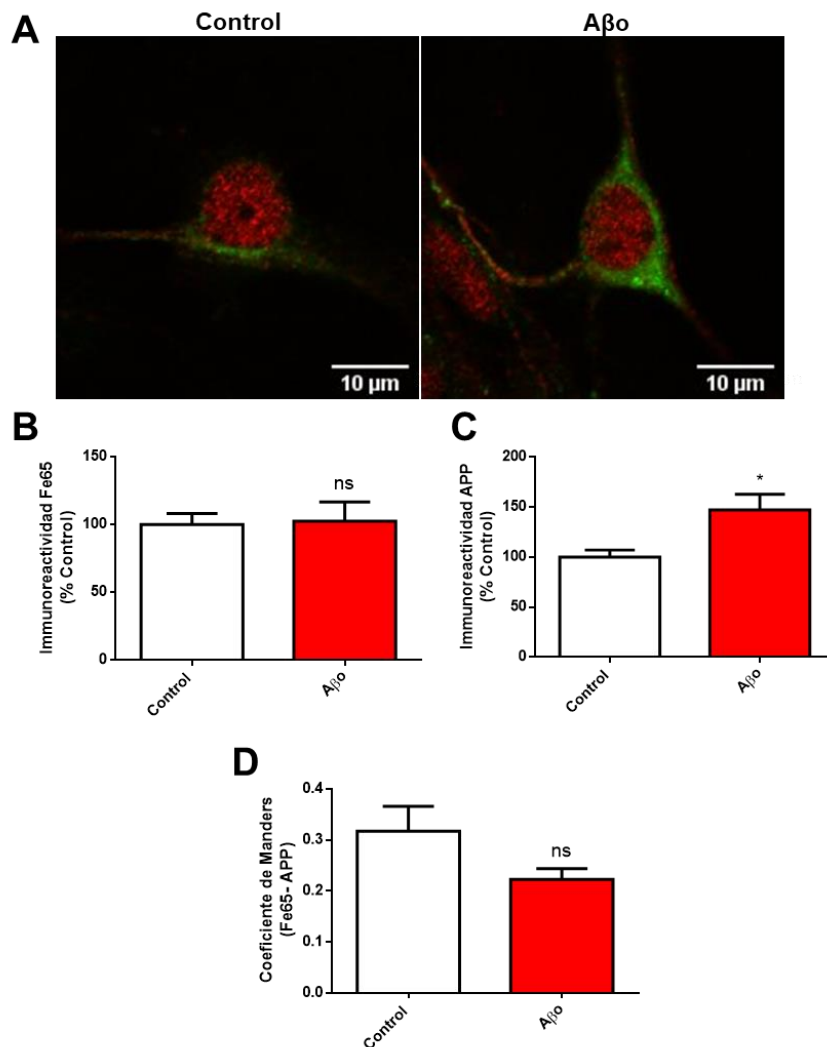


Figura 19. Co-localización entre APP y Fe65 luego de tratamientos con Aβ₀.

A. Imágenes representativas de inmunofluorescencia de Fe65 (rojo) y APP (verde) en neuronas hipocámpales control y tratadas con Aβ₀ 0,5 μM por 24 h. Barra blanca indica 10 μm. **B.** Cuantificación de la inmunofluorescencia de Fe65 expresada en % del control. Control = 100,0 ± 8,0%, Aβ₀ = 102,3 ± 14,3%, ns, n = 5. **C.** Cuantificación de la inmunofluorescencia de APP expresada en % del control. Control = 100,0 ± 7,0%, Aβ₀ = 147,2 ± 15,5,

* $p < 0,05$, $n = 5$. **E.** Coeficiente de Manders entre los inmunomarcajes de APP y Fe65. Control = $0,32 \pm 0,05$, $A\beta_0 = 0,22 \pm 0,02$, ns, $n = 5$, $N = 13$.

Como una manera de reforzar lo observado en el tratamiento con $A\beta_0$, quisimos determinar si frente a la sobreexpresión de P2X2R, se observa algún efecto en la co-localización de APP y Fe65, para lo cual se utilizaron células PC12 transfectadas con ambas isoformas de P2X2, en las que se evaluó la co-localización del inmunomarcaje de estas dos proteínas (Fig. 20A, Anexo 5). Tras el análisis del coeficiente de Manders, no se observaron cambios significativos en ninguna de las condiciones (Fig. 20B, C= $0,087 \pm 0,038$, mCherry = $0,13 \pm 0,066$, P2X2a = $0,099 \pm 0,051$, P2X2b = $0,16 \pm 0,055$); y además, también se observa una baja co-localización entre estos inmunomarcajes en células PC12. Esto refuerza la observación previa (Fig. 19) de una baja co-localización entre APP y Fe65, y que la sobreexpresión de P2X2 no afecta este resultado.

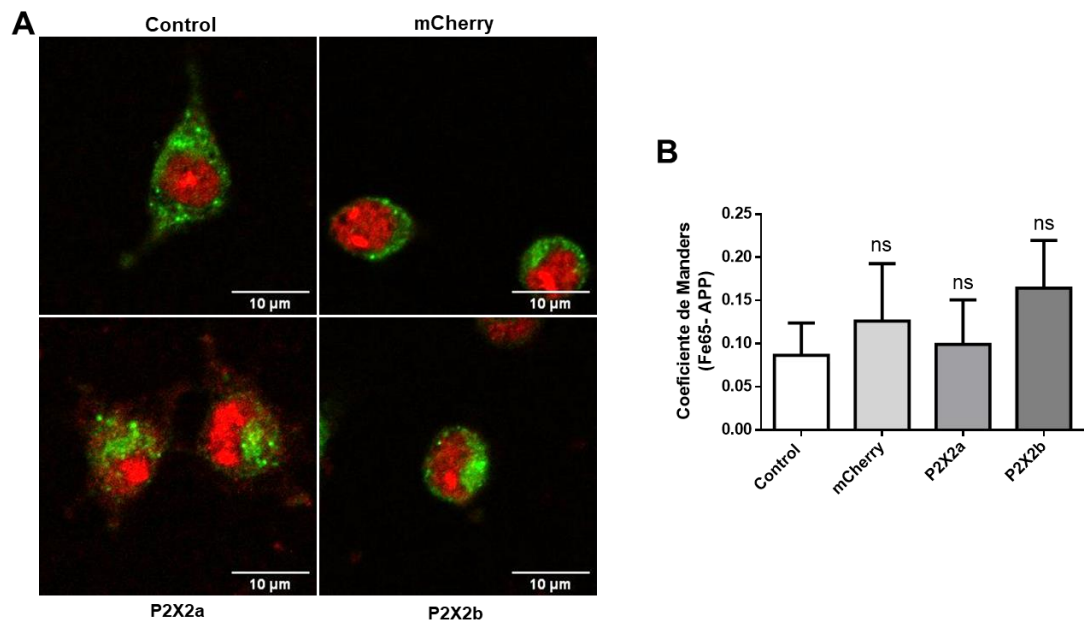


Figura 20. Análisis de la co-localización entre Fe65 y APP en presencia de la sobreexpresión de P2X2

A. Imágenes representativas de inmunofluorescencia de Fe65 (rojo) y APP (verde) en células PC12 control y transfectadas para sobreexpresar P2X2a, P2X2b o mCherry como control de transfección. Cuadro blanco muestra un acercamiento de estas células. **B.** Coeficiente de Manders entre los inmunomarcajes de APP y Fe65. Control = $0,087 \pm 0,038$, mCherry = $0,13 \pm 0,066$, P2X2 = $0,099 \pm 0,051$, P2X2b = $0,16 \pm 0,055$, ns, n = 3, N = 10.

2.4 Impacto del tratamiento con A β en la interacción de APP con factores claves de la endocitosis: Rab5

Uno de los elementos claves en la vía amiloidogénica es la endocitosis de APP, por lo tanto, nos pareció relevante evaluar si las aproximaciones experimentales de nuestro modelo inducen un incremento en este proceso.

Para ello, utilizamos una estrategia de inmunomarcaje y estudio de co-localización entre APP y Rab5, marcador de endosomas tempranos, como herramienta de estudio para la endocitosis de APP. Así, utilizamos neuronas hipocampales tratadas con $A\beta_0$ 0,5 μ M por 24 h, a las cuales se les realizó inmunofluorescencia utilizando microscopía confocal (Fig. 21A, Anexo 6). Del análisis del coeficiente de Manders, se pudo observar una alta co-localización entre APP y Rab5, sin cambios significativas luego del tratamiento con $A\beta_0$ (Fig. 21B, $C = 0,59 \pm 0,04$; $A\beta_0 = 0,69 \pm 0,04$, $p = 0,77$). Para profundizar en este resultado, se utilizó microscopía de superresolución que permite mejorar la calidad del análisis en base a un aumento en la resolución espacial (Fig. 22A, Anexo 7). De esta manera, se determinó que el coeficiente de Manders presenta un incremento significativo para la co-localización ya descrita, luego de la exposición a $A\beta_0$ (Fig. 22B, $C = 0,49 \pm 0,04$; $A\beta_0 = 0,64 \pm 0,03$); lo que sugiere que este tratamiento aumenta la presencia de APP en endosomas tempranos, que podría estar dado por un aumento en la endocitosis de APP.

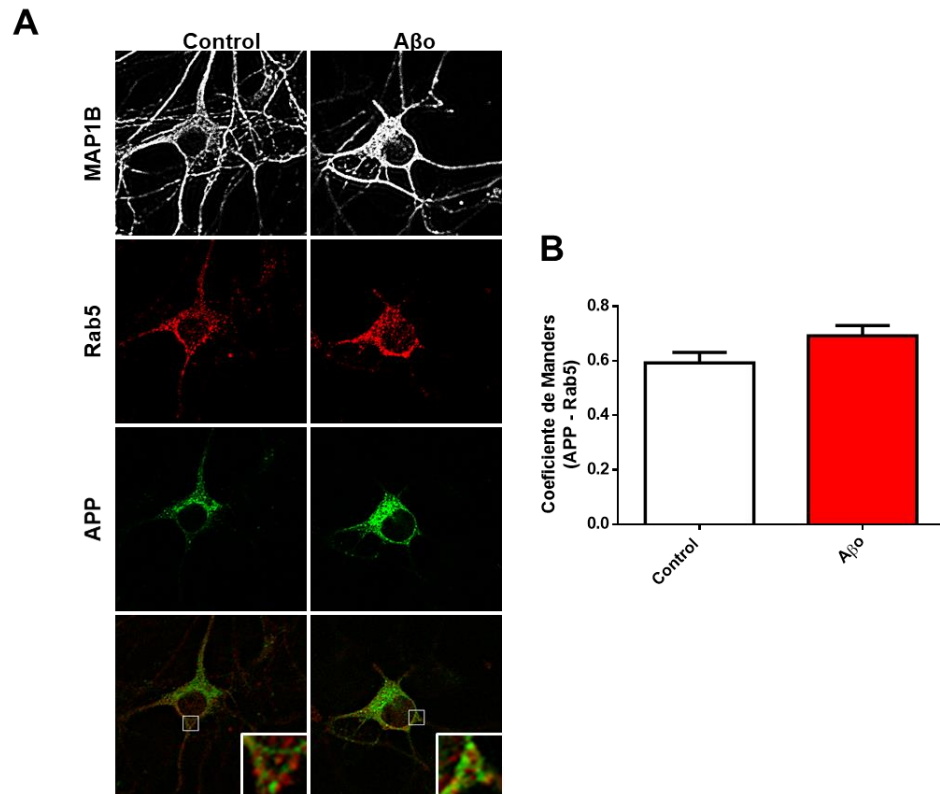


Figura 21. Análisis de la co-localización entre APP y Rab5.

A. Imágenes confocales representativas de inmunofluorescencia de MAP1B (blanco), Rab5 (rojo) y APP (verde) en neuronas hipocámpales control y tratadas con A β 0 0,5 μ M por 24 h. Cuadro blanco muestra un acercamiento de estas células. **B.** Coeficiente de Manders entre los inmunomarcajes de APP y Rab5. Control = 0,59 \pm 0,04; A β 0 = 0,69 \pm 0,04, ns, p = 0,77 n = 5, N = 15.

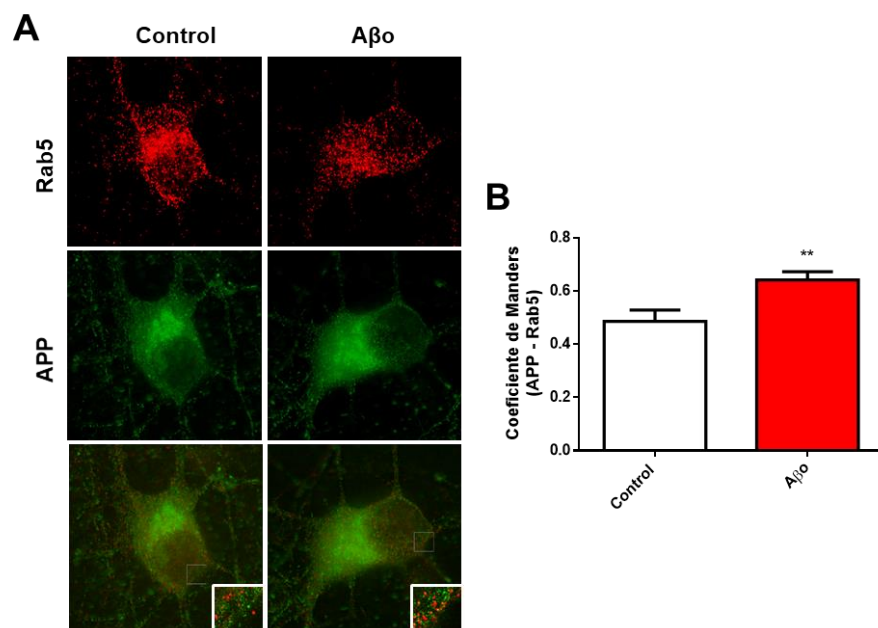


Figura 22. Aβ aumenta la co-localización entre APP y Rab5 observado por microscopía superresolución.

A. Imágenes representativas de microscopía de superresolución de Rab5 (rojo) y APP (verde) en neuronas hipocámpales control y tratadas con Aβ 0,5 μM por 24 h. Cuadro blanco muestra un acercamiento de estas células. **B.** Coeficiente de Manders entre los inmunomarcajes de APP y Rab5. Control = $0,49 \pm 0,04$; Aβ = $0,64 \pm 0,03$, $p < 0,01$, $n = 5$, $N = 16$.

2.5 Incremento en los niveles de Aβ tras la sobreexpresión de P2X2R: posible impacto en la endocitosis de APP

Dado que hemos visto que tratamientos con Aβ incrementan la expresión de P2X2R y a su vez la endocitosis de APP, nos propusimos evaluar si el incremento de P2X2R podría tener un impacto en los niveles de Aβ, lo que permitiría correlacionar preliminarmente nuestros resultados y así establecer

una potencial participación de P2X2R en el mecanismo tóxico de este modelo. Para esto realizamos Western blot en células PC12 transfectadas con las isoformas P2X2a y P2X2b (Fig. 23A). La cuantificación de ambas bandas observadas para A β muestra un aumento significativo en las condiciones de sobreexpresión de ambas isoformas (Fig. 23B, C = 100,0 \pm 10,6%; mCherry = 107,9 \pm 15,2%; P2X2a = 299,1 \pm 54,6%; P2X2b = 299,5 \pm 53,8%). Esto permite establecer que el incremento de P2X2, independiente de la isoforma expresada, induciría una mayor generación de A β , lo que podría estar de acuerdo con los resultados previos, y permite establecer una correlación entre el efecto de los A β en la sobreexpresión del receptor P2X2, el incremento en la co-localización de APP y Rab5 y un aumento en el procesamiento amiloidogénico, en un ciclo que potenciaría la toxicidad amiloide en este modelo.

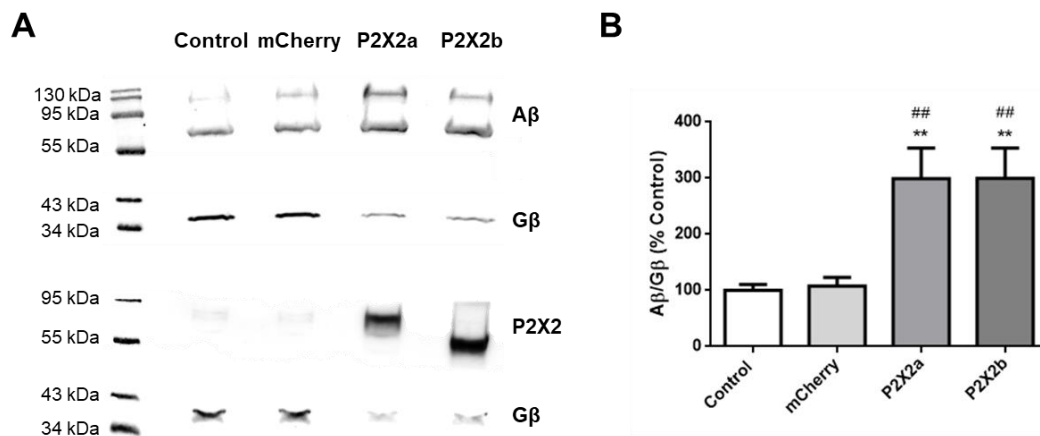


Figura 23. La sobreexpresión de P2X2 incrementa los niveles de Aβ en células PC12.

A. Western blot representativo de lisados de células PC12 control, transfectadas con mCherry, P2X2a y P2X2b. Se observan las bandas de Aβ, P2X2 y Gβ, proteína que fue utilizada como control de carga. Se cargó menos cantidad de lisado en las condiciones de sobreexpresión con el fin de no saturar la imagen y poder detectar las bandas presentes en las situaciones control **B.** Cuantificación de la inmunorreactividad de Aβ, normalizada con respecto de Gβ y expresada en % del control. Control = 100,0 ± 10,6%; mCherry = 107,9 ± 15,2%; P2X2a = 299,1 ± 54,6%; P2X2b = 299,5 ± 53,8%; **p < 0,01 respecto del control; ##p < 0,01 respecto de mCherry, n = 4.

3. IMPACTO EN LA DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE FE65 Y LOS NIVELES DE PGC-1 α FRENTE A UN AUMENTO DE P2X2

Nos propusimos evaluar la distribución subcelular de Fe65, ya que esta proteína transloca al núcleo y cumple un rol trascendental en la regulación transcripcional de distintos genes [120]. Entre ellos, una proteína clave en la biogenesis mitocondrial, PGC-1 α [110]. Con este fin, evaluamos cambios en los patrones de distribución de la proteína Fe65 en tratamientos con A β y frente a la sobreexpresión de P2X2a, y sus consecuencias en un factor clave como es el ya mencionado PGC1- α .

3.1 A β disminuye la razón núcleo/citosol de Fe65

Lo primero que hicimos fue evaluar la inmunorreactividad de Fe65 en neuronas hipocampales tratadas con A β 0,5 μ M por 24 h (Fig. 24A, Anexo 8). Utilizando inmunocitoquímica pudimos determinar que luego de la exposición a A β , a pesar de que no se observaron cambios en la inmunofluorescencia total de Fe65 respecto del control, como fue descrito previamente en este mismo trabajo (Fig. 24B, C = 100,0 \pm 8,0%; A β = 102,3 \pm 14,3%); la distribución subcelular (Fig. 24C) presentó una disminución significativa en la razón de inmunorreactividad de la proteína en el núcleo versus el citosol (núcleo/citosol: N-C) (Fig. 24D, C = 100,0 \pm 6,6%; A β = 71,6 \pm 6,3%).

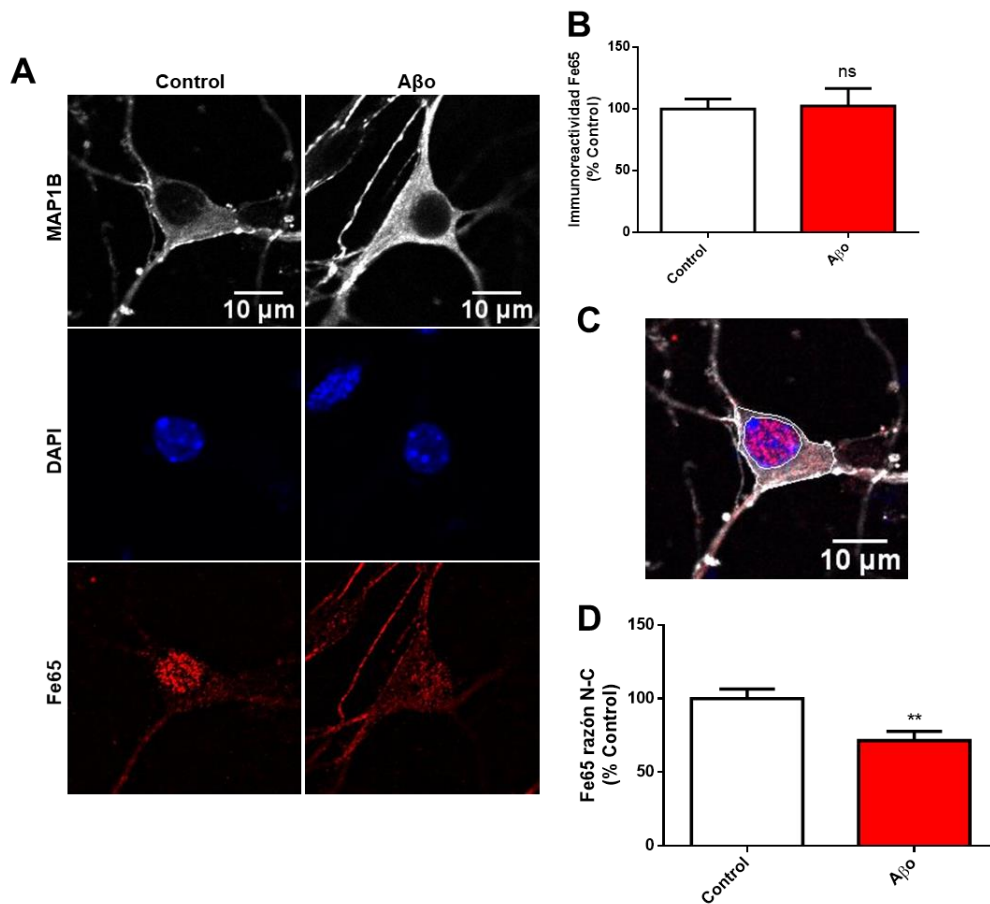


Figura 24. Aβo disminuye la razón N-C de Fe65 en neuronas hipocampales.

A. Imágenes confocales representativas de neuronas hipocampales control y tratadas con Aβo 0,5 μM por 24 h, marcadas con MAP-1B (blanco), DAPI (azul) y Fe65 (rojo). Línea blanca representa 10 μm **B.** Cuantificación de la inmunofluorescencia total de Fe65 en neuronas hipocampales, representada como % del control. Control = 100,0 ± 8,0%; Aβo = 102,3 ± 14,3%, ns, n = 5, N = 16. **C.** Esquema representativo de cómo se analizó la distribución núcleo-citosol en las neuronas hipocampales, utilizando los marcajes de DAPI y MAP-1B. **D.** Cuantificación de la razón N-C de la inmunofluorescencia de Fe65 en

neuronas hipocamapales, representada como % del control. Control = 100,0 ± 6,6%; Aβ_o = 71,6 ± 6,3%; ** = p < 0,01, n = 5, N = 16.

3.2 P2X2a disminuye la razón núcleo/citosol de Fe65

Considerando que nuestros resultados previos mostraron que Aβ_o aumenta P2X2, nos propusimos determinar si la sobreexpresión de P2X2 pudiese afectar de una manera similar a los tratamientos con Aβ_o la distribución subcelular de Fe65. Utilizando el mismo protocolo experimental de inmunofluorescencia en células PC12 transfectadas con las isoformas P2X2a y P2X2b, evaluamos eventuales cambios en la razón núcleo/citosol para Fe65 (Fig. 25, Anexo 9). Al cuantificar la fluorescencia total de Fe65 no se observaron diferencias significativas para las distintas condiciones experimentales (Fig. 25B, C = 100,0 ± 6,4%; mCherry = 93,7 ± 20,5 %; P2X2a = 82,6 ± 14,1%; P2X2 = 97,3 ± 8,8%). Para este objetivo utilizamos las mismas imágenes analizadas en la Fig. 19, donde utilizamos APP como marcaje para delimitar el citosol (Fig. 25C). De este análisis se cuantificó la razón N-C de Fe65, donde se observó una disminución solo en las células transfectadas con la isoforma P2X2a (Fig. 25D, C = 100,0 ± 5,3%; mCherry = 96,9 ± 5,9 %; P2X2a = 71,5 ± 7,6%; P2X2 = 89,1 ± 6,1%). Esto nos permite confirmar las observaciones ya discutidas, respecto del impacto que la sobreexpresión de este receptor, especialmente la isoforma P2X2a, puede tener en el ciclo tóxico de Aβ.

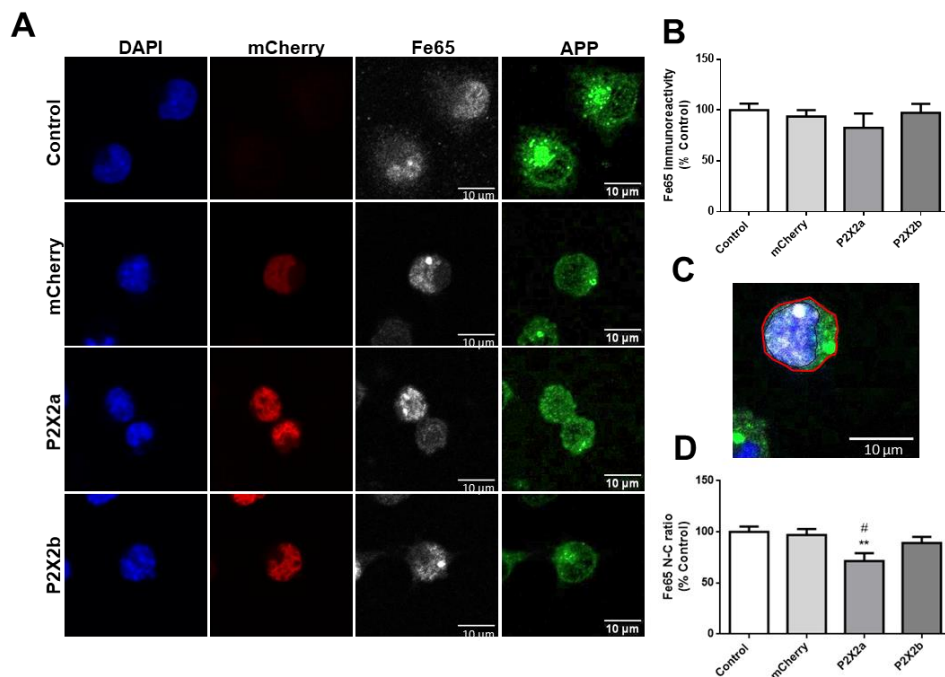


Figura 25. La sobreexpresión de P2X2a disminuye la razón N-C de Fe65 en células PC12.

A. Imágenes confocales representativas de células PC12 control y transfectadas con mCherry, P2X2a o P2X2b, marcadas con DAPI (azul), mCherry como control de transfección (rojo), Fe65 (blanco) y APP (verde). **B.** Cuantificación de la inmunoreactividad total de Fe65 en células PC12, representada como % del control. Control = 100,0 ± 6,4%; mCherry = 93,7 ± 20,5%; P2X2a = 82,6 ± 14,1%; P2X2 = 97,3 ± 8,8%; ns, n = 3, N = 10. **C.** Esquema representativo de cómo se analizó la distribución núcleo-citosol en células PC12, utilizando los marcajes de DAPI y APP. **D.** Cuantificación de la razón N-C de la inmunofluorescencia de Fe65 en células PC12, representada como % del control. Control = 100,0 ± 5,3%, mCherry = 96,9 ± 5,9 %, P2X2a = 71,5 ± 7,6%, P2X2 = 89,1 ± 6,1%). ** = p < 0,01 respecto del control, # = p < 0,05 respecto de mCherry, n = 3, N = 12.

3.3 A β y sobreexpresión de P2X2a disminuyen la inmunorreactividad de PGC-1 α

Considerando que A β y P2X2a disminuyen la razón N-C de Fe65, se estudió el impacto de la reducción de Fe65 en el núcleo, en la expresión y función de PGC-1 α , un factor clave para la biogénesis mitocondrial. Para ello, utilizamos neuronas hipocampales tratadas con A β , y cuantificamos la inmunorreactividad total de PGC-1 α (Fig. 26A, Anexo 10). De este análisis se pudo establecer que efectivamente la presencia de A β indujo una reducción en la inmunorreactividad de PGC-1 α cercana a un 15% (Fig. 26B, C = 100,0 \pm 2,3%; A β = 84,7 \pm 4,6 %). Esta misma aproximación experimental se utilizó en células PC12 donde teníamos la posibilidad de transfectar y sobreexpresar las isoformas del receptor P2X2 estudiadas en esta tesis (Fig. 27A, Anexo 11). Este fue un importante resultado, que nos permitió establecer que la isoforma P2X2a logró inducir una disminución significativa de PGC-1 α cercana a un 35% de la condición control (Fig. 27B, C = 100,0 \pm 3,7%; mCherry = 83,4 \pm 10,9 %; P2X2a = 66,3 \pm 4,8%; P2X2b = 89,0 \pm 6,9 %). Esto es relevante para establecer la participación del receptor P2X2a, Fe65, APP y PGC-1 α en un eje que potencia la toxicidad del péptido A β y que podrían estar participando en los eventos de falla sináptica, estrés oxidativo y falla mitocondrial ampliamente descritos en la EA.

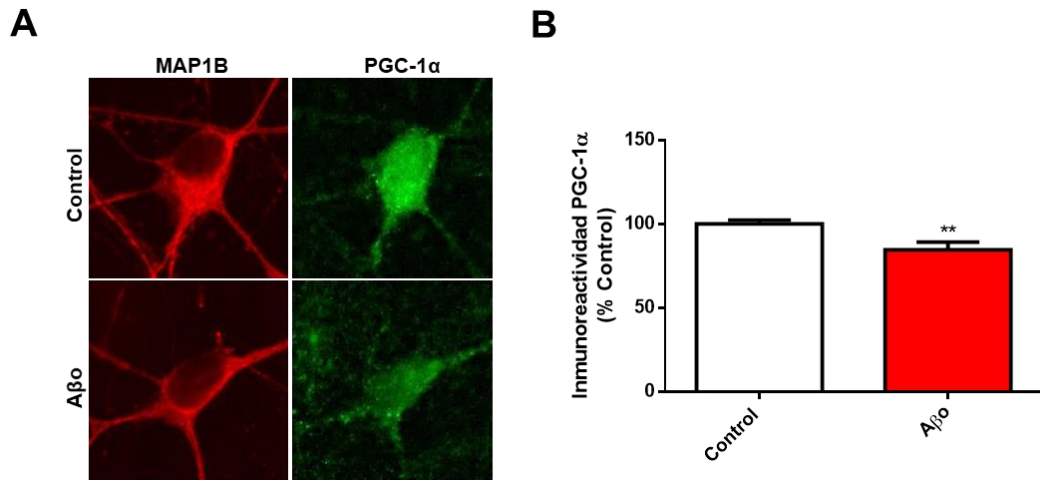


Figura 26. A β disminuye la intensidad de la inmunorreactividad de PGC-1 α en neuronas hipocampales.

A. Imágenes representativas de epifluorescencia de neuronas hipocampales control y tratadas con A β , marcadas con MAP1B (rojo) y PGC-1 α (verde). **B.** Cuantificación de la inmunofluorescencia total de PGC-1 α en neuronas hipocampales, representada como % del control. Control = 100,0 \pm 2,3%; A β = 84,7 \pm 4,6 %; ** = p < 0,01; n = 5, N = 17.

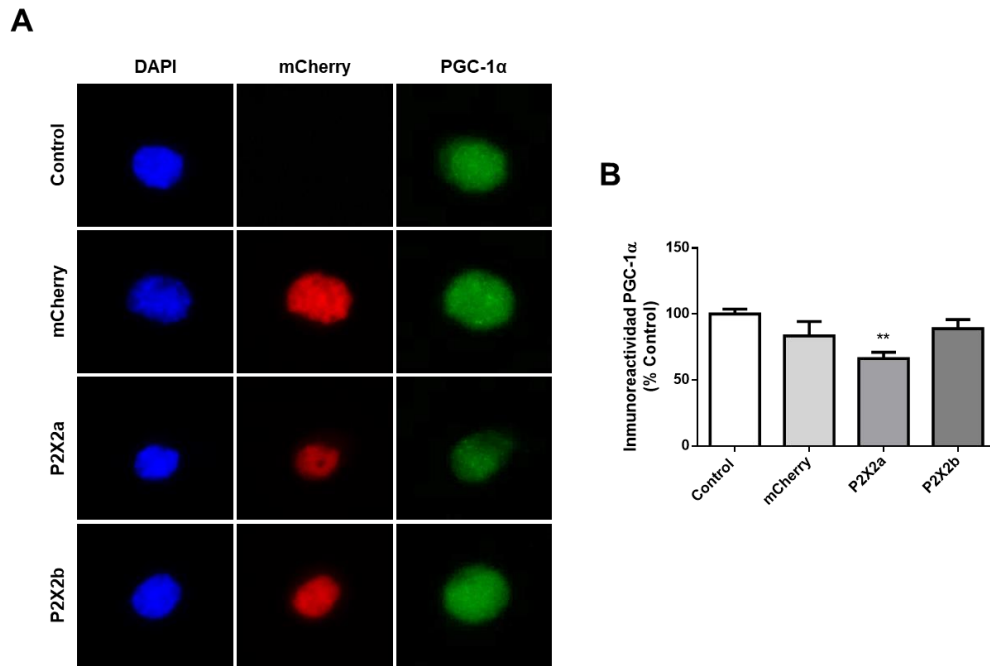


Figura 27. La sobreexpresión de P2X2a, pero no de P2X2b, disminuye la intensidad de la inmunorreactividad de PGC-1 α en células PC12.

A. Imágenes representativas de epifluorescencia de células PC12 control y transfectadas con mCherry, P2X2a o P2X2b, marcadas con DAPI (azul), mCherry (rojo) y PGC-1 α (verde). **B.** Cuantificación de la inmunofluorescencia total de PGC-1 α en células PC12, representada como % del control. Control = 100,0 ± 3,7%; mCherry = 83,4 ± 10,9 %; P2X2a = 66,3 ± 4,8%; P2X2b = 89,0 ± 6,9 %; ** = p < 0,01; n = 5, N = 15.

4. P2X2 AUMENTA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Finalmente, para correlacionar nuestros resultados utilizando el péptido A β como agente tóxico en modelos celulares, quisimos evaluar la expresión del receptor P2X2 en muestras post mortem de cerebro de pacientes diagnosticados con EA y clasificados de acuerdo con los estadios Braak. Se utilizaron 10 muestras de cada grupo: estadio Braak I–II, III–IV y V–VI, mientras que 9 muestras provenientes de individuos sin demencia fueron usadas como control. Se utilizó la técnica de Western blot para evaluar los niveles de la proteína P2X2 en lisados obtenidos desde corteza (Fig. 28A). Así, fue posible observar un aumento significativo de P2X2 en las muestras de pacientes que habían sido clasificados en los estadios Braak V-VI, respecto de lo cuantificado en las muestras de pacientes control (ND, Fig.28B, ND = $105,5 \pm 11,4\%$; I-II = $124,8 \pm 17,2\%$; III-IV = $106,3 \pm 12,1\%$; V-VI = $153,5 \pm 14,5\%$), lo que estaría en línea con los resultados experimentales obtenidos en los modelos celulares. Es importante destacar, que la banda obtenida en este experimento se condice con el tamaño esperado de banda para P2X2 de acuerdo a la hoja de datos del anticuerpo, sin embargo, al ser distinta de las bandas observadas para las isoformas en nuestros experimentos en líneas celulares, no es posible determinar a qué isoforma corresponde la banda observada en muestras humanas.

Este resultado confirma la propuesta de este trabajo de investigación, en términos de correlacionar la sobreexpresión del P2X2R y su participación en los procesos de falla neuronal y muerte celular característicos de la patología y que en esta etapa se tornan irreversibles para la función neuronal.

Estas mismas muestras se clasificaron de acuerdo con el estadio Amiloide, que está relacionado con las áreas del cerebro en las que se encuentran depósitos amiloides en las muestras de cerebro de estas personas (descritas en la introducción, Fig. 2B). Al cuantificar estas muestras fue posible observar un aumento significativo de los niveles del P2X2 en aquellas muestras de pacientes que se encontraban en el estadio C (el estadio que presenta más áreas del cerebro con depósitos amiloides), en comparación con las muestras control (Fig. 28C, ND = $105,5 \pm 11,4\%$; 0 = $102,2 \pm 17,3\%$; A = $125,2 \pm 18,0\%$; B = $131,7 \pm 19,0\%$; C = $152,8 \pm 14,1\%$). Llama la atención y destaca que utilizando este tipo de desagregación de los datos (estadios A-C) es posible observar una cierta linealidad entre el incremento del receptor y la progresión de los estadios relacionado a una mayor cantidad de A β ; considerando esta tendencia estos datos refuerzan nuestra idea de una participación del receptor en aquellas etapas de alto deterioro tisular y avanzada enfermedad.

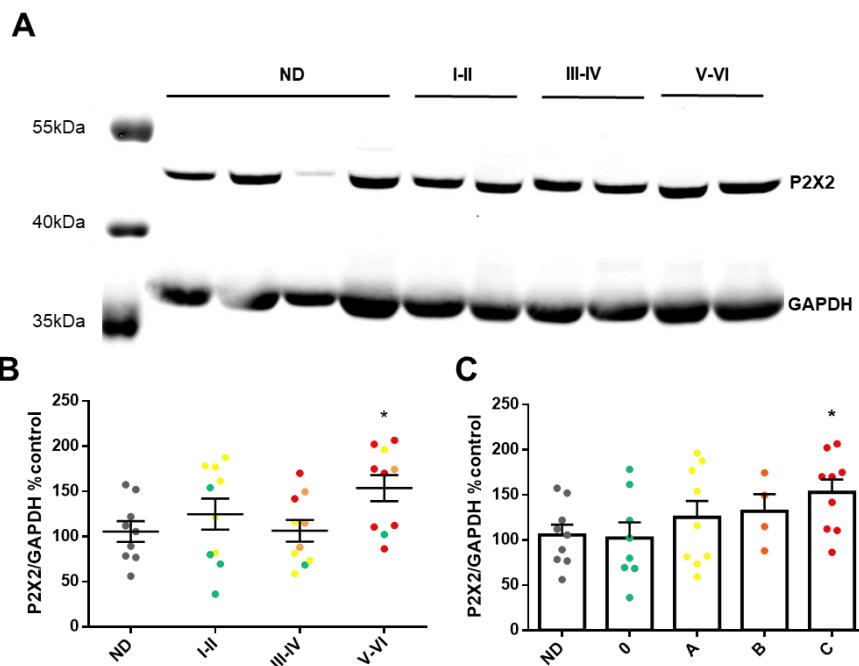


Figura 28. P2X2 aumenta sus niveles en el cerebro de personas con EA.

A. Western blot representativo de P2X2 y GAPDH en muestras obtenidas del cerebro de personas control no dementes (ND), o con EA en los estadios Braak I-II, III-IV y V-VI. **B.** Cuantificación de la inmunorreactividad de la banda de P2X2, normalizada utilizando GAPDH y representada como % del control. Los diferentes estadios Amiloides de las muestras se presentan en un Sistema de colores, 0: verde, A: amarillo, B: naranja, C: rojo. ND = $105,5 \pm 11,4\%$; I-II = $124,8 \pm 17,2\%$; III-IV = $106,3 \pm 12,1\%$; V-VI = $153,5 \pm 14,5\%$; * = $p < 0,05$; n = 9 (ND). **C.** Cuantificación de la inmunoreactividad de la banda de P2X2 en las muestras de distintos estadios Amiloides, normalizada utilizando GAPDH y representada como % del control. ND = $105,5 \pm 11,4\%$; 0 = $102,2 \pm 17,3\%$; A = $125,2 \pm 18,0\%$; B = $131,7 \pm 19,0\%$; C = $152,8 \pm 14,1$; * = $p < 0,05$, n = 9 (ND).

Como una forma de corroborar las observaciones previas, y descartar que los incrementos observados en el P2X2R en las muestras de pacientes con EA se debiesen solo a un cambio en su degradación, evaluamos adicionalmente los niveles de ARNm de P2X2 en estas mismas muestras utilizando GAPDH como gen *housekeeping* (Fig. 29). De la cuantificación en relación con los estadios Braak de las muestras, no se observaron diferencias significativas respecto del control (Fig. 29A, ND: $100,0 \pm 25,6\%$; I-II: $202,6 \pm 53,8\%$; III-IV: $202,1 \pm 60,3\%$; V-VI: $209,6 \pm 46,3\%$), aunque sí se observan algunas muestras con un marcado incremento en la expresión, sin embargo, debido a la dispersión de los datos no permite establecer una significancia en los distintos estadios braak respecto del control. Sin embargo, al realizar esta misma cuantificación en función de los estadios Amiloides (A-C) es posible observar que ya en el estadio A hay un incremento significativo en el ARNm del receptor P2X2 significativo (Fig. 29B, ND: $100,0 \pm 25,6\%$; 0: $161,8 \pm 56,5\%$; A: $232,2 \pm 50,4\%$; B: $137,5 \pm 71,5\%$; C: $239,7 \pm 61,4\%$), y es posible observar también que este nivel de incremento se mantiene en el estadio C, pero la dispersión de los datos no permite darle una significancia estadística a esta determinación. De todas formas este resultado, mantiene una correlación con lo observado en el western blot y análisis de la Fig. 28, lo que finalmente consolida nuestras observaciones respecto de la participación del P2X2R en la toxicidad de A β .

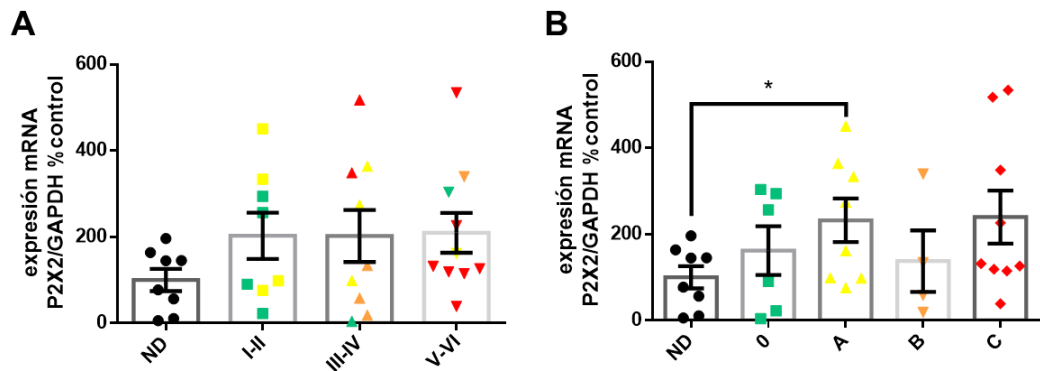


Figura 29. Los niveles de ARNm de P2X2 aumentan en el cerebro de personas con EA.

A. Cuantificación de la expresión del ARNm de P2X2, normalizada utilizando GAPDH como gen *housekeeping* y representada como % del control. Los diferentes estadios Amiloides de las muestras se presentan en un Sistema de colores, 0: verde, A: amarillo, B: naranja, C: rojo. ND = 105,5 ± 11,4%; I-II = 124,8 ± 17,2%; III-IV = 106,3 ± 12,1%; V-VI = 153,5 ± 14,5%; * = p < 0,05; n = 9 (ND). **C.** Cuantificación de la expresión del ARNm de P2X2 en las muestras de distintos estadios Amiloides, normalizada utilizando GAPDH y representada como % del control. ND = 105,5 ± 11,4%; 0 = 102,2 ± 17,3%; A = 125,2 ± 18,0%; B = 131,7 ± 19,0%; C = 152,8 ± 14,1%; * = p < 0,05; n = 9 (ND).

VI. DISCUSIÓN

A pesar de los enormes esfuerzos científicos desarrollados en los últimos 30 años para poder establecer el mecanismo fisiopatológico preciso de la EA, biomarcadores tempranos para el comienzo de la enfermedad y estrategias farmacológicas y clínicas para impedir su avance, han sido esfuerzos que no han permitido alcanzar estos objetivos de forma certera, y nos enfrentamos hoy en día a la conjunción de una serie de factores que perfectamente pudiese transformar a la EA en una pandemia silente del siglo XXI, puesto que la progresión en el envejecimiento de la población, el incremento en la expectativa de vida y el desarrollo tecnológico y biomédico que permiten el tratamiento efectivo de patologías concomitantes, han puesto al ser humano en un escenario de longevidad que constituye el factor preponderante en la incidencia y prevalencia de enfermedades neurodegenerativas como la EA. El impacto de esta patología no solo tiene que ver con la irreversibilidad de su diagnóstico sino que también con el impacto económico, familiar y para los sistema de salud que ello conlleva, de ahí la importancia y la urgencia de avanzar en el conocimiento de los eventos celulares y moleculares de esta patología, que han estado inicialmente asociados a la presencia de la proteína tau hiperfosforilada [121] y los agregados extracelulares del péptido A β [13]. Pese a que se han estudiado distintos mecanismos celulares y moleculares para dilucidar los mecanismos patológicos de la EA, la reciente aprobación por la FDA del fármaco biológico Aducanumab vuelve a poner en el centro de la estrategia terapéutica al péptido A β [122, 123].

Si bien los efectos del péptido A β , sus agregados y su capacidad de formar placas se han descrito ampliamente en la literatura, nadie hasta el momento de este trabajo, había propuesto una vinculación directa entre la presencia del péptido y la sobreexpresión de un receptor que modulase la neurotransmisión purinérgica a nivel neuronal, que de esa manera pudiese participar en los eventos neurotóxicos y la falla sináptica características de esta patología. Bastante se ha discutido sobre el rol de la transmisión glutamatérgica en esta patología, el rol de los receptores de NMDA y de sus subunidades claves como N2A y N2B [124, 125]; sin embargo, los fármacos autorizados por la FDA para la modulación farmacológica de esta neurotransmisión han mostrado resultados modestos en la clínica [126], con lo que de cierta forma se releva la importancia de estos receptores en la patología. Por otra parte, el aumento observado de P2X2 en el cerebro de pacientes con EA y la correlación con los resultados obtenidos en nuestros modelos celulares de toxicidad del péptido A β , nos permiten plantear la participación de este receptor en los mecanismos patogénicos de esta enfermedad. Además del aumento en los niveles proteicos de P2X2, y de su mensajero, pudimos demostrar que tanto las características electrofisiológicas como la señalización intracelular mediada por calcio, se veían exacerbadas cuando los agregados del péptido A β estaban presentes, lo que nos permite establecer que las células expuestas a A β experimentan una sobreexpresión de P2X2R funcional. Si bien, no podemos descartar que parte de esta respuesta sea mediada por otras subunidades de P2XR presentes en estas células, experimentos previos realizados en nuestro grupo demuestran que el P2X2

sería el más relevante en neuronas para la toxicidad amiloide, [80] lo cual es consistente con la evidencia descrita en este trabajo respecto de la participación del P2X2R y en particular la isoforma P2X2a en los eventos citotóxicos descritos en este modelo. Cabe destacar que P2X2R es una de las subunidades ampliamente descritas en la literatura por su expresión en diferentes tipos neuronales [82, 127-129]. Es así, que diferentes aproximaciones experimentales y modelos de injuria neuronal, han demostrado la participación de distintos receptores purinérgicos en los mecanismos citotóxicos asociados a estas injurias; por ejemplo, en un modelo de privación de glucosa/oxígeno e isquemia, se observó un aumento de la expresión de P2X2R en neuronas de la zona CA1 de hipocampo, mientras que P2X4R aumentó principalmente en células microgliales [129]. También se ha descrito que otras subunidades, como P2X1R y P2X7R, se expresan principalmente en células gliales [130], atribuyéndoseles un rol importante en la generación de los procesos inflamatorios del SNC, por lo que es probable, que estas otras subunidades de los P2XR estén involucradas en la respuesta neuroinflamatoria que también se ha descrito en los mecanismos tóxicos de la EA [73].

De nuestros resultados y dadas las características estructurales de la isoforma P2X2a, se puede proponer que esta tendría una mayor injerencia en los eventos celulares y moleculares asociados a la toxicidad de A β . En este trabajo, determinamos que la principal isoforma expresada luego de tratamientos con A β sería P2X2a, y la relevancia de esto, se basa en la

evidencia descrita en literatura respecto a la capacidad de interaccionar con Fe65 [92], un resultado que fue posible corroborar en nuestros modelos celulares de trabajo y que nos permite plantear posibles mecanismos de participación del P2X2R en la toxicidad amiloide.

Fe65 además interacciona con APP y podría regular su tráfico y procesamiento, lo que se soporta en las referencias bibliográficas expuestas en esta tesis [100, 103, 104]. Adicionalmente, evidencia reciente ha demostrado que en un modelo celular, el KO para Fe65 aumenta la velocidad y difusibilidad de vesículas que contienen APP, y disminuye los niveles de péptido A β producido en estas células [131], lo que sugiere que la ausencia de Fe65 altera el tráfico vesicular de APP y disminuye su procesamiento amiloidogénico. Además, se ha descrito que Fe65 funciona como proteína adaptadora que interacciona con APP e integrantes de la familia de receptores de lipoproteína [96, 105, 132]. De manera importante, se observó que la disminución de la formación del complejo APP-Fe65-LRP disminuye el procesamiento amiloidogénico de APP [133]. Mientras que LRP1B favorece la presencia de APP en la membrana plasmática, disminuyendo la generación de A β [134]. Esto demuestra que cambios en la expresión de receptores que interaccionan con Fe65 son capaces de modificar el tráfico y procesamiento de APP. Nuestros resultados de co-inmunoprecipitación sugieren la posible formación de un complejo entre P2X2a-Fe65-APP. Además, observamos que luego del tratamiento con A β 0 y la sobreexpresión de P2X2R no existen cambios significativos en la baja co-localización observada entre Fe65 y APP,

lo que sugiere que un posible aumento en la interacción de P2X2a con Fe65 podría no afectar la interacción de esta proteína adaptadora con APP. Explicar esto en conjunto con nuestros propios resultados donde la sobreexpresión de receptores P2X2a genera un incremento en los niveles de A β , es aún más complejo, ya que esto se podría contraponer a la hipótesis de la formación de este complejo trimérico, ya que el APP estaría siendo dirigido hacia los sitios intracelulares, como endosomas, donde es proteolizado para generar A β . Esto abre una interesante veta de trabajo ya que serán necesarios estudios con técnicas más sensibles y mejor dirigidas, para evaluar de forma efectiva la formación de este complejo proteico, su ubicación subcelular y el posible impacto que el aumento de P2X2a tendría en el tráfico o distribución subcelular de APP, su procesamiento y la generación de A β .

Por otra parte, en neuronas hipocampales observamos que luego del tratamiento con A β ₀ aumenta la co-localización de APP con Rab5, una proteína que se utiliza para marcar endosomas tempranos. Este resultado sugiere que luego de la exposición al péptido A β podría estar aumentando la endocitosis de APP, paso clave para la formación del péptido A β . Es decir, se generaría un ciclo tóxico en el que luego de la exposición inicial a A β ₀, aumenta el procesamiento amiloidogénico de APP en neuronas hipocampales, produciendo a su vez más péptido A β . Esto también se alinea con evidencia descrita en la literatura, en que se ha demostrado que A β ₀ aumenta el procesamiento de APP, llevando a un aumento en la producción de A β y su acumulación intracelular [135].

Nuestros resultados muestran que luego de la sobreexpresión de ambas isoformas de P2X2R aumentan los niveles del péptido A β ; esto indica que el incremento en estos niveles no estaría asociado de forma directa a la interacción con Fe65, sino que por un mecanismo independiente de esta interacción. Se requerirán mayores esfuerzos para poder dilucidar qué otros mecanismos podrían estar relacionados; probablemente, estos son mediados por la activación del P2X2R y sus cascadas de señalización. Se demostró que tras la activación de P2X2R por ATP se inicia la cascada de las MAP quinasas ERK1 y ERK2, mecanismo para el cual el influjo de Ca²⁺ a través del P2X2R es un requisito de activación [136]; esto impacta por ejemplo, en la fosforilación de residuos de tirosina en proteínas asociadas a citoesqueleto en células PC12 [137]. Mecanismos como este, podrían estar involucrados en un cambio en el tráfico y procesamiento de APP.

Adicionalmente, en este trabajo se observó que luego del tratamiento con A β se genera un cambio en la distribución subcelular de Fe65. Esta proteína transloca al núcleo para regular la transcripción de diversos genes [109, 138, 139]. Se ha descrito que la interacción con AICD es necesaria para la función transcripcional de Fe65, y estas proteínas formarían un trímero con Tip60, una histona acetiltransferasa [138]. En ausencia de APP, Fe65 tiene una distribución marcadamente nuclear, mientras que la sobreexpresión de APP cambia la distribución de Fe65, aumentando su presencia en el citosol, dejándola anclada a la membrana [138, 140]. La fosforilación del residuo T668 de APP disminuye la cantidad de Fe65 asociada a membrana, y aumenta su

presencia en el núcleo [107, 141]. Por lo tanto, esta fosforilación, que regula la interacción de Fe65 con APP, parece ser también un mecanismo de regulación de la función transcripcional de Fe65. En un trabajo más reciente, se describió que la inhibición de la formación de AICD por ambas vías de procesamiento disminuye también la localización nuclear de Fe65 [109], sugiriendo que el procesamiento de APP regula también la función transcripcional de Fe65 [120].

Nuestros resultados muestran que tras la exposición a A β o disminuye la razón N-C del inmunomarcaje de Fe65 en neuronas hipocampales. De acuerdo con todo lo discutido previamente, esto podría generar un detrimento en la regulación transcripcional ejercida por Fe65. Además, este mismo evento se observó en células PC12 tras la sobreexpresión de P2X2a, pero no de P2X2b. Este importante resultado, sugiere que la interacción de P2X2a con Fe65 podría estar generando un aumento en la fracción de Fe65 asociada a membranas, incrementando la presencia de esta proteína en el citosol y disminuyendo su translocación al núcleo, lo que queda de manifiesto en nuestras aproximaciones experimentales donde observamos una disminución en la inmunorreactividad de PGC-1 α , un co-activador transcripcional que regula la biogénesis mitocondrial y cuya transcripción depende de Fe65 [110]. Estos resultados se observaron tanto tras la exposición de neuronas de hipocampo a A β o como con la sobreexpresión de P2X2a, lo que está en concordancia con los cambios observados en la razón N-C de Fe65. Es decir, tanto la exposición a A β o como la sobreexpresión de P2X2a, disminuyen la

presencia de Fe65 en el núcleo, impactando su función transcripcional del gen de PGC-1 α . Este es un resultado importante en el contexto de la EA, ya que la disfunción mitocondrial y una disminución en la biogénesis mitocondrial son marcadores de la enfermedad y mecanismos importantes en su patogénesis [58]. Incluso, se ha reportado una disminución en los niveles de proteína y ARNm de PGC-1 α en el cerebro de pacientes con EA [62], lo que se correlaciona directamente con lo observado en esta tesis y con otros resultados de nuestro grupo de laboratorio en el que se evalúan los niveles de esta proteína luego de la exposición a A β o y el impacto que esto tiene en la función mitocondrial [57]. Allí fue posible observar por ejemplo, que la morfología mitocondrial se modifica de un patrón fibrilar a uno granular dando cuenta de cambios importantes en el control de la dinámica mitocondrial [57]. Finalmente, uno de los resultados más importantes de este trabajo fue el obtenido en muestras de corteza cerebral de pacientes con EA. En estas, pudimos observar un aumento en los niveles de proteína de P2X2 en estadio Braak V-VI y estadio Amiloide C; es decir, en etapas avanzadas de la enfermedad. Además, los niveles de P2X2 muestran una correlación directa con el estadio Amiloide de las muestras, dicho de otro modo, de la cantidad de depósitos amiloides presente en el cerebro de los pacientes. Esta observación se correlaciona directamente, con nuestros resultados desde modelos celulares de exposición a A β o, es decir, probablemente serían los oligómeros solubles los que producen el aumento en la expresión de P2X2R en el cerebro de los pacientes con EA. Dado a que el tamaño de banda

observado para P2X2 en las muestras humanas es distinto a lo observado en los modelos celulares, no podemos definir qué isoforma es la que se expresa principalmente en corteza frontal humana y que, por lo tanto, es la que aumenta en la EA. Una aproximación experimental diferente será necesaria para poder dilucidar esta incógnita.

Por su parte, el ARNm de P2X2 presenta una tendencia al aumento en las muestras de los pacientes en todos los estadios Braak comparados con las muestras controles; y se observa un aumento significativo de este en muestras del estadio Amiloide A, es decir, en etapas más tempranas de lo que se observa para los niveles proteicos de P2X2. Esto nos indica que en las muestras de cerebros de pacientes con EA, aumenta la expresión de P2X2, lo que en conjunto con los demás resultados presentados en esta tesis constituyen la primera evidencia de la sobreexpresión de este receptor purinérgico en la EA, los que han sido publicados recientemente [142]. Esto se suma a la creciente evidencia que relaciona a los P2XR con la patogénesis de la EA, en especial lo ampliamente descrito para P2X7R y su aumento en la expresión de células microgliales y su participación en el proceso de inflamación asociado a la EA; esto también fue expuesto en mayor detalle en una revisión bibliográfica que publicamos recientemente [73].

Es importante mencionar que para poder realizar estos y futuros estudios, el contar con el acceso a muestras de pacientes humanos post-mortem es completamente necesario. Sin embargo, en Chile, hasta el momento, no es posible acceder a este tipo de muestras. Por este motivo, urge que esto se

implemente en nuestro país, permitiendo una mejor comunicación entre las investigaciones que se realizan en las universidades y centros de investigación con hospitales de la zona, lo que permitiría el acceso a muestras clínicas de todo tipo, mejorando también la calidad e impacto de las investigaciones realizadas en el país.

Para terminar, el esquema de la Fig. 30 presenta el resumen de los resultados expuestos en esta tesis que nos permiten decir que:

- P2X2R aumenta su expresión en la corteza frontal de personas con EA.
- A β incrementa funcionalmente los niveles de P2X2a en neuronas hipocampales (5).
- La exposición a A β aumenta la localización de APP en endosomas tempranos (7).
- La sobreexpresión de P2X2R aumenta los niveles de péptido A β (8).
- La exposición a A β y la sobreexpresión de P2X2a disminuyen la presencia de Fe65 en el núcleo y disminuyen los niveles de PGC-1 α (9).

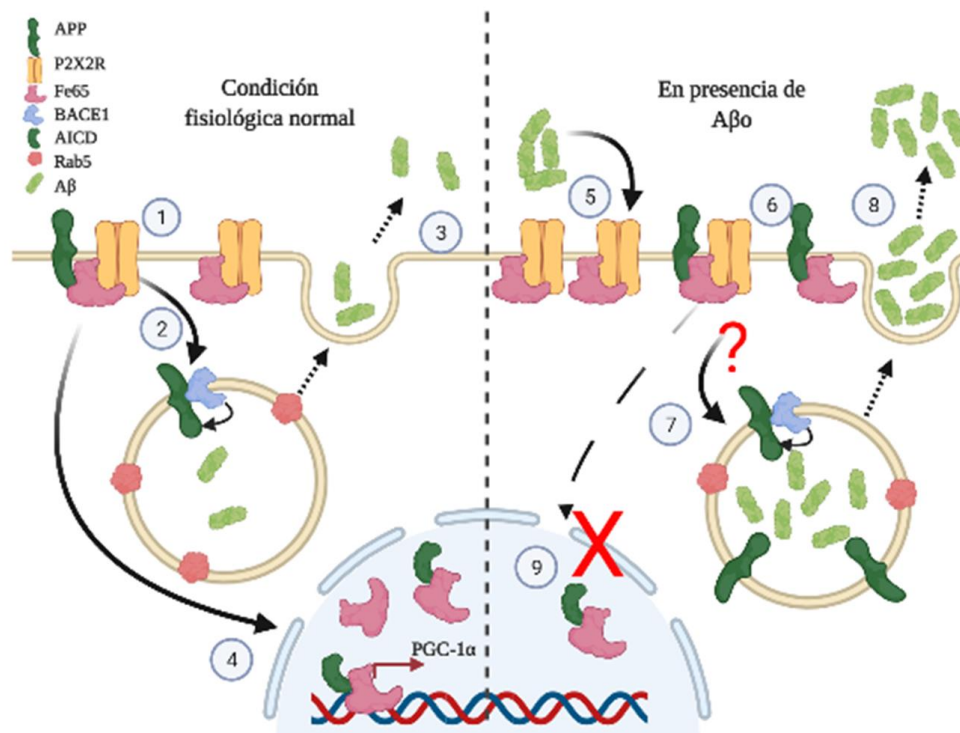


Figura 30. Modelo de la relación funcional entre A β , P2X2a, Fe65 y APP.

A la izquierda se observa lo que sucede en condiciones fisiológicas y a la derecha en presencia de A β . **(1)** Nuestros resultados plantean que se podría formar un complejo P2X2a-Fe65-APP. **(2)** APP en su tráfico normal es endocitado y **(3)** se produce A β en bajas cantidades. **(4)** Fe65 transloca al núcleo donde regula positivamente la transcripción de PGC-1 α . **(5)** Los A β aumentan los niveles de P2X2a, **(6)** lo que promueve que Fe65 se encuentre más en el citosol y **(9)** disminuya su función reguladora de la transcripción de PGC-1 α . **(7)** Por un mecanismo aún no identificado, el aumento de P2X2 estaría provocando un aumento en la endocitosis de APP y **(8)** en la generación de A β , promoviendo un ciclo de toxicidad amiloide.

VII. CONCLUSIÓN

Esta tesis representa el primer trabajo en donde se ha establecido, con evidencia traslacional, que el aumento en la expresión de P2X2R en la EA es parte de la fisiopatología de este trastorno cognitivo, y por lo tanto, representa una nueva propuesta para estudiar los mecanismos celulares asociados a la Enfermedad. Mi trabajo representa el inicio para que futuros estudios puedan profundizar en los mecanismos que modifican el tráfico y procesamiento de APP, y la localización subcelular y función de Fe65. Finalmente, este trabajo nos permite proponer al P2X2R como una nueva diana terapéutica para el desarrollo de herramientas farmacológicas en el tratamiento de esta enfermedad neurodegenerativa tan compleja.

VIII. REFERENCIAS

1. Organization, W.H., *Risk reduction of cognitive decline and dementia: WHO guidelines*. 2019.
2. Control, C.f.D. and Prevention, *Alzheimer's disease: Promoting health and independence for an aging population at a glance*. 2018.
3. Monica Moore, M., M. Díaz-Santos, and K. Vossel, *Alzheimer's Association 2021 Facts and Figures Report*.
4. Association, A.s., *2019 Alzheimer's disease facts and figures*. *Alzheimer's & Dementia*, 2019. **15**(3): p. 321-387.
5. Braak, H. and E. Braak, *Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes*. *Neurobiology of aging*, 1995. **16**(3): p. 271-278.
6. Bird, T.D., *Alzheimer disease overview*, in *GeneReviews®*[Internet]. 2018, University of Washington, Seattle.
7. Braak, H. and E. Braak, *Neuropathological staging of Alzheimer-related changes*. *Acta neuropathologica*, 1991. **82**(4): p. 239-259.
8. Selkoe, D.J. and J. Hardy, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years*. *EMBO molecular medicine*, 2016. **8**(6): p. 595-608.
9. Hardy, J. and D.J. Selkoe, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics*. *science*, 2002. **297**(5580): p. 353-356.
10. Tanzi, R.E. and L. Bertram, *Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective*. *Cell*, 2005. **120**(4): p. 545-555.
11. Hardy, J., *The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal*. *Journal of neurochemistry*, 2009. **110**(4): p. 1129-1134.
12. Hardy, J.A. and G.A. Higgins, *Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis*. *Science*, 1992. **256**(5054): p. 184-186.
13. Hardy, J. and D. Allsop, *Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease*. *Trends in pharmacological sciences*, 1991. **12**: p. 383-388.
14. Rossor, M., et al., *Clinical features of sporadic and familial Alzheimer's disease*. *Neurodegeneration*, 1996. **5**(4): p. 393-397.
15. Thinakaran, G. and E.H. Koo, *Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. **283**(44): p. 29615-29619.
16. Sanan, D.A., et al., *Apolipoprotein E associates with beta amyloid peptide of Alzheimer's disease to form novel monofibrils. Isoform apoE4 associates more efficiently than apoE3*. *The Journal of clinical investigation*, 1994. **94**(2): p. 860-869.
17. Jones, L., et al., *Genetic evidence implicates the immune system and cholesterol metabolism in the aetiology of Alzheimer's disease*. *PloS one*, 2010. **5**(11): p. e13950.
18. Young, J.E., et al., *Elucidating molecular phenotypes caused by the SORL1 Alzheimer's disease genetic risk factor using human induced pluripotent stem cells*. *Cell stem cell*, 2015. **16**(4): p. 373-385.
19. Andersen, O.M., et al., *Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005. **102**(38): p. 13461-13466.
20. Iqbal, K. and I. Grundke-Iqbal, *Alzheimer's disease, a multifactorial disorder seeking multitherapies*. 2010, Elsevier.
21. Fillenbaum, G.G., et al., *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD): the first twenty years*. *Alzheimer's & Dementia*, 2008. **4**(2): p. 96-109.

22. Thal, D.R., et al., *Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD*. *Neurology*, 2002. **58**(12): p. 1791-1800.
23. Hyman, B.T., et al., *National Institute on Aging–Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease*. *Alzheimer's & dementia*, 2012. **8**(1): p. 1-13.
24. Schöll, M., et al., *Biomarkers for tau pathology*. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2019. **97**: p. 18-33.
25. Kang, J., et al., *The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor*. *Nature*, 1987. **325**(6106): p. 733-736.
26. Puig, K.L. and C.K. Combs, *Expression and function of APP and its metabolites outside the central nervous system*. *Experimental gerontology*, 2013. **48**(7): p. 608-611.
27. Tanaka, S., et al., *Tissue-specific expression of three types of β -protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain*. *Biochemical and biophysical research communications*, 1989. **165**(3): p. 1406-1414.
28. Weyer, S.W., et al., *Comparative analysis of single and combined APP/APLP knockouts reveals reduced spine density in APP-KO mice that is prevented by APP α expression*. *Acta neuropathologica communications*, 2014. **2**(1): p. 1-15.
29. Caselli, R.J., D.S. Knopman, and G. Bu, *An agnostic reevaluation of the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease pathogenesis: The role of APP homeostasis*. *Alzheimer's & Dementia*, 2020.
30. Müller, U.C. and H. Zheng, *Physiological functions of APP family proteins*. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2012. **2**(2): p. a006288.
31. De Strooper, B. and W. Annaert, *Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein*. *Journal of cell science*, 2000. **113**(11): p. 1857-1870.
32. Haass, C., et al., *Trafficking and proteolytic processing of APP*. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2012. **2**(5): p. a006270.
33. Sengupta, U., A.N. Nilson, and R. Kaye, *The role of amyloid- β oligomers in toxicity, propagation, and immunotherapy*. *EBioMedicine*, 2016. **6**: p. 42-49.
34. Chow, V.W., et al., *An overview of APP processing enzymes and products*. *Neuromolecular medicine*, 2010. **12**(1): p. 1-12.
35. Ludewig, S. and M. Korte, *Novel insights into the physiological function of the APP (gene) family and its proteolytic fragments in synaptic plasticity*. *Frontiers in molecular neuroscience*, 2017. **9**: p. 161.
36. Tan, J.Z.A. and P.A. Gleeson, *The role of membrane trafficking in the processing of amyloid precursor protein and production of amyloid peptides in Alzheimer's disease*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2019. **1861**(4): p. 697-712.
37. Tan, J.Z.A. and P.A. Gleeson, *The trans-Golgi network is a major site for α -secretase processing of amyloid precursor protein in primary neurons*. *Journal of Biological Chemistry*, 2019. **294**(5): p. 1618-1631.
38. Shimizu, H., et al., *Crystal structure of an active form of BACE1, an enzyme responsible for amyloid β protein production*. *Molecular and cellular biology*, 2008. **28**(11): p. 3663-3671.
39. Chia, P.Z.C., et al., *Intracellular itinerary of internalised β -Secretase, BACE1, and its potential impact on β -Amyloid peptide biogenesis*. *Traffic*, 2013. **14**(9): p. 997-1013.
40. Toh, W.H., et al., *GGA1 regulates signal-dependent sorting of BACE1 to recycling endosomes, which moderates A β production*. *Molecular biology of the cell*, 2018. **29**(2): p. 191-208.

41. Takada-Takatori, Y., et al., *Donepezil modulates amyloid precursor protein endocytosis and reduction by up-regulation of SNX33 expression in primary cortical neurons*. Scientific reports, 2019. **9**(1): p. 1-11.
42. Chun, Y.S., et al., *Justicidin A Reduces β -Amyloid via Inhibiting Endocytosis of β -Amyloid Precursor Protein*. Biomolecules & therapeutics, 2019. **27**(3): p. 276.
43. Rogaeva, E., et al., *The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease*. Nature genetics, 2007. **39**(2): p. 168-177.
44. Mohamed, L.A., H. Qosa, and A. Kaddoumi, *Age-related decline in brain and hepatic clearance of amyloid-beta is rectified by the cholinesterase inhibitors donepezil and rivastigmine in rats*. ACS chemical neuroscience, 2015. **6**(5): p. 725-736.
45. Klyubin, I., et al., *Amyloid β protein immunotherapy neutralizes A β oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo*. Nature medicine, 2005. **11**(5): p. 556-561.
46. Walsh, D.M., et al., *Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo*. Nature, 2002. **416**(6880): p. 535-539.
47. Cleary, J.P., et al., *Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function*. Nature neuroscience, 2005. **8**(1): p. 79-84.
48. Hu, X., et al., *Amyloid seeds formed by cellular uptake, concentration, and aggregation of the amyloid-beta peptide*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(48): p. 20324-20329.
49. Snyder, S.W., et al., *Amyloid-beta aggregation: selective inhibition of aggregation in mixtures of amyloid with different chain lengths*. Biophysical journal, 1994. **67**(3): p. 1216-1228.
50. Parbhu, A., et al., *Imaging real-time aggregation of amyloid beta protein (1–42) by atomic force microscopy*. Peptides, 2002. **23**(7): p. 1265-1270.
51. Gandy, S., et al., *Days to criterion as an indicator of toxicity associated with human Alzheimer amyloid- β oligomers*. Annals of neurology, 2010. **68**(2): p. 220-230.
52. Patel, A.N. and J.H. Jhamandas, *Neuronal receptors as targets for the action of amyloid-beta protein (A [β]) in the brain*. Expert reviews in molecular medicine, 2012. **14**.
53. Sepúlveda, F.J., et al., *Nature of the neurotoxic membrane actions of amyloid- β on hippocampal neurons in Alzheimer's disease*. Neurobiology of Aging, 2014. **35**: p. 472e481.
54. Sepulveda, F.J., et al., *Synaptotoxicity of Alzheimer beta amyloid can be explained by its membrane perforating property*. PloS one, 2010. **5**(7): p. e11820.
55. Chakroborty, S. and G.E. Stutzmann, *Calcium channelopathies and Alzheimer's disease: insight into therapeutic success and failures*. European journal of pharmacology, 2014. **739**: p. 83-95.
56. Cardoso, S.M., R.H. Swerdlow, and C.R. Oliveira, *Induction of cytochrome c-mediated apoptosis by amyloid β 25-35 requires functional mitochondria*. Brain research, 2002. **931**(2): p. 117-125.
57. Panes, J.D., et al., *Changes in PGC-1 α /SIRT1 Signaling Impact on Mitochondrial Homeostasis in Amyloid-Beta Peptide Toxicity Model*. Frontiers in Pharmacology, 2020. **11**.
58. Wang, X., et al., *Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2014. **1842**(8): p. 1240-1247.

59. Moreira, P.I., et al., *Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2010. **1802**(1): p. 2-10.
60. Zhu, X., et al., *Abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. *Journal of Alzheimer's disease*, 2013. **33**(s1): p. S253-S262.
61. Sheng, B., et al., *Impaired mitochondrial biogenesis contributes to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease*. *Journal of neurochemistry*, 2012. **120**(3): p. 419-429.
62. Qin, W., et al., *PGC-1 α expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia*. *Archives of neurology*, 2009. **66**(3): p. 352-361.
63. Kinney, J.W., et al., *Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease*. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 2018. **4**: p. 575-590.
64. Heppner, F.L., R.M. Ransohoff, and B. Becher, *Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease*. *Nature Reviews Neuroscience*, 2015. **16**(6): p. 358.
65. McGeer, P.L., J. Rogers, and E.G. McGeer, *Inflammation, antiinflammatory agents, and Alzheimer's disease: the last 22 years*. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2016. **54**(3): p. 853-857.
66. Molz, S., et al., *Purine receptors are required for DHA-mediated neuroprotection against oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices*. *Purinergic signalling*, 2015. **11**(1): p. 117-126.
67. Couillin, I., A. Gombault, and L. Baron, *ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation*. *Frontiers in immunology*, 2013. **3**: p. 414.
68. Ratajczak, M.Z., et al., *ATP-Nlrp3 inflammasome-complement cascade axis in sterile brain inflammation in psychiatric patients and its impact on stem cell trafficking*. *Stem cell reviews and reports*, 2019. **15**(4): p. 497-505.
69. Burnstock, G., *Historical review: ATP as a neurotransmitter*. *Trends in pharmacological sciences*, 2006. **27**(3): p. 166-176.
70. Khakh, B.S. and R.A. North, *Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS*. *Neuron*, 2012. **76**(1): p. 51-69.
71. Di Virgilio, F., et al., *The P2X7 receptor in infection and inflammation*. *Immunity*, 2017. **47**(1): p. 15-31.
72. Di Virgilio, F., G. Schmalzing, and F. Markwardt, *The elusive P2X7 macropore*. *Trends in cell biology*, 2018. **28**(5): p. 392-404.
73. Godoy, P.A., O. Ramírez-Molina, and J. Fuentealba, *Exploring the Role of P2X Receptors in Alzheimer's Disease*. *Frontiers in Pharmacology*, 2019. **10**(1330).
74. Parvathenani, L.K., et al., *P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(15): p. 13309-13317.
75. McLarnon, J.G., et al., *Upregulated Expression of Purinergic P2X7 Receptor in Alzheimer Disease and Amyloid- β Peptide-Treated Microglia and in Peptide-Injected Rat Hippocampus*. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2006. **65**(11): p. 1090-1097 10.1097/01.jnen.0000240470.97295.d3.
76. Martin, E., et al., *New role of P2X7 receptor in an Alzheimer's disease mouse model*. *Molecular psychiatry*, 2019. **24**(1): p. 108.
77. Varma, R., et al., *Amyloid- β induces a caspase-mediated cleavage of P2X4 to promote purinotoxicity*. *Neuromolecular medicine*, 2009. **11**(2): p. 63-75.

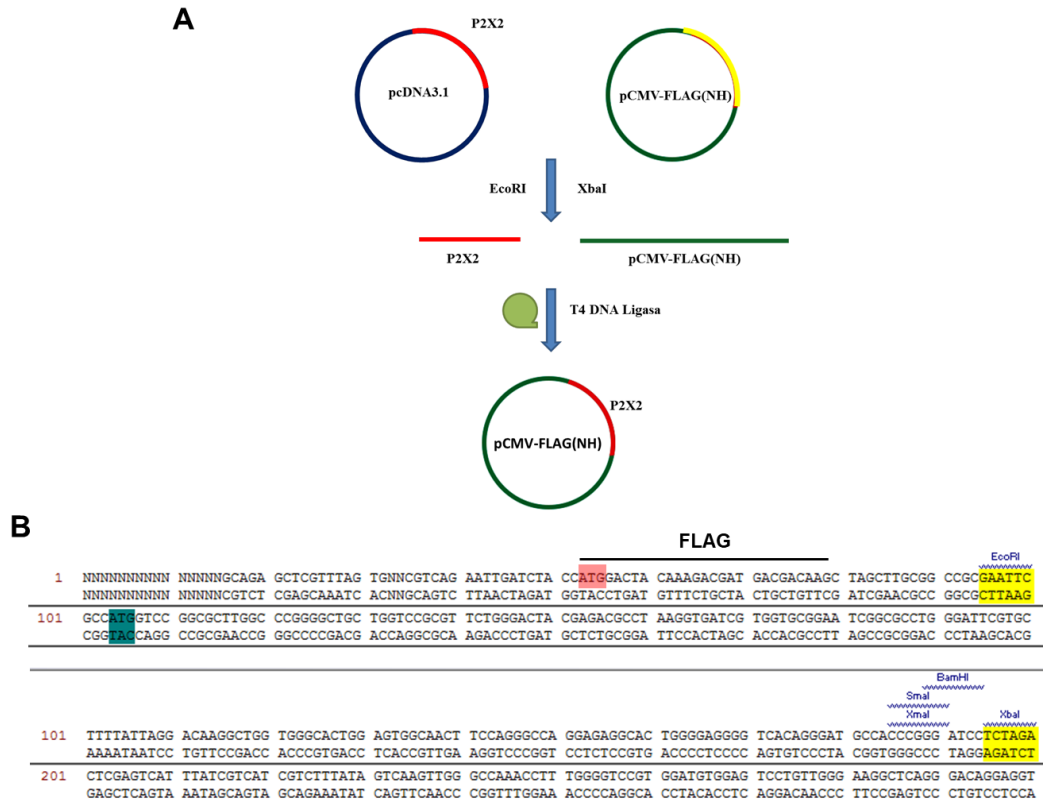
78. Saez-Orellana, F., et al., *ATP leakage induces P2XR activation and contributes to acute synaptic excitotoxicity induced by soluble oligomers of beta-amyloid peptide in hippocampal neurons*. *Neuropharmacology*, 2016. **100**: p. 116-23.
79. Li, C., *Novel mechanism of inhibition by the P2 receptor antagonist PPADS of ATP-activated current in dorsal root ganglion neurons*. *Journal of Neurophysiology*, 2000. **83**(5): p. 2533-2541.
80. Saez-Orellana, F., et al., *P2X receptor overexpression induced by soluble oligomers of amyloid beta peptide potentiates synaptic failure and neuronal dyshomeostasis in cellular models of Alzheimer's disease*. *Neuropharmacology*, 2018. **128**: p. 366-378.
81. Brake, A.J., M.J. Wagenbach, and D. Julius, *New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor*. *Nature*, 1994. **371**(6497): p. 519.
82. Kanjhan, R., et al., *Distribution of the P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channels in the rat central nervous system*. *Journal of Comparative Neurology*, 1999. **407**(1): p. 11-32.
83. Soto, F. and M.E. Rubio, *Cloned P2X receptor subunits in cerebellum and hippocampus*. *Drug development research*, 2001. **52**(1-2): p. 133-139.
84. Rodrigues, R.J., et al., *Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus*. *Journal of Neuroscience*, 2005. **25**(27): p. 6286-6295.
85. Sáez-Orellana, F., et al., *Modulation of the neuronal network activity by P2X receptors and their involvement in neurological disorders*. *Pharmacological Research*, 2015. **101**: p. 109-115.
86. Kaczmarek-Hájek, K., et al., *Molecular and functional properties of P2X receptors—recent progress and persisting challenges*. *Purinergic signalling*, 2012. **8**(3): p. 375-417.
87. Coddou, C., et al., *Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels*. *Pharmacological reviews*, 2011. **63**(3): p. 641-683.
88. Simon, J., et al., *Localization and functional expression of splice variants of the P2X2 receptor*. *Molecular Pharmacology*, 1997. **52**(2): p. 237-248.
89. Russo, T., et al., *Fe65 and the protein network centered around the cytosolic domain of the Alzheimer's β -amyloid precursor protein*. *FEBS letters*, 1998. **434**(1-2): p. 1-7.
90. Schettini, G., et al., *Phosphorylation of APP-CTF-AICD domains and interaction with adaptor proteins: signal transduction and/or transcriptional role—relevance for Alzheimer pathology*. *Journal of neurochemistry*, 2010. **115**(6): p. 1299-1308.
91. McLoughlin, D.M. and C.C. Miller, *The FE65 proteins and Alzheimer's disease*. *Journal of neuroscience research*, 2008. **86**(4): p. 744-754.
92. Masin, M., et al., *Fe65 interacts with P2X2 subunits at excitatory synapses and modulates receptor function*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(7): p. 4100-4108.
93. Espanel, X. and M. Sudol, *A single point mutation in a group I WW domain shifts its specificity to that of group II WW domains*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(24): p. 17284-17289.
94. Lanier, L.M., et al., *Mena is required for neurulation and commissure formation*. *Neuron*, 1999. **22**(2): p. 313-325.
95. Lee, E.J., et al., *Human NIMA-related kinase 6 is one of the Fe65 WW domain binding proteins*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2007. **358**(3): p. 783-788.

96. Pohlkamp, T., C.R. Wasser, and J. Herz, *Functional roles of the interaction of APP and lipoprotein receptors*. *Frontiers in molecular neuroscience*, 2017. **10**: p. 54.
97. Perez, R.G., et al., *Mutagenesis identifies new signals for β -amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including A β 42*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(27): p. 18851-18856.
98. Borg, J.-P., et al., *The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein*. *Molecular and cellular biology*, 1996. **16**(11): p. 6229-6241.
99. Jiang, S., et al., *Trafficking regulation of proteins in Alzheimer's disease*. *Molecular neurodegeneration*, 2014. **9**(1): p. 1-13.
100. Ando, K., et al., *Phosphorylation-dependent regulation of the interaction of amyloid precursor protein with Fe65 affects the production of β -amyloid*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(43): p. 40353-40361.
101. Santiard-Baron, D., et al., *Expression of human FE65 in amyloid precursor protein transgenic mice is associated with a reduction in β -amyloid load*. *Journal of neurochemistry*, 2005. **93**(2): p. 330-338.
102. Barbagallo, A.P., et al., *Tyr 682 in the intracellular domain of APP regulates amyloidogenic APP processing in vivo*. *PLoS one*, 2010. **5**(11): p. e15503.
103. Lau, K., et al., *FE65 serine-610 phosphorylation and its functional implications in Alzheimer disease amyloid precursor protein processing*. *Hong Kong Med J*, 2019. **25**(5 Supplement 7).
104. Lee, Y.S., W.N.V. Chow, and K.-F. Lau, *Phosphorylation of FE65 at threonine 579 by GSK3 β stimulates amyloid precursor protein processing*. *Scientific reports*, 2017. **7**(1): p. 1-10.
105. Pietrzik, C.U., et al., *FE65 constitutes the functional link between the low-density lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein*. *Journal of Neuroscience*, 2004. **24**(17): p. 4259-4265.
106. Szögi, T., et al., *Effects of the Pentapeptide P33 on Memory and Synaptic Plasticity in APP/PS1 Transgenic Mice: A Novel Mechanism Presenting the Protein Fe65 as a Target*. *International journal of molecular sciences*, 2019. **20**(12): p. 3050.
107. Nakaya, T. and T. Suzuki, *Role of APP phosphorylation in FE65-dependent gene transactivation mediated by AICD*. *Genes to Cells*, 2006. **11**(6): p. 633-645.
108. Beckett, C., et al., *Nuclear signalling by membrane protein intracellular domains: the AICD enigma*. *Cellular signalling*, 2012. **24**(2): p. 402-409.
109. Koistinen, N.A., et al., *Nuclear localization of amyloid- β precursor protein-binding protein Fe65 is dependent on regulated intramembrane proteolysis*. *PLoS one*, 2017. **12**(3): p. e0173888.
110. Robinson, A., et al., *Upregulation of PGC-1 α expression by Alzheimer's disease-associated pathway: presenilin 1/amyloid precursor protein (APP)/intracellular domain of APP*. *Aging cell*, 2014. **13**(2): p. 263-272.
111. Fernandez-Marcos, P.J. and J. Auwerx, *Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis*. *The American journal of clinical nutrition*, 2011. **93**(4): p. 884S-890S.
112. Mirra, S.S., et al., *Interlaboratory comparison of neuropathology assessments in Alzheimer's disease: a study of the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD)*. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 1994. **53**(3): p. 303-315.

113. Fuentealba, J., et al., *Synaptic failure and adenosine triphosphate imbalance induced by amyloid-beta aggregates are prevented by blueberry-enriched polyphenols extract*. J Neurosci Res, 2011. **89**(9): p. 1499-508.
114. Fuentealba, J., et al., *Synaptic silencing and plasma membrane dyshomeostasis induced by amyloid-beta peptide are prevented by Aristotelia chilensis enriched extract*. J Alzheimers Dis, 2012. **31**(4): p. 879-89.
115. Dunn, K.W., M.M. Kamocka, and J.H. McDonald, *A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2011. **300**(4): p. C723-C742.
116. Torres, G.E., T.M. Egan, and M.M. Voigt, *N-Linked glycosylation is essential for the functional expression of the recombinant P2X2 receptor*. Biochemistry, 1998. **37**(42): p. 14845-14851.
117. Godoy, P.A., *El péptido β -amiloide aumenta los niveles del receptor P2X2, lo que afecta el procesamiento de APP, pudiendo potenciar los mecanismos de toxicidad del péptido*. 2015.
118. Dove, S., O. Hoegh-Guldberg, and S. Ranganathan, *Major colour patterns of reef-building corals are due to a family of GFP-like proteins*. Coral reefs, 2001. **19**(3): p. 197-204.
119. Rokic, M.B., et al., *Opposing roles of calcium and intracellular ATP on gating of the purinergic P2X2 receptor channel*. International journal of molecular sciences, 2018. **19**(4): p. 1161.
120. Probst, S., et al., *Fe65 is the sole member of its family that mediates transcription regulated by the amyloid precursor protein*. Journal of Cell Science, 2020. **133**(17).
121. Mandelkow, E.-M. and E. Mandelkow, *Tau in Alzheimer's disease*. Trends in cell biology, 1998. **8**(11): p. 425-427.
122. Sevigny, J., et al., *The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease*. Nature, 2016. **537**(7618): p. 50-56.
123. Dhillon, S., *Aducanumab: first approval*. Drugs, 2021. **81**(12): p. 1437-1443.
124. Shankar, G.M., et al., *Natural oligomers of the Alzheimer amyloid- β protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway*. Journal of Neuroscience, 2007. **27**(11): p. 2866-2875.
125. Hanson, J.E., et al., *GluN2A NMDA receptor enhancement improves brain oscillations, synchrony, and cognitive functions in Dravet syndrome and Alzheimer's disease models*. Cell reports, 2020. **30**(2): p. 381-396. e4.
126. Li, D.-D., et al., *Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials on the Efficacy and Safety of Donepezil, Galantamine, Rivastigmine, and Memantine for the Treatment of Alzheimer's Disease*. Frontiers in Neuroscience, 2019. **13**(472).
127. Khakh, B.S., et al., *Activation-dependent changes in receptor distribution and dendritic morphology in hippocampal neurons expressing P2X2-green fluorescent protein receptors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(9): p. 5288-5293.
128. Ueno, S., et al., *Involvement of P2X2 and P2X3 receptors in neuropathic pain in a mouse model of chronic constriction injury*. Drug development research, 2003. **59**(1): p. 104-111.
129. Cavaliere, F., et al., *Up-regulation of P2X2, P2X4 receptor and ischemic cell death: prevention by P2 antagonists*. Neuroscience, 2003. **120**(1): p. 85-98.
130. Kukley, M., et al., *Distribution of P2X receptors on astrocytes in juvenile rat hippocampus*. Glia, 2001. **36**(1): p. 11-21.

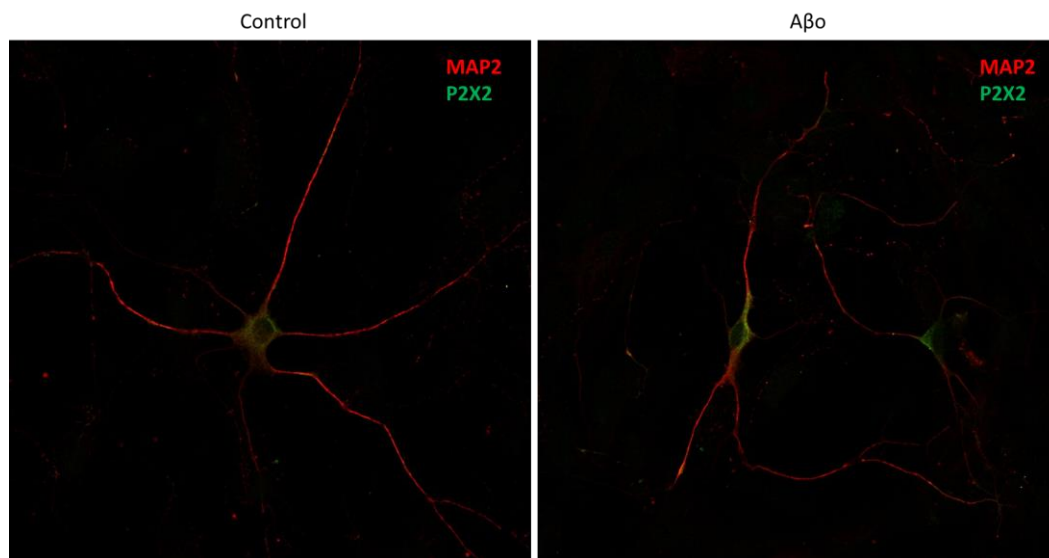
131. Xu, P., et al., *GSAP regulates lipid homeostasis and mitochondrial function associated with Alzheimer's disease*. Journal of Experimental Medicine, 2021. **218**(8): p. e20202446.
132. Trommsdorff, M., et al., *Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(50): p. 33556-33560.
133. Kwon, O.Y., et al., *Dab1 binds to Fe65 and diminishes the effect of Fe65 or LRP1 on APP processing*. Journal of cellular biochemistry, 2010. **111**(2): p. 508-519.
134. Cam, J.A., et al., *The low density lipoprotein receptor-related protein 1B retains β -amyloid precursor protein at the cell surface and reduces amyloid- β peptide production*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(28): p. 29639-29646.
135. Rolland, M., et al., *Effect of A β oligomers on neuronal APP triggers a vicious cycle leading to the propagation of synaptic plasticity alterations to healthy neurons*. Journal of Neuroscience, 2020.
136. Swanson, K.D., C. Reigh, and G.E. Landreth, *ATP-stimulated activation of the mitogen-activated protein kinases through ionotropic P2X2 purinoreceptors in PC12 cells: difference in purinoreceptor sensitivity in two PC12 cell lines*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(32): p. 19965-19971.
137. Schindelholz, B. and B.F. Reber, *L-type Ca $^{2+}$ channels and purinergic P2X2 cation channels participate in calcium-tyrosine kinase-mediated PC12 growth cone arrest*. European Journal of Neuroscience, 2000. **12**(1): p. 194-204.
138. Cao, X. and T.C. Südhof, *A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60*. Science, 2001. **293**(5527): p. 115-120.
139. Probst, S., et al., *Fe65 is the sole member of its family that mediates transcription regulated by the amyloid precursor protein*. Journal of cell science, 2020. **133**(17): p. jcs242917.
140. Minopoli, G., et al., *The β -amyloid precursor protein functions as a cytosolic anchoring site that prevents Fe65 nuclear translocation*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(9): p. 6545-6550.
141. Nakaya, T., T. Kawai, and T. Suzuki, *Regulation of FE65 nuclear translocation and function by amyloid β -protein precursor in osmotically stressed cells*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(27): p. 19119-19131.
142. Godoy, P.A., et al., *Increased P2 \times 2 receptors induced by amyloid- β peptide participates in the neurotoxicity in alzheimer's disease*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021. **142**: p. 111968.

IX. ANEXOS



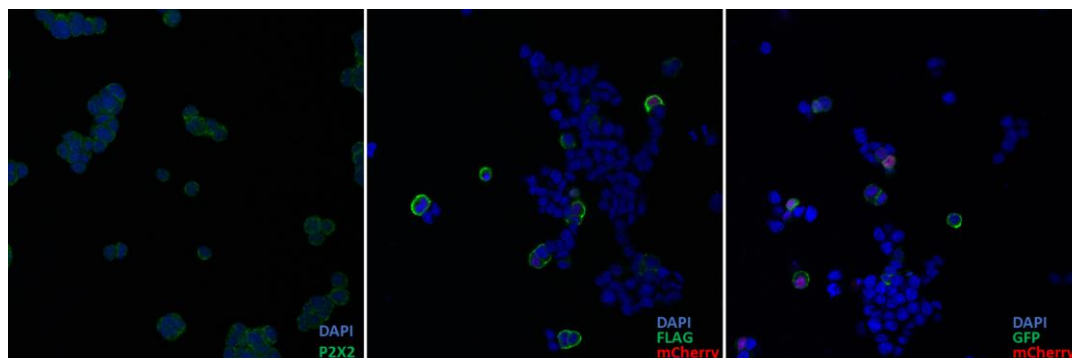
Anexo 1. Subclonamiento para obtener plásmido FLAG-P2X2a.

A. Esquema de cómo se realizó la digestión de los plásmidos iniciales con las enzimas EcoRI y XbaI, y la posterior ligación del inserto obtenido y el vector receptor linealizados para obtener el vector pCMVFLAG(NH)-P2X2. **B.** Secuenciamiento del vector obtenido. Arriba se observan los primeros 200 pares de bases de la secuencia *forward* del vector; se destaca la secuencia del FLAG, el sitio de restricción para la enzima EcoRI y además, en rojo el codón de inicio ATG del FLAG y en verde de P2X2. Abajo se puede ver el secuenciamiento *reverse* del vector, donde también se muestran los primeros 200 pares de bases y el sitio de restricción para la enzima XbaI.



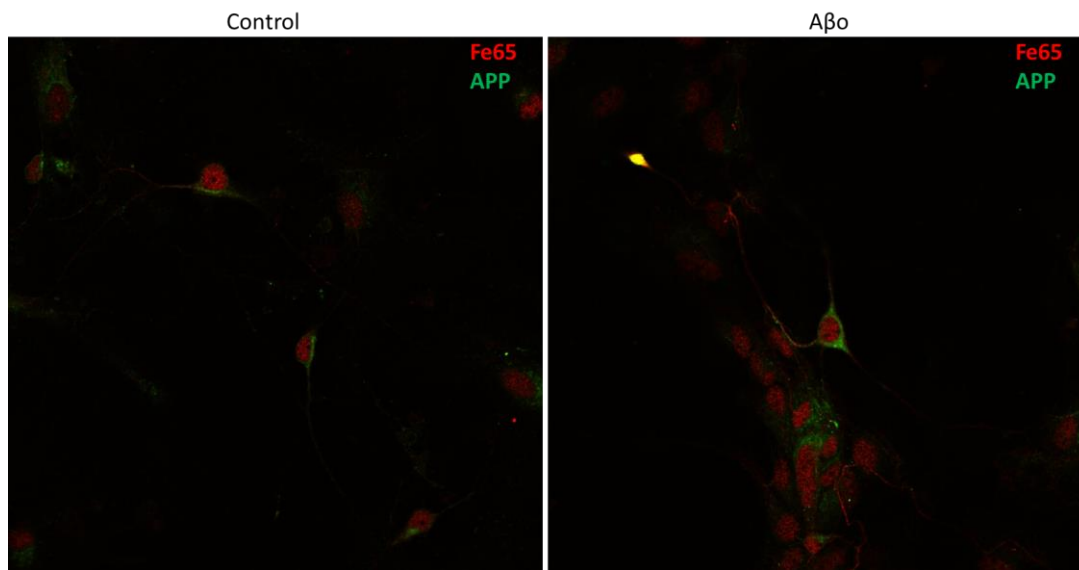
Anexo 2. Inmunofluorescencia de P2X2 neuronas hipocampales

Imagen original de las inmunofluorescencia en neuronas hipocampales control y tratadas con A β o 0,5 μ M por 24 horas. En rojo se observa el inmunomarcaje para MAP2 y en verde para P2X2.



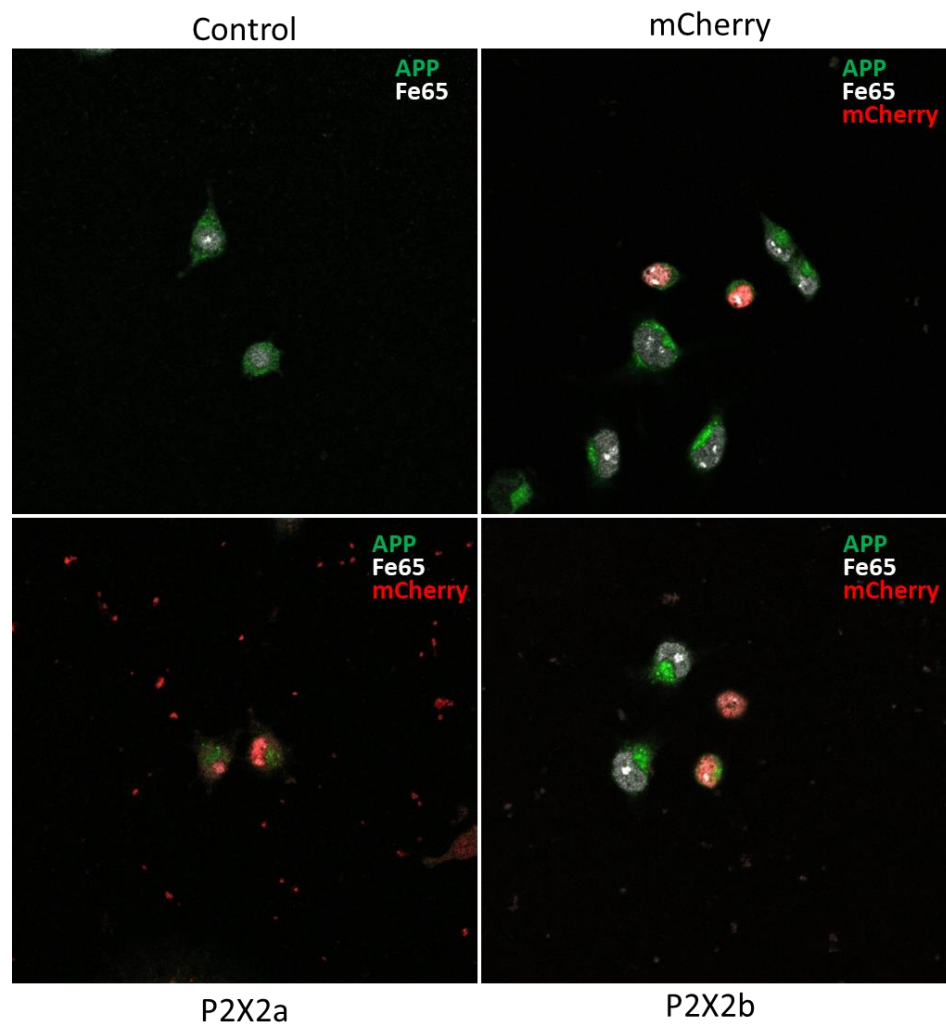
Anexo 3. Inmunofluorescencia de células PC12 transfectadas

Imagenes originales de las inmunofluorescencia en células PC12 control y transfectadas para expresar FLAG-P2X2a o P2X2b-GFP. En azul se observa DAPI, en rojo la fluorescencia de mCherry y en verde el inmunomarcaje para P2X2, FLAG o la fluorescencia de GFP, respectivamente.



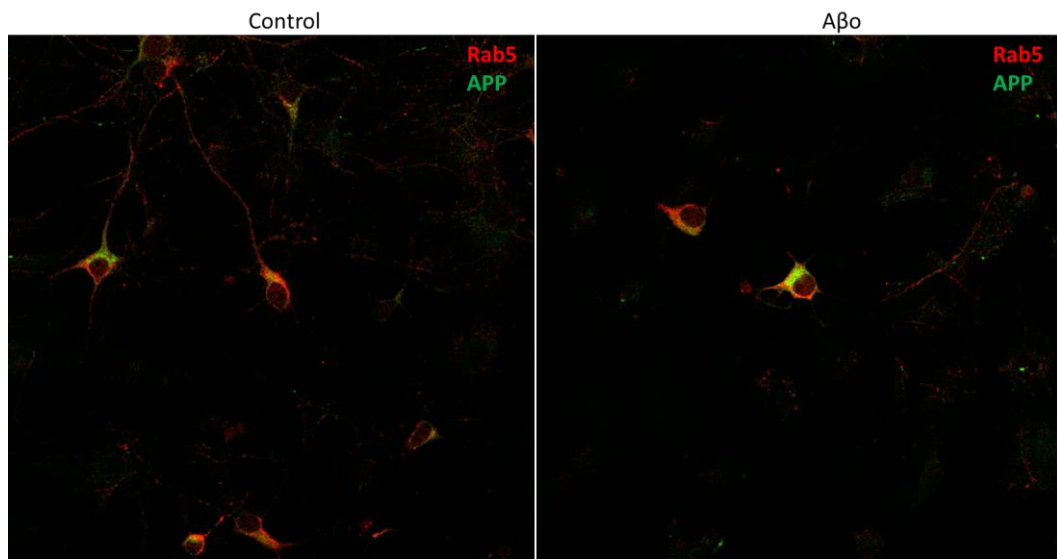
Anexo 4. Inmunofluorescencia de APP y Fe65 en neuronas hipocampales

Imágenes originales de las inmunofluorescencia en neuronas hipocampales control y tratadas con Aβo 0,5 μM por 24 horas. En rojo se observa el inmunomarcaje para Fe65 y en verde para APP.



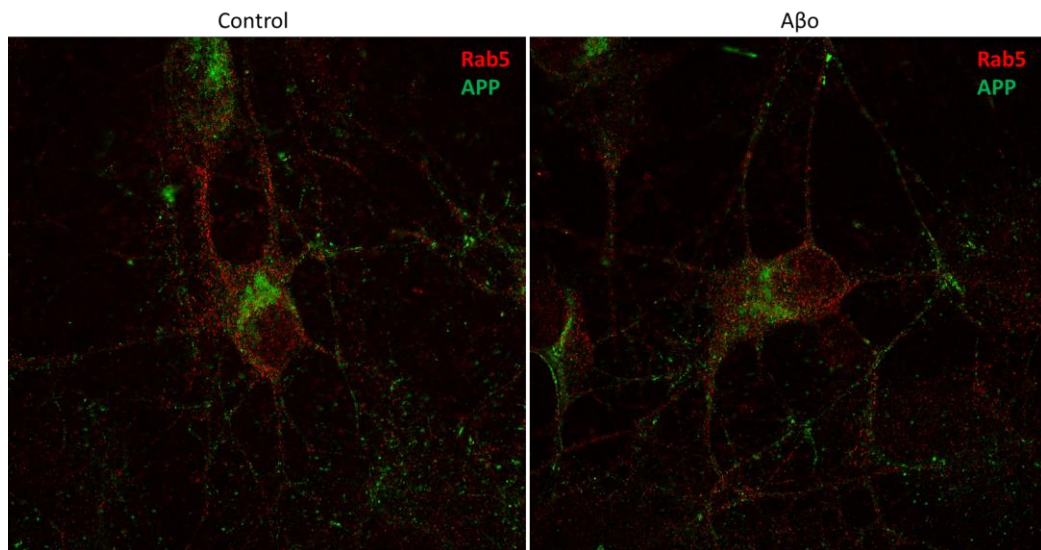
Anexo 5. Inmunofluorescencia de APP y Fe65 en células PC12

Imágenes originales de la inmunofluorescencia en células PC12 control y transfectadas con mCherry y P2X2a o P2X2b. En blanco se observa el inmunomarcado para Fe65, en verde para APP y en rojo la fluorescencia de mCherry.



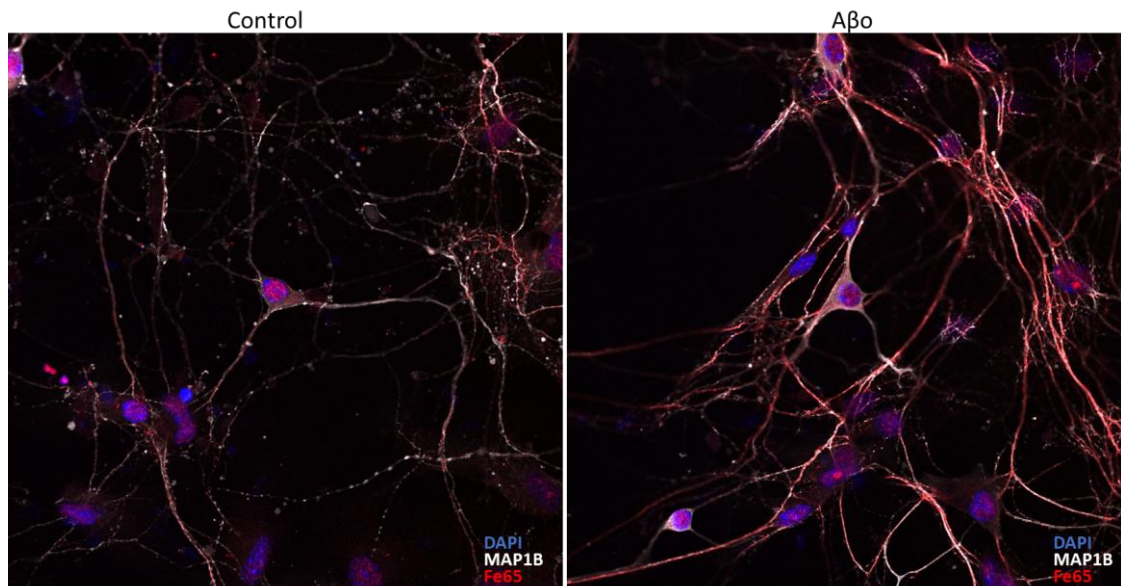
Anexo 6. Inmunofluorescencia de APP y Rab5 en neuronas hipocampales

Imágenes originales de las inmunofluorescencias obtenidas en microscopio confocal de neuronas hipocampales control y tratadas con Aβo 0,5 μM por 24 horas. En rojo se observa el inmunomarcado para Rab5 y en verde para APP.



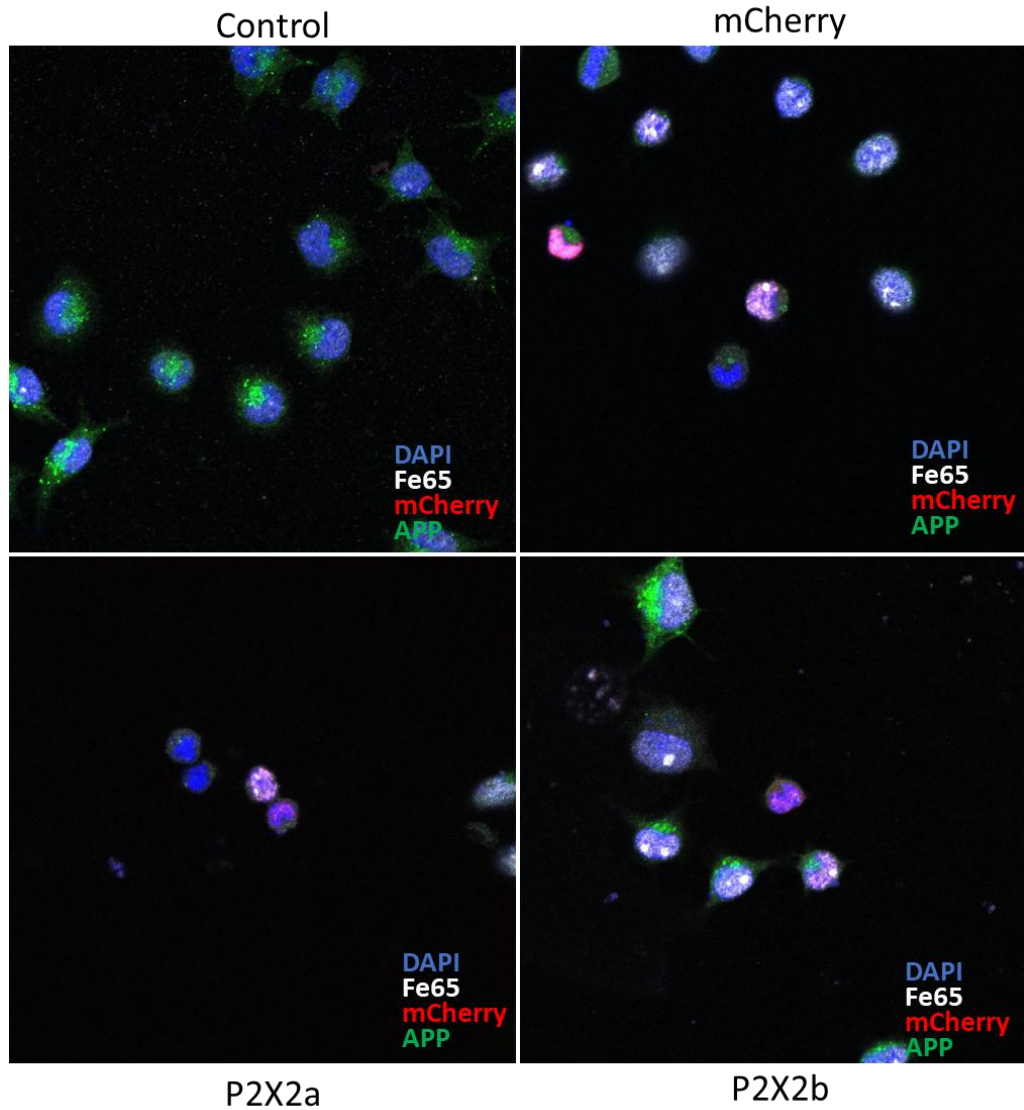
Anexo 7. Inmunofluorescencia superresolución de APP y Rab5 en neuronas hipocampales

Imágenes originales de las inmunofluorescencias obtenidas en microscopio de superresolución de neuronas hipocampales control y tratadas con Aβo 0,5 μM por 24 horas. En rojo se observa el inmunomarcado para Rab5 y en verde para APP.



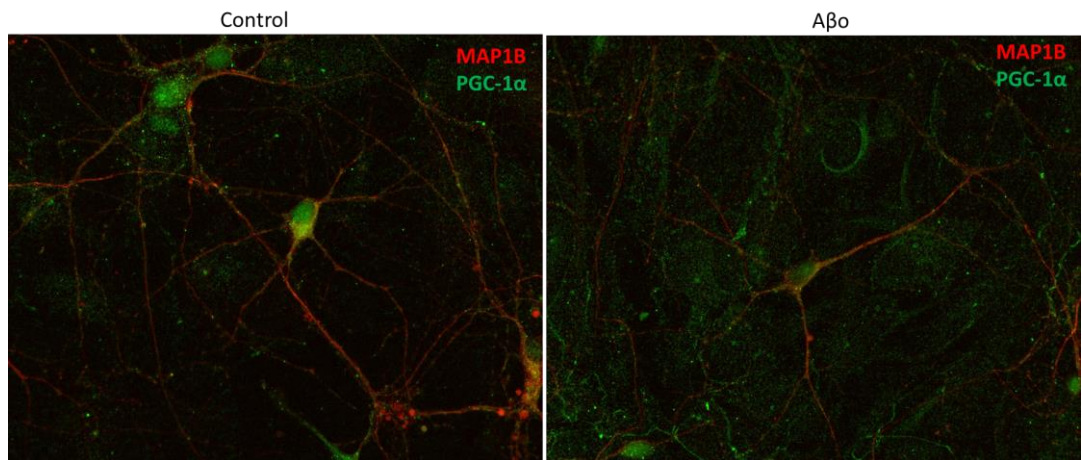
Anexo 8. Inmunofluorescencia de Fe65 en neuronas hipocampales

Imágenes originales de la inmunofluorescencia obtenidas en neuronas hipocampales control y tratadas con A β o 0,5 μ M por 24 horas. En rojo se observa el inmunomarcaje para Fe65, en blanco para MAP1B y en azul DAPI.



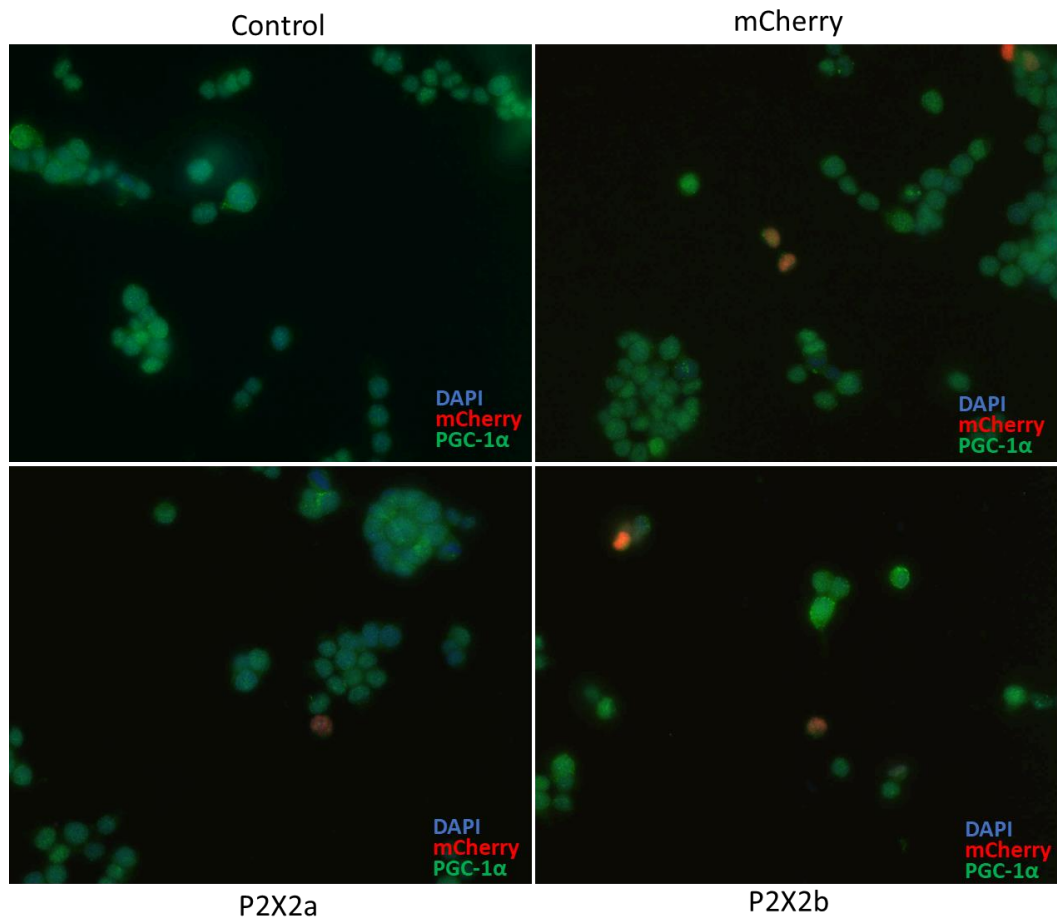
Anexo 9. Inmunofluorescencia de Fe65 en células PC12

Imágenes originales de la inmunofluorescencia en células PC12 control y transfectadas con mCherry y P2X2a o P2X2b. En blanco se observa el inmunomarcaje para Fe65, en verde para APP, en rojo la fluorescencia de mCherry y en azul DAPI.



Anexo 10. Inmunofluorescencia de PGC-1 α en neuronas hipocampales

Imágenes originales de las inmunofluorescencias obtenidas en neuronas hipocampales control y tratadas con A β o 0,5 μ M por 24 horas. En rojo se observa el inmunomarcado para MAP1B y en verde para PGC-1 α .



Anexo 11. Inmunofluorescencia de PGC-1 α en células PC12

Imágenes originales de la inmunofluorescencia en células PC12 control y transfectadas con mCherry y P2X2a o P2X2b. En verde se observa el inmunomarcaje para PGC-1 α , en rojo la fluorescencia de mCherry y en azul DAPI.