



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

**“EFECTOS DE LA ACTIVACIÓN DE CALPAÍNAS
MEDIADA POR EL RECEPTOR P2X2 SOBRE LA VÍA
AMILOIDOGÉNICA EN LA ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER”.**

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

JAVIERA ANDREA GAVILAN GAVILAN
CONCEPCIÓN-CHILE
2025

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 Patricio Fuentealba Arcos
Profesor Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Patricio Alejandro Castro Maldonado
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Roberto Javier Elizondo Vega
Facultad de Ciencias Biológicas

Dra. Cheril Cecilia Tapia Rojas
Profesora Evaluadora Externa
Universidad San Sebastián

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

Presentación

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

Presentaciones a congresos nacionales e internacionales:

- **J. Gavilán**, S. Escamilla, I. Cuchillo-Ibáñez, C. Coddou, N. Espinoza-Rubilar, J. Panes-Fernández, O. Ramírez-Molina, O. Flores-Núñez, A. Pinto, R. Durán, M. Mesa and J. Fuentealba. P2X2R/calpain-1 activation axis enhances the amyloidogenic pathway and beta-amyloid peptide formation in Alzheimer's disease. XLV Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. Viña del Mar, Chile. 11 al 14 de noviembre de 2024.
- **J. Gavilan**, J. Panes-Fernandez, P. Godoy, O. Ramirez-Molina, P. Castro, G. Yevenes, G. Moraga and J. Fuentealba. Increases calpain-1 levels by P2X2R activation promote the amyloidogenic pathway and beta-amyloid peptide generation. 11th IBRO World Congress of Neuroscience. Granada, España. 9 al 13 de septiembre de 2023
- **J. Gavilan**, J. Panes-Fernandez, P. Godoy, O. Ramirez-Molina, P. Castro, C. Muñoz, G. Yevenes, G. Moraga and J. Fuentealba. Increases calpain-1 levels by P2X2R activation promote the amyloidogenic pathway and beta-amyloid peptide generation. XLIII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. Punta Arenas, Chile. 5 al 12 de diciembre de 2022.

- **J. Gavilan**, J. Panes-Fernandez, P. A. Godoy, O. Ramirez, R. Duran, P. A. Castro, C. Munoz-Montesinos, G. Yevenes, G. Moraga, E. L. Jara and J. Fuentealba. Increases calpain-1 levels by P2X2R activation promote the Abeta peptide generation & potentiate their cellular toxicity. Neuroscience. San Diego, USA. 12 al 16 de noviembre de 2022.

Publicaciones:

- **Javiera Gavilán**, Claudia Mardones, Gabriela Oyarce, Sergio Triviño, Nicole Espinoza-Rubilar, Oscar Ramírez-Molina, Claudia Pérez, José Becerra, Patricio Varas, Robinson Duran-Arcos, Carola Muñoz-Montesino, Gustavo Moraga-Cid, Gonzalo E. Yévenes and Jorge Fuentealba (2023). Elephant Black Garlic's Beneficial Properties for Hippocampal Neuronal Network, Chemical Characterization and Biological Evaluation. Foods, 12(21):3968. DOI: 10.3390/foods12213968.
- Jessica Panes Fernández; Pamela A. Godoy; **Javiera Gavilán**; Oscar Ramírez-Molina; Carlos Felipe Burgos; Ana Maria Marileo; Oscar Flores-Núñez; Patricio A. Castro; Gustavo Moraga-Cid; Gonzalo E. Yévenes; Carola Muñoz-Montesino and Jorge Fuentealba (2023). TG2 promotes the amyloid beta aggregates: Impact on ER-mitochondria crosstalk, Ca²⁺ homeostasis and synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. Biomedicine & Pharmacotherapy, 162:114596 DOI: 10.1016/j.biopha.2023. 114596.
- Ana M. Marileo, **Javiera Gavilán**, Victoria P. San Martín, Cesar O. Lara, Anggelo Sazo, Carola Muñoz-Montesino, Patricio A. Castro, Carlos F. Burgos, Elías Leiva-Salcedo, Luis G. Aguayo, Gustavo Moraga-Cid, Jorge Fuentealba and Gonzalo E. Yévenes (2023). Modulation of GABAA receptors and of GABAergic synapses by the natural alkaloid gelsemine.

Frontiers in Molecular Neuroscience, 15:772. DOI: 10.3389/fnmol.2022.1083189.

- Castillo, C., Bravo-Arrepol, G., Wendt, A., Saez-Orellana, F., Millar, C., Burgos, CF., **Gavilán, J.**, Pacheco, C., Ahumada-Rudolph, R., Napiórkowska, M., Pérez, C., Becerra, J., Fuentealba, J. and Cabrera-Pardo, J. (2022). Neuroprotective Properties of Eudesmin on a Cellular Model of Amyloid- β Peptide Toxicity. *Journal of Alzheimer's Disease*, p. 1-12. DOI: 10.3233/JAD-220935.
- Panes JD, Godoy PA, Silva-Grecchi T, Celis MT, Ramirez-Molina O, **Gavilan J**, Muñoz-Montecino C, Castro PA, Moraga-Cid G, Yévenes GE, Guzmán L, Salisbury JL, Trushina E and Fuentealba J (2020) Changes in PGC-1a/SIRT1 Signaling Impact on Mitochondrial Homeostasis in Amyloid-Beta Peptide Toxicity Model. *Front. Pharmacol.* 11:709. DOI: 10.3389/fphar.2020.00709.
- Cabrera-Pardo, J. R., Fuentealba, J., **Gavilán, J.**, Cajas, D., Becerra, J., & Napiórkowska, M. (2020). Exploring the multi-target neuroprotective chemical space of benzofuran scaffolds: a new strategy in drug development for Alzheimer's Disease. *Frontiers in Pharmacology*, 10: 1679. DOI: 10.3389/fphar.2019.01679.

Premios

- Premio al mejor póster en el área de Farmacología «Prof. Dr. Jorge Mardones Restat». XLIII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Punta Arenas, Chile. Diciembre 2022.

- Segundo lugar en la actividad «poster day» de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, en la categoría «presentación de investigación en 3 minutos» para estudiantes de postgrado. Noviembre 2021.

Becas

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

- Beca ANID 21200612 para Estudios de Doctorado en Chile. Se obtuvo el primer lugar de 2600 postulantes del país. Enero de 2020.
- Beneficio complementario Beca ANID 21200612 para Gastos Operacionales del Proyecto de Tesis Doctoral. Julio de 2022.
- Extensión de Beca de Doctorado ANID 21200612 por pandemia COVID-19. Mayo de 2023.
- Beneficio complementario Beca ANID 21200612 para Pasantía Doctoral en el Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández, Alicante, España. Septiembre de 2023.
- Beneficio complementario Beca ANID 21200612 Extensión para Redacción de Tesis Doctoral. Enero de 2024.

Financiamiento

Esta tesis fue financiada por los proyectos Fondecyt 1161078 y 1200908.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi director de tesis, Dr. Jorge Fuentealba Arcos por su constante apoyo y guía durante la realización de esta tesis doctoral, lo que me ha permitido potenciar mis habilidades como científica y adquirir pensamiento crítico.

También quiero agradecer a los profesores integrantes de esta comisión evaluadora, Dra. Cheril Tapia, Dra. María de los Ángeles García, Dr. Roberto Elizondo y Dr. Ariel Castro, quienes se dieron el tiempo de leer mi proyecto de tesis, así como mis avances y el manuscrito final de esta tesis, y realizaron críticas constructivas que me ayudaron a mejorar la calidad de mi trabajo.

Al equipo técnico del Dpto. de Fisiología, especialmente a Ixia Cid y Jocelin González, por todo su apoyo y buena disposición durante la realización de esta tesis, y por esa amistad y confianza indestructible, que ha trascendido por años.

A mis compañeros de laboratorio, Dra. Jessica Panes, Oscar Ramírez y Dra. Pamela Godoy, por su ayuda en los experimentos, las constantes discusiones científicas y el compañerismo que hace más agradable el trabajo diario.

Al Dr. Claudio Coddou, por recibirme en el Laboratorio de Señalización Purinérgica (Facultad de Medicina) de la Universidad Católica del norte, lo que me permitió adquirir experiencia en el campo de la farmacología optogenética.

Al Dr. Thomas Grutter (University of Strasbourg) por facilitar el plásmido con la mutación P2X2R-I328C y la pinza óptica MEA-TMA necesarios para la ejecución de los experimentos.

A la Dra. Inmaculada Cuchillo Ibáñez y al Dr. Javier Sáez Valero por recibirme en su laboratorio durante mi pasantía doctoral, en el Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández, Alicante, España. Agradezco también al equipo de este laboratorio, en especial a Sergio Escamilla, Carlos, Carmen y María de los Ángeles, por su buena disposición, por enseñarme nuevas estrategias experimentales y el trabajo con muestras humanas, y también por todas las risas y los buenos momentos, que perdurarán por siempre en mi mente.

Al Dr. Gonzalo Yévenes, quien me motivó a entrar al doctorado, y ha tenido una excelente disposición para ayudarme con la redacción de papers.

Al Dr. Luis Aguayo, por facilitarnos el modelo transgénico APP/PS1, que fue utilizado en un grupo de experimentos.

A mi hijo, Joaquín, mi apoyo fundamental y mi gran motivación para continuar. Aunque haya días grises, contigo siempre sale el sol. Gracias por hacerme reír en nuestras caminatas y antes de dormir, con pequeños gestos me haces entender lo simple que es la vida.

A mi familia y amigos, mi gran apoyo, mi contención en los momentos difíciles. Principalmente a Rosa Gavilán, mi madre, la persona que se ha madrugado conmigo todos los días desde pequeña para que todo lo que soy hoy en día sea posible.

A mi abuela, gracias por tu amor e inmensa bondad, espero que en algún lugar me estés mirando y te sientas orgullosa. Tú, que desde pequeña me aconsejabas que debía ir a la Universidad y ser una gran mujer, esta tesis es para ti...

INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS	x
INDICE DE FIGURAS.....	xi
ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN.....	xxii
ABSTRACT.....	xxiv
I. INTRODUCCION	1
1. La enfermedad de Alzheimer.....	1
2. Diagnóstico de la EA	3
3. Rol del péptido beta-amiloide en la fisiopatología de la EA.....	8
4. ATP y receptores purinérgicos.....	13
5. Rol de P2XR en la EA	15
6. Proteasas con actividad dependiente de Ca ²⁺ : Calpaínas.....	18
7. Activación de calpaínas por receptores purinérgicos P2X7.....	22
8. Rol de las calpaínas en la vía amiloidogénica de la EA.....	25
II. HIPÓTESIS.....	30
III. OBJETIVOS.....	31
Objetivo general	31
Objetivos específicos.....	31
Objetivo específico 1.....	31
Objetivo específico 2.....	31
Objetivo específico 3.....	31
IV. METODOLOGÍA	32
1. Cultivo celular	32
2. Transfección	32
3. Animales	33
4. Preparación de muestras humanas	34
5. Fraccionamiento subcelular de muestras humanas	35
6. Western blot.....	37
7. Western Blot para detectar A β en muestras humanas.....	39

8. Inmunocitoquímica.....	42
9. Ensayo de actividad de calpaínas	44
10. Electrofisiología	45
11. Microfluorimetría de Ca ²⁺ citosólico	46
12. Análisis de datos.....	47
V. RESULTADOS	48
1. Estandarización de un modelo de sobreexpresión de P2X2R en células PC-12.....	48
2. Incrementos en los niveles de la proteína calpaína-1 inducidos por la activación del receptor purinérgico P2X2R.....	52
3. La activación del receptor purinérgico P2X2R incrementa la actividad proteasa de calpaínas.	61
4. La desregulación del sistema de calpaínas es dependiente de la sobreexpresión del receptor purinérgico P2X2R.	65
5. La activación del receptor purinérgico P2X2R potencia la generación de péptido Aβ de forma dependiente de calpaínas.....	67
6. Control selectivo del receptor P2X2R por medio de una pinza óptica.	76
7. La activación selectiva de P2X2R con luz incrementa los niveles de calpaína-1.....	80
8. La activación de P2X2R con luz no incrementa la actividad proteasa de calpaínas.	83
9. La activación de P2X2R con luz no incrementa la producción de péptido Aβ.....	84
10. Evaluación del sistema de calpaínas en un modelo transgénico de la EA.	88
11. El eje P2X2R/Calpaína-1 podría estar involucrado en la potenciación de la vía amiloidogénica en modelos animales transgénicos de la EA.	93
12. El eje P2X2R-calpaína-1 está regulado al alza en corteza prefrontal de pacientes con Enfermedad de Alzheimer.....	97
VII. DISCUSION.....	106
VII. CONCLUSIONES.....	123
VIII. REFERENCIAS	124

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes de la familia de calpaínas en humanos.	19
Tabla 2. Anticuerpos utilizados en Western Blot para células PC-12 y cerebro de ratones.	41
Tabla 3. Anticuerpos utilizados en Western Blot para muestras humanas.....	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo de los estadios Braak (I-VI) de la EA de acuerdo con el patrón de distribución de NFTs.....	5
Figura 2. Esquema representativo de los estadios amiloides de la EA de acuerdo con el patrón de distribución de depósitos amiloides.....	6
Figura 3. Vías de procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP).	9
Figura 4. Esquema de una subunidad de P2XR.	14
Figura 5. Representación esquemática de la estructura de calpaínas y su inhibidor endógeno calpastatina.....	21
Figura 6. La activación de calpaínas incrementa la producción del péptido A β	27
Figura 7. Protocolo de fraccionamiento subcelular para muestras de corteza prefrontal humana.	37
Figura 8. Transfección del receptor purinérgico P2X2.....	49
Figura 9. Corrientes purinérgicas inducidas por ATP en células que sobreexpresan P2X2R.	50
Figura 10. Incrementos de Ca ²⁺ citosólicos inducidos por ATP en células que sobreexpresan P2X2R.....	51
Figura 11. Aumento en los niveles de calpaína-1 tiempo-dependiente de ATP en células que sobreexpresan P2X2R.	53
Figura 12. Cambios en la inmunorreactividad de calpaína-1 por la activación de P2X2R.	54
Figura 13. Determinación de los niveles de calpaína-2 en células PC-12 transfectadas con P2X2R y estimuladas con ATP.	56
Figura 14. La activación de P2X2R no cambia los niveles de calpaína-2.....	57
Figura 15. Distribución celular de calpaína-1 y calpaína-2 en células PC-12.	58
Figura 16. Variaciones en los niveles de calpastatina frente a la activación de P2X2R.	59
Figura 17. Variaciones en los niveles de expresión de componentes del sistema de calpaínas, tras la activación de P2X2R a diferentes tiempos.	60
Figura 18. Cambios en los niveles de espectrina tras la activación de P2X2R a diferentes tiempos.	62
Figura 19. Aumento en la actividad proteasa de calpaínas, mediada por la estimulación de P2X2R.	64
Figura 20. Niveles de calpaína-1, calpaína-2, calpastatina y espectrina en células que no sobreexpresan P2X2R.....	66
Figura 21. Niveles de p25 y Cdk5 en células que sobreexpresan P2X2R.....	69
Figura 22. Razón pSTAT3/STAT3 en células PC-12, tras la activación de P2X2R.	70
Figura 23. El incremento en los niveles de BACE1 (β -secretasa) tras la activación de P2X2R es mediado por calpaínas.....	72
Figura 24. Niveles de BACE1 en células que sobreexpresan P2X2R.	73

Figura 25. La activación de P2X2R incrementa los niveles del péptido A β a través de un mecanismo mediado por calpaínas.....	75
Figura 26. Niveles de A β y APP en células que sobreexpresan P2X2R.	76
Figura 27. Estandarización de la transfección del receptor P2X2R-I328C en células PC-12.	78
Figura 28. Activación/desactivación del receptor P2X2R-I328C con luz.....	80
Figura 29. La foto-activación del receptor P2X2-I328C incrementa los niveles de calpaína-1.....	82
Figura 30. Niveles de espectrina y p35 tras la foto-activación del receptor P2X2-I328C.	84
Figura 31. Niveles de pSTAT3, BACE1 y A β tras la foto-activación del receptor P2X2-I328C.....	87
Figura 32. Incremento en los niveles de P2X2R y calpaína-1 en hipocampo de ratones APP/PS1.	90
Figura 33. Cambios en los niveles de calpaína-1, calpastatina y espectrina en corteza cerebral de ratones APP/PS1.	93
Figura 34. Niveles de p25, Cdk5 y pSTAT3 en hipocampo de ratones APP/PS1.	95
Figura 35. Incremento de la vía amiloidogénica en hipocampo de ratones APP/PS1... ..	96
Figura 36. Niveles de P2X2R y calpaína-1 en muestras postmortem de pacientes con EA en diferentes estadios.	98
Figura 37. Cuantificación de proteínas clave en diferentes fracciones de corteza prefrontal de muestras postmortem de pacientes con EA.	100
Figura 38. Niveles de P2X2R y calpaína-1 en fracciones TxS de muestras postmortem de pacientes con EA.....	102
Figura 39. Cuantificación de los niveles de P2X2R y calpaína-1 en fracciones TxP de muestras postmortem de pacientes con EA.....	103
Figura 40. Cuantificación de los niveles de P2X2R y calpaína-1 en fracciones citosólicas de muestras postmortem de pacientes con EA.....	104
Figura 41. Aumento en los niveles del péptido A β en homogenizados totales de corteza prefrontal de muestras postmortem de pacientes con EA.	105
Figura 42. Esquema integrativo de la tesis doctoral.....	122

ABREVIATURAS

α -CTF: Fragmento C-terminal α o C83

β -CTF: Fragmento beta carboxi-terminal de APP o C99

λ : Longitud de onda

μ g: Microgramo

μ l: Microlitro

μ M: Micromolar

$^{\circ}$ C: Grados Celsius

[Ca²⁺]_i: Concentración de calcio intracelular

A431: Línea celular de carcinoma epidermoide

A β : Péptido beta-amiloide

A β ₄₀: Péptido beta-amiloide de 40 aminoácidos

A β ₄₂: Péptido beta-amiloide de 42 aminoácidos

A β ₂₅₋₃₅: Fragmento A β (25-35)

Ac-LLY-AFC: Sustrato fluorescente de calpaínas

ADP: Adenosín difosfato

AFU: Unidades de fluorescencia arbitraria

AICD: Dominio intracelular de APP

AIS: Segmento inicial del axón

ALLN: Inhibidor de calpaínas

APOE ϵ 4: Apolipoproteína épsilon 4

APP: Proteína Precursora Amiloide

APP/PS1: Ratón transgénico con las mutaciones APP_{SWE} y PS1 Δ E9

APP α : Fragmento APP soluble α

APP β : Fragmento APP soluble β

APP_{SWE}: Mutación sueca de APP K670M/N671L

ARNi: Ácido ribonucleico de interferencia

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adenosín trifosfato

BACE1: Enzima β -secretasa

BAPTA: ácido 2-[2-[2-[2-[bis(carboximetil)amino]fenoxi]etoxi]-N-(carboximetil)anilino] acético

BBG: Azul Brillante G

BCA: Ácido Bicinconínico

BDNF: Factor neurotrófico derivado de cerebro

Ca²⁺: Iones de calcio

CaCl₂: Cloruro de calcio

Calp-1: Calpaína-1

Calp-2: Calpaína-2

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico

CAPN1: Gen que codifica para la subunidad grande de calpaína-1

CAPN2: Gen que codifica para la subunidad grande de calpaína-2

CAPNS1: Gen que codifica para la subunidad pequeña de calpaína-1 y calpaína-2

CAST: Calpastatina

CERAD: Consorcio para el Establecimiento de un Registro de la EA

Cdk5: Quinasa dependiente de ciclina 5

CMA: Centro de microscopía avanzada

CO₂: Dióxido de carbono

Da: Dalton

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco

DPBS: Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco

EA: Enfermedad de Alzheimer

EC50: Concentración efectiva para obtener el 50% de la respuesta máxima

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EGFP: Proteína fluorescente verde mejorada

EOAD: Enfermedad de Alzheimer de inicio precoz

ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares

FAD: Enfermedad de Alzheimer familiar

FBS: Suero fetal bovino

FITC: Fluoresceína-5-isotiocianato

FL: Longitud completa

g: Fuerza centrífuga relativa o RCF

GFP: Proteína fluorescente verde

GPCR: Receptores acoplados a proteína G

GR: Rico en glicina

GTP: Guanosina trifosfato

GWAS: Estudio de asociación del genoma completo

HCN-2: Línea celular de neuronas corticales humanas

HEK293: Células de riñón embrionario humano

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico

HRP: Peroxidasa de rábano

HS: Suero de caballo

IL-1 β : Interleucina-1-beta.

IMAX: corriente máxima

IP3: Inositol 1,4,5-trifosfato

K⁺: Iones de potasio

KCl: Cloruro de potasio

KDa: Kilodalton

KH₂PO₄: Fosfato monopotásico

KO: Knock-Out

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LGIC: Canales iónicos activados por ligando

LOAD: Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío

LTP: Potenciación a largo plazo

mA: Miliampere

MAPK: Proteína quinasa de activación mitogénica

MDL: Inhibidor de calpaínas III MDL28170

MEA-TMA: Compuesto foto-conmutador ((E) - 2 - ((4 - ((4 - (3- (2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il) propanamido) fenil) diazenil) fenil) amino) N, N, N-trimetil-2-oxoetanaminio 2,2,2-trifluoroacetato)

mg: Miligramo

MgCl₂: Cloruro de magnesio

MgSO₄: Sulfato de magnesio

min: Minutos

mM: Milimolar

mOsm: Mili Osmoles

mV: Milivolt

n: réplicas de experimentos

nA: Nano ampere

Na⁺: Iones de sodio

Na₃VO₄: Ortovanadato de sodio

NaCl: Cloruro de sodio

NaF: Fluoruro sódico

NaHCO₃: Bicarbonato de sodio

nAChR α4: Receptores nicotínicos de acetilcolina alfa 4

nAChR α7: Receptores nicotínicos de acetilcolina alfa 7

NFTs: Ovillos neurofibrilares intracelulares

NIH: National Institutes of Health

nm: Nano metro

nM: Nano molar

NMDA: N-metil-D-aspartato

O₂: Oxígeno

opti-MEM: Medio esencial mínimo mejorado

ox-ATP: ATP oxidado

P1: Pellet 1 que contiene la fracción nuclear

P2: Pellet 2 con fracción enriquecida en membrana

p25: Fragmento de p35

P2X: Receptores purinérgicos ionotrópicos

P2X2R-I328C: Receptor P2X2R mutado

P2Y: Receptores purinérgicos metabotrópicos

p35: Proteína reguladora no ciclina que activa a Cdk5

pA: Pico ampere

PBS: Solución salina tamponada con fosfato

PC-12: Línea celular de feocromocitoma de glándula suprarrenal de rata

PEF(L): Penta-EF-hand

PEF(S): Dominio PEF similar a calmodulina

PHMG-p: Fosfato de polihexametilenguanidina

PI3K: Fosfoinositol 3-cinasa

PIP2: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PKA: Proteína quinasa A

PPADS: 5'-phosphopyridoxal-6-azobenzene-2,4-disulfonic acid

PS1 Δ E9: Deleción del exón 9 de presenilina 1

PSD95: Proteína de densidad post-sináptica 95

PSEN1: Presenilina 1

PSEN2: Presenilina 2

p-STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3 fosforilado

pTau: Proteína Tau hiperfosforilada

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa

RE: Retículo endoplásmico

RFU: Unidades de fluorescencia relativa

RIPA: Tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación

ROI: Región de interés

Rpm: Revoluciones por minuto

s: segundos

S1: Sobrenadante 1 libre de núcleo

S2: Sobrenadante 2 que contiene fracción citosólica y microsomas

SAD: Enfermedad de Alzheimer esporádica

SDS: Dodecilsulfato sódico

SEN: Solución externa normal

SIN: Solución interna normal de potasio

siRNA: ARN pequeño de interferencia

SNC: Sistema nervioso central

SOA β : Oligómeros solubles del péptido beta-amiloide

SORL1: Receptor relacionado con la sortilina 1

STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3

SV2: Proteína de vesícula sináptica 2

SYN: Proteína presináptica de vesícula sinaptofisina

T: Homogenizados totales de corteza prefrontal humana

TA: Temperatura ambiente

TBS: Solución salina tamponada con Tris

Tg2567: Ratón transgénico que expresa la mutación APP^{swe}

TGN46: Proteína citosólica de la red trans-Golgi

TM: Transmembrana

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

TxP: Membrana postsináptica

TxS: Membranas extrasinápticas + presinápticas

UV: Ultravioleta

V: Volt

VGCC: Canales de calcio voltaje-dependientes

vs: versus

W: Watt

WGA: Aglutinina del germen de trigo

WT: Wild type

Z-LLY-FMK: Inhibidor de calpaínas IV

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es el principal tipo de demencia que afecta a la población adulto mayor. Se postula que el acontecimiento clave en la patogénesis de esta enfermedad es la acumulación de péptido beta-amiloide ($A\beta$), que produce muerte neuronal en áreas como el hipocampo, la amígdala y la corteza cerebral, causando un deterioro cognitivo severo.

Previamente, nuestro grupo demostró que tanto los aumentos en el Ca^{2+} intracelular, así como la disminución en los niveles de proteínas sinápticas y en la viabilidad neuronal, inducidos por $A\beta$, eran prevenidos con un antagonista de los receptores purinérgicos P2X (P2XR). Y que, específicamente la subunidad P2X2R incrementa su expresión luego de la exposición crónica a $A\beta$, receptor que es altamente permeable a Ca^{2+} . Entre las proteínas que participan en vías de señalización intracelular dependientes de Ca^{2+} están las calpaínas; proteasas citosólicas que pueden participar en la proteólisis de algunos sustratos para potenciar la formación de $A\beta$ en la EA.

Dados los antecedentes, en esta tesis nos propusimos estudiar la actividad de calpaínas mediada por la activación de los receptores purinérgicos P2X2 para determinar su impacto sobre la vía amiloidogénica y formación de $A\beta$, en modelos de sobreexpresión de P2X2R.

Nuestros estudios en células PC-12 muestran que la activación de P2X2R produce un aumento específico en los niveles de calpaína-1 ($146\pm 6\%$), mientras que los niveles de calpaína-2 y el inhibidor de calpaínas endógeno: calpastatina, no se vieron afectados. La actividad proteasa de calpaínas también incrementó significativamente debido a la degradación de sus principales sustratos: espectrina ($64\pm 5\%$), p35 ($128\pm 3\%$), y el sustrato fluorescente de calpaínas Ac-LLY-AFC ($158\pm 9\%$).

A su vez, la proteólisis de p35 produjo el fragmento p25, que activa de forma permanente a la quinasa neuronal dependiente de ciclina 5 (Cdk5). Esta quinasa aumentó los niveles de STAT3 fosforilado ($363\pm 38\%$), un factor de transcripción de regulación positiva para BACE1; enzima que cumple un rol clave en la vía amiloidogénica de la proteína precursora amiloide (APP). En efecto, encontramos niveles elevados de BACE1 ($124\pm 5\%$), y el péptido A β ($159\pm 4\%$), que se evitaron con el uso del inhibidor de calpaínas MDL-28170.

Niveles elevados de P2X2R ($120\pm 2\%$) y calpaína-1 ($168\pm 9\%$), también se encontraron en el hipocampo de ratones transgénicos APP/PS1. Sumado a la degradación de espectrina ($68\pm 5\%$) y p35 ($165\pm 13\%$), y niveles elevados de pSTAT3 ($166\pm 17\%$) que se asociaron con altos niveles de BACE1 ($151\pm 12\%$) y A β ($132\pm 6\%$), lo que implica que el eje de activación P2X2R/calpaína-1 está desregulado en este modelo animal de la EA, y probablemente contribuyendo a la acumulación de A β . Además, estos resultados mostraron tener una correlación con los aumentos en los niveles de P2X2R ($176\pm 22\%$) y calpaína-1 ($150\pm 12\%$) observados en muestras de corteza prefrontal de pacientes post-mortem con EA, específicamente en fracciones enriquecidas en membranas presinápticas, donde la mayor expresión de P2X2R podría contribuir a la actividad incrementada de calpaína-1 y la consecuente potenciación de la vía amiloidogénica.

En resumen, nuestros resultados nos permiten proponer al eje P2X2R/calpaína-1 como un elemento relevante en la fisiopatología de la EA. Nuestros datos apuntan a un mecanismo de retroalimentación positiva, donde el péptido A β incrementa la expresión de P2X2R para producir más A β intracelular, y este incremento estaría mediado por un mecanismo dependiente de calpaína-1. Esto podría representar un punto de partida novedoso en la elaboración de nuevas estrategias terapéuticas que contribuyan al tratamiento de la EA.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the main type of dementia affecting the older adult population. It is postulated that the key event in the pathogenesis of this disease is the accumulation of beta-amyloid peptide ($A\beta$), which produces neuronal death in areas such as the hippocampus, amygdala and cerebral cortex, causing severe cognitive impairment.

Previously, our group demonstrated that increases in intracellular Ca^{2+} , decreases in synaptic protein levels and neuronal viability induced by $A\beta$ were prevented by a purinergic P2X receptor (P2XR) antagonist. And specifically, P2X2R subunit increases its expression after chronic exposure to $A\beta$, a receptor that is highly permeable to Ca^{2+} . Among the proteins involved in intracellular Ca^{2+} -dependent signaling pathways are calpains; cytosolic proteases that may participate in the proteolysis of some substrates to enhance $A\beta$ formation in AD.

For this reason, in this thesis we set out to study the activity of calpains mediated by P2X2 purinergic receptor activation to determine their impact on the amyloidogenic pathway and $A\beta$ formation in P2X2R overexpression models.

Our studies in PC-12 cells show that P2X2R activation produces a specific increase in calpain-1 levels ($146\pm 6\%$), whereas calpain-2 levels and the endogenous calpain inhibitor calpastatin were not affected. Calpain protease activity also increased significantly due to degradation of its main substrates: spectrin ($64\pm 5\%$), p35 ($128\pm 3\%$), and the fluorescent calpain substrate Ac-LLY-AFC ($158\pm 9\%$).

In turn, proteolysis of p35 produced the p25 fragment, which permanently activates neuronal cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5). This kinase increased the

levels of phosphorylated STAT3 ($363\pm 38\%$), a positively regulated transcription factor for BACE1; an enzyme that plays a key role in the amyloidogenic pathway of amyloid precursor protein (APP). Indeed, we found elevated levels of BACE1 ($124\pm 5\%$), and A β peptide ($159\pm 4\%$), which were prevented with the use of the calpain inhibitor MDL-28170.

Elevated levels of P2X2R ($120\pm 2\%$) and calpain-1 ($168\pm 9\%$) were also found in the hippocampus of APP/PS1 transgenic mice. Added to the degradation of spectrin ($68\pm 5\%$) and p35 ($165\pm 13\%$), and elevated levels of pSTAT3 ($166\pm 17\%$) that were associated with high levels of BACE1 ($151\pm 12\%$) and A β ($132\pm 6\%$), implying that the P2X2R/calpain-1 activation axis is dysregulated in this animal model of AD, and probably contributing to the accumulation of A β . Furthermore, these results were shown to correlate with increases in P2X2R ($176\pm 22\%$) and calpain-1 ($150\pm 12\%$) levels observed in prefrontal cortex samples from postmortem AD patients, specifically in fractions enriched in presynaptic membranes, where increased P2X2R expression could contribute to increased calpain-1 activity and consequent potentiation of the amyloidogenic pathway.

In summary, our results allow us to propose the P2X2R/calpain-1 axis as a relevant element in the pathophysiology of AD. Our data point to a positive feedback mechanism, where A β peptide increases P2X2R expression to produce more intracellular A β , and this increase would be mediated by a calpain-1-dependent mechanism. This could represent a novel starting point in the development of new therapeutic strategies that contribute to the treatment of AD.

I. INTRODUCCION

1. La enfermedad de Alzheimer.

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia en la población adulta mayor, representando aproximadamente el 70% de los casos [1]. Se define por el deterioro de la cognición, trastornos del lenguaje, personalidad y desorientación [2]. Estos síntomas suelen comenzar con un deterioro cognitivo leve, asociado a la pérdida de memoria sobre acontecimientos recientes [3], seguido de un aumento de la gravedad de la demencia (leve, moderada y grave), generando dependencia e incapacidad para realizar actividades cotidianas básicas, lo cual tiene un impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes y sus cuidadores [2, 3]. La EA constituye una de las principales causas de muerte a nivel mundial; y el tiempo de supervivencia promedio desde su detección es de 8 años [4]. El Informe Mundial sobre Alzheimer 2022, realizado por Gauthier y col., reveló que más de 55 millones de personas padecen EA o afecciones relacionadas en todo el mundo, y se estima que esta cifra alcanzaría los 82 millones en 2030 y los 138 millones en 2050, debido al acelerado envejecimiento de la población [5]. En 2024, Estados Unidos informó que la EA tiene un costo estimado de 612.000 millones de dólares por

año, asociado a tratamientos médicos y cuidados [6]. Estas cifras suponen un reto sin precedentes para el sistema sanitario y la economía mundial [7].

La EA se diferencia de otras demencias, por la presencia de dos marcadores histopatológicos patognomónicos, que se determinan *post mortem*: los ovillos neurofibrilares intracelulares (NFTs), compuestos por la proteína tau hiperfosforilada y las placas seniles extracelulares compuestas por el péptido beta-amiloide (A β) [8]. Si bien, las causas exactas de esta enfermedad siguen sin estar claras, se cree que el acontecimiento clave en la patogénesis de la EA es la acumulación de A β , que puede producirse décadas antes de la aparición de los síntomas clínicos [9]. Esta hipótesis se sustenta en que la EA familiar (FAD) o también denominada EA de inicio precoz (EOAD), suele estar causada por mutaciones en los genes que codifican las principales proteínas implicadas en el metabolismo amiloide. Estos incluyen: genes que codifican para la proteína precursora amiloide (APP), y genes que codifican para la presenilina-1 (PSEN1) y la presenilina-2 (PSEN2), que forman el sitio activo de la enzima γ -secretasa [10]. La FAD se presenta en un rango de edad que va desde los 40 a 50 años, y su incidencia corresponde sólo entre el 1% y el 5% de los casos totales [8, 10]. Otra evidencia que pone en el centro de atención al péptido A β es que los individuos con trisomía 21 (síndrome de Down) tienen una copia extra del gen APP, lo que da lugar a un aumento en la producción amiloide y el riesgo de padecer EA antes de los 40 años [11].

Por el contrario, la EA esporádica (SAD) o EA de inicio tardío (LOAD) afecta principalmente a personas mayores de 65 años, siendo la edad el factor de riesgo más importante [8, 10]. El gen más comúnmente asociado a SAD es el alelo APOE ϵ 4 de la apolipoproteína [12, 13]. El riesgo de padecer EA aumenta entre 2 y 3 veces en las personas con un alelo ϵ 4, y más de 12 veces en aquellas con dos alelos [14]. Los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han definido genes adicionales que contribuyen a aumentar el riesgo de SAD, por ejemplo, genes que codifican para clusterina, fosfatidil-inositol, SORL1, y genes relacionados el metabolismo del colesterol [15, 16]. Entre los factores de riesgo no genéticos para desarrollar EA se encuentran los traumatismos craneoencefálicos y muchas afecciones que dañan el corazón y los vasos sanguíneos, como la aterosclerosis, la diabetes, la hipertensión arterial, los niveles altos de colesterol, la obesidad y los accidentes cerebrovasculares [3].

2. Diagnóstico de la EA

La EA puede coexistir con otras enfermedades que también contribuyen al deterioro cognitivo [17]. Las comorbilidades más comunes son los cuerpos de Lewy, la lesión cerebral vascular y la esclerosis del hipocampo. Esto dificulta el diagnóstico de la EA y es difícil definir qué proceso patológico contribuye al estado cognitivo de un paciente [17, 18]. En el año 1991, Braak y Braak describieron un sistema de estadificación de los NFTs, que se basa en su

distribución en distintas áreas del cerebro [19], este sistema propone seis estadios Braak, que suelen reducirse a cuatro para una mayor fiabilidad de diagnóstico: sin NFTs, estadios Braak I/II: NFTs predominantemente en corteza transentorrinal y áreas estrechamente relacionadas, estadios Braak III/IV: NFTs abundantes en hipocampo y amígdala, extendiéndose ligeramente a la corteza de asociación, y estadios Braak V/VI: NFTs ampliamente distribuidos por todo el neocórtex (o isocórtex), que en última instancia afectan áreas motoras y sensoriales primarias (Figura 1) [19]. En la actualidad, este sistema es utilizado ampliamente para establecer la severidad de la neuropatología de la EA en pacientes post-mortem [20].

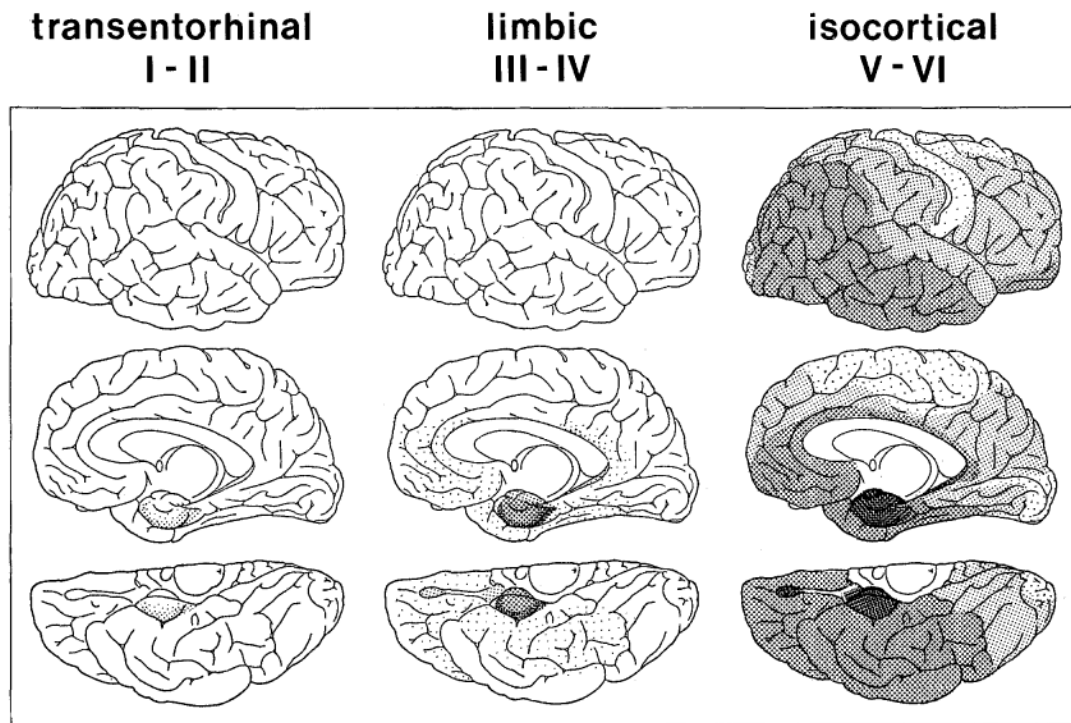


Figura 1. Esquema representativo de los estadios Braak (I-VI) de la EA de acuerdo con el patrón de distribución de NFTs.

Estadios I-II: muestran alteraciones confinadas a una sola capa de la región transentorrinal (transentorrinal I-II). Estadios III-IV: grave afectación de las capas entorrinal y transentorrinal (límbica III-IV). Estadios V-VI: están marcados por la destrucción isocortical (isocortical V-VI). El aumento de la densidad del sombreado indica un mayor grado de afectación por los NFTs [19].

Otro componente neuropatológico trascendental en la EA es la presencia de placas seniles compuestas por depósitos extracelulares del péptido A β [8]. Es por esto que además de los estadios NFTs, Braak y Braak propusieron 3 estadios amiloides en la EA, que van en aumento de acuerdo con la cantidad de depósitos de A β y su ubicación en distintas áreas del cerebro [19]. Así, en el estadio A se observan depósitos de A β en las porciones basales de la neocorteza, en el estadio B se afectan las áreas de asociación isocortical y el hipocampo, mientras

que en el estadio C los depósitos están presentes en todas las áreas de la isocorteza, incluyendo los campos sensoriales y motores (Figura 2) [19].

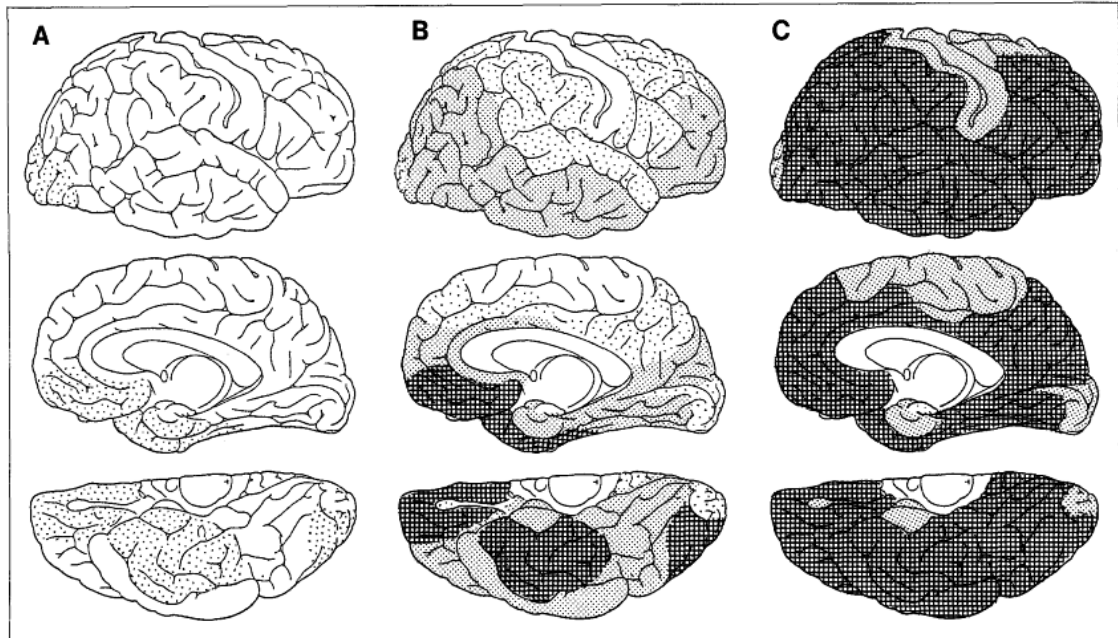


Figura 2. Esquema representativo de los estadios amiloides de la EA de acuerdo con el patrón de distribución de depósitos amiloides.

Estadio A: en las porciones basales de la isocorteza. Estadio B: en todas las áreas de asociación isocortical y afectación leve en hipocampo. Estadio C: depósitos en todas las áreas de la isocorteza, incluidas las áreas sensoriales y motoras. El aumento de la densidad de sombreado indica un número creciente de depósitos amiloides [19].

Numerosos estudios clínico-patológicos coinciden en que la distribución de NFTs se correlaciona directamente con la gravedad de la demencia, mientras que la acumulación de placa senil no se encuentra estrechamente ligada al grado de deterioro cognitivo [8, 21]. Esto puede ser debido a que los depósitos amiloides son morfológicamente diversos y forman una gran heterogeneidad de placas de

A β [22]. Entre las diferentes formas de placas de A β , las placas neuríticas se encuentran fuertemente implicadas en la lesión neuronal, ya que están asociadas a neuritas distróficas, pérdida de sinapsis local y reactividad glial [18]. En efecto, el consenso de 1997 (para la evaluación neuropatológica de la EA y otras enfermedades del cerebro en ancianos) adoptó un sistema de puntuación de placas neuríticas desarrollado previamente por el Consorcio para el Establecimiento de un Registro de la EA (CERAD), que clasifica la densidad de placas neuríticas en distintas áreas del neocórtex [23].

Finalmente, en 2012 se convocó a un panel de consenso entre Estados Unidos y Europa con el fin de actualizar y revisar las directrices del consenso de 1997, donde se recomendó un protocolo de estadificación «ABC» para los cambios neuropatológicos de la EA, basado en tres características morfológicas de la enfermedad: Placas amiloides (A), NFTs (B) y placas neuríticas (C) [18]. Estas nuevas directrices permiten reconocer una etapa preclínica en la EA, mejoran la evaluación de la EA para incluir la acumulación de amiloide, así como los cambios neurofibrilares y las placas neuríticas [18].

3. Rol del péptido beta-amiloide en la fisiopatología de la EA.

Una de las teorías que se ha propuesto para explicar los mecanismos involucrados en la fisiopatología de la EA es la teoría amiloidogénica, que propone como principal agente tóxico al péptido A β [20]. Este péptido proviene del procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP); la cual puede ser proteolizada por dos vías. La primera es una vía no amiloidogénica, donde APP es clivada por la enzima α -secretasa para generar el fragmento APP soluble α (APPs α) y el fragmento C-terminal α (α -CTF o C83). Posteriormente, el fragmento C83 es clivado por γ -secretasa, produciendo el dominio intracelular amiloide (AICD) y el péptido p3 [24] (Figura 3). La segunda es una vía amiloidogénica, donde APP es clivada por la enzima β -secretasa (BACE1) para generar el fragmento APP soluble β (APPs β) y el fragmento beta carboxi-terminal de APP (β -CTF o C99). Luego, C99 es clivado por la enzima γ -secretasa para formar el fragmento AICD y el péptido A β (Figura 3) [24].

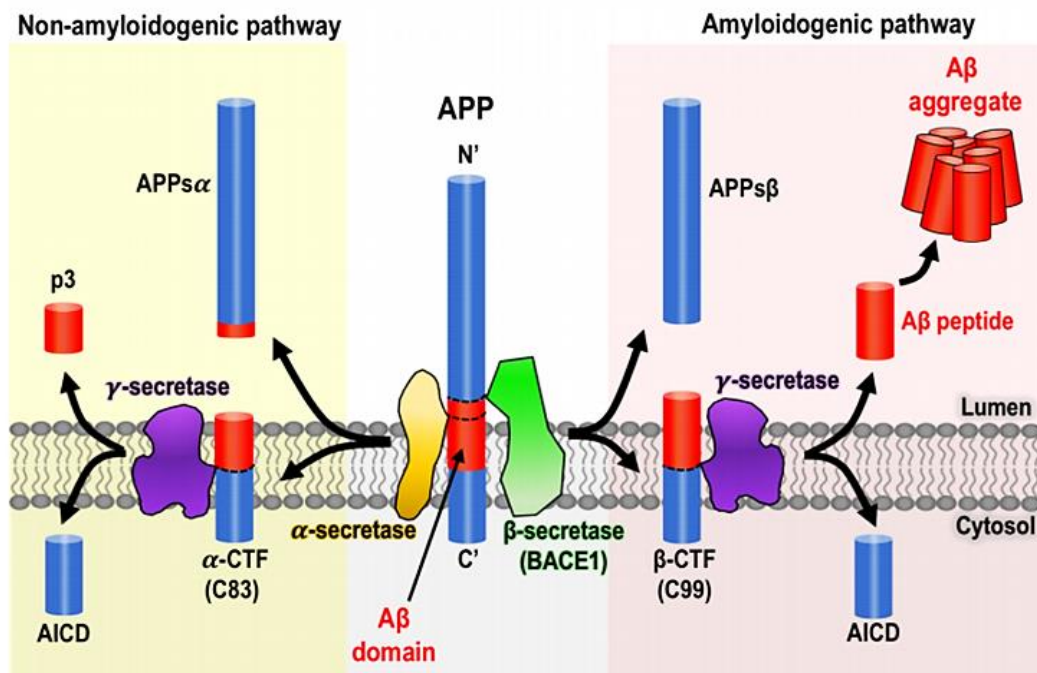


Figura 3. Vías de procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP).

En la vía de procesamiento no amiloidogénico, APP es procesada por α -secretasa para generar los fragmentos APPs α y α -CTF (C83). La posterior escisión de α -CTF (C83) por γ -secretasa genera los fragmentos p3 y AICD. En la vía de procesamiento amiloidogénico, β -secretasa (BACE1) escinde APP para generar los fragmentos APPs β y β -CTF (C99). A continuación, C99 se escinde por γ -secretasa para dar origen a AICD y al péptido A β [24].

APP es una proteína transmembrana, de expresión ubicua, que desempeña un papel esencial durante la embriogénesis, regulando el desarrollo neuronal, la migración neuronal, el crecimiento de las neuritas y la sinaptogénesis [25]. Para algunos productos generados en el procesamiento de APP también se han descrito funciones fisiológicas. Por ejemplo, APPs α actúa como un fragmento neuroprotector y neurotrófico, que promueve la viabilidad neuronal, inhibiendo la apoptosis neuronal y aumentando la resistencia neuronal a lesiones cerebrales.

Además, desempeña un papel crucial en la neurogénesis en adultos, la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria. Mientras que el fragmento AICD se transloca al núcleo y puede funcionar un como regulador transcripcional, e inducir el crecimiento de neuritas mediante la activación de una cascada Gas-adenilil ciclasa-cAMP [26].

Por otro lado, concentraciones fisiológicas o picomolares de A β pueden mejorar el aprendizaje, la memoria, y la potenciación a largo plazo, además de potenciar la arborización de procesos dendríticos, el crecimiento de neuritas y la supervivencia celular. Se cree que estos efectos pueden estar mediados por la activación de PI3K y MAPK, por la activación el receptor nicotínico de acetilcolina y por el aumento de la producción de acetilcolina en el hipocampo, que son componentes bioquímicos esenciales en la formación de la memoria [27]. Sin embargo, en la EA, por razones aún desconocidas, se produce un desequilibrio entre la producción, degradación y clearance de A β , generando una acumulación y agregación de este péptido con potencial neurotóxico que afecta la cognición [28].

En el procesamiento amiloidogénico de APP, γ -secretasa produce péptidos A β de distinta longitud, que van desde 38 a 43 aminoácidos, siendo A β_{40} y A β_{42} las isoformas producidas con mayor abundancia, en una proporción 9:1, por lo que numerosos estudios han informado que la medición de la razón A β_{42} /A β_{40} es un

mejor predictor de pacientes con deterioro cognitivo, que la medición individual de cada isotipo [29, 30]. Debido a su hidrofobicidad, A β tiende a agregarse, formando pequeños oligómeros solubles (3-24 monómeros), pasando por grandes oligómeros con una masa superior a 60 kDa, luego forma protofibrillas y fibrillas, hasta finalmente agruparse en placas amiloides [31, 32], pudiendo co-existir todas estas estructuras, sin alcanzar un estado de agregación de mayor complejidad [31].

El péptido A β_{40} se presenta predominantemente en su forma oligomérica [33], mientras que A β_{42} forma placas estables [30]. Esto se debe a que A β_{42} posee propiedades altamente hidrofóbicas, que son otorgadas por sus residuos de alanina e isoleucina en la porción carboxilo-terminal, haciendo que se agregue con mayor facilidad [30]. La evidencia demuestra que los niveles de oligómeros solubles del péptido A β (SOA β) se correlacionan directamente con los cuadros de déficit cognitivo en la EA, lo que no ocurre con las placas amiloides en cerebros post-mortem de pacientes [34]. Debido a esto, se propone que SOA β es el principal agente tóxico en la EA, ya que por su tamaño puede difundir por el parénquima y afectar la estructura sináptica, la función neuronal y la supervivencia celular [34].

Es ampliamente conocido que SOA β produce una dishomeostasis del calcio intracelular ([Ca $^{2+}$]_i), a través de distintos mecanismos. Por ejemplo, se ha

descrito que tratamientos con SOA β_{42} incrementan la actividad de receptores NMDA [35] y modulan la actividad de canales de calcio voltaje-dependientes (VGCC) [36]. En base a estudios de microscopía de fuerza atómica, en bicapas lipídicas artificiales, se ha logrado determinar que SOA β_{40} y SOA β_{42} interactúan con la membrana plasmática y forman estructuras tipo poro, que están compuestas por un número variable de unidades de oligómeros de A β , desde trímeros a octámeros [32]. En un análisis *in-vitro*, realizado en cultivo de neuronas hipocampales expuestas a SOA β_{40} , se observó que el poro formado permite el paso de iones como el Ca $^{2+}$ y moléculas más grandes, como el bromuro de etidio, de una forma tiempo y concentración dependiente [37]. Además, se sugirió que su tamaño oscilaría en torno a los 2-3 nm, lo que permitiría el paso inespecífico de moléculas de hasta 900 Da [37]. La dishomeostasis iónica y, particularmente, la sobrecarga de [Ca $^{2+}$]_i afecta directamente la función mitocondrial, haciendo que este organelo pierda su capacidad para tamponar este catión y, en consecuencia, no pueda responder a la alta demanda metabólica y energética de las neuronas [38]. Sumado a esto, existe evidencia de que este poro permite la salida de moléculas a favor de un gradiente de concentración, como el ATP [39], lo que podría generar la activación de otras cascadas de señales como posibles mecanismos en respuesta a la neurotoxicidad del péptido.

4. ATP y receptores purinérgicos.

El ATP no es solo una fuente de energía intracelular, sino también un neurotransmisor, que se almacena en vesículas sinápticas a altas concentraciones, pudiendo almacenarse y liberarse conjuntamente con otros neurotransmisores [40]. Aunque existe evidencia convincente sobre la liberación vesicular neuronal excitotónica de ATP, se han proporcionado mecanismos adicionales de liberación de nucleótidos, como la liberación de ATP desde los astrocitos, mediante transportadores de casetes de unión a ATP, hemicanales de conexina o panexina, y receptores P2X7 [41]. En el medio extracelular, el ATP sufre degradación enzimática por ectonucleotidasas para formar ADP y adenosina. Esto es funcionalmente importante porque el ATP y sus metabolitos actúan como ligandos fisiológicos de una amplia gama de receptores purinérgicos [42].

Los receptores purinérgicos se expresan ampliamente en el sistema nervioso central (SNC), y se clasifican en receptores P1 (receptores de adenosina) y receptores P2 [41]. A su vez, los receptores P2 se subdividen en receptores metabotrópicos P2Y y receptores ionotrópicos P2X. Los receptores P2Y son receptores acoplados a proteína G (GPCR), y existen 8 subunidades diferentes. Los receptores P2X (P2XR) son canales iónicos operados por ligando (LGIC) que al unirse a ATP, abren un poro permeable a cationes (Na^+ , K^+ y Ca^{2+}) [41]. Los

P2XR están formados por trímeros, a partir de subunidades individuales codificadas por siete genes distintos (designados P2X1 a P2X7), y el ensamblaje de estas subunidades puede ser homo o heterotrimérico. Cada subunidad contiene dos segmentos hidrofóbicos transmembrana (TM1 y TM2), que forman el canal, un ectodominio glicosilado que contiene 10 residuos de cisteína conservados que proporcionan estabilidad a la estructura, y los segmentos N y C terminal hacia citosol (Figura 4) [43].

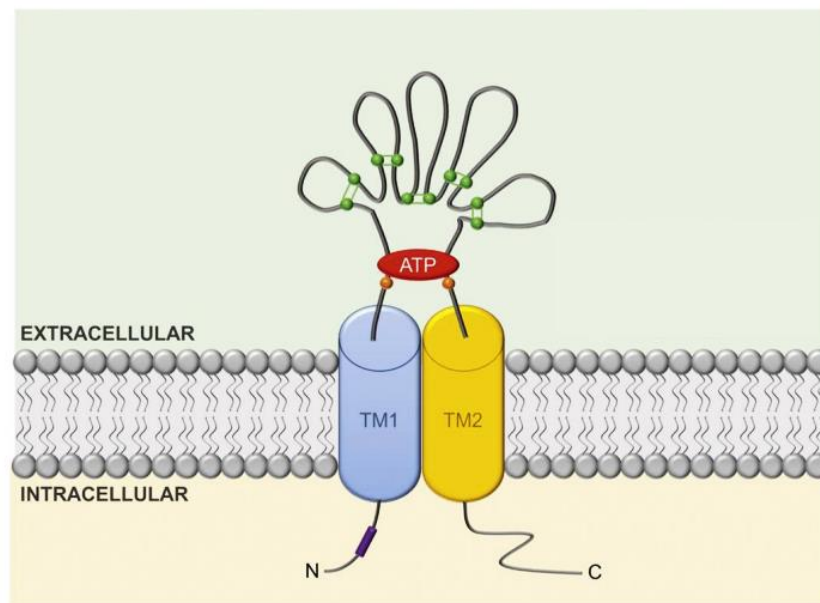


Figura 4. Esquema de una subunidad de P2XR.

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 Sáez-Orellana y colaboradores, 2015 [43].

Los receptores homotriméricos P2X7 se activan con concentraciones de ATP de 100-1000 μM , mientras que el resto de los receptores P2X tienen una EC_{50} de 1-10 μM [44]. Una vez activados, estos receptores han demostrado tener una alta permeabilidad a Ca^{2+} , comparable con la conductancia de Ca^{2+} de receptores NMDA (NMDAR) [41]. Esto puede ser funcionalmente importante porque la activación de P2XR postsinápticos proporciona una entrada significativa de Ca^{2+} que no requiere la pre-depolarización celular, como ocurre en el caso de NMDAR. Por lo tanto, incluso corrientes relativamente pequeñas mediadas por ATP podrían influir significativamente en la señalización neuronal de Ca^{2+} , la plasticidad sináptica y el desarrollo en el SNC [40].

5. Rol de P2XR en la EA

Ya que previamente, mencionamos que los receptores P2XR son altamente permeables a Ca^{2+} , nuestro grupo de investigación se propuso evaluar si el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por $\text{A}\beta$ puede ser mediado por la señalización purinérgica. De esta manera, neuronas hipocampales de rata fueron expuestas a $\text{A}\beta$ y se observó un aumento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 4 veces sobre sus niveles basales, sin embargo, cuando se utilizó apirasa (3U/mL), una enzima que hidroliza ATP; o PPADS (10 μM), un inhibidor de los receptores purinérgicos P2, que tiene mayor selectividad por P2XR, el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se mantuvo en valores cercanos al control [39]. Adicionalmente, la exposición a $\text{A}\beta$ incrementó la frecuencia y amplitud de las

corrientes excitatorias, lo que fue bloqueado con el uso de PPADS o apirasa [39]. Por otra parte, efectos observados luego de la exposición crónica a A β por 24 h, 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) [45]. Estos antecedentes demuestran que P2XR participa en el mecanismo de toxicidad de A β en neuronas de hipocampo.

Dentro de las distintas subunidades de P2XR, el receptor P2X7 (P2X7R) ha sido el más estudiado en la EA. Un estudio demostró que ratones transgénicos Tg2567 de 24 meses de edad, que sobreexpresan APP con la mutación sueca, presentan una sobreexpresión de P2X7R en el hipocampo, en comparación con los ratones no transgénicos [46]. La sobreexpresión de P2X7R también ha sido descrita en microglía y astrocitos de pacientes con EA [47, 48]. Además, P2X7R se expresó altamente en cultivos de microglía fetal humana expuesta a A β , y en microglía de hipocampo de ratas inyectadas con A β [47]. Se ha descrito que este receptor participa en la respuesta inflamatoria de la microglía a través de la liberación de citoquinas, quimioquinas y la alteración de la fagocitosis de A β [48-50], por lo que P2X7R tiene un rol central en la neuroinflamación de la EA.

Por otro lado, se descubrió que los niveles de P2X4R estaban disminuidos en la circunvolución frontal media y la circunvolución temporal media de pacientes con EA con deterioro cognitivo grave [51]. Sin embargo, la sobreexpresión de P2X4R

en neuronas de hipocampo potenció el efecto tóxico de A β , mientras que el silenciamiento de este receptor purinérgico disminuyó la muerte celular después de la exposición a A β [51], lo que indica que P2X4R estaría contribuyendo a la muerte neuronal inducida por A β . El gen que codifica P2X4 en humanos se encuentra en el cromosoma 12, cerca del gen P2X7, y evolutivamente se cree que se formaron por duplicación de genes. En ratones knockout (KO) para P2X7 se encontró un aumento en la expresión de P2X4, lo que sugiere que estos receptores podrían complementar su función [52].

En nuestro laboratorio, mediante qRT-PCR, se evaluó la expresión de las distintas subunidades de P2XR (P2X1-P2X7) en cultivos primarios de neuronas hipocampales expuestos a A β por 12 h, y se encontró un aumento significativo del ARNm de las subunidades P2X1, P2X2, P2X5 y P2X7 [45]. Sin embargo, luego de 24 h de exposición a A β , solo P2X2 permaneció aumentado, mientras que las otras subunidades de P2XR no mostraron diferencias significativas [45]. Este aumento en los niveles de P2X2 fue confirmado mediante inmunocitoquímica y western blot. Adicionalmente, se demostró que P2X2 está sobreexpresado en corteza prefrontal de pacientes con EA en los estadios Braak V y VI [53].

El receptor P2X2 (P2X2R) se expresa en neuronas de diferentes áreas del SNC, como el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, la amígdala y el hipocampo [54]. Las

células piramidales del hipocampo de CA1 a CA4, y las células granulares de la circunvolución dentada expresan altos niveles de P2X2R y la inmunotinción se limita principalmente al soma y las dendritas [54]. Su presencia en las espinas dendríticas apoya la idea de que el ATP puede actuar como un neurotransmisor excitador rápido, mientras que la localización presináptica es consistente con el reporte de receptores purinérgicos que actúan como moduladores de la liberación de neurotransmisores [54]. A diferencia de P2X7R y P2X4R, P2X2R colocaliza exclusivamente con marcadores neuronales, no con marcadores gliales, lo que confirma la expresión neuronal de este receptor [47, 55]. La permeabilidad a Ca^{2+} de P2X2R es $\sim 2,5 \text{ Ca/Na}$, lo que lo convierte en el tercero de esta familia en permeabilidad a este catión [56].

6. Proteasas con actividad dependiente de Ca^{2+} : Calpaínas.

Las calpaínas son cisteína-proteasas citosólicas con actividad dependiente de Ca^{2+} , que se expresan en humanos y otros organismos [57]. Hasta la fecha, se conocen 15 genes humanos que codifican para calpaínas (Tabla 1). La mayoría de estas proteínas tiene expresión ubicua, sin embargo, en el cerebro sólo están presentes calpaína-1 (μ -calpaína) y calpaína-2 (m-calpaína) [57]. La denominación de μ o m-calpaína deriva del requerimiento de Ca^{2+} para su activación, ya que calpaína-1 se activa con una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 3 - 50 μM , mientras que calpaína-2 es activada en un rango de 0,4 a 0,8mM de Ca^{2+} [58].

Tabla 1. Genes de la familia de calpaínas en humanos.

Tabla tomada de Mahaman y col., 2019 [57].

Gene	Chromosome	Name	Distribution	Deficiency
CAPN1	11q13	CAPN1	Ubiquitous	Platelet dysfunction
CAPN2	1q41-q42	CAPN2	Ubiquitous except erythrocytes	Embryonic lethality
CAPN3	15q15.1-q21.1	CAPN3	Skeletal muscle	Muscular dystrophy
CAPN5	11q14	CAPN5	Ubiquitous	Vitreoretinopathy
CAPN6	Xq23	CAPN6	Embryonic muscles, placenta	Hypergenesis
CAPN7	3p24	CAPN7	Ubiquitous	...
CAPN8	1q41	CAPN8	Gastrointestinal tracts	Gastric ulcer
CAPN9	1q42.11-q42.3	CAPN9	Gastrointestinal tracts	Gastric ulcer
CAPN10	2q37.3	CAPN10	Ubiquitous	Type 2 diabetes
CAPN11	6p12	CAPN11	Testis	...
CAPN12	19q13.2	CAPN12	Hair follicle	...
CAPN13	2p22-p21	CAPN13	Ubiquitous	...
CAPN14	2p23.1-p21	CAPN14	Ubiquitous	Eosinophilic Esophagitis
CAPN15	16p13.3	CAPN15	Ubiquitous	...
CAPN16	6q24.3	CAPN16	Ubiquitous	...
CAPNS1	19q13.1	CAPNS1	Ubiquitous	...
CAPNS2	16q12.2	CAPNS2	Ubiquitous	...
CAST	5q15	Calpastatin	Ubiquitous	...

Cada calpaína forma un heterodímero compuesto por una subunidad grande (80 kDa) y una subunidad pequeña (28 kDa). La subunidad grande se divide en cuatro dominios: El dominio I (extremo N) sufre autólisis cuando se une a Ca^{2+} , el dominio II (núcleo proteasa o dominio CysPc) forma la unidad catalítica, el dominio III (dominio similar a C2) tiene función reguladora y el dominio IV (penta-EF-hand [PEF(L)]) contiene el sitio de unión de Ca^{2+} [59-61]. La subunidad pequeña posee dos dominios: un dominio rico en glicina (GR) y un dominio PEF

similar a calmodulina [PEF(S)] (Figura 5A) [58]. La subunidad grande (80 kDa) de calpaína-1 está codificada por el gen CAPN1, y la subunidad grande de calpaína-2 por el gen CAPN2, con una homología de aproximadamente 60%. Mientras que la subunidad reguladora pequeña (28 kDa) es compartida y está codificada por el gen CAPNS1 (Tabla 1) [57].

La actividad enzimática de las calpaínas está regulada por calpastatina (CAST), que es su inhibidor endógeno específico [62]. CAST posee seis dominios, cuatro unidades de homología inhibitoria (CAST1-4) y dos dominios N-terminales, denominados dominio XL y dominio L. Cada uno de los cuatro dominios CAST1-4 puede unirse de forma específica y eficaz a una molécula de calpaína para inhibirla, mientras que los dominios XL y L carecen de potencial inhibidor [63] (Figura 5B).

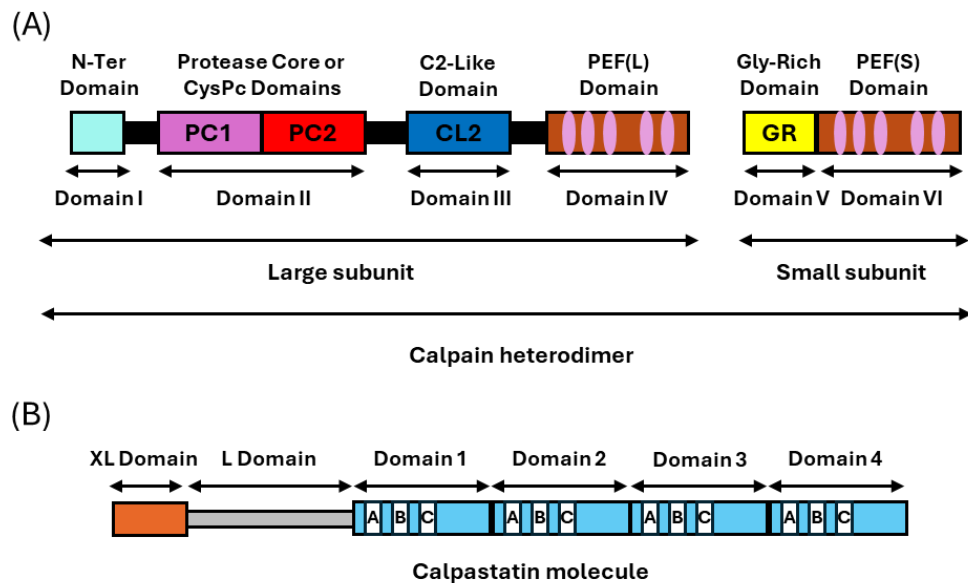


Figura 5. Representación esquemática de la estructura de calpaínas y su inhibidor endógeno calpastatina.

A) Las calpaínas son heterodímeros compuestos por una gran subunidad catalítica y una pequeña subunidad reguladora. La subunidad grande contiene cuatro dominios que incluyen: dominio N-terminal o dominio I, el dominio catalítico CysPc formado por dos dominios del núcleo proteasa (PC1 y PC2) que juntos constituyen el dominio II. El dominio tipo C2 y el dominio penta-EF-hand (PEF [L]) contienen los sitios de unión al calcio, desempeñan una función reguladora y constituyen los dominios III y IV, respectivamente. La subunidad pequeña contiene un dominio rico en glicina (GR) y un dominio PEF (S), que forman los dominios V y VI del heterodímero de calpaína [57]. **B)** Representación esquemática de calpastatina humana: los dominios XL y L no tienen actividad inhibitora, mientras que cada uno de los dominios inhibitoros (1 a 4) pueden unirse a una molécula de calpaína e inhibirla. Estos dominios están formados por subdominios o regiones A B y C. El subdominio B media el efecto inhibitor de calpaína, mientras que los subdominios A y C interactúan con PEF(L) y PEF(S), respectivamente, y son necesarios para el efecto inhibitor del subdominio B [57].

Las calpaínas tienen una actividad óptima en torno al pH neutro y son proteasas reguladoras, no digestivas. En condiciones fisiológicas normales de la célula, con una concentración de Ca^{2+} inferior a 50 nM, las calpaínas actúan como biomoduladoras, participando en procesos como la transducción de señales,

proliferación celular, diferenciación, apoptosis, aprendizaje y memoria, y potenciación a largo plazo [58, 64]. Sin embargo, los mecanismos reguladores de estas proteasas disminuyen con el aumento de la edad [65, 66], y la actividad regulada al alza de las calpaínas se ha relacionado con algunas enfermedades humanas conocidas colectivamente como calpainopatías [57]. En este sentido, existen datos que muestran que el déficit de calpaína-3 está asociado a distrofia muscular [67], la calpaína-10 está relacionada con la diabetes mellitus [68, 69], mientras que una mutación de calpaína-5 provoca uveítis autoinmune y la degeneración de fotorreceptores (vitreo-retinopatía) [70], y la calpaína-14 se ha asociado con la esofagitis eosinofílica [71]. Además, se ha descrito su participación en enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EA [72]. Estos datos aportan pruebas sobre las funciones fisiológicas de las calpaínas y del rol indispensable que desempeñan como moduladores centrales de vías de señalización intracelular dependientes de Ca^{2+} .

7. Activación de calpaínas por receptores purinérgicos P2X7.

Según la evidencia bibliográfica, las calpaínas han demostrado incrementar su actividad proteasa en respuesta a aumentos en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por la activación de los receptores purinérgicos P2X7 [73-77]. En este sentido, un estudio demostró que la estimulación con ATP (3 mM, 30 min) a macrófagos humanos producía la activación del inflamasoma NLRP3 y la secreción de

citoquinas proinflamatorias como IL-1 β . Estos efectos fueron mediados por el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la activación de P2X7R, y un consecuente incremento en los niveles de calpaína-1 y calpaína-2, así como en su actividad proteasa, lo que demuestra que el eje de activación P2X7R/Calpaínas juega un rol clave en enfermedades inflamatorias [74].

Una investigación realizada en las células epiteliales bronquiales humanas BEAS-2B, mostró que la exposición a fosfato de polihexametilenguanidina (PHMG-p) redujo el número de uniones estrechas y deterioró la integridad de la arquitectura de F-actina, lo que afecta el funcionamiento de la barrera epitelial y causa inflamación pulmonar [73]. En un intento de descifrar como PHMG-p afecta la barrera epitelial, se observó que la exposición a PHMG-p aumentó el nivel de $[Ca^{2+}]_i$, lo que condujo a un incremento en la actividad de la proteasa calpaína-1. Además, se demostró que la inhibición específica del receptor P2X7 con su antagonista A438079, produjo una disminución en los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ y en la actividad de calpaína-1. Sumado a esto, el tratamiento con el inhibidor de calpaína-1 (ALLN) revirtió el deterioro de las uniones estrechas y la arquitectura de F-actina mediado por PHMG-p [73]. Esto demuestra que PHMG-p daña las uniones estrechas y la arquitectura de F-actina al activar a calpaína-1 a través de P2X7R [73].

Del Puerto y col., en el 2015, reportaron que la transfección del receptor purinérgico P2X7 y su activación (ATP 1mM, 24 h) reducía la densidad de proteínas estructurales como anquirina G, y la densidad de canales de Na⁺ activados por voltaje en el segmento inicial del axón (AIS), de cultivo de neuronas de hipocampo y en rebanadas de hipocampo de ratón. Además, estudios electrofisiológicos mostraron que la transfección de P2X7R disminuía la amplitud de la corriente de Na⁺ y la excitabilidad neuronal intrínseca. Tanto la inhibición de P2X7 con Azul Brillante G (BBG), como el uso de inhibidores de calpaínas (MDL28170 y calpeptina) previnieron estos efectos. Debido a que alteraciones en el AIS se han implicado en enfermedades neurodegenerativas, psiquiátricas y traumatismos cerebrales; P2X7R en conjunto con calpaína, podrían estar involucrados en la regulación de la excitabilidad neuronal mediada por AIS en condiciones fisiológicas y patológicas [75]. En apoyo a esto, está la observación de que el ATP (10mM, 2 h) evoca la entrada de Ca²⁺ produciendo la muerte de cultivos de neuronas corticales de rata, en un mecanismo mediado por la activación de P2X7R y calpaínas [77]. Adicionalmente, la estimulación con ATP (5 mM, 2h) indujo la apoptosis en células Par-C5 con una afluencia sostenida de Ca²⁺. El ATP también indujo la escisión de espectrina (o alfa-fodrina); uno de los principales sustratos de calpaína. Sin embargo, tanto la muerte celular apoptótica como la escisión de espectrina se inhibieron con un bloqueante irreversible de P2X7R (ox-ATP), o en solución libre de Ca²⁺ [76].

Estos antecedentes ponen de manifiesto que los receptores purinérgicos participan en vías de señalización intracelular que son principalmente mediadas por calpaínas, en distintos modelos celulares. Esto revela la importancia de estudiar el eje de activación P2XR/calpaína en enfermedades neurodegenerativas como la EA.

8. Rol de las calpaínas en la vía amiloidogénica de la EA

Diversos estudios han mostrado pruebas sobre la desregulación del sistema de calpaínas en la patogénesis de la EA. Kurbatskaya y col., en el 2016, reportaron altos niveles de calpaína-1 en homogenizados de cerebros de pacientes en estadios Braak III, IV, V y VI, en comparación con pacientes control [78]. Sumado a esto, se observaron incrementos en la expresión y actividad proteasa de calpaína-2 en sinaptosomas aislados de personas que padecen la enfermedad [79]. Mientras que el inhibidor endógeno de calpaínas CAST, estaba disminuido en el córtex prefrontal con EA, en comparación con cerebros normales [80]. La elevada cantidad de espectrina escindida por calpaína detectada en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de los pacientes con EA [81], sugiere que la disminución de la relación CAST/calpaínas incrementa los niveles de calpaínas hiperactivadas en el cerebro de estos pacientes, lo que conlleva a una proteólisis aberrante e incontrolada de diversos sustratos [72].

Los agregados de A β son una de las características distintivas de la EA y el proceso de agregación de oligómeros de A β afecta negativamente la estructura sináptica y la plasticidad [82, 83], produciendo importantes trastornos cognitivos en la EA. En este sentido, la evidencia bibliográfica sugiere que las calpaínas podrían regular positivamente la expresión/actividad de la enzima BACE1, potenciando el procesamiento de APP por la vía amiloidogénica y la producción del péptido A β [84-86]. Cuando las calpaínas se sobreactivan por un incremento en la [Ca²⁺]_i, producen un clivaje a la proteína p35 para generar un fragmento más pequeño denominado p25. p35 es una proteína reguladora no ciclina que actúa como activador neuronal de la quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) [87]. p25 tiene una vida media mayor que p35 y activa de forma prolongada a Cdk5 [87]. Una vez activada, Cdk5 fosforila a STAT3 [88], y p-STAT3 va al núcleo para regular positivamente la transcripción de BACE1. El aumento en la expresión de la enzima BACE1 se ha asociado con una mayor proteólisis de APP por la vía amiloidogénica y un incremento en la producción de los péptidos A β ₄₀ y A β ₄₂ (Figura 6) [84-86].

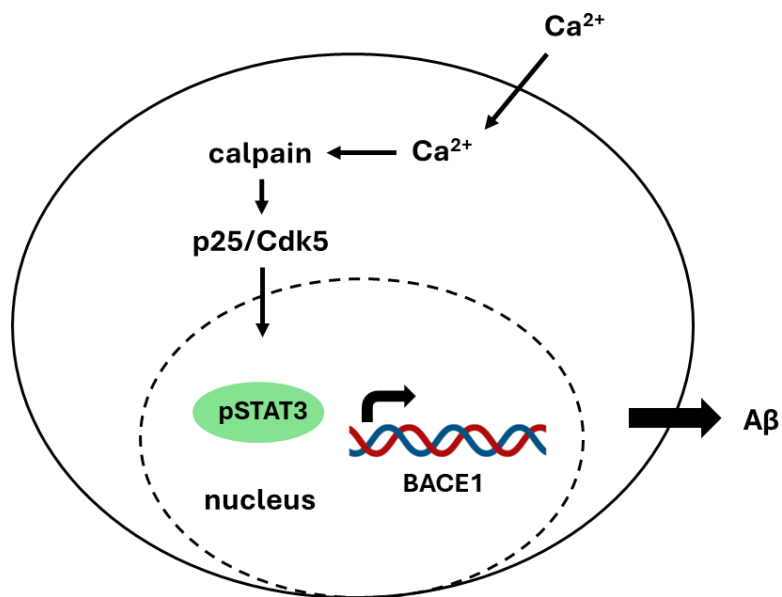


Figura 6. La activación de calpaínas incrementa la producción del péptido Aβ.

El Ca^{2+} intracelular elevado aumenta la actividad de calpaína, una proteasa dependiente de Ca^{2+} , que a su vez aumenta la actividad de p25/Cdk5. STAT3 es fosforilada por p25/Cdk5 y se transloca al núcleo. El elevado nivel de pSTAT3 en el núcleo aumenta la transcripción de ARNm de BACE1, lo que potencia la producción de Aβ. Modificado de Liu y colaboradores, 2013 [85].

En la misma línea, está la observación de que ratones transgénicos que expresan p25 humano inducible, presentan un aumento en la expresión de BACE1 y niveles más altos de Aβ en el prosencéfalo, luego de 2 a 11 semanas de inducción de p25 [89]. Adicionalmente, los niveles de BACE1 y el correspondiente fragmento β-carboxi terminal de APP (β-CTF) aumentaron tras la sobreexpresión de m-calpaína en células HEK293 que expresan APP [86].

De manera opuesta, en modelos murinos APP/PS1, que expresan APP humana con mutación sueca (APP_{swe}) y presenilina 1 humana mutante (PS1E9), se sobreexpresó CAST y se observó una disminución en los niveles de BACE1 y β -CTF. Además, esto se asoció con una disminución en el número de placas amiloides y en los niveles totales de $A\beta$ en hipocampo, neocorteza y cuerpo calloso [86], lo que significa que calpaína podría promover indirectamente el procesamiento de APP por la vía amiloidogénica, mediante la síntesis de BACE1.

Por otro lado, se cree que la fosforilación de APP en Thr668 desempeña un papel crítico en su escisión en fragmento soluble productor de $A\beta$, y se demostró que la principal quinasa que fosforila APP en este sitio es Cdk5 [90, 91], lo que sugiere que la activación de Cdk5 mediada por calpaína conduce al procesamiento amiloidogénico de APP tanto por el aumento en la expresión de BACE1, así como la fosforilación de APP en Thr668. Estos antecedentes, en conjunto, demuestran que las calpaínas juegan un rol clave en la EA, potenciando la vía amiloidogénica de APP para aumentar la generación del péptido $A\beta$; y contribuyendo de esta forma a la muerte neuronal.

En base a los antecedentes planteados, y a resultados previos de nuestro grupo que demuestran que tanto neuronas de hipocampo expuestas a A β , como cerebros de pacientes con EA presentan un incremento en la expresión del receptor purinérgico P2X2, nos proponemos estudiar el rol de este receptor en la fisiopatología de la EA. De esta manera, planteamos establecer un posible vínculo entre la activación de P2X2R y la actividad incrementada de calpaínas, como un elemento de señalización intracelular central en el mecanismo fisiopatológico de la EA.

Esta propuesta de investigación plantea varias preguntas fundamentales. Entre ellas se encuentran: 1) ¿Los receptores purinérgicos P2X2 tendrán un rol relevante para modular vías de señalización intracelular Ca²⁺-dependientes que conduzcan al deterioro neuronal en la EA? 2) ¿Calpaína-1 y calpaína-2 pueden ser activadas por los receptores purinérgicos P2X2 para potenciar la vía amiloidogénica e incrementar producción de péptido beta-amiloide?

Estudiar estos elementos, es fundamental para comprender los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a la neurodegeneración, y dilucidar la posible implicación del eje P2X2R/calpaínas en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas irreversibles, como la EA.

II. HIPÓTESIS

“La sobreexpresión y activación de receptores purinérgicos P2X2 conduce a una sobreactivación de calpaína-1 y calpaína-2, en un mecanismo mediado por el incremento de Ca^{2+} intracelular, potenciando la vía amiloidogénica y la producción de péptido beta-amiloide”.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el rol de la actividad de calpaína-1 y calpaína-2, tras la activación de los receptores purinérgicos P2X2, para determinar su impacto sobre la vía amiloidogénica y la producción del péptido beta-amiloide.

Objetivos específicos

Objetivo específico 1. Determinar los cambios en la expresión y actividad de calpaína-1 y calpaína-2, tras la activación de los receptores purinérgicos P2X2, en líneas celulares con sobreexpresión del receptor.

Objetivo específico 2. Evaluar el efecto de la activación de calpaínas, mediada por P2X2R, sobre la vía amiloidogénica y la producción del péptido beta amiloide, en líneas celulares con sobreexpresión del receptor.

Objetivo específico 3. Evaluar los niveles proteicos de calpaínas y del receptor purinérgico P2X2R en ratones transgénicos APP/PS1 y en cerebros humanos post-mortem diagnosticados con diferentes estadios de la enfermedad de Alzheimer.

IV. METODOLOGÍA

1. Cultivo celular

La línea celular PC-12, de feocromocitoma de glándula suprarrenal de rata (CRL-1721.1, ATCC, USA) fue cultivada en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Corning) que contiene 4,5 g/L de glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio; suplementado con suero fetal bovino (FBS, 5%), suero de caballo (HS, 5%) y penicilina-estreptomicina (1%). Los cultivos se mantuvieron a 37°C y 5% CO₂, y las células fueron utilizadas con un 60-70% de confluencia.

2. Transfección

Células PC-12 fueron transfectadas con 0,5 µg del plásmido pcDNA3.1-P2X2R o 1 µg del plásmido pcDNA3.1-P2X2R-I328C, y 0,5 µg de GFP como gen reportero. Se utilizó 1,5 µl de lipofectamina-2000 (Invitrogen, CA, USA) por cada µg de plásmido a utilizar. Se preparó una solución con el mix de plásmidos y lipofectamina en opti-MEM (Gibco), y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Esta solución se agregó a las células por 4 h, y luego se realizó un cambio de medio de cultivo. Las células fueron utilizadas 24 h post-transfección.

3. Animales

Todos los animales fueron procesados cumpliendo con las regulaciones éticas establecidas por NIH y la Universidad de Concepción, bajo los criterios 3B (basados en las pautas para el cuidado y uso de animales de la comunidad ética, bioética y de bioseguridad de la Universidad de Concepción). El número de aprobación ética para este estudio es CEBB667-2020. Se utilizaron ratones transgénicos APP/PS1 (B6.Cg-Tg(APP^{swe},PSEN1^{dE9})85Dbo/Mmjax) (Jackson Laboratory, USA). Estos animales expresan la mutación sueca K594M/N595L y una variante humana de Presenilina-1 con una delección del exón 9 (PS1-dE9), por lo que secretan mayores niveles de A β [92]. Los ratones se alojaron en grupos de 2-4, permanecieron con un ciclo de 12 h de luz/oscuridad y se les suministró comida y agua libremente. Se utilizaron 6 machos transgénicos APP/PS1 y 6 machos compañeros de camada wild type (WT) correspondiente a la cepa C57BL/6J, de 6-7 meses de edad. Los ratones fueron sacrificados por decapitación tras anestesia con isoflurano, y los cerebros obtenidos se depositaron en solución de corte (NaCl 120mM, KCl 1mM, CaCl₂ 0,5mM, NaHCO₃ 26mM, MgSO₄ 10mM, KH₂PO₄ 1,18mM, glucosa 11mM y sacarosa 200mM, pH 7.4) burbujeada constantemente con una mezcla gaseosa 95% O₂/5%CO₂ para diseccionar hipocampo y corteza.

4. Preparación de muestras humanas

Este estudio fue aprobado por el comité ético de la Universidad Miguel Hernández de Elche y por el Departamento de Salud de Alicante - Hospital General (España), y se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Las muestras cerebrales (corteza prefrontal, área 9 de Brodmann) y los datos de los pacientes incluidos en este estudio fueron proporcionados por el Biobanco HUB-ICO-IDIBELL (PT20/00171), integrado en la Plataforma de Biobancos y Biomodelos del ISC-III, que gestiona y regula las diferentes colecciones de muestras biológicas provenientes del Hospital Universitario de Bellvitge (Barcelona, España). Las muestras fueron procesadas siguiendo procedimientos operativos estándar con la correspondiente aprobación de los Comités Ético y Científico.

Casos de EA esporádico fueron seleccionados en base a su historial clínico de demencia y diagnóstico neuropatológico CERAD [93], y se clasificaron en estadios Braak de acuerdo con la distribución de NFTs [19]. De esta manera, se obtuvieron estadios Braak I-II: n=8 (2 mujeres/6 hombres), 63 ± 5 años; estadios Braak III-IV: n=8 (3 mujeres/5 hombres), 78 ± 7 años; y estadios Braak V-VI: n=8 (3 mujeres/5 hombres), 76 ± 6 años. Tomando en conjunto desde Braak I a VI: n=24 (8 mujeres/16 hombres), 72 ± 9 años. Se tuvo especial cuidado en no incluir casos con patologías combinadas para evitar sesgos en la serie patológica. Las

muestras de pacientes control (n=8, 4 mujeres/4 hombres, 56±10 años) corresponden a individuos sin demencia clínica y sin evidencia de otra patología en el cerebro. El intervalo post-mortem medio del tejido fue de 7,1 h en todos los casos, sin diferencias significativas entre los subgrupos.

Las muestras de corteza prefrontal humana se mantuvieron a -80°C y luego en hielo seco para realizar cortes de aproximadamente 100 mg con bisturí. En seguida, los cortes se homogenizaron en 1mL de buffer que contiene: Sucrosa 0,32M, Tris 10mM, Na₃VO₄ 1mM, NaF 5mM, EDTA 1mM, HEPES 1mM e inhibidor de proteasas (MilliporeSigma), con la ayuda de un homogeneizador Heidolph (10 golpes), en cámara fría (4°C). De esta manera se obtuvieron homogenizados totales de corteza (T).

5. Fraccionamiento subcelular de muestras humanas

Homogenizados totales de corteza (T) fueron sometidos a una centrifugación (1000 g, 10 min, 4°C) para obtener un pellet 1 que corresponde a la fracción nuclear y un sobrenadante 1 libre de núcleo (S1). S1 se centrifugó a 10000 g (15 min, 4°C) para obtener un pellet 2 o fracción enriquecida en membrana (P2), y un sobrenadante 2 que corresponde a la fracción celular citosólica y microsomas (S2). P2 se solubilizó en agitación por 20 min, en 300 µl de buffer que contiene: Tritón X-100 1% v/v, Tris 10mM, Na₃VO₄ 1mM, NaF 5mM, EDTA 1mM, HEPES

1mM e inhibidor de proteasas. Luego de una centrifugación a 320000 g (20 min, 4°C), se obtuvo un pellet enriquecido en membrana postsináptica (TxP), que se solubilizó en 100 µl de buffer RIPA 1x, y un sobrenadante enriquecido en membrana extrasináptica, que incluyen membranas no sinápticas y membranas presinápticas (TxS) (Figura 7).

2 µl de T, P2, S2, TxP y TxS se utilizaron para cuantificar proteína a través del método de BCA. Para cada ensayo se realizó una curva de estandarización de BCA y la absorbancia se leyó en placas de 96 pocillos en el lector de microplacas Infinite 200PRO MNano Nanoquant (Tecan) a 570 nm.

Para validar nuestro protocolo de fraccionamiento subcelular, medimos los niveles de proteínas clave asociadas a cada compartimento celular: La proteína de densidad post-sináptica PSD95, la proteína presináptica de vesícula sinaptofisina y la proteína citosólica de la red trans-Golgi TGN46 (Figura 37A).

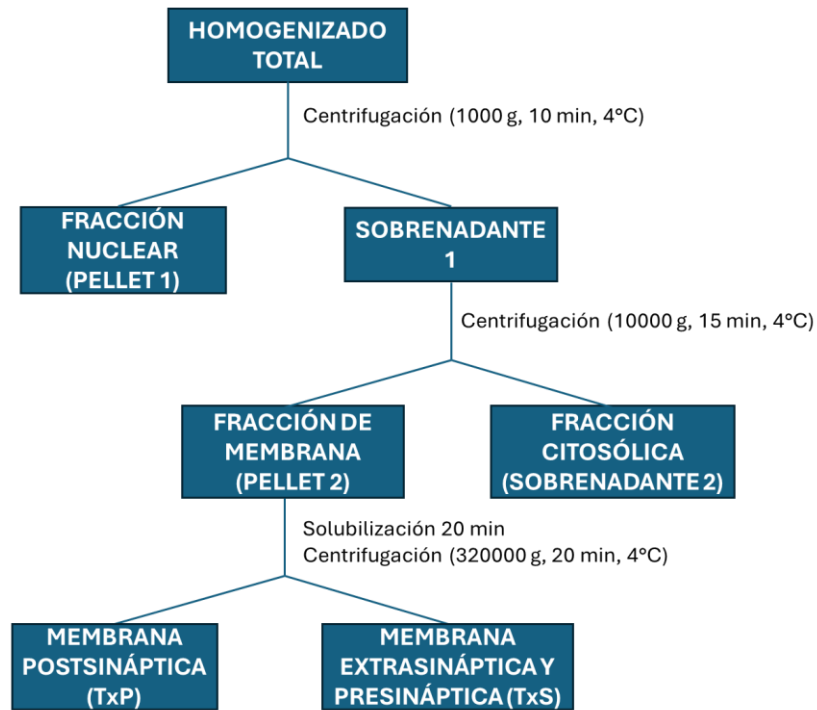


Figura 7. Protocolo de fraccionamiento subcelular para muestras de corteza prefrontal humana.

6. Western blot

Células PC-12 fueron lisadas en hielo con buffer de composición: Tris 10mM, EDTA 10mM, NaCl 100mM, Tritón 0,5%, Glicerol 10%, inhibidor de proteasas (complete Mini EDTA free, Sigma Aldrich) e inhibidor de fosfatasas (Sigma-Aldrich), pH 7.4.

Para la lisis de cerebro de ratones se utilizó un buffer de homogenización que está compuesto por: Tris 10mM, N-metil-maleimida 10mM, sacarosa 0,25 M,

inhibidor de proteasas e inhibidor de fosfatasas, pH 7.4. Hipocampos y cortezas se lisaron con un sonicador (Cole-Parmer 8850), en hielo, y posteriormente se centrifugaron (8000 g, 10 min, 4°C) para obtener el sobrenadante.

Cortezas prefrontales humanas se prepararon como se describe en las secciones de “preparación de muestras humanas” y “fraccionamiento subcelular”.

Todas las muestras se mezclaron con buffer de carga y se denaturaron a 95°C por 10 min. Se cargaron 20-30 µg de proteína por carril en geles de poliacrilamida (al 7.5, 10 o 12%, dependiendo del tamaño de la proteína). La electroforesis se realizó a 100 V, por 100 min. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 250 mA, por 120 min. Para muestras provenientes de cultivos celulares y ratones, la membrana se bloqueó con leche (5%, en TBS Tween 1X) o con phosphoBLOCKER (Cell Biolabs) en el caso de proteínas fosforiladas (1 h); mientras que para muestras humanas, la membrana se bloqueó con Buffer de bloqueo Odyssey (Li-COR) por 1 h. Los anticuerpos primarios descritos en las Tablas 2 y 3 se incubaron durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 5 min con TBS y se incubaron los anticuerpos secundarios descritos en las Tablas 2 y 3, por 1 h, a temperatura ambiente (TA).

Las bandas inmunoreactivas fueron reveladas con el kit Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) y el sistema de detección Odyssey FC (Li-COR) cuando se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con HRP (Tabla 2); o el sistema Odyssey CL×Infrared Imaging (Li-COR Biosciences GmbH) en el caso de

anticuerpos secundarios fluorescentes (Tabla 3). La cuantificación de la inmunoreactividad de las bandas se llevó a cabo con el software Image Studio (Image Studio Inc., Appleton, WI, USA), y la normalización se realizó para cada banda con la correspondiente proteína de control de carga.

7. Western Blot para detectar A β en muestras humanas

100 mg de corteza prefrontal humana fueron homogenizados en 1 mL de buffer que contiene: Sucrosa 0,32M, Tris 10mM, Na₃VO₄ 1mM, NaF 5mM, EDTA 1mM, HEPES 1mM e inhibidor de proteasas, con un homogeneizador Heidolph, en cámara fría (4°C). Las muestras se mezclaron con buffer de carga y se denaturaron a 65°C por 15 min. Se cargaron 20 μ g de proteína en geles de glicerol-acrilamida en gradiente (4% fase superior, 10% fase intermedia y 16% fase inferior). La electroforesis se realizó a 30 V por 30 min, y luego a 120 V por 120 min, con un buffer cátodo 1x (Tris 1M, Tricina 1M, SDS 1%, pH 8.25, Sigma) y un buffer ánodo 1x (Tris 1M, pH 8.9). Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa con un sistema de transferencia en semi-seco (Bio-Rad) a 160 mA, por 1 h. La membrana se bloqueó con Buffer de bloqueo Odyssey (Li-COR) por 1 h. El anticuerpo primario anti-A β 6E10 (Tabla 3) se incubó durante toda la noche a 4°C, y el anticuerpo secundario (Tabla 3) se incubó por 1 h a TA.

Las bandas inmunoreactivas fueron reveladas con el sistema de detección Odyssey CL×Infrared Imaging (Li-COR Biosciences GmbH). La cuantificación de la inmunoreactividad de las bandas se llevó a cabo con el software Image Studio, y la normalización se realizó para cada banda con α -tubulina (Tabla 3).

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en Western Blot para células PC-12 y cerebro de ratones.

Anticuerpo primario	especie	dilución	código	marca
anti-P2X2R	rabbit	1:1000	APR-003	Alomone Labs
anti-calpaína-1	rabbit	1:1000	2556S	Cell Signaling
anti-calpaína-2	rabbit	1:1000	2539S	Cell Signaling
anti-calpastatina	rabbit	1:2000	4146S	Cell Signaling
anti-espectrina	rabbit	1:1000	2122S	Cell Signaling
anti-p35/25	rabbit	1:500	2680S	Cell Signaling
anti-Cdk5	mouse	1:1000	sc-249	Santa Cruz Biotech
anti-pSTAT3	rabbit	1:1000	9134T	Cell Signaling
anti-STAT3	mouse	1:1000	9139T	Cell Signaling
anti-BACE1	mouse	1:1000	MA1-177	Invitrogen
anti-A β	rabbit	1:2000	NBP1-78007	Novus Biologicals
anti-APP	rabbit	1:500	51-2700	Invitrogen
anti- β -actina	mouse	1:3000	sc-69879	Santa Cruz Biotech
anti-G β	rabbit	1:1000	sc-378	Santa Cruz Biotech
Anticuerpos secundarios conjugados a HRP				
anti-rabbit IgG HRP	rabbit	1:5000	1706515	Bio-Rad
Anti-mouse IgG HRP	mouse	1:5000	1721011	Bio-Rad

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en Western Blot para muestras humanas.

Anticuerpo primario	especie	dilución	código	marca
anti-P2X2R	rabbit	1:1000	NBP2-19655	Novus Biologicals
anti-calpaína-1	mouse	1:1000	MA3940	Invitrogen
anti-PSD95	goat	1:1000	ab12093	Abcam
anti-sinaptofisina	mouse	1:1000	60191-1-Ig	Proteintech
anti-TGN46	rabbit	1:1000	13573-1-AP	Proteintech
anti-A β 6E10	mouse	1:1000	803001	Biolegend
anti- α -tubulina	mouse	1:5000	62204	Invitrogen
Anticuerpos secundarios fluorescentes				
IRDye 800CW	rabbit	1:10000	926-32213	LI-COR Biosciences
IRDye 680RD	mouse	1:10000	926-68072	LI-COR Biosciences
IRDye 680RD	goat	1:10000	926-68074	LI-COR Biosciences

8. Inmunocitoquímica

Células PC-12 transfectadas con P2X2R/GFP y sometidas a tratamientos con ATP y MDL28170, fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS 1X (15 min, 4°C). Las células se lavaron 3 veces con PBS 1X y se incubaron con el marcador de membrana WGA (Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor 647, Invitrogen) 5 μ g/mL, 10 min, a TA antes de permeabilizar. La permeabilización y bloqueo de uniones inespecíficas se realizó de manera simultánea con una solución que

contiene: PBS 1X, HS 10% y Tritón X-100 0.1%, durante 30 min. Se utilizaron los anticuerpos primarios de la Tabla 2: anti-calpaína-1 (rabbit, 1:200), anti-calpaína-2 (rabbit, 1:200), anti-BACE1 (mouse, 1:200) y anti-A β (rabbit, 1:200), los cuales se incubaron durante 90 min a TA. Como anticuerpos secundarios se utilizaron asociados a fluoróforos Cy3 (1:200, anti-rabbit, 711166152, Jackson Inmuno Research) y Cy3 (1:200, anti-mouse, 715165150, Jackson Inmuno Research), por 1 h a TA. Luego, las muestras se incubaron con tinción nuclear DAPI (Tocris) 300 nM, durante 10 min, y se montaron en portaobjetos utilizando el medio de montaje de inmunofluorescencia DAKO (Agilent, USA). Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal de alta resolución espacio-temporal (SP8 LIGHTNING, LEICA) con un aumento de 63x y zoom de 1.8x, en el centro de microscopía avanzada (CMA BIOBIO) de la Universidad de Concepción. Las imágenes fueron deconvolucionadas 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 CY3: 550; λ Alexa Fluor 647: 651; λ DAPI: 358). Para medir la intensidad de fluorescencia se seleccionaron 3 regiones de interés (ROIs) de 10x10 píxeles en el citosol de cada célula, utilizando GFP para evitar sesgos en la selección de ROIs y la posterior cuantificación de la inmunorreactividad. La deconvolución, análisis y cuantificación de las imágenes fueron realizadas en el programa ImageJ (NIH).

9. Ensayo de actividad de calpaínas

Se evaluó la actividad proteasa de calpaínas con Calpain Activity Fluorometric Assay Kit (MAK228, Sigma). Se utilizaron placas Petri de 60 mm de células PC-12 control o transfectadas con P2X2R. 24 h post-transfección, las células se lavaron con PBS 1X, se trataron con tripsina (5min, 37°C) y se centrifugaron (3000 rpm, 3 min) para traspasarlas a placas de 12 pocillos. Allí, se separaron en 4 grupos: Control, transfectadas con P2X2R, P2X2R+ATP (100µM), P2X2R+ATP+el inhibidor de calpaínas Z-LLY-FMK (1µM, MAK228E), por 60min. Luego de los tratamientos, las células se pasaron a tubos eppendorf, se centrifugaron (3000 rpm, 3 min) para eliminar el medio de cultivo y se añadió 50 µl de Extraction Buffer (MAK228A), por 20 min en hielo, con agitación cada 2-3min.

En seguida, las muestras se traspasaron a una placa negra de 96 pocillos con fondo transparente (Greiner). Cada pocillo contenía: 45 µl de muestra, 10 µl de Reaction Buffer 10X (MAK228B), 5 µl del sustrato fluorescente de calpaínas Ac-LLY-AFC (MAK228C) y 40 µl de Extraction Buffer. La fluorescencia (ex: 400 nm; em: 505 nm) se registró en lector de multiplacas NOVOstar por 200 min, 60 ciclos, a 37°C. El sustrato Ac-LLY-AFC emite luz azul (400 nm); tras la escisión por calpaína, el AFC libre emite fluorescencia amarillo-verde (505 nm). La comparación de la intensidad de fluorescencia de una muestra tratada con un

control permite determinar los cambios en la actividad de calpaína [94]. Los valores de intensidad de fluorescencia del sustrato Ac-LLY-AFC obtenidos fueron normalizados por milígramo de proteína para cada condición, y se graficaron los datos normalizados en el punto final de la curva (minuto 200).

10. Electrofisiología

Patch Clamp de célula completa se realizó según los protocolos descritos por Fuentealba y colaboradores [95, 96], 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, 2,1 MgCl₂; 10 HEPES, 10 Glucosa, pH 7.35 - 7.4, 300 mOsm). La pipeta se rellenoó 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 100 µM por 10 s. El compuesto foto-conmutador MEA-TMA ((E) - 2 - ((4 - ((4 - (3- (2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il) propanamido) fenil) diazenil) fenil) amino) N, N, N-trimetil-2-oxoetanaminio 2,2,2-trifluoroacetato) fue proporcionado por el Dr. Thomas Grutter (University of Strasbourg). Las células fueron incubadas con MEA-TMA (200 µM) por 5 min y en oscuridad, antes de realizar el sello para registrar las corrientes. Luego, las corrientes sensibles a la luz en estado estable a -60 mV se modularon mediante la exposición a la luz verde (525 nm). En estas condiciones, la configuración trans

de MEA-TMA activa al mutante P2X2R-I328C, permitiendo el flujo iónico [97]. Para evitar una activación tan prolongada que posiblemente sea perjudicial para las células, se realizaron breves aplicaciones de luz UV (365 nm) para forzar al azobenceno a su estado cis-inactivado, con una lámpara de arco de mercurio (Ushio) y los filtros de excitación necesarios. El control de iluminación fue realizado por medio de un Shutter Lambda 10-B (Sutter Instrument Co, Novato, CA, USA). Los análisis se realizaron usando Clampfit 10.7 (Axon Instruments, USA).

11. Microfluorimetría de Ca²⁺ citosólico

Células PC-12 fueron incubadas con la sonda de calcio intracelular Fluo4-AM® (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante (5µM, 20min, 37°C). En seguida, se realizó un lavado con DPBS 1X por 20 min. Para la realización de los experimentos, las células permanecieron en solución externa normal (SEN), de composición (en mM): 150 NaCl, 5,4 KCl, 2 CaCl₂, 2,1 MgCl₂; 10 HEPES, 10 Glucosa, pH 7.4, 300 mOsm. Las células fueron expuestas a ATP 100 µM (SIGMA) mediante un sistema de perfusión (AutoMate Scientific), y los cambios intracelulares en los niveles de Ca²⁺ se registraron utilizando un microscopio de epifluorescencia invertido Nikon TE-2000-U (Nikon, Tokio, Japón) acoplado a una cámara EM-CCD iXon ANDOR de 16 bit (Andor, Belfast, Irlanda). El control de iluminación fue realizado por medio de un Shutter Lambda 10-B (Sutter

Instrument Co, Novato, CA, USA), la fuente de iluminación fue una lámpara de Arco de mercurio, utilizando un filtro de excitación de 480 nm y un filtro de emisión de 520 nm. La adquisición de datos, manejo de cámara, shutter, y análisis de fluorescencia se llevaron a cabo con el programa Imaging Workbench 6.0 (Indec BioSystems, Santa Clara, CA, USA).

12. Análisis de datos

Todos los experimentos se realizaron en al menos tres repeticiones biológicas independientes. Los resultados fueron graficados como promedio \pm error estándar y expresados como porcentaje del control. La significancia estadística se determinó utilizando la prueba t Student no emparejada (para dos grupos) o ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (para comparaciones de múltiples grupos). Se consideró significancia estadística si $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Prism, CA, USA).

No se utilizaron herramientas de inteligencia artificial en la escritura de esta tesis.

V. RESULTADOS

1. Estandarización de un modelo de sobreexpresión de P2X2R en células PC-12.

En primer lugar, comenzamos a estandarizar nuestro modelo de estudio. Para esto, transfectamos el plásmido que contiene la secuencia codificante para P2X2R de rata en células PC-12, mediante el uso de lipofectamina 2000. Con la técnica de Western blot se pudo observar que luego de la transfección con el plásmido (0,5 µg), hubo un incremento de un 198% en la expresión del receptor P2X2R, en comparación con las células sin transfectar (células control) o en comparación con las células transfectadas con el plásmido codificante para GFP (0,5 µg), que muestran una expresión de P2X2R endógena (Control:100±2%, GFP: 88±5%, P2X2R/GFP: 298±13%) (Figura 8A, 8B).

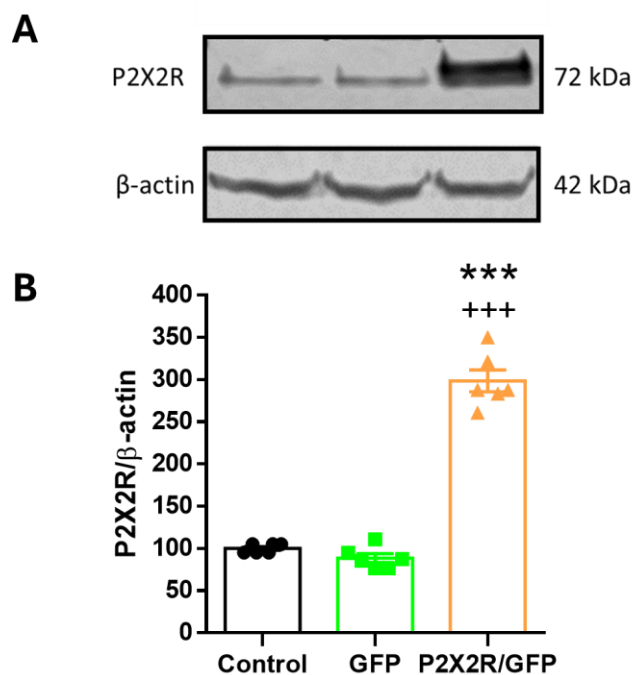


Figura 8. Transfección del receptor purinérgico P2X2.

A) Imagen de Western blot representativa de los niveles de P2X2R en células PC-12 control, células PC-12 transfectadas con 0,5 µg de plásmido que codifica GFP como control de transfección y células PC-12 transfectadas con 0,5 µg de plásmido que codifica para P2X2R. Se utilizó β-actina como control de carga. **B)** Cuantificación de la banda inmunorreactiva de P2X2R respecto de la banda de β-actina, expresada como porcentaje del control, (n=6). La significancia estadística se determinó mediante prueba t-student, donde ***p<0,001 P2X2R/GFP vs control, y ***p<0,001 P2X2R/GFP vs GFP.

Posteriormente, mediante electrofisiología, se evaluó la expresión funcional de los receptores P2X2R en las células transfectadas (Figura 9A). Así, observamos que las corrientes inducidas por ATP (100 µM, 10 s) incrementaron significativamente en las células transfectadas con P2X2R, en comparación con las células control o con las células transfectadas sólo con GFP (Control:100±39%, GFP:96±34%, P2X2R/GFP:443±201%) (Figura 9B).

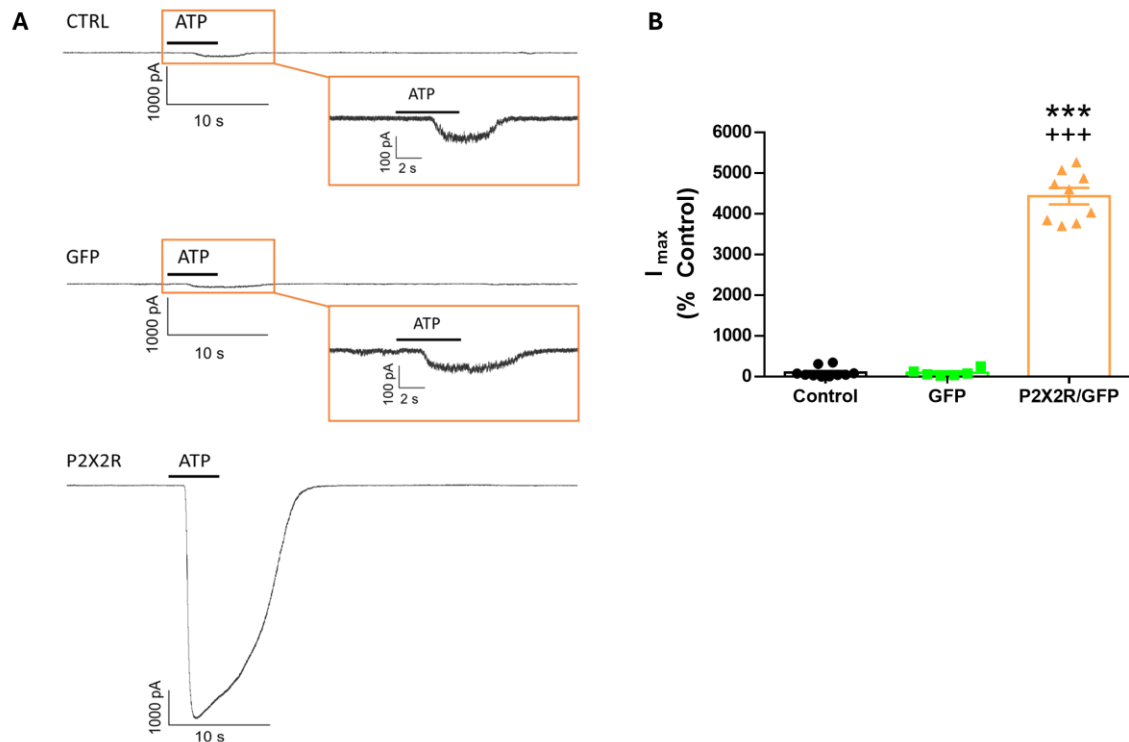


Figura 9. Corrientes purinérgicas inducidas por ATP en células que sobreexpresan P2X2R.

A) Mediante patch clamp, se obtuvieron trazos representativos de las corrientes purinérgicas evocadas por pulsos de ATP (100 μ M, 10 s) en células PC-12 control, células transfectadas con 0,5 μ g de GFP y células transfectadas con 0,5 μ g de plásmido que codifica para P2X2R. **B)** Se cuantificó la corriente máxima (I_{MAX}) obtenida a partir de los trazos obtenidos en A, (n=9). La significancia estadística se determinó mediante prueba t-student, donde ***p<0,001 P2X2R/GFP vs control, y +++p<0,001 P2X2R/GFP vs GFP.

Para comprobar que el aumento en las corrientes medidas por patch clamp están asociadas a la activación de P2X2R, y un consecuente aumento del Ca^{2+} intracelular, se realizaron ensayos de microfluorimetría de Ca^{2+} citosólico (Figura 10A). De esta manera, observamos que frente a estímulos de ATP (100 μ M, 10 s), existe un aumento significativo en la fluorescencia de la sonda Fluo-4AM, lo

que indica un aumento del Ca^{2+} intracelular en las células que fueron transfectadas con el plásmido codificante para P2X2R, en comparación con las células control (Control: $100 \pm 8\%$, P2X2R: $222 \pm 15\%$) (Figura 10B). Estos resultados, en conjunto, nos demuestran que la sobreexpresión de P2X2R en células PC-12 es efectiva, y además es funcional.

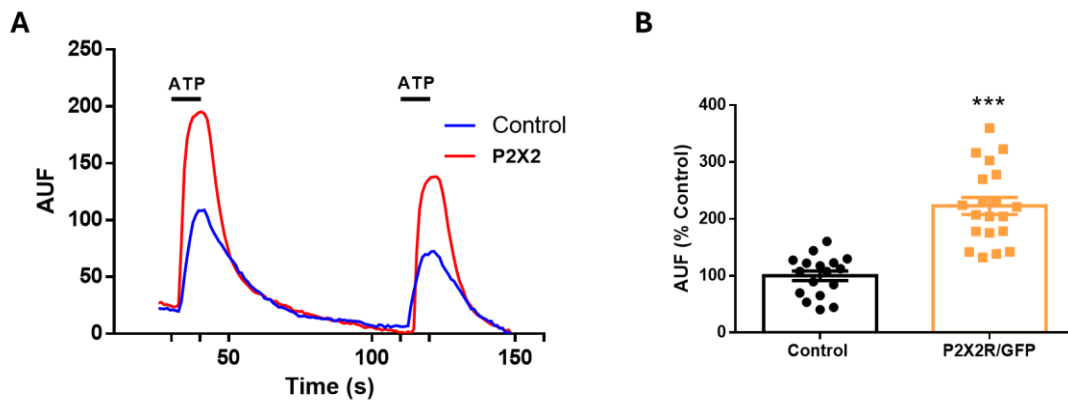


Figura 10. Incrementos de Ca^{2+} citosólicos inducidos por ATP en células que sobreexpresan P2X2R.

A) Trazos representativos de señales de Ca^{2+} citosólicas evocadas por pulsos de ATP ($100 \mu\text{M}$, 10 s) en células PC-12 control (azul) y co-transfectadas con P2X2R/GFP (rojo).

B) Cuantificación de la fluorescencia del primer pulso de ATP en células control y transfectadas, ($n=20$). La significancia estadística se realizó mediante prueba t-student, donde *** $p < 0,001$ P2X2R/GFP vs control.

2. Incrementos en los niveles de la proteína calpaína-1 inducidos por la activación del receptor purinérgico P2X2R.

Células PC-12 transfectadas con P2X2R fueron tratadas con ATP (100 μ M) durante 15, 30 y 60 min, para cuantificar los niveles de las proteínas calpaína-1 y calpaína-2 mediante la técnica de Western blot. De esta manera, observamos que los niveles de calpaína-1 incrementaron de manera tiempo dependiente de la incubación con ATP, siendo este aumento significativo a los 15, 30 y 60 min (Control: 100 \pm 2%, GFP: 104 \pm 3%, ATP (0 min): 105 \pm 4%, ATP (15 min): 126 \pm 4%, ATP (30 min): 136 \pm 4%, ATP (60 min): 146 \pm 6%, Figura 11A, 11B). Para consolidar este resultado, evaluamos la inmunorreactividad de calpaína-1 mediante la técnica de inmunocitoquímica (Figura 12A), y observamos que las células transfectadas con P2X2R tuvieron un incremento de un 14% en la inmunoreactividad para la proteína, en comparación con las células control. Sin embargo, cuando activamos a los receptores P2X2R con ATP (100 μ M, 60 min), el incremento de calpaína-1 fue de un 37% sobre el control (Control: 100 \pm 2%, GFP: 98 \pm 2%, P2X2R: 114 \pm 2%, P2X2R+ATP: 137 \pm 3%, Figura 12B).

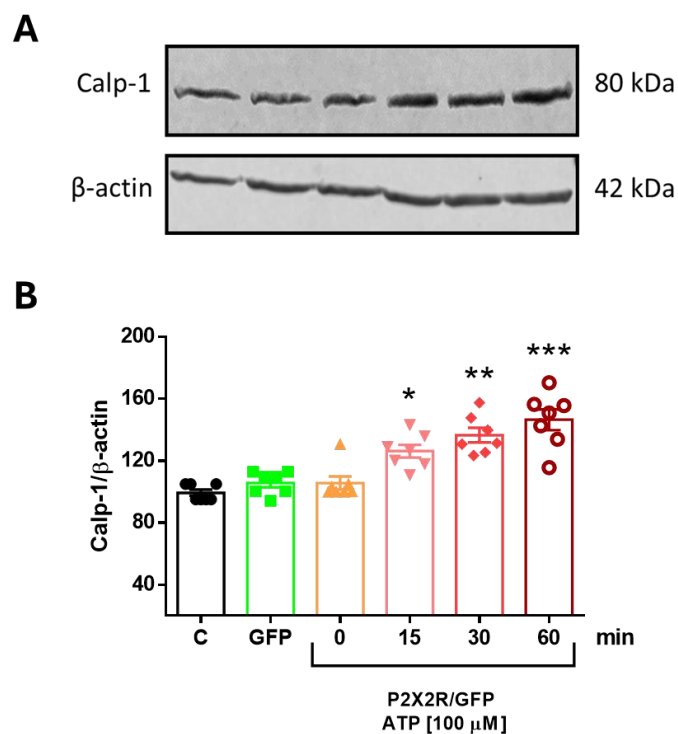


Figura 11. Aumento en los niveles de calpaína-1 tiempo-dependiente de ATP en células que sobreexpresan P2X2R.

A) Imagen de Western blot representativa de los niveles de calpaína-1 en células PC-12 transfectadas con P2X2R y tratadas con ATP (100 μ M) durante 15, 30 y 60 min. Se usó β -actina como control de carga. **B)** Cuantificación de la banda inmunorreactiva de calpaína-1 respecto de la banda de β -actina, expresada como porcentaje del control, (n=7). La significancia estadística se determinó mediante ANOVA para múltiples grupos, donde * p <0,05, ** p <0,01 y *** p <0,001 vs control.

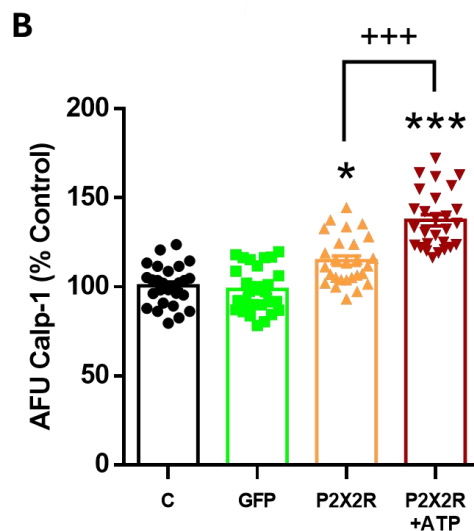
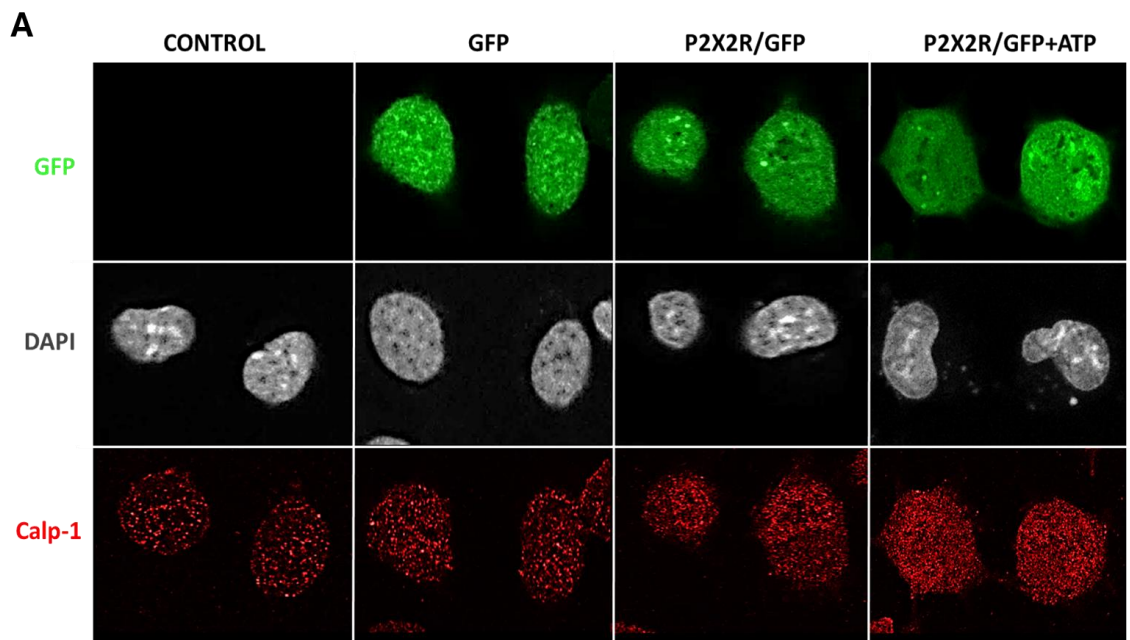


Figura 12. Cambios en la inmunorreactividad de calpaína-1 por la activación de P2X2R.

A) Imágenes representativas de la inmunorreactividad de calpaína-1 en células PC-12 transfectadas con P2X2R y tratadas con ATP (100 μ M, 60 min), obtenidas mediante la técnica de inmunocitoquímica. Verde (GFP), gris (tinción nuclear DAPI), rojo (calpaína-1) **B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de A, expresada como porcentaje del control, (n=3; N=27). Mediante ANOVA se determinó que *p<0,05, ***p<0,001 vs control, y con t-student que +++p<0,001 P2X2R vs P2X2R+ATP.

Luego, analizamos los niveles de calpaína-2 bajo las condiciones mencionadas anteriormente, es decir, células PC-12 transfectadas con P2X2R fueron tratadas con ATP (100 μ M) durante 15, 30 y 60 min. De esta manera observamos que los tratamientos con ATP no produjeron cambios en los niveles de proteína de calpaína-2 con respecto a las células control (Control: 100 \pm 2%, GFP: 95 \pm 4%, ATP (0 min): 91 \pm 4%, ATP (15min): 86 \pm 7%, ATP (30 min): 86 \pm 8%, ATP (60 min): 93 \pm 3%, Figura 13A, 13B). Al evaluar la inmunorreactividad de calpaína-2 mediante inmunocitoquímica (Figura 14A), observamos que las células transfectadas con P2X2R y estimuladas con ATP, no tuvieron un aumento significativo en los niveles de calpaína-2 (Control: 100 \pm 6%, GFP: 102 \pm 5%, P2X2R: 116 \pm 5%, P2X2R+ATP: 119 \pm 4%, Figura 14B). Además, calpaína-2 mostró tener una distribución asociada a la membrana plasmática de células PC-12, lo que se observa con el uso del marcador de membrana WGA (Figura 14A), mientras que calpaína-1 presentó una distribución citosólica (Figura 12A, Figura 15).

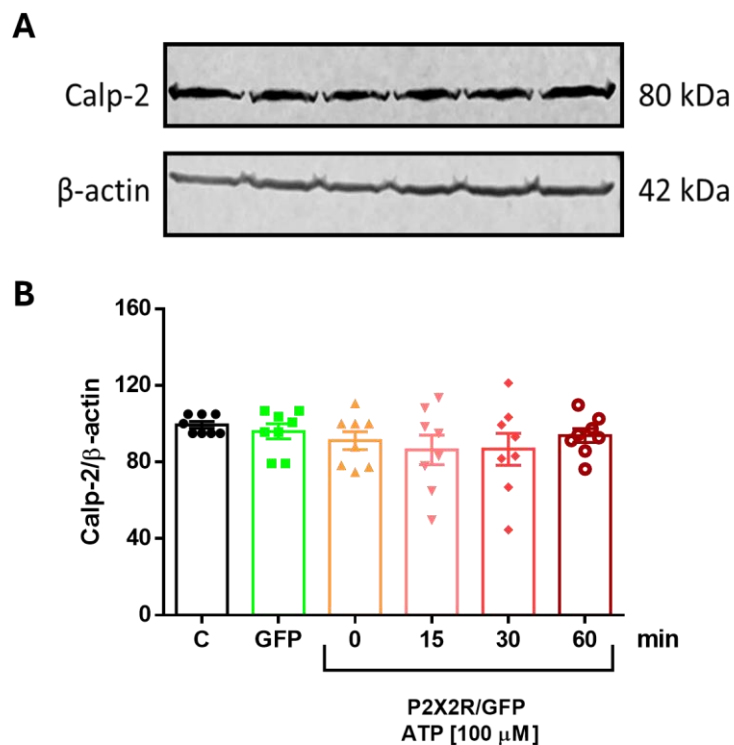


Figura 13. Determinación de los niveles de calpaína-2 en células PC-12 transfectadas con P2X2R y estimuladas con ATP.

A) Imagen de Western blot representativa de los niveles de calpaína-2 en células PC-12 transfectadas con P2X2R y tratadas con ATP (100 μ M) durante 15, 30 y 60 min. Se usó β -actina como control de carga. **B)** Cuantificación de la banda inmunorreactiva de calpaína-2 respecto de la banda de β -actina, expresada como porcentaje del control, (n=8). No se obtuvieron diferencias estadísticas mediante ANOVA para comparación de múltiples grupos.

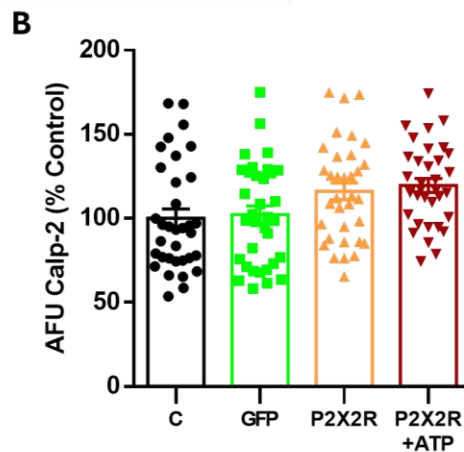
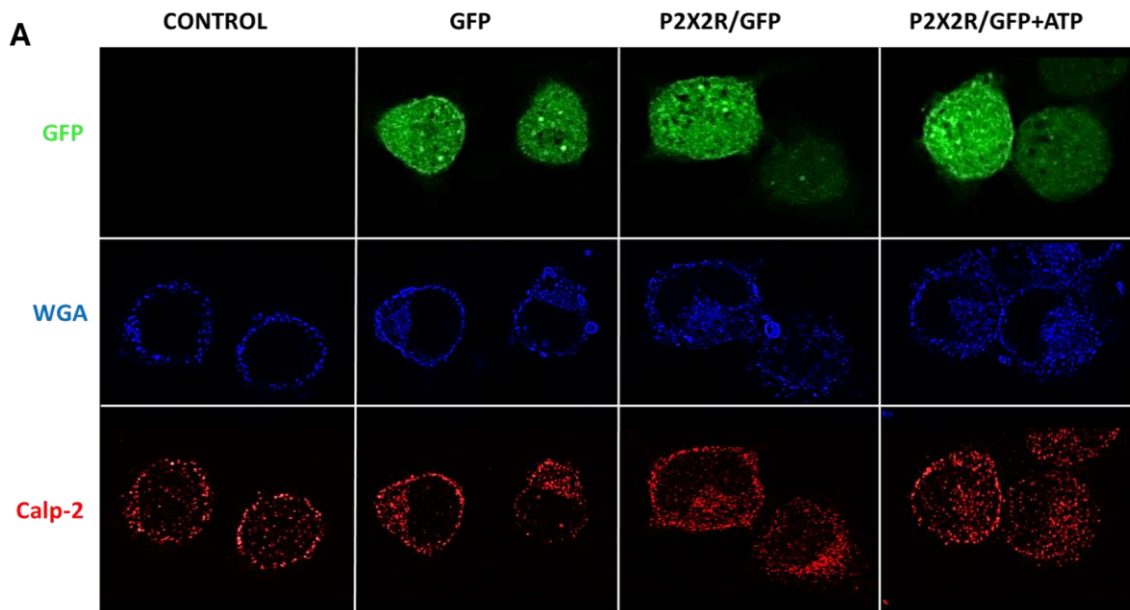


Figura 14. La activación de P2X2R no cambia los niveles de calpaína-2.

A) Mediante la técnica de inmunocitoquímica se obtuvieron imágenes representativas de la inmunorreactividad de calpaína-2 en células PC-12 transfectadas con P2X2R y tratadas con ATP (100 μ M, 60 min). Verde (GFP), azul (marcador de membrana WGA), rojo (calpaína-2) **B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de A, expresada como porcentaje del control (n=3, N=34). No se obtuvieron diferencias estadísticas mediante ANOVA para comparación de múltiples grupos.

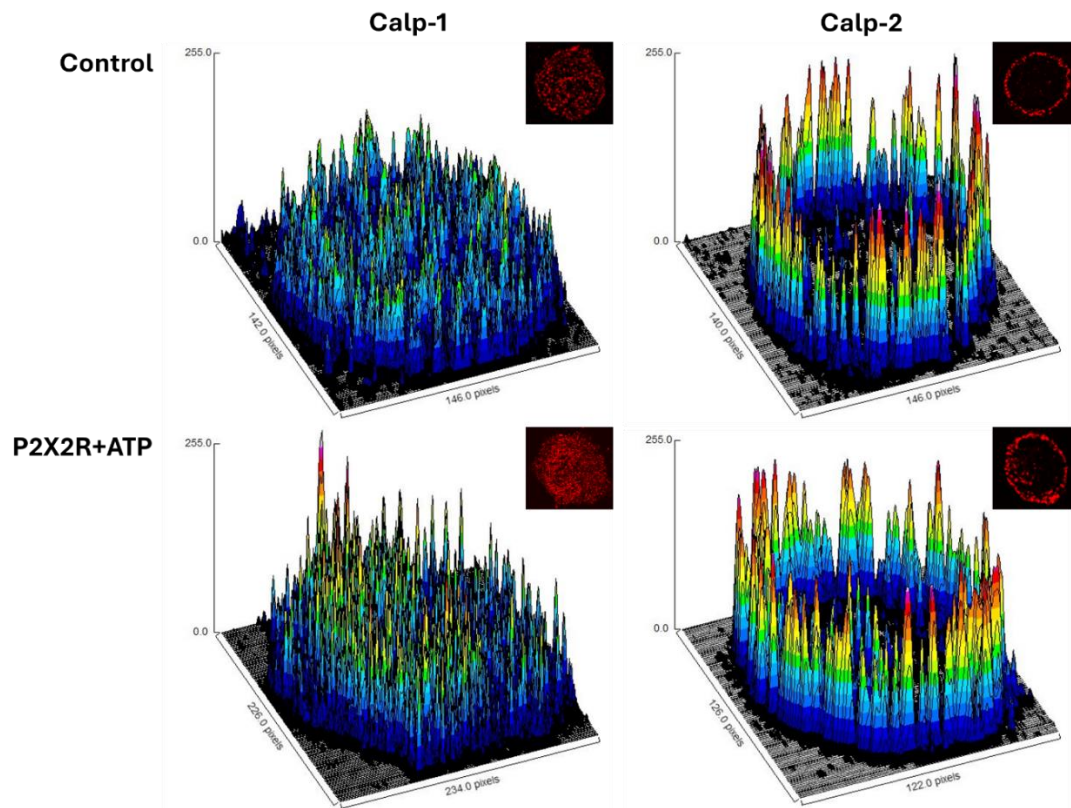


Figura 15. Distribución celular de calpaína-1 y calpaína-2 en células PC-12.

Surface plots 3D comparativos de la distribución celular de calpaína-1 y calpaína-2 en células PC-12 control (sin tratamientos) y células PC-12 transfectadas con P2X2R (0.5 μ g), que fueron expuestas a ATP 100 μ M por 60 min. En rojo se muestran imágenes representativas para cada condición (célula única) obtenidas a través de la técnica de inmunocitoquímica.

Adicionalmente, analizamos los niveles del inhibidor endógeno específico de calpaínas: calpastatina, con el propósito de conocer si la sobreexpresión y/o activación de P2X2R genera un cambio en su inmunorreactividad, lo que podría influir directamente en el aumento de la proteína calpaína-1 observado previamente. Sin embargo, al sobreexpresar P2X2R y estimular las células PC-

12 con ATP (100 μ M) durante 15, 30 y 60 min, no observamos diferencias significativas en los niveles de calpastatina en comparación con las células control (Control: $100\pm 2\%$, GFP: $102\pm 4\%$, ATP (0 min): $102\pm 6\%$, ATP (15 min): $93\pm 5\%$, ATP (30 min): $94\pm 8\%$, ATP (60 min): $94\pm 2\%$, Figura 16A, 16B).

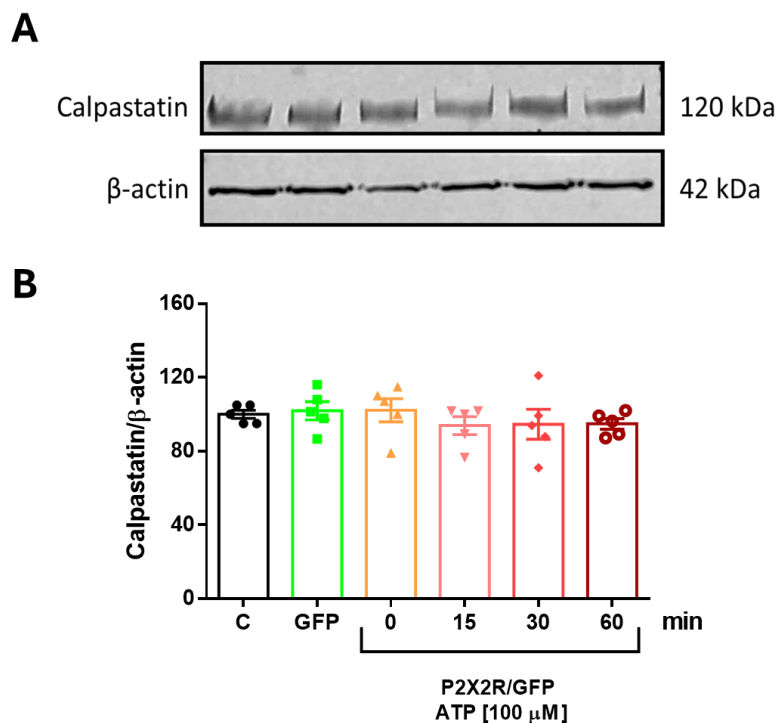


Figura 16. Variaciones en los niveles de calpastatina frente a la activación de P2X2R.

A) Imagen de Western blot representativa de los niveles de calpastatina en células PC-12 transfectadas con P2X2R y tratadas con ATP (100 μ M) durante 15, 30 y 60 min. Se usó β -actina como control de carga. **B)** Cuantificación de la banda inmunorreactiva de calpastatina respecto de la banda de β -actina, expresada como porcentaje del control, (n=5). No se obtuvieron diferencias estadísticas mediante ANOVA para comparación de múltiples grupos.

Al realizar una normalización de los resultados obtenidos por western blot, observamos que a medida que aumenta el tiempo de incubación con ATP (100 μ M) en células PC-12 que sobreexpresan P2X2R, incrementan los niveles de calpaína-1. Sin embargo, los niveles de calpaína-2 y calpastatina no varían en el tiempo (Figura 17). Estos resultados nos permiten sugerir que la activación de P2X2R produce un aumento específico en los niveles de calpaína-1, sin alterar los otros componentes del sistema.

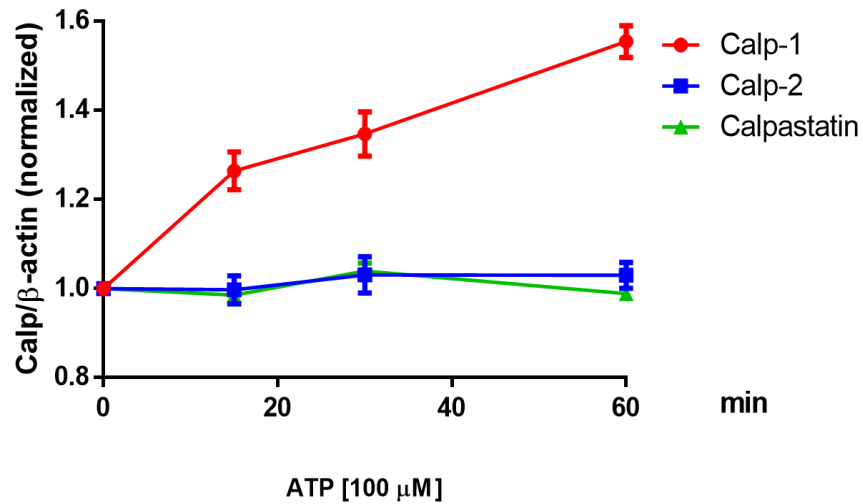


Figura 17. Variaciones en los niveles de expresión de componentes del sistema de calpaínas, tras la activación de P2X2R a diferentes tiempos.

Comparación entre los niveles normalizados de calpaína-1, calpaína-2 y calpastatina, en células PC-12 transfectadas con P2X2R y tratadas con ATP (100 μ M), a partir de los datos obtenidos por western blot de las figuras 11, 13 y 16.

3. La activación del receptor purinérgico P2X2R incrementa la actividad proteasa de calpaínas.

Luego de observar que la activación de P2X2R produce un aumento selectivo de calpaína-1, comenzamos a estudiar la actividad proteasa de calpaínas. Para esto, analizamos los niveles de la proteína espectrina, que se ha utilizado ampliamente en la literatura por ser uno de los principales sustratos de calpaínas [85, 98]. Mediante la técnica de Western blot observamos que en células PC-12 transfectadas con P2X2R, hubo una disminución de un 38% y 36% en los niveles de espectrina de longitud completa a los 30 y 60 min de incubación con ATP (100 μ M), respectivamente (Control: $100\pm 2\%$, GFP: $100\pm 9\%$, ATP (0 min): $101\pm 10\%$, ATP (15 min): $79\pm 6\%$, ATP (30 min): $62\pm 5\%$, ATP (60 min): $64\pm 5\%$, Figura 18A, 18B).

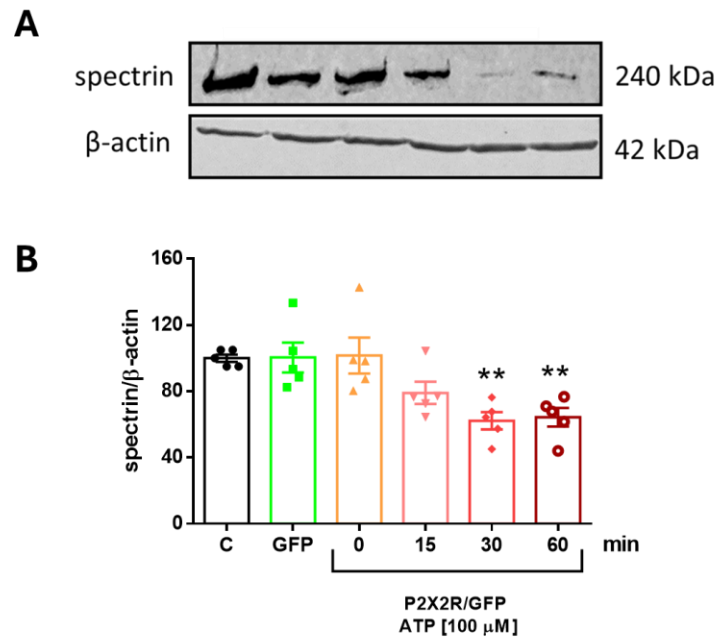


Figura 18. Cambios en los niveles de espectrina tras la activación de P2X2R a diferentes tiempos.

A) Imagen de Western blot representativa de los niveles de espectrina de longitud completa (sustrato de calpaínas) en células PC-12 transfectadas con P2X2R y tratadas con ATP (100 μM) durante 15, 30 y 60 min. Se usó β-actina como control de carga. **B)** Cuantificación de la banda inmunorreactiva de espectrina respecto de la banda de β-actina, expresada como porcentaje del control, (n=5). La significancia estadística se determinó mediante ANOVA para múltiples grupos, donde **p<0,01 vs control.

Adicionalmente, evaluamos la actividad proteasa de calpaínas con el sustrato fluorogénico de calpaínas Ac-LLY-AFC (S-calp, Figura 19A). Células PC-12 transfectadas con P2X2R fueron tratadas con ATP (100 μ M) durante 60 min, y luego la fluorescencia de S-calp (ex: 400 nm; em: 505 nm) se cuantificó en lector de multiplacas NOVOstar. Los valores de intensidad de fluorescencia de S-calp fueron normalizados por milígramo de proteína para cada condición. La cuantificación de los datos normalizados en el punto final de la curva de la Figura 19A (en el minuto 200) muestra que la activación de P2X2R con ATP (100 μ M) incrementó significativamente la actividad proteasa de calpaínas, en comparación con las células sin tratamiento (Figura 19B). Como un control adicional utilizamos el inhibidor de calpaínas Z-LLY-FMK (I-calp, 1 μ M) (Control: $100 \pm 12\%$, P2X2R: $131 \pm 8\%$, P2X2R+ATP: $158 \pm 9\%$, P2X2R+ATP+I-Calp: $58 \pm 11\%$).

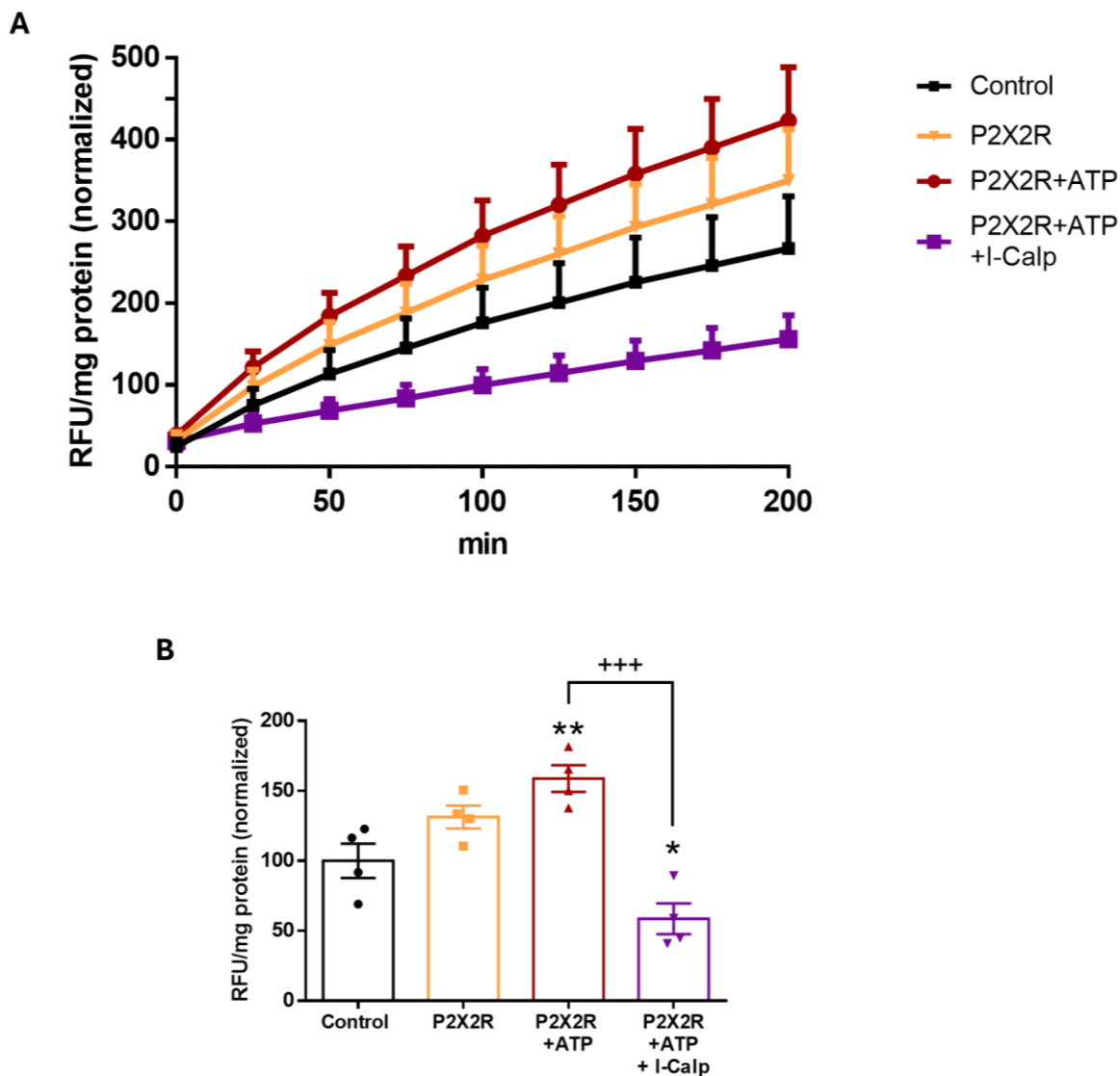


Figura 19. Aumento en la actividad proteasa de calpaínas, mediada por la estimulación de P2X2R.

A) Células PC-12 transfectadas con P2X2R fueron tratadas con ATP (100 μ M, 60 min) y posteriormente se midió la fluorescencia de S-calp (ex: 400 nm; em: 505 nm) durante 200 min en el lector de multiplacas NOVOstar. Como control utilizamos I-calp (1 μ M). **B)** La cuantificación de la fluorescencia en el punto final de la curva de A (minuto 200) se graficó como porcentaje del control, (n=4). RFU: Unidades de Fluorescencia Relativa. Mediante ANOVA se determinó que * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs control, y con t-student que +++ $p < 0,001$ P2X2R+ATP vs P2X2R+ATP+I-Calp

4. La desregulación del sistema de calpaínas es dependiente de la sobreexpresión del receptor purinérgico P2X2R.

Como el ATP y los productos derivados de su degradación activan a una amplia gama de receptores purinérgicos, incluidos los receptores P2X, P2Y y receptores de adenosina [41], nos propusimos evaluar como variaba la expresión de nuestras proteínas en células PC-12 que sólo fueron transfectadas con GFP y posteriormente se trataron con ATP 100 μ M durante 15, 30 y 60 min. En este modelo, donde no hubo una sobreexpresión del receptor P2X2R, observamos que los niveles de calpaína-1 (Control: 100 \pm 2%, ATP (0 min): 99 \pm 1%, ATP (15 min): 102 \pm 2%, ATP (30 min): 104 \pm 5%, ATP (60 min): 103 \pm 8%, Figura 20A, 20B), calpaína-2 (Control: 100 \pm 2%, ATP (0 min): 98 \pm 2%, ATP (15 min): 94 \pm 12%, ATP (30 min): 95 \pm 13%, ATP (60 min): 100 \pm 14%, Figura 20C, 20D), calpastatina (Control: 100 \pm 2%, ATP (0 min): 100 \pm 1%, ATP (15 min): 99 \pm 1%, ATP (30 min): 99 \pm 1%, ATP (60 min): 101 \pm 1%, Figura 20E, 20F) y espectrina (Control: 100 \pm 2%, ATP (0 min): 95 \pm 4%, ATP (15 min): 81 \pm 6%, ATP (30 min): 84 \pm 13%, ATP (60 min): 89 \pm 8%, Figura 20G, 20H) no variaron de forma significativa con respecto a las condiciones control. Esto demuestra, que el aumento en los niveles de calpaína-1 y la disminución de espectrina observados previamente, dependen exclusivamente de la sobreexpresión y activación de los receptores P2X2R, en el modelo experimental utilizado.

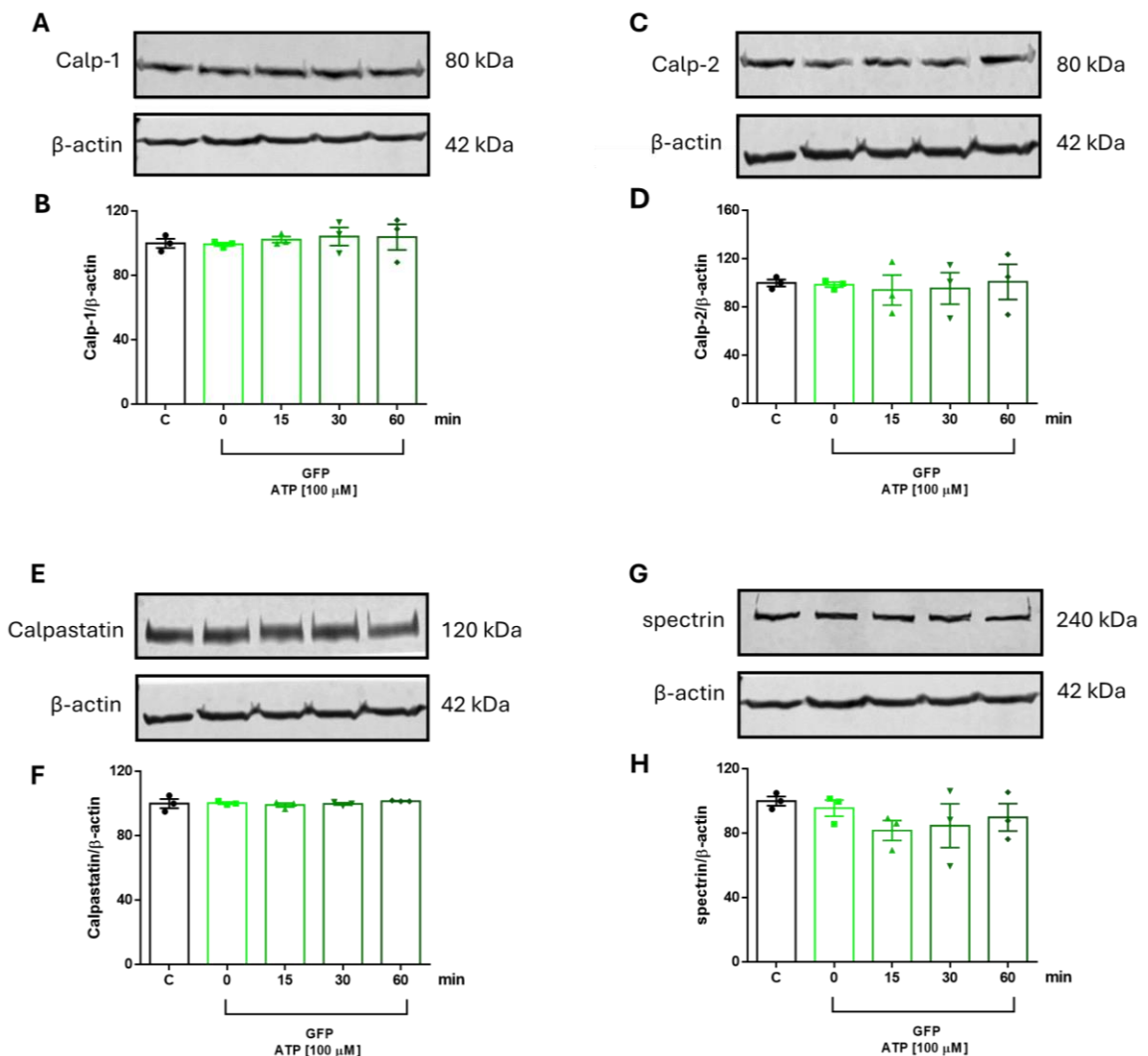


Figura 20. Niveles de calpaína-1, calpaína-2, calpastatina y espectrina en células que no sobreexpresan P2X2R.

A) Imagen de Western blot representativa de los niveles de calpaína-1 en células PC-12 transfectadas con 0,5 μg de plásmido codificante para GFP, y tratadas con ATP (100 μM) por 15, 30 y 60 min. Se usó β-actina como control de carga. **B)** Cuantificación de la banda de calpaína-1 (n=3). **C)** Imagen representativa de los niveles de calpaína-2 bajo las mismas condiciones de A. **D)** Cuantificación de la banda de calpaína 2 (n=3). **E)** Imagen representativa de los niveles de calpastatina bajo las mismas condiciones de A. **F)** Cuantificación de la banda de calpastatina (n=3). **G)** Imagen representativa de los niveles de espectrina bajo las mismas condiciones de A. **H)** Cuantificación de la banda de espectrina (n=3). La cuantificación de cada banda se normalizó con su respectiva banda de β-actina, y se expresó como porcentaje del control. No se obtuvieron diferencias estadísticas mediante ANOVA para comparación de múltiples grupos.

5. La activación del receptor purinérgico P2X2R potencia la generación de péptido A β de forma dependiente de calpaínas.

Algunos estudios han demostrado que las calpaínas podrían estar involucradas en la toxicidad amiloide [86, 99]. Recordando brevemente lo discutido en la introducción de esta tesis, cuando las calpaínas son activadas por incrementos en el Ca²⁺ intracelular, clivan a la proteína p35 para formar el fragmento p25, que activa a la quinasa neuronal dependiente de ciclina 5 (Cdk5) (Figura 6). Cdk5 fosforila al factor de transcripción STAT3, y p-STAT3 va al núcleo para regular positivamente la expresión de BACE1, lo que produce una mayor proteólisis de APP por la vía amiloidogénica y un incremento en la producción del péptido β -amiloide [84, 85].

Esta idea nos llevó a estudiar esta vía de señalización intracelular de generación de A β mediada por calpaínas, en un modelo celular de sobreexpresión de P2X2R. En primer lugar, se evaluó los niveles de p25 y p35 en células PC-12 que sobreexpresan P2X2R (Figura 21A). Mediante la técnica de western blot observamos que la razón p25/p35 incrementó en un 28% tras la activación de P2X2R con ATP (100 μ M, 60 min), mientras que la co-incubación con el inhibidor de calpaínas MDL (20 μ M) mantuvo la razón p25/p35 con valores cercanos al control (Control: 100 \pm 2%, GFP: 101 \pm 2%, MDL: 101 \pm 2%, P2X2R: 108 \pm 6%, P2X2R+MDL: 112 \pm 3%, P2X2R+ATP: 128 \pm 3%, P2X2R+ATP+MDL: 111 \pm 4%,

Figura 21B). Al analizar la inmunorreactividad de Cdk5, no observamos diferencias significativas con los tratamientos (Control: $100\pm 2\%$, GFP: $111\pm 7\%$, MDL: $100\pm 6\%$, P2X2R: $97\pm 5\%$, P2X2R+MDL: $95\pm 5\%$, P2X2R+ATP: $103\pm 6\%$, P2X2R+ATP+MDL: $111\pm 4\%$, Figura 21C, 21D). Sin embargo, la activación de P2X2R con ATP ($100\ \mu\text{M}$, 60 min) produjo un aumento significativo en los niveles de la proteína STAT3 fosforilada en la serina 727 (Figura 22A), un sitio de fosforilación mediado principalmente por Cdk5. No obstante, el inhibidor de calpaínas MDL ($20\ \mu\text{M}$) no bloqueó completamente este incremento de pSTAT3 (Control: $100\pm 3\%$, GFP: $103\pm 14\%$, MDL: $90\pm 14\%$, P2X2R: $105\pm 15\%$, P2X2R+MDL: $115\pm 15\%$, P2X2R+ATP: $363\pm 38\%$, P2X2R+ATP+MDL: $241\pm 35\%$, Figura 22B). Estos resultados nos permiten sugerir que STAT3 podría estar siendo fosforilado por otras quinasas en la serina 727, o bien, que la concentración IC_{50} de MDL utilizada en nuestros experimentos ($20\ \mu\text{M}$) no es suficiente para bloquear eficientemente la fosforilación de STAT3. Para dilucidar esto, repetimos nuestro experimento, utilizando MDL a una concentración de $40\ \mu\text{M}$ (Figura 22C), y observamos que MDL evitó completamente la fosforilación de STAT3, obteniendo valores cercanos al control (Control: $100\pm 4\%$, GFP: $107\pm 16\%$, MDL: $82\pm 11\%$, P2X2R: $108\pm 27\%$, P2X2R+MDL: $103\pm 14\%$, P2X2R+ATP: $428\pm 18\%$, P2X2R+ATP+MDL: $125\pm 18\%$, Figura 22D). Adicionalmente, analizamos la razón pSTAT3/STAT3 en células PC-12 tratadas con ATP ($100\ \mu\text{M}$, 60 min) que no sobreexpresan P2X2R, y observamos que los niveles de pSTAT3 no incrementaron con respecto al control ($109\pm 19\%$, Figura

22C, 22D). Estos resultados demuestran que la fosforilación de STAT3, en el modelo propuesto, se debe exclusivamente a la activación de P2X2R y la consecuente cascada de señalización mediada por calpaínas.

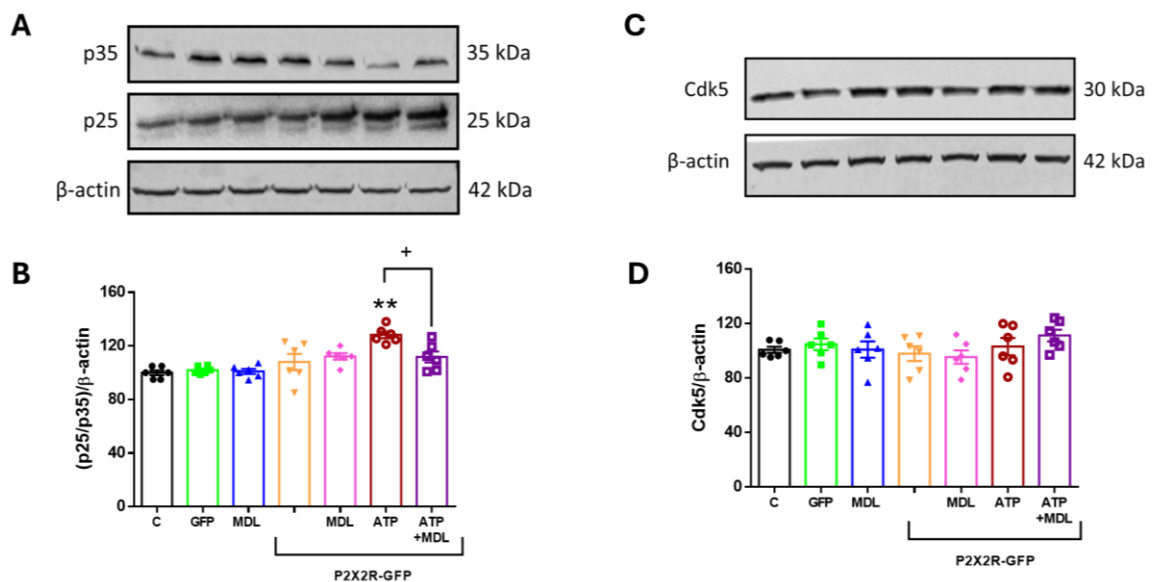


Figura 21. Niveles de p25 y Cdk5 en células que sobreexpresan P2X2R.

A) Imagen de Western blot representativa de los niveles de p35 y p25 en células PC-12 transfectadas con P2X2R, tratadas con ATP (100 μ M) y con el inhibidor de calpaínas MDL28170 (20 μ M) durante 60 min. Se utilizó β -actina como control de carga. **B)** La cuantificación del ratio p25/p35 se normalizó con su banda de β -actina, y se expresó como porcentaje del control, (n=6). Mediante ANOVA se determinó que $**p < 0,01$ vs control, y con t-student que $+p < 0,05$ P2X2R+ATP vs P2X2R+ATP+MDL. **C)** Imagen representativa de los niveles de Cdk5 bajo las mismas condiciones que A. **D)** Cuantificación de la banda de Cdk5, normalizada con su respectiva β -actina y expresada como porcentaje del control, (n=6). No se obtuvieron diferencias estadísticas mediante ANOVA para comparación de múltiples grupos.

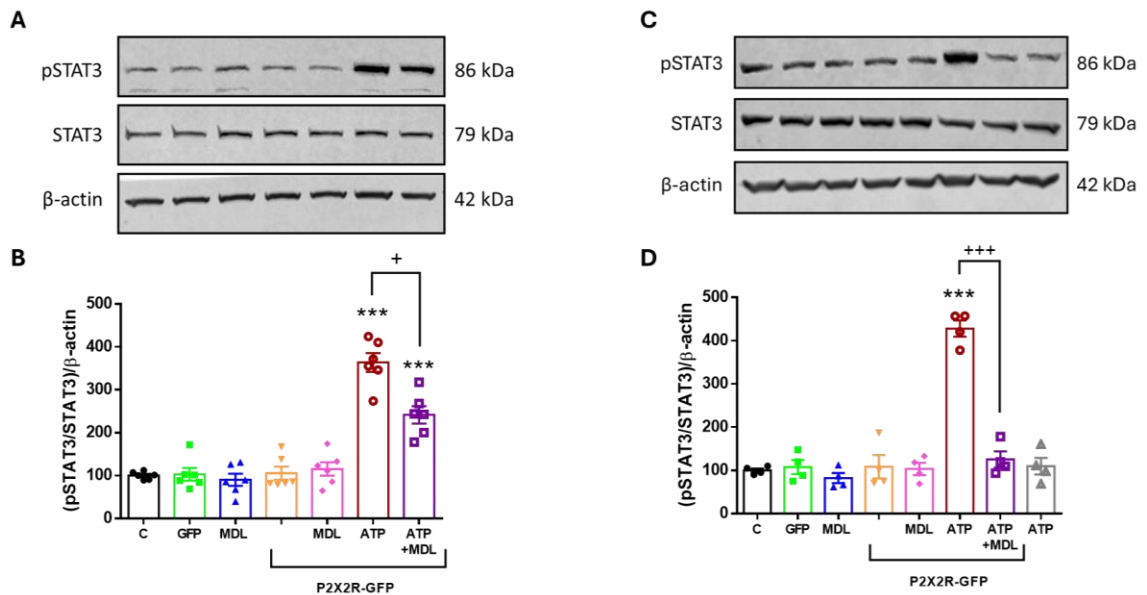


Figura 22. Razón pSTAT3/STAT3 en células PC-12, tras la activación de P2X2R.

A) Imagen de Western blot representativa de los niveles de pSTAT3 y STAT3 en células PC-12 transfectadas con P2X2R, tratadas con ATP (100 μ M) y con el inhibidor de calpaínas MDL28170 (20 μ M) durante 60 min. Se utilizó β -actina como control de carga. **B)** La cuantificación del ratio pSTAT3/STAT3 se normalizó con su banda de β -actina, y se expresó como porcentaje del control, (n=6). **C)** Imagen representativa de los niveles de pSTAT3 y STAT3 en células sometidas a los mismos tratamientos descritos en A, a excepción de MDL28170 que fue utilizado a una concentración de 40 μ M. **D)** La cuantificación del ratio pSTAT3/STAT3 se normalizó con β -actina, y se expresó como porcentaje del control, (n=4). Mediante ANOVA se determinó que ***p<0,001 vs control, y con t-student que +p<0,05, +++p<0,001 P2X2R+ATP vs P2X2R+ATP+MDL.

Posteriormente, se analizó la inmunoreactividad de la enzima BACE1 a través de la técnica de inmunocitoquímica (Figura 23A). Observamos que las células PC-12 transfectadas con P2X2R y tratadas con ATP (100 μ M, 60 min) mostraron un incremento de un 26% en los niveles de BACE1, y este incremento fue prevenido cuando las células se co-incubaron con el inhibidor de calpaínas MDL (20 μ M) (Control: 100 \pm 2%, MDL: 85 \pm 3%, GFP: 100 \pm 2%, P2X2R+ATP: 126 \pm 2%,

P2X2R+ATP+MDL: $93\pm 3\%$, Figura 23B). De forma similar y para reforzar esta observación, los resultados obtenidos por western blot demuestran que la activación de P2X2R con ATP (100 μM , 60 min) produce un incremento significativo en los niveles de BACE1 con respecto al control, y este aumento se evita cuando las células son tratadas con el inhibidor de calpaínas MDL (20 μM) (Control: $100\pm 2\%$, GFP: $100\pm 2\%$, MDL: $91\pm 4\%$, P2X2R: $113\pm 3\%$, P2X2R+MDL: $95\pm 5\%$, P2X2R+ATP: $124\pm 5\%$, P2X2R+ATP+MDL: $96\pm 6\%$, Figura 24A, 24B).

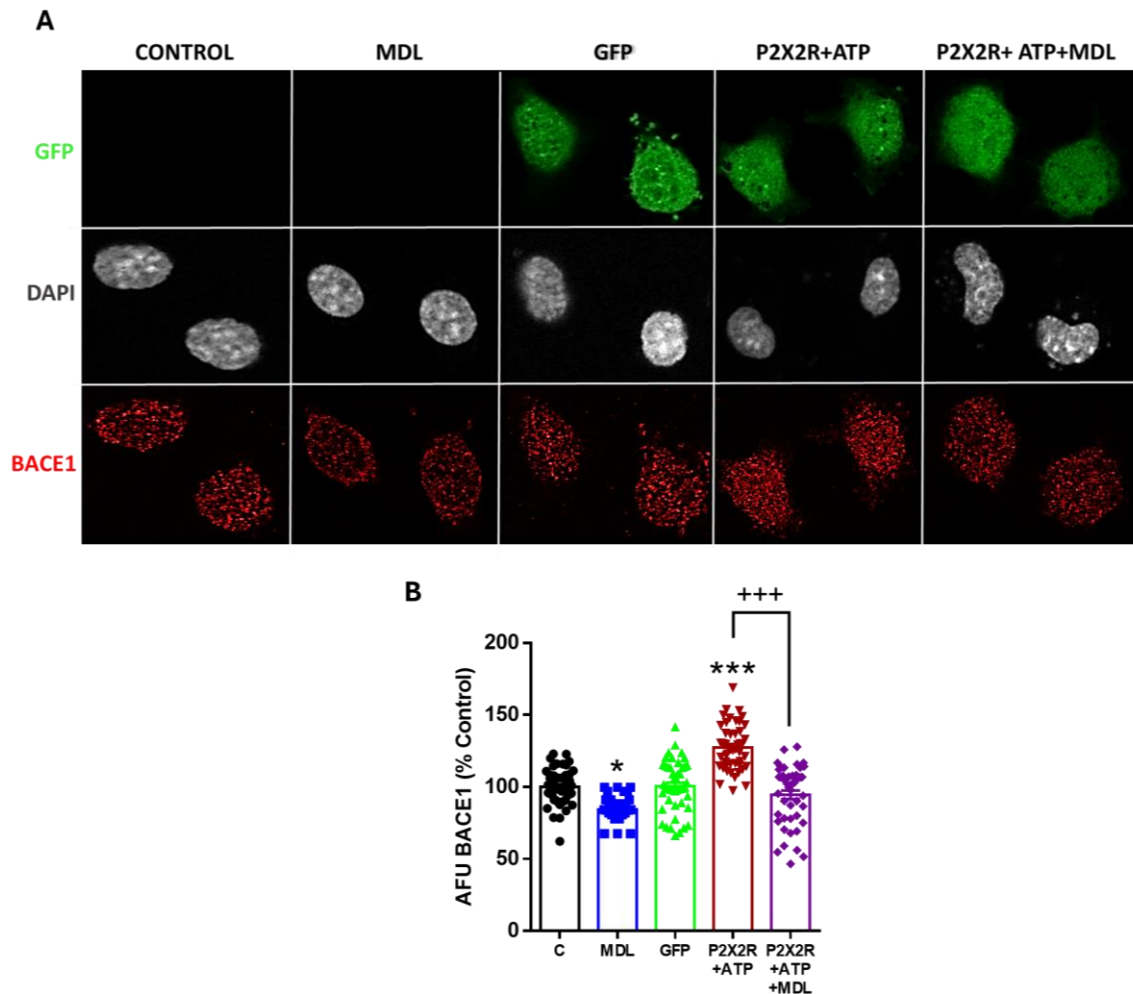


Figura 23. El incremento en los niveles de BACE1 (β -secretasa) tras la activación de P2X2R es mediado por calpaínas.

A) Imágenes representativas de la inmunorreactividad de BACE1 en células PC-12 transfectadas con P2X2R, tratadas con ATP (100 μ M) y el inhibidor de calpaínas MDL28170 (20 μ M) por 60 min. Verde (GFP), gris (tinción nuclear DAPI), rojo (BACE1).

B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de A, expresada como porcentaje del control, (n=3; N=47). Mediante ANOVA se determinó que *p<0,5, ***p<0,001 vs control; y con t-student que +++p<0,001 P2X2R+ATP vs P2X2R+ATP+MDL.

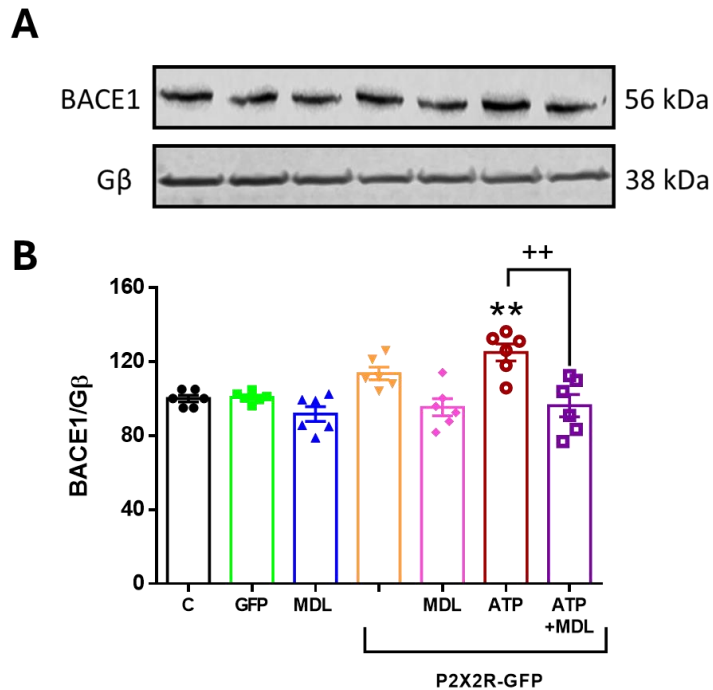


Figura 24. Niveles de BACE1 en células que sobreexpresan P2X2R.

A) Imagen de Western blot representativa de los niveles de BACE1 en células PC-12 transfectadas con P2X2R, tratadas con ATP (100 μ M) y con el inhibidor de calpaínas MDL28170 (20 μ M) durante 60 min. Se utilizó G β como control de carga. **B)** La cuantificación de la banda de BACE1 se normalizó con su banda de G β , y se expresó como porcentaje del control, (n=6). Mediante ANOVA se determinó que **p<0,01 vs control, y con t-student que ++p<0,01 P2X2R+ATP vs P2X2R+ATP+MDL.

Luego de confirmar que la activación del receptor purinérgico P2X2R produce aumentos en los niveles de p25, pSTAT3 y BACE1, quisimos evaluar si estos incrementos observados se correlacionan, en consecuencia, con la generación de péptido β -amiloide en nuestro modelo de estudio. A partir de los datos obtenidos por inmunocitoquímica (Figura 25A), observamos que células PC-12 transfectadas con P2X2R y tratadas con ATP (100 μ M, 60 min) tuvieron un incremento significativo de 59% en la inmunorreactividad de A β , y este

incremento fue prevenido cuando las células se co-incubaron con el inhibidor de calpaínas MDL (20 μ M) (Control: 100 \pm 4%, MDL: 87 \pm 2%, GFP: 101 \pm 2%, P2X2R+ATP: 159 \pm 4%, P2X2R+ATP+MDL: 99 \pm 2%, Figura 25B).

Como una forma de respaldar nuestras observaciones, evaluamos los niveles de A β por western blot (Figura 26A), y los resultados mostraron un aumento significativo luego de la activación de P2X2R con ATP (100 μ M, 60 min) en células PC-12, en comparación con la condición control, y este aumento de A β se evitó con el tratamiento de MDL (20 μ M) (Control: 100 \pm 2%, GFP: 96 \pm 4%, MDL: 95 \pm 4%, P2X2R: 114 \pm 6%, P2X2R+MDL: 102 \pm 6%, P2X2R+ATP: 129 \pm 6%, P2X2R+ATP+MDL: 104 \pm 5%, Figura 26B). Adicionalmente, para descartar la posibilidad de que los aumentos del péptido A β , previamente observados, pudieran deberse a que los protocolos experimentales utilizados generan cambios en los niveles de la proteína precursora amiloide (APP) de longitud completa, la evaluamos por western blot (Figura 26C) y pudimos determinar que tanto la sobreexpresión de P2X2R, como la incubación con ATP (100 μ M) y/o MDL (20 μ M) por 60 min, no produjeron variaciones en los niveles de APP en nuestro modelo celular (Control: 100 \pm 2%, GFP: 103 \pm 2%, MDL: 103 \pm 3%, P2X2R: 100 \pm 4%, P2X2R+MDL: 96 \pm 5%, P2X2R+ATP: 96 \pm 4%, P2X2R+ATP+MDL: 91 \pm 3%, Figura 26D), lo que en conjunto demuestra que el eje de activación P2X2R/calpaína-1 podría estar involucrado en la potenciación de la vía

amiloidogénica, y la consecuente formación de péptido beta-amiloide, a través del incremento en la presencia de BACE1.

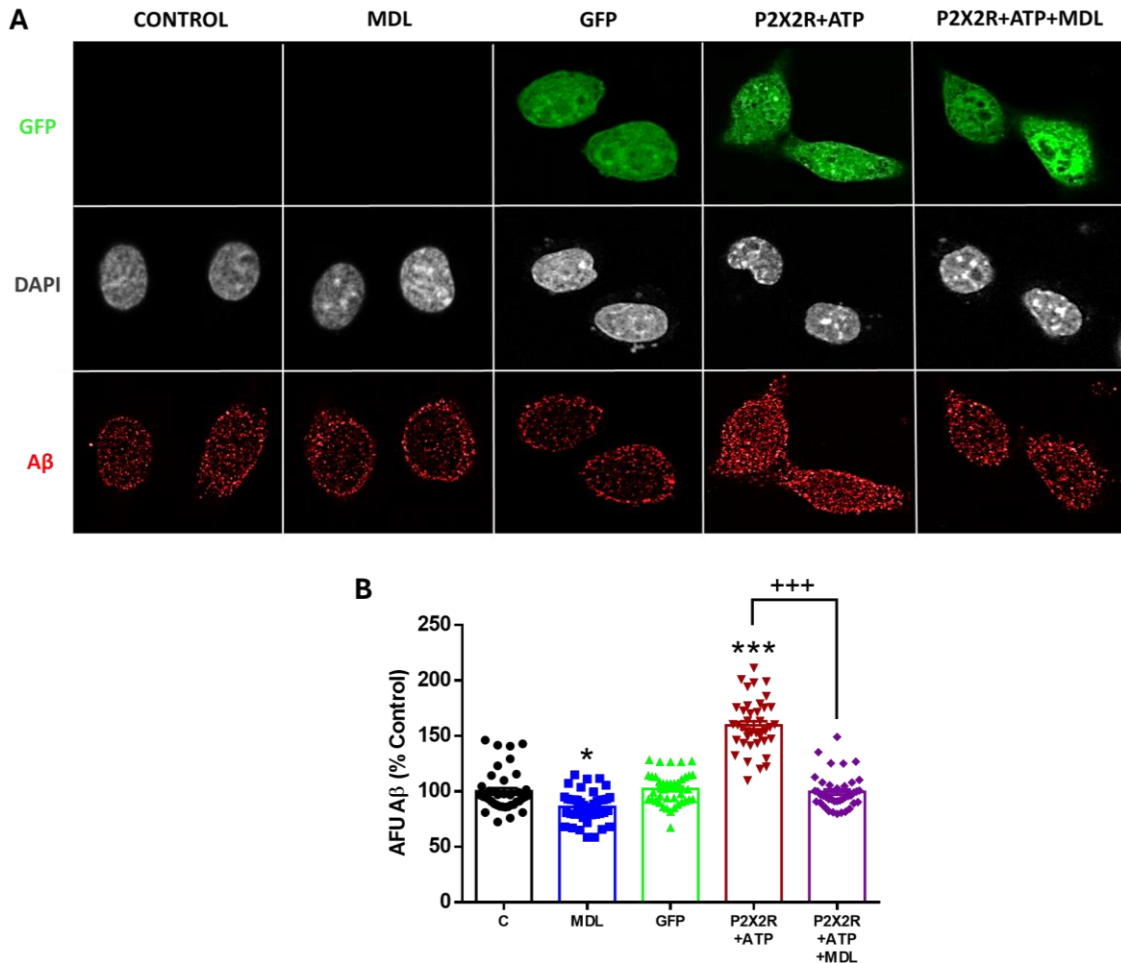


Figura 25. La activación de P2X2R incrementa los niveles del péptido Aβ a través de un mecanismo mediado por calpaínas.

A) Imágenes representativas de la inmunorreactividad de Aβ en células PC-12 transfectadas con P2X2R, tratadas con ATP (100 μM) y el inhibidor de calpaínas MDL28170 (20 μM) por 60 min, mediante la técnica de inmunocitoquímica. Verde (GFP), gris (tinción nuclear DAPI), rojo (Aβ) **B)** La cuantificación de la intensidad de fluorescencia de A se expresa como porcentaje del control (n=3; N=40). Mediante ANOVA se determinó que *p<0,05, ***p<0,001 vs control; y con t-student que +++p<0,001 P2X2R+ATP vs P2X2R+ATP+MDL.

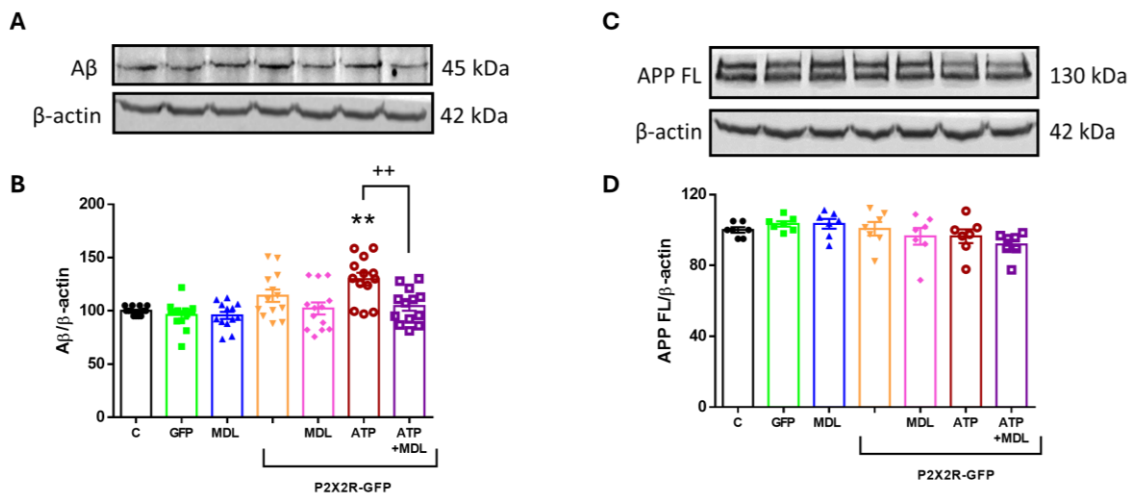


Figura 26. Niveles de Aβ y APP en células que sobreexpresan P2X2R.

A) Imagen de Western blot representativa de los niveles de Aβ en células PC-12 transfectadas con P2X2R, tratadas con ATP (100 μM) y con el inhibidor de calpaínas MDL28170 (20 μM) durante 60 min. Se utilizó β-actina como control de carga. **B)** La cuantificación de la banda de Aβ se normalizó con su respectiva banda de β-actina, y se expresó como porcentaje del control, (n=13). Mediante ANOVA se determinó que $**p < 0,01$ vs control, y con t-student que $++p < 0,01$ P2X2R+ATP vs P2X2R+ATP+MDL. **C)** Imagen representativa de los niveles de APP de longitud completa (APP FL) en células PC-12 sometidas a las mismas condiciones de A. **D)** La cuantificación de la banda de APP FL se normalizó con su β-actina, y se expresó como porcentaje del control, (n=7). No se obtuvieron diferencias estadísticas mediante ANOVA para comparación de múltiples grupos.

6. Control selectivo del receptor P2X2R por medio de una pinza óptica.

Para estudiar los efectos de la activación selectiva y controlada de P2X2R, utilizamos un método de farmacología optogenética, que permite el control del receptor purinérgico P2X2R mediante un ligando fotosensible, es decir, permite activar y desactivar el receptor por medio de la aplicación de luz. El receptor P2X2R- I328C es un receptor purinérgico activado por ATP, que fue modificado

genéticamente para responder a la luz. La mutación consistió en el reemplazo de la isoleucina 328 de la región transmembrana por una cisteína [97].

Con el propósito de estandarizar la transfección de este receptor, células PC-12 fueron co-transfectadas con un plásmido codificante para P2X2R (0,5 µg) + el vector reportero GFP (0,5 µg), o con el plásmido pcDNA3.1-P2X2R-I328C (1 µg) + GFP (0,5 µg). Lipofectamina 2000 se utilizó en dos volúmenes distintos: 0,75 µl (-) o 1,5 µl por pocillo (+). Así, mediante microscopía de epifluorescencia, observamos que la transfección de nuestro vector reportero GFP fue más eficiente con el volumen más alto de lipofectamina (1,5 µl), tanto para P2X2R, como para I328C, estimándose un porcentaje de transfección del 70% (Figura 27A).

Enseguida, mediante western blot, confirmamos la expresión de I328C en células PC-12, utilizando un anticuerpo específico para P2X2 (Figura 27B). De esta manera, observamos que tanto P2X2R, como I328C se transfectan de forma más eficiente con un volumen de 1,5 µl de lipofectamina por pocillo (+). Sin embargo, aunque se utilizó el doble de plásmido para nuestro receptor mutado, la eficiencia de transfección de I328C sigue siendo más baja que la de P2X2R en nuestro modelo celular (Control: 100±2%, GFP: 105±11%, -P2X2R/GFP: 220±27%, +P2X2R/GFP: 347±62%, -I328C/GFP: 177±13%, +I328C/GFP: 261±34%, Figura 27C).

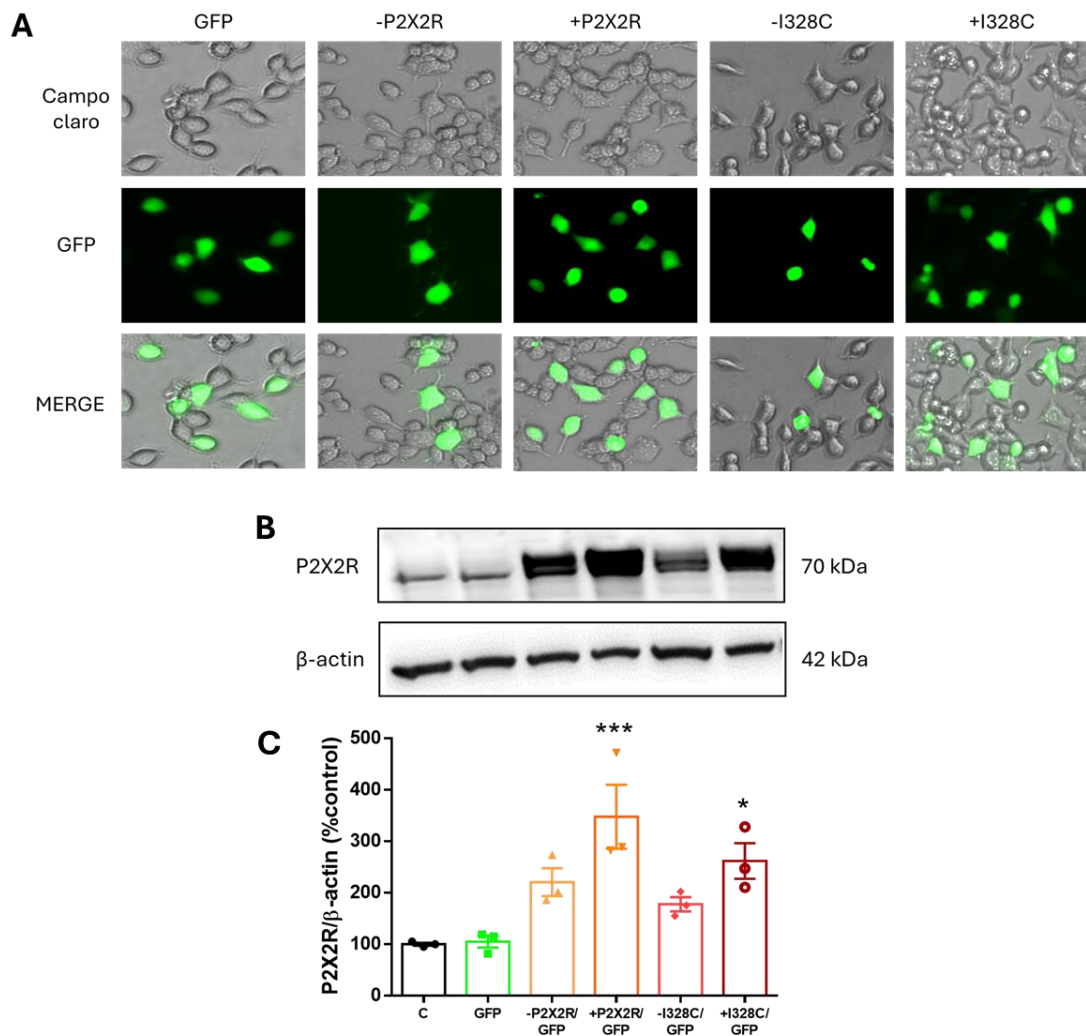


Figura 27. Estandarización de la transfección del receptor P2X2R-I328C en células PC-12.

A) Imágenes representativas de células PC-12 transfectadas con un plásmido codificante para GFP como control de transfección (0,5 µg), células co-transfectadas con el plásmido codificante para P2X2R (0,5 µg) y GFP, y células co-transfectadas con el plásmido pcDNA3.1-P2X2R-I328C (1 µg) y GFP. Los símbolos (-) y (+) indican un volumen de 0,75 µl y 1,5 µl de lipofectamina por pocillo, respectivamente (n=4). **B)** Imagen de Western blot representativa de los niveles de P2X2R en células PC-12 sometidas a los mismos tratamientos que A. Se utilizó β-actina como control de carga. **C)** La cuantificación de la banda de P2X2R se normalizó con su respectiva banda de β-actina, y se expresó como porcentaje del control, (n=3). Mediante ANOVA se determinó que *p<0,05, **p<0,01 vs control.

Posteriormente, evaluamos la expresión funcional del receptor I328C, es decir, su activación y desactivación con luz. Para esto, luego de la transfección, células PC-12 fueron incubadas con el azobenceno MEA-TMA (200 μ M, en oscuridad, 5 min). MEA-TMA se une a las cisteínas mutadas en los segmentos transmembrana del receptor I328C, y al ser una molécula fotosensible, cambia su conformación de cis a trans y viceversa, con pulsos de luz verde (525 nm) y UV (365 nm), respectivamente (Figura 28A), lo que permite tener el receptor en modo abierto o cerrado, actuando como una pinza óptica.

Los datos obtenidos por patch clamp muestran que un pulso de luz verde (525 nm, 5s) generó la apertura del canal, con una corriente iónica aproximada de 300 pA (Figura 28B), permaneciendo activo en oscuridad. En seguida, un pulso de luz UV (365 nm, 2s) generó el cierre del canal. Por lo tanto, los cambios en la conformación cis y trans de MEA-TMA por luz, permiten que el receptor I328C pueda activarse y desactivarse reversiblemente, sin necesidad de ATP, permitiendo así un mecanismo de activación independiente del agonista y altamente selectivo.

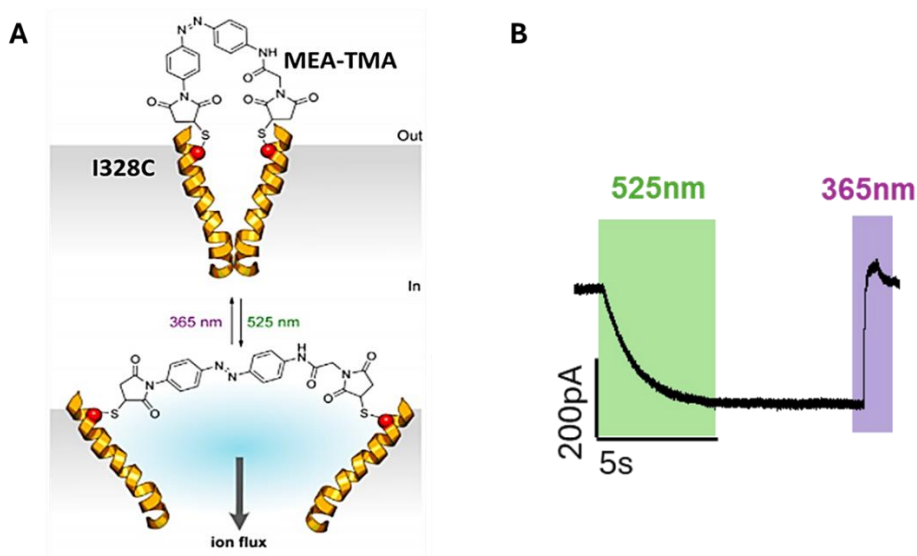


Figura 28. Activación/desactivación del receptor P2X2R-I328C con luz.

A) Esquema representativo del azobenceno MEA-TMA unido a las cisteínas mutadas en la región transmembrana del receptor I328C. En su conformación cis, MEA-TMA mantiene al receptor I328C cerrado o inactivo, mientras que en su conformación trans el receptor se activa, permitiendo el flujo de iones. Los cambios de cis a trans y viceversa, son generados por pulsos de luz verde (525 nm) y luz ultravioleta (365 nm). **B)** Mediante la técnica de patch clamp, se observa un trazo representativo de nuestros resultados, donde un pulso de luz de 525 nm (5 s) genera una corriente aproximada de 300 pA, mientras que a 365 nm (2 s) el receptor P2X2R-I328C se desactiva. Este mecanismo permite la apertura y cierre de P2X2R-I328C de forma reversible (n=6).

7. La activación selectiva de P2X2R con luz incrementa los niveles de calpaína-1.

Células PC-12 transfectadas con el receptor mutado P2X2R-I328C, fueron incubadas con el azobenceno fotoisomerizable MEA-TMA (5 min, TA, en oscuridad). Posteriormente, las células fueron expuestas a luz verde (525 nm, 5s), y el receptor permaneció activado por 15 min en oscuridad, seguido de su desactivación con luz UV (365 nm, 2s). Luego, las células se mantuvieron por 1

h en incubadora termorregulada, y se realizó la lisis celular para evaluar los niveles de nuestras proteínas. Durante todo este tiempo, un grupo de células se trató con el inhibidor de calpaínas MDL28170 (40 μ M).

Así, observamos que la fotoactivación del receptor I328C generó un aumento significativo en los niveles de calpaína-1 (Figura 29A), que fue controlado con el inhibidor de calpaínas MDL (Control: $100\pm 4\%$, I328C/MEA-TMA: $124\pm 10\%$, I38C/MEA-TMA/MDL: $103\pm 5\%$, Figura 29B). Los datos también muestran que los niveles de calpaína-2 (Control: $100\pm 3\%$, I328C/MEA-TMA: $99\pm 6\%$, I38C/MEA-TMA/MDL: $93\pm 3\%$, Figura 29C, 29D) y calpastatina (Control: $100\pm 3\%$, I328C/MEA-TMA: $109\pm 3\%$, I38C/MEA-TMA/MDL: $100\pm 5\%$, Figura 29E, 29F) no variaron con la activación del receptor I328C, en comparación con el control. Estos resultados indican que la activación selectiva de P2X2R con luz incrementa de forma específica los niveles de calpaína-1, lo que se correlaciona con nuestros datos previos de la activación de P2X2R con ATP.

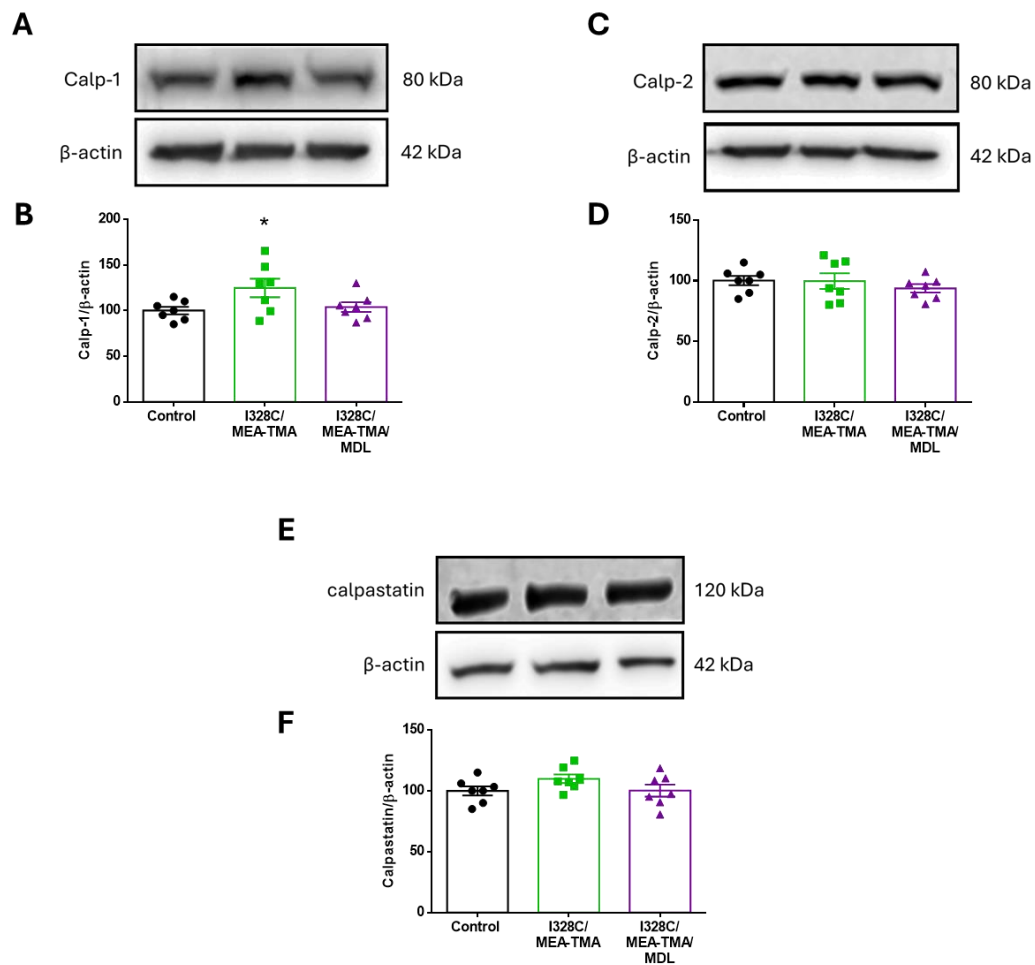


Figura 29. La foto-activación del receptor P2X2-I328C incrementa los niveles de calpaína-1.

A) Imagen de Western blot representativa de los niveles de calpaína-1 en células PC-12 transfectedas con un plásmido codificante para el receptor mutante P2X2-I328C, que fue activado mediante la incubación del azobenceno MEA-TMA, y la exposición a luz verde (525 nm, 5s). El receptor P2X2-I238C permaneció activado por 15 min en oscuridad, y luego se desactivó mediante la exposición a luz UV (365 nm, 2s). Durante todo este tiempo, un grupo de células fue tratado con el inhibidor de calpaínas MDL28170 (40 μ M). Posteriormente, las células se mantuvieron en incubadora termoregulada por 1 h. Se usó β -actina como control de carga. **B)** Cuantificación de la banda de calpaína-1, (n=7). **C)** Imagen representativa de los niveles de calpaína-2 en células PC-12 sometidas a las mismas condiciones de A. **D)** Cuantificación de la banda de calpaína-2 (n=7). **E)** Imagen representativa de los niveles de calpastatina bajo las mismas condiciones de A. **F)** Cuantificación de la banda de calpastatina, (n=7). La cuantificación de cada banda se normalizó con su respectiva banda de β -actina, y se expresó como porcentaje del control. Mediante ANOVA se determinó que *p<0,05 vs control.

8. La activación de P2X2R con luz no incrementa la actividad proteasa de calpaínas.

Como una forma de estudiar la actividad proteasa de calpaínas luego de la activación del receptor I328C, analizamos los niveles de los dos principales sustratos de calpaínas: Espectrina y p35, en células PC-12. Así, observamos que ambas proteínas tuvieron una tendencia a su disminución, sin embargo, esto no tuvo diferencias estadísticas con respecto al control. Espectrina (Control: $100 \pm 4\%$, I328C/MEA-TMA: $88 \pm 6\%$, I38C/MEA-TMA/MDL: $103 \pm 9\%$, Figura 30A, 30B). p35 (Control: $100 \pm 5\%$, I328C/MEA-TMA: $87 \pm 7\%$, I38C/MEA-TMA/MDL: $101 \pm 8\%$, Figura 30C, 30D). Estos datos sugieren que el aumento del 24% en los niveles de calpaína-1 tras la foto-activación de I328C no es suficiente para aumentar su actividad proteasa y generar la degradación de los sustratos.

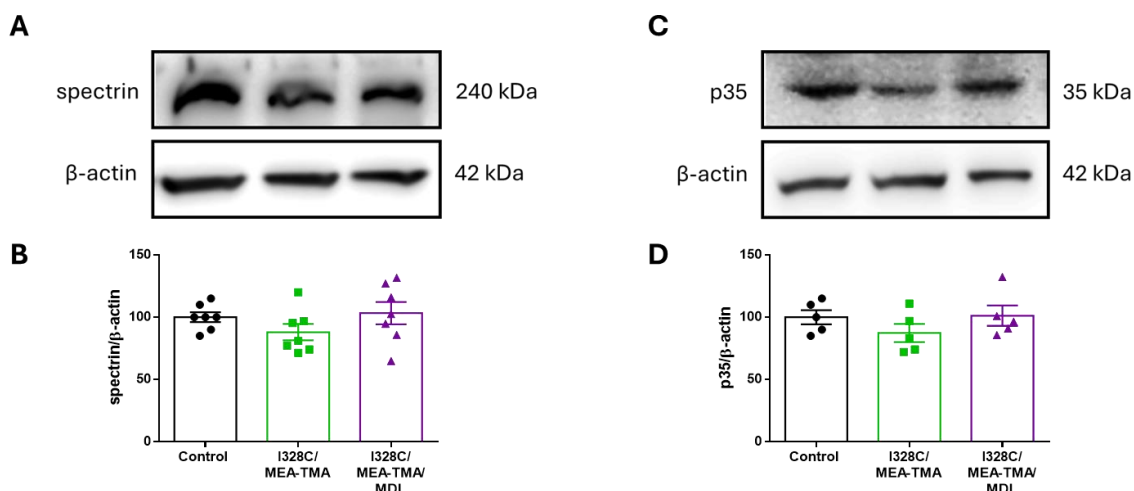


Figura 30. Niveles de espectrina y p35 tras la foto-activación del receptor P2X2-I328C.

A) Imagen de Western blot representativa de los niveles de espectrina en células PC-12 transfectadas con P2X2-I328C. Este receptor se activó con la incubación del azobenceno MEA-TMA, y la exposición a luz verde (525 nm, 5s), permaneciendo activado por 15 min en oscuridad, hasta su desactivación con la exposición a luz UV (365 nm, 2s). Durante todo este tiempo, un grupo de células fue tratado con el inhibidor de calpaínas MDL28170 (40 μ M). Posteriormente, las células se mantuvieron en incubadora termoregulada por 1 h. Se usó β -actina como control de carga. **B)** Cuantificación de la banda de espectrina, (n=7). **C)** Imagen representativa de los niveles de p35 en células PC-12 sometidas a las mismas condiciones de A. **D)** Cuantificación de la banda de p35 (n=5). La cuantificación de cada banda se normalizó con su respectiva banda de β -actina, y se expresó como porcentaje del control. No se obtuvieron diferencias estadísticas mediante ANOVA para comparación de múltiples grupos.

9. La activación de P2X2R con luz no incrementa la producción de péptido A β .

Debido a que previamente observamos que la activación de P2X2R con ATP producía un aumento en los niveles de A β , que era mediado por un aumento del factor de transcripción pSTAT3 y el consecuente incremento en la expresión de

la enzima BACE1, nos propusimos analizar los niveles de estas proteínas tras la activación selectiva del receptor I328C con luz, en células PC-12.

De esta manera, observamos que la razón pSTAT3/STAT3 tuvo una tendencia al aumento luego de la activación de I328C, sin embargo, este valor no fue estadísticamente distinto al control (Control: $100 \pm 4\%$, I328C/MEA-TMA: $121 \pm 8\%$, I38C/MEA-TMA/MDL: $95 \pm 7\%$, Figura 31A, 31B). De forma similar, los niveles de la enzima BACE1 (Control: $100 \pm 5\%$, I328C/MEA-TMA: $96 \pm 6\%$, I38C/MEA-TMA/MDL: $99 \pm 9\%$, Figura 31C, 31D) y del péptido A β (Control: $100 \pm 3\%$, I328C/MEA-TMA: $107 \pm 5\%$, I38C/MEA-TMA/MDL: $104 \pm 4\%$, Figura 31E, 31F), no variaron significativamente.

Las diferencias en los resultados obtenidos en P2X2R e I328C se pueden deber a que las corrientes iónicas promedio registradas para I328C (300 pA) fueron significativamente menores que las corrientes de P2X2R (<1000 pA) (Figura 9, Figura 28B) lo que se traduce en un menor influjo de Ca²⁺ para la activación eficiente de calpaína-1. Esto puede tener dos posibles explicaciones. La primera, es que la transfección de I328C en células PC-12 es más baja que la de P2X2R, aunque se utilice el doble de la concentración de plásmido. Y la segunda, es que la carga positiva de MEA-TMA en la región transmembrana del receptor I328C podría repeler otras cargas positivas de iones como el Ca²⁺. Por lo que a futuro

se requieren ajustes experimentales adicionales para el uso efectivo de esta herramienta optogenética.

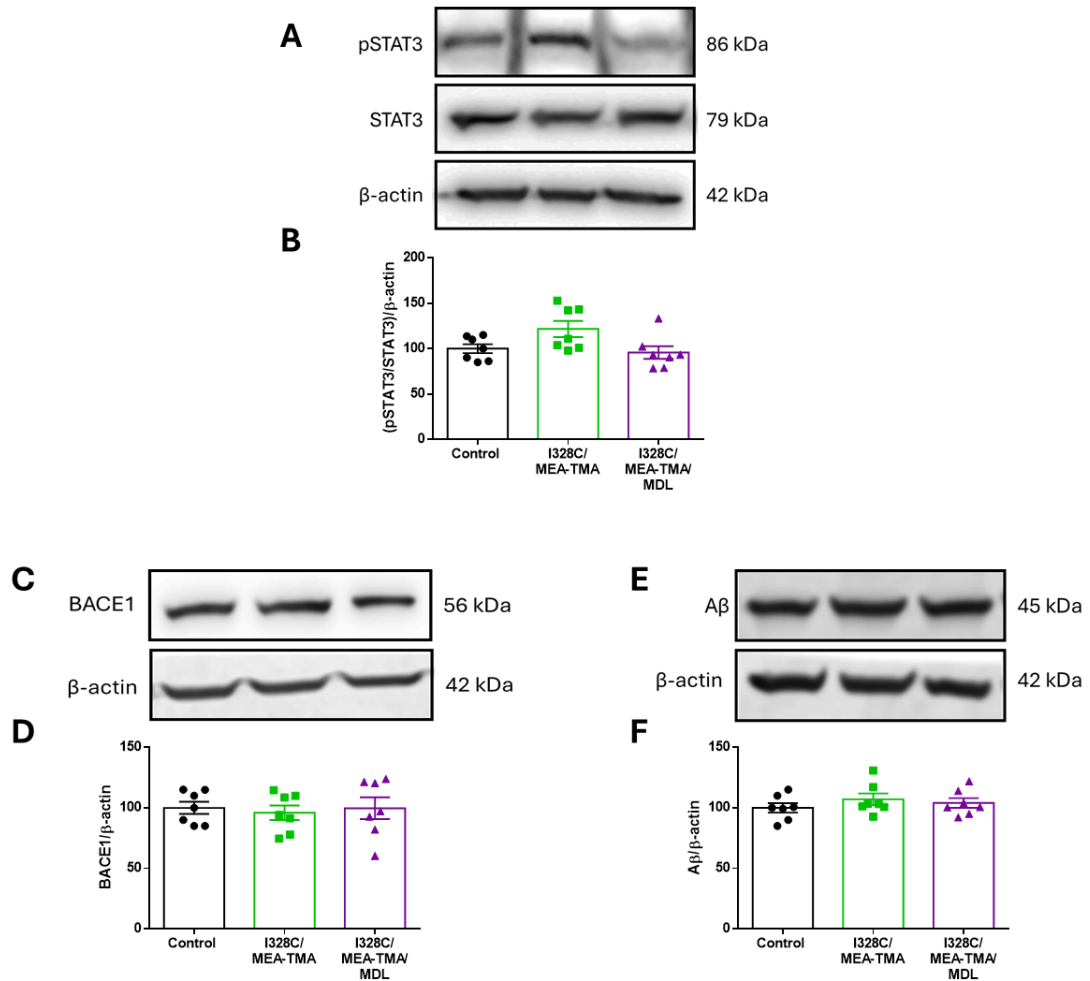


Figura 31. Niveles de pSTAT3, BACE1 y Aβ tras la foto-activación del receptor P2X2-I328C.

A) Imagen de Western blot representativa de los niveles de pSTAT3 y STAT3 en células PC-12 transfectadas con P2X2-I328C. Este receptor se activó con la incubación del azobenceno MEA-TMA, y la exposición a luz verde (525 nm, 5s), permaneciendo activado por 15 min en oscuridad, hasta su desactivación con la exposición a luz UV (365 nm, 2s). Durante todo este tiempo, un grupo de células fue tratado con el inhibidor de calpaínas MDL28170 (40 μM). Posteriormente, las células se mantuvieron en incubadora termoregulada por 1 h. Se usó β-actina como control de carga. **B)** Cuantificación del ratio pSTAT3/STAT3 (n=7). **C)** Imagen representativa de los niveles de BACE1 en células PC-12 sometidas a las mismas condiciones de A. **D)** Cuantificación de la banda de BACE1 (n=7). **E)** Imagen representativa de los niveles de Aβ bajo las mismas condiciones de A. **F)** Cuantificación de la banda de Aβ (n=7). La cuantificación de cada banda se normalizó con su respectiva banda de β-actina, y se expresó como porcentaje del control. No se obtuvieron diferencias estadísticas mediante ANOVA para comparación de múltiples grupos.

10. Evaluación del sistema de calpaínas en un modelo transgénico de la EA.

El siguiente paso fue analizar los niveles de nuestras proteínas de interés en los ratones doble transgénicos APP/PS1 que expresan la proteína precursora amiloide quimérica de ratón/humano (Mo/HuAPP695swe) y la presenilina-1 humana mutante (PS1-dE9), ambas mutaciones están dirigidas a neuronas del SNC y se asocian con la Enfermedad de Alzheimer (EA) de aparición temprana [100, 101]. En primer lugar, analizamos muestras de hipocampo, ya que es una de las principales áreas afectada en la EA [19, 102]. De esta manera, observamos que hubo un incremento significativo (20%) en los niveles de P2X2R en el hipocampo de ratones APP/PS1 de 6 meses de edad, en comparación con sus hermanos de camada wild type (WT) (WT: $100 \pm 2\%$, APP/PS1: $120 \pm 2\%$, Figura 32A, 32B). Este aumento en los niveles de P2X2R se asoció con un significativo incremento de 68% en los niveles de calpaína-1 (WT: $100 \pm 9\%$, APP/PS1: $168 \pm 9\%$, Figura 32C, 32D); mientras que los niveles de calpaína-2 (WT: $100 \pm 1\%$, APP/PS1: $106 \pm 3\%$, Figura 32E, 32F) y calpastatina (WT: $100 \pm 3\%$, APP/PS1: $102 \pm 3\%$, Figura 32G, 32H) no variaron significativamente. En paralelo, se observó una disminución de un 32% en los niveles de espectrina de longitud completa (WT: $100 \pm 7\%$, APP/PS1: $68 \pm 5\%$, Figura 32I, 32J); resultados que se muestran en línea con las observaciones realizadas en los modelos celulares de sobreexpresión de P2X2R.

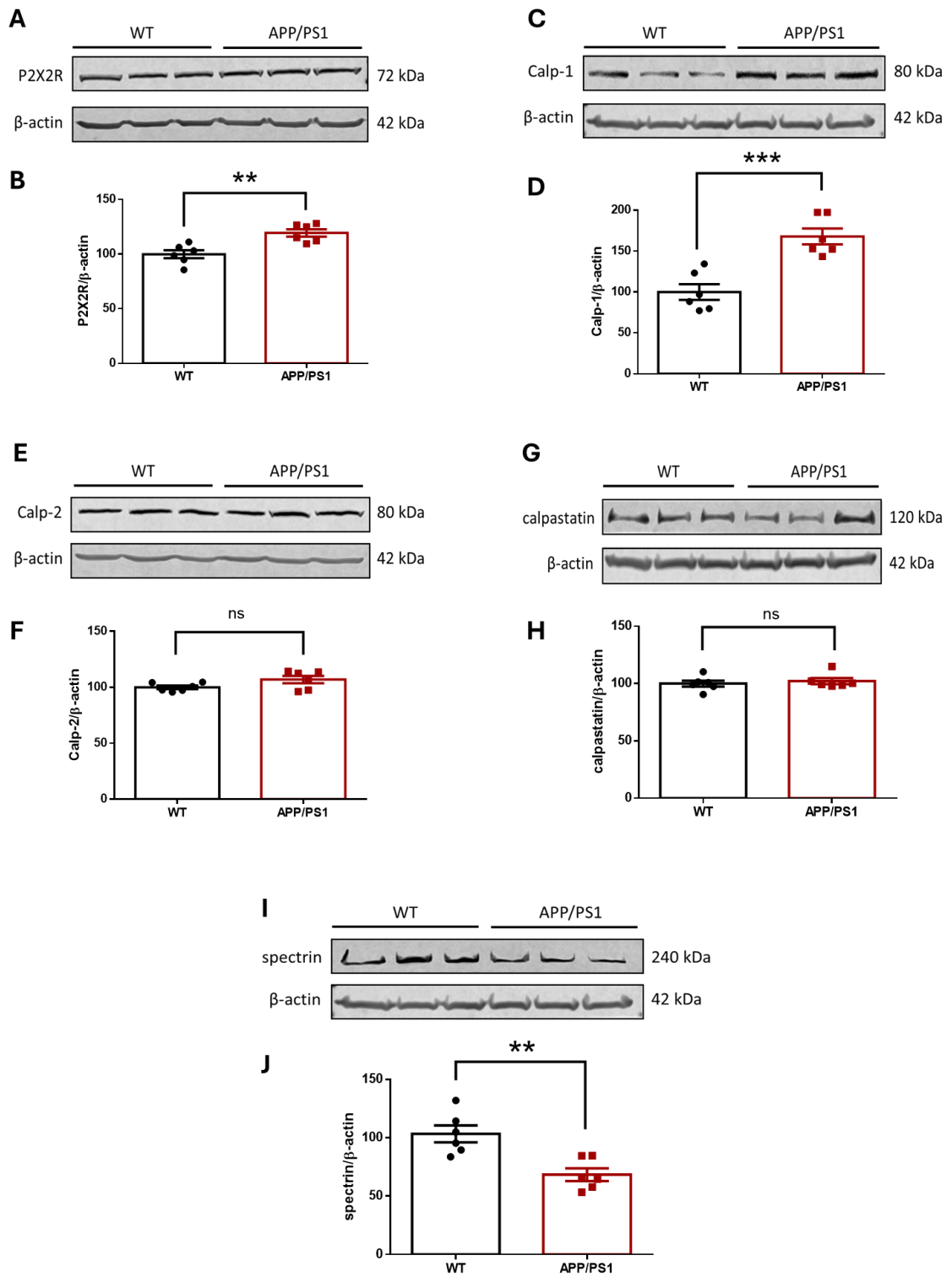


Figura 32. Incremento en los niveles de P2X2R y calpaína-1 en hipocampo de ratones APP/PS1.

A) Imagen de Western blot representativa de los niveles de P2X2R en muestras de hipocampo de ratones WT y ratones transgénicos APP/PS1 de 6 meses de edad. Se utilizó β -actina como control de carga. **B)** Cuantificación de la banda de P2X2R (n=6). **C)** Imagen representativa de los niveles de calpaína-1 en las mismas muestras de A. **D)** Cuantificación de la banda de calpaína-1 (n=6). **E)** Imagen representativa de los niveles de calpaína-2 en las mismas muestras de A. **F)** Cuantificación de la banda de calpaína-2 (n=6). **G)** Imagen representativa de los niveles de calpastatina en las mismas muestras de A. **H)** Cuantificación de la banda de calpastatina (n=6). **I)** Imagen representativa de los niveles de espectrina en las mismas muestras de A. **J)** Cuantificación de la banda de espectrina (n=6). La cuantificación de cada banda se normalizó con su respectiva banda de β -actina, y se expresó como porcentaje del control. Mediante prueba t-student se determinó que **p<0,01, ***p<0,001 WT vs APP/PS1.

Al analizar muestras de otras regiones del tejido nervioso central, como por ejemplo la corteza cerebral, observamos que P2X2R no tuvo un incremento estadísticamente significativo en ratones APP/PS1 de 6 meses de edad, en comparación con sus hermanos de camada WT (WT: 100±3%, APP/PS1: 107±3%, Figura 33A, 33B), a diferencia de lo observado previamente en hipocampo. Sin embargo, los niveles de calpaína-1 incrementaron en un 68% (WT: 100±13%, APP/PS1: 168±12%, Figura 33C, 33D), mientras que calpaína-2 no presentó variaciones significativas (WT: 100±6%, APP/PS1: 123±10%, Figura 33E, 33F). A diferencia de lo observado en hipocampo, calpastatina incrementó significativamente en muestras de corteza (WT: 100±4%, APP/PS1: 126±6%, Figura 33G, 33H), lo que podría representar un mecanismo de respuesta a la importante alza en los niveles de calpaína-1, mientras que los niveles de espectrina disminuyeron en un 21% (WT: 100±3%, APP/PS1: 79±6%, Figura 33I, 33J). Considerando que espectrina de longitud completa disminuía un 32% en el

hipocampo de estos animales (Figura 32I, 32J), es posible suponer que el aumento en los niveles de calpastatina se encuentra regulando la actividad proteasa de calpaína-1 en la corteza cerebral, disminuyendo así la degradación de espectrina; proceso que estaría menos regulado en hipocampo.

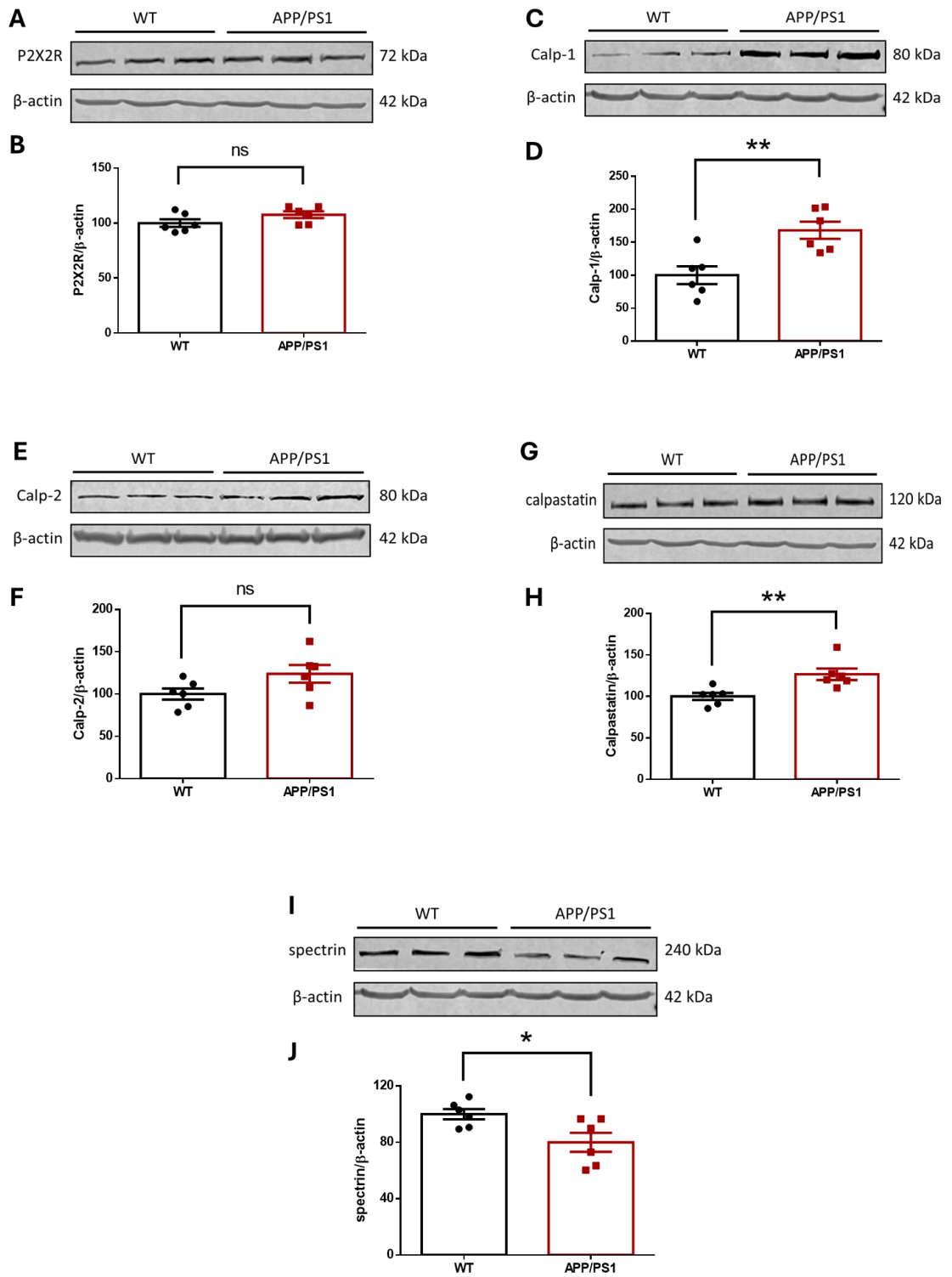


Figura 33. Cambios en los niveles de calpaína-1, calpastatina y espectrina en corteza cerebral de ratones APP/PS1.

A) Imagen de Western blot representativa de los niveles de P2X2R en muestras de corteza cerebral de ratones WT y ratones transgénicos APP/PS1 de 6 meses de edad. Se utilizó β -actina como control de carga. **B)** Cuantificación de la banda de P2X2R (n=6). **C)** Imagen representativa de los niveles de calpaína-1 en las mismas muestras de A. **D)** Cuantificación de la banda de calpaína-1 (n=6). **E)** Imagen representativa de los niveles de calpaína-2 en las mismas muestras de A. **F)** Cuantificación de la banda de calpaína-2 (n=6). **G)** Imagen representativa de los niveles de calpastatina en las mismas muestras de A. **H)** Cuantificación de la banda de calpastatina (n=6). **I)** Imagen representativa de los niveles de espectrina en las mismas muestras de A. **J)** Cuantificación de la banda de espectrina (n=6). La cuantificación de cada banda se normalizó con su respectiva banda de β -actina, y se expresó como porcentaje del control. Mediante prueba t-student se determinó que *p<0,05, **p<0,01 WT vs APP/PS1.

11. El eje P2X2R/Calpaína-1 podría estar involucrado en la potenciación de la vía amiloidogénica en modelos animales transgénicos de la EA.

Previamente encontramos que los niveles de P2X2R (Figura 32A, 32B) y calpaína-1 (Figura 32C, 32D) estaban incrementados en el hipocampo de ratones APP/PS1, en comparación con ratones WT. Por este motivo, quisimos estudiar la vía de generación de A β mediada por calpaínas en los ratones APP/PS1. Así, los datos obtenidos a partir de homogenizados de hipocampo muestran que los ratones APP/PS1 de 6 meses de edad poseen un incremento significativo en la razón p25/p35, en comparación con sus hermanos de camada WT (WT: 100 \pm 9%, APP/PS1: 165 \pm 13%, Figura 34A, 34B). Los niveles de Cdk5 incrementaron en un 15% (WT: 100 \pm 2%, APP/PS1: 115 \pm 3%, Figura 34C, 34D), mientras que la razón pSTAT3/STAT3 incrementó en un 66% (WT: 100 \pm 4%, APP/PS1: 166 \pm 17%, Figura

34E, 34F). Sumado a esto, los niveles de la enzima BACE1 incrementaron en un 51% (WT: $100 \pm 12\%$, APP/PS1: $151 \pm 12\%$, Figura 35A, 35B), así como también aumentaron los niveles del fragmento C99, el cual es generado por BACE1 en el procesamiento de APP (WT: $100 \pm 9\%$, APP/PS1: $199 \pm 11\%$, Figura 35C, 35D).

Cuando analizamos los niveles de A β en los ratones APP/PS1 observamos un incremento del 32% en los niveles de este péptido, en comparación con su contraparte WT (WT: $100 \pm 5\%$, APP/PS1: $132 \pm 6\%$, Figura 35E, 35F). Mientras que como era esperado, los niveles de APP se encuentran incrementados significativamente en estos animales transgénicos (WT: $100 \pm 4\%$, APP/PS1: $367 \pm 14\%$, Figura 35G, 35H). Si bien, en los ratones APP/PS1 podrían existir más factores involucrados en la desregulación del sistema de calpaínas; nuestros datos en el modelo celular de sobreexpresión de P2X2R, en conjunto con estos últimos resultados, permiten sugerir la idea de la contribución del receptor P2X2R a la toxicidad amiloide, en un posible mecanismo mediado por calpaínas.

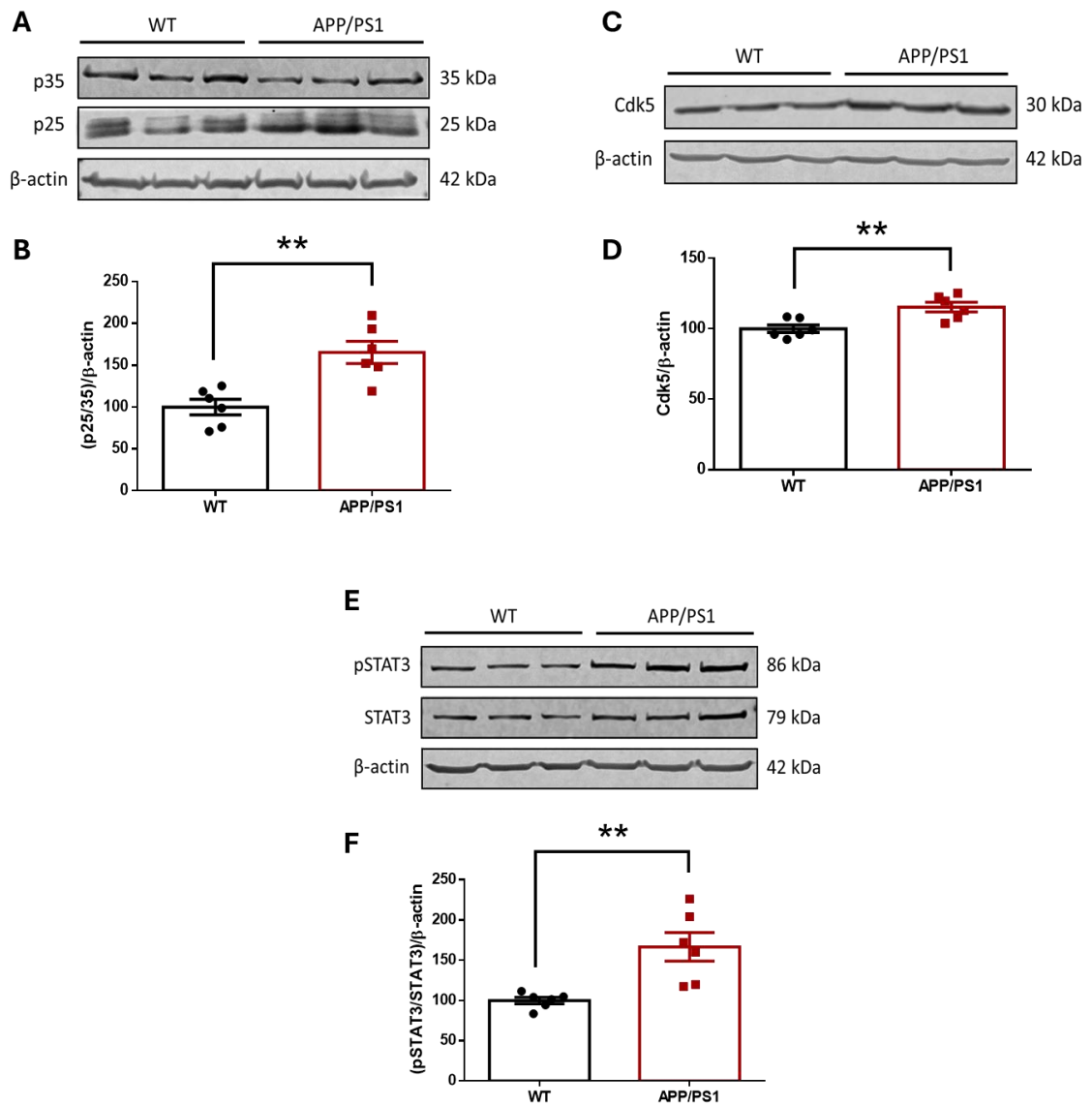


Figura 34. Niveles de p25, Cdk5 y pSTAT3 en hipocampo de ratones APP/PS1.

A) Imagen de Western blot representativa de los niveles de p35 y p25 en muestras de hipocampo de ratones WT y ratones transgénicos APP/PS1 de 6 meses de edad. Se utilizó β -actina como control de carga. **B)** Cuantificación del ratio p25/p35 (n=6). **C)** Imagen representativa de los niveles de Cdk5 en las mismas muestras de A. **D)** Cuantificación de la banda de Cdk5 (n=6). **E)** Imagen representativa de los niveles de pSTAT3 y STAT3 en las mismas muestras de A. **F)** Cuantificación del ratio pSTAT3/STAT3 (n=6). La cuantificación de cada banda se normalizó con su respectiva banda de β -actina, y se expresó como porcentaje del control. Mediante prueba t-student se determinó que ****p<0,01 WT vs APP/PS1**.

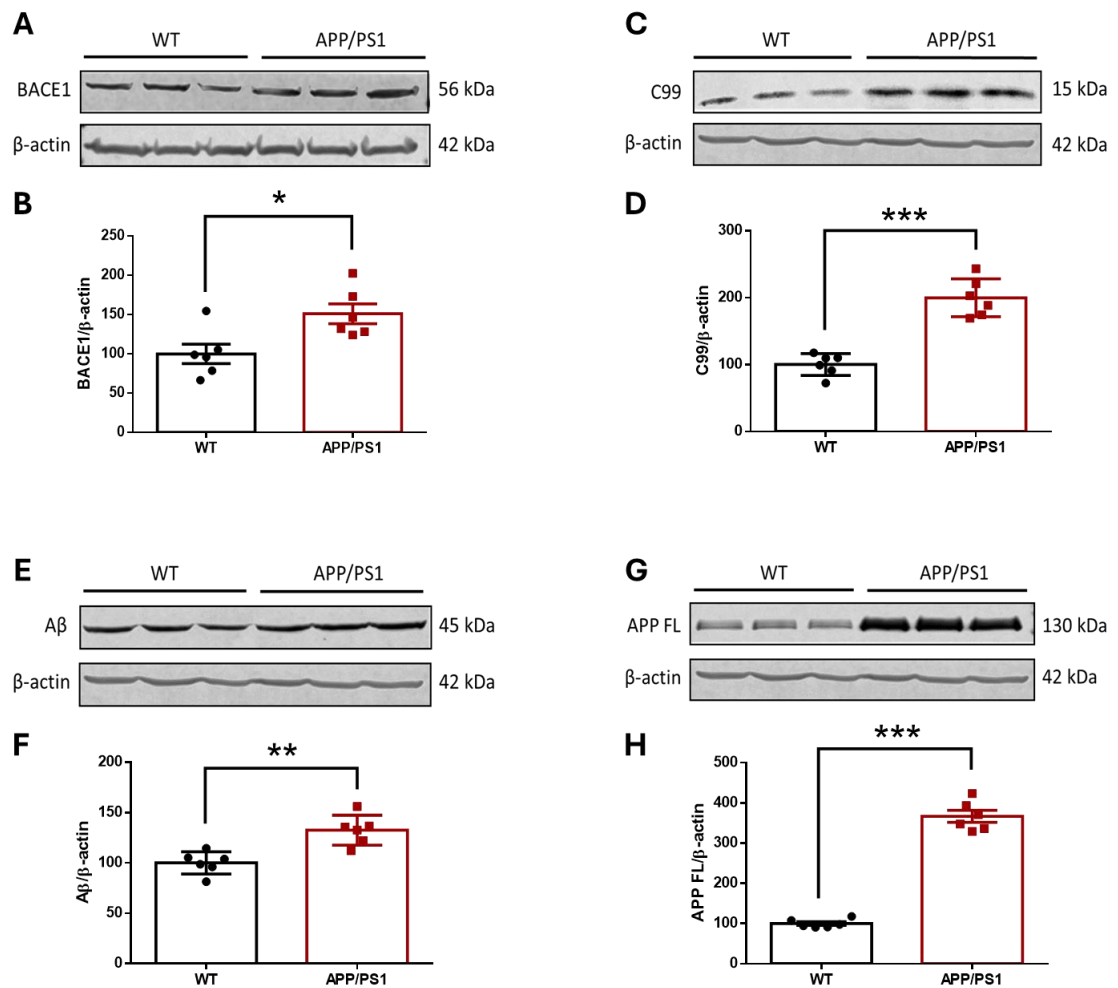


Figura 35. Incremento de la vía amiloidogénica en hipocampo de ratones APP/PS1.

A) Imagen de Western blot representativa de los niveles de BACE1 en muestras de hipocampo de ratones WT y ratones transgénicos APP/PS1 de 6 meses de edad. Se utilizó β -actina como control de carga. **B)** Cuantificación de la banda de BACE1 (n=6). **C)** Imagen representativa de los niveles de C99 (Fragmento β -carboxi-terminal de APP, β -CTF), en las mismas muestras de A. **D)** Cuantificación de la banda de C99 (n=6). **E)** Imagen representativa de los niveles de $A\beta$ en las mismas muestras de A. **F)** Cuantificación de la banda de $A\beta$ (n=6). **G)** Imagen representativa de los niveles de APP FL en las mismas muestras de A. **H)** Cuantificación de la banda de APP FL (n=6). La cuantificación de cada banda se normalizó con su respectiva banda de β -actina, y se expresó como porcentaje del control. Mediante prueba t-student se determinó que * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ WT vs APP/PS1.

12. El eje P2X2R-calpaína-1 está regulado al alza en corteza prefrontal de pacientes con Enfermedad de Alzheimer.

Previamente demostramos que la activación del receptor purinérgico P2X2 incrementa los niveles de calpaína-1 y su actividad proteasa, y que hay un incremento de P2X2R y calpaína-1 en los ratones transgénicos APP/PS1. Debido a esto, nos propusimos evaluar los niveles del receptor P2X2R y calpaína-1 en muestras post-mortem de cerebro de pacientes diagnosticados con EA, clasificados de acuerdo con los estadios Braak. Las muestras (ver materiales y métodos) se clasificaron en los siguientes grupos: estadio Braak I–II, III–IV y V–VI, mientras que muestras provenientes de individuos sin demencia fueron usadas como control.

En primer lugar, obtuvimos homogenizados totales provenientes de corteza prefrontal humana. Utilizando la técnica de western blot, observamos un aumento significativo en los niveles de P2X2R en todos los estadios Braak de la EA, en comparación con los individuos control (Control: $100 \pm 6\%$, I-II: $136 \pm 10\%$, III-IV: $153 \pm 11\%$, V-VI: $154 \pm 10\%$, Figura 36A, 36B); mientras que calpaína-1 presentó incrementos significativos en los estadios Braak III-IV, V-VI (Control: $100 \pm 5\%$, I-II: $119 \pm 8\%$, III-IV: $134 \pm 6\%$, V-VI: $133 \pm 8\%$, Figura 36C, 36D).

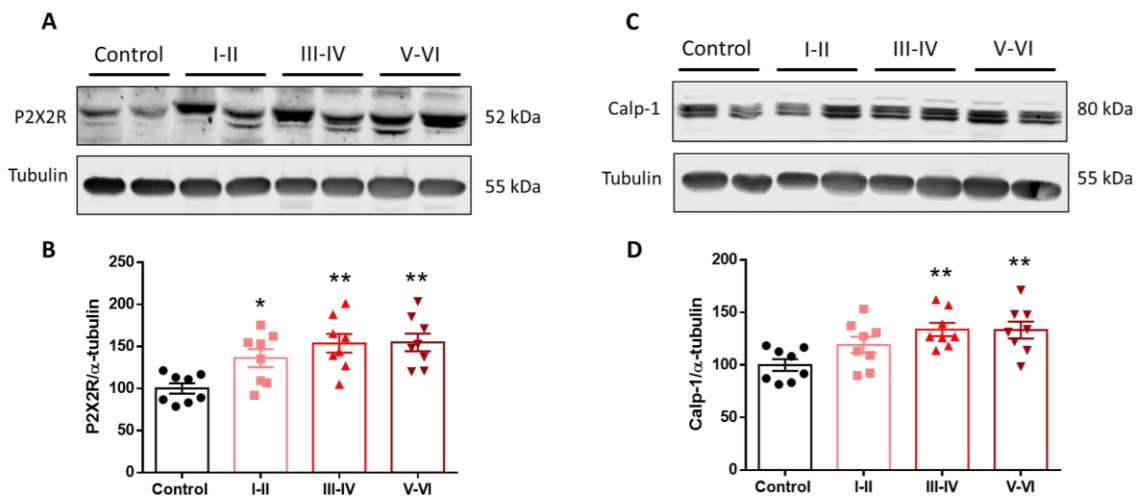


Figura 36. Niveles de P2X2R y calpaína-1 en muestras postmortem de pacientes con EA en diferentes estadios.

A) Imagen de Western blot representativa de los niveles de P2X2R en homogenizados de muestras de corteza prefrontal de pacientes control (sin demencia) y pacientes con EA en los estadios Braak I-II, III-IV, V-VI. Se utilizó α -tubulina como control de carga. **B)** Cuantificación de la banda de P2X2R (n=8). **C)** Imagen representativa de los niveles de calpaína-1 en las mismas muestras de A. **D)** Cuantificación de la banda de calpaína-1 (n=8). La cuantificación de cada banda se normalizó con su respectiva banda de α -tubulina, y se expresó como porcentaje del control. Mediante ANOVA para múltiples grupos se determinó que * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs control.

Luego de encontrar un aumento en los niveles de P2X2R y Calpaína-1 en pacientes con EA, realizamos fraccionamiento subcelular de las muestras de corteza prefrontal (ver materiales y métodos), con el objetivo de conocer la distribución de estas proteínas y su posible rol asociado a la enfermedad. A partir de una serie de solubilizaciones y centrifugaciones obtuvimos homogenizados totales (T), fracciones citosólicas (S2) y fracciones de membrana (P2). A partir de P2 obtuvimos fracciones de membrana postsináptica (TxP) y fracciones de membrana extrasináptica+presináptica (TxS) (Figura 7). Para validar nuestro

protocolo de fraccionamiento subcelular, analizamos los niveles de proteínas clave asociadas a los distintos compartimentos celulares obtenidos. Así, en la fracción TxP encontramos niveles elevados de la proteína postsináptica PSD95 (Figura 37A), mientras que la proteína de vesícula sináptica sinaptofisina se encontró mayormente presente en las fracciones TxS y S2 (Figura 37A), y la proteína de la red trans-Golgi TGN46 fue más abundante en S2 (Figura 37A). P2X2R se encontró en mayor proporción en las fracciones TxS y S2, mientras que calpaína-1 estaba localizada principalmente en TxS (Figura 37A).

La cuantificación de los datos nos permitió demostrar que el receptor purinérgico P2X2R se localiza principalmente en TxS (TxP: $41\pm 2\%$, TxS: $100\pm 4\%$, Figura 37B, 37C), al igual que calpaína-1 (TxP: $35\pm 2\%$, TxS: $100\pm 3\%$, Figura 37D, 37E), lo que podría sugerir un posible rol conjunto de estas proteínas en el cerebro humano, donde probablemente la mayor expresión de P2X2R en TxS contribuye a una mayor eficiencia en la activación de calpaína-1. Estos datos fueron respaldados con las mediciones de los niveles de PSD95 (TxP: $100\pm 6\%$, TxS: $16\pm 4\%$) y sinaptofisina (TxP: $15\pm 5\%$, TxS: $100\pm 3\%$, Figura 37F, 37G).

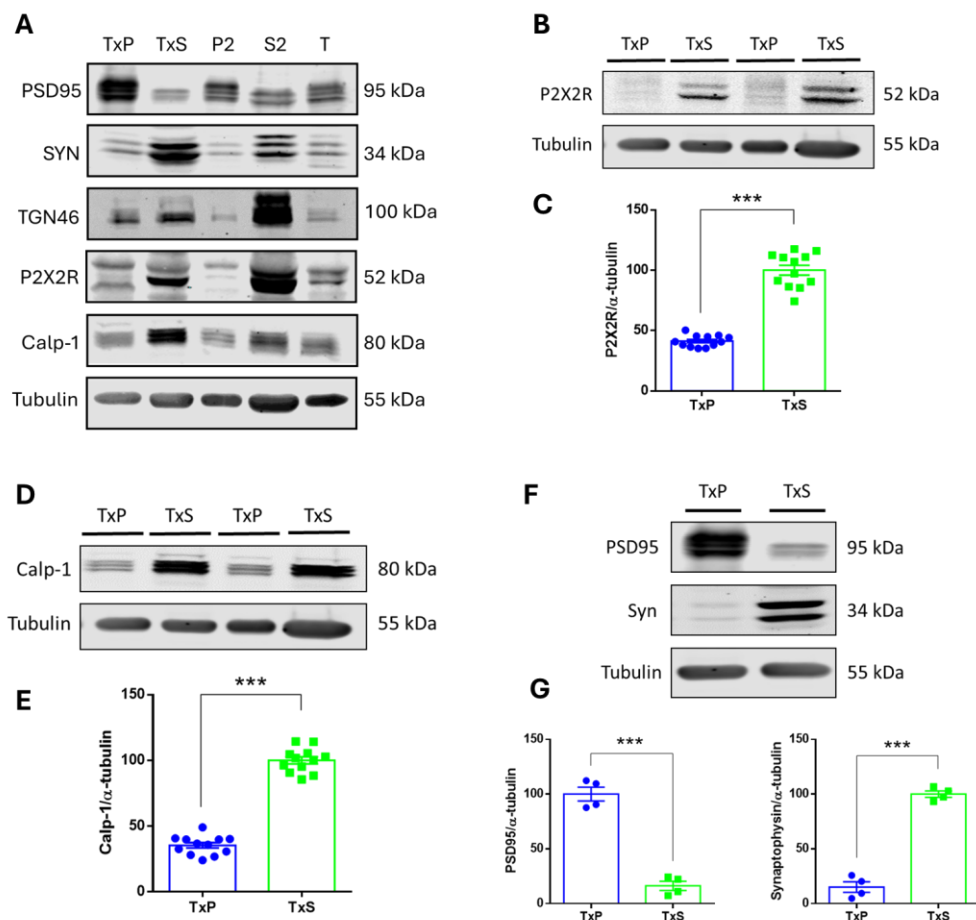


Figura 37. Cuantificación de proteínas clave en diferentes fracciones de corteza prefrontal de muestras postmortem de pacientes con EA.

A) Imagen de Western blot representativa de los niveles de la proteína postsináptica PSD95, la proteína presináptica sinaptosifina (SYN), la proteína de la red de Trans-Golgi (TGN46), P2X2R y calpaína-1 en fracciones de membrana postsináptica (TxP) fracciones de membrana extrasináptica-presináptica (TxS), fracciones de membrana total (P2), fracciones citosólicas (S2) y homogenizado total (T) de corteza prefrontal humana. Se utilizó α -tubulina como control de carga. **B)** Imagen de Western blot representativa de los niveles de P2X2R y α -tubulina en fracciones TxP vs TxS. **C)** Cuantificación de la banda de P2X2R (n=12). **D)** Imagen representativa de los niveles de calpaína-1 y α -tubulina en fracciones TxP vs TxS. **E)** Cuantificación de la banda de calpaína-1 (n=12). **F)** Imagen representativa de los niveles de PSD95, sinaptosifina y α -tubulina en fracciones TxP vs TxS. **G)** Cuantificación de la banda de PSD95 y sinaptosifina (n=4). La cuantificación de cada banda se normalizó con su respectiva banda de α -tubulina, y se expresó como porcentaje. Mediante prueba t-student se determinó que ***p<0,001 TxP vs TxS.

Dado que P2X2R y calpaína-1 están distribuidos principalmente en TxS, nos propusimos evaluar los niveles de estas proteínas en fracciones TxS de grupos controles y pacientes con EA en los distintos estadios Braak. De esta manera observamos que los niveles de P2X2R aumentaron en todos los estadios Braak de la enfermedad (Figura 38A, 38B), mientras que los niveles de calpaína-1 incrementaron significativamente en los estadios Braak III-VI y V-VI (Figura 38C, 38D), en comparación con los pacientes control, que no presentan enfermedades neuropatológicas. P2X2R (Control: $100 \pm 7\%$, I-II: $152 \pm 12\%$, III-IV: $189 \pm 17\%$, V-VI: $176 \pm 22\%$), calpaína-1 (Control: $100 \pm 5\%$, I-II: $128 \pm 7\%$, III-IV: $146 \pm 11\%$, V-VI: $150 \pm 12\%$). Sin embargo, al analizar los niveles de P2X2R y calpaína-1 en las fracciones TxP de individuos control y pacientes con EA, no encontramos diferencias significativas en los niveles de estas proteínas: P2X2R (Control: $100 \pm 4\%$, I-II: $103 \pm 10\%$, III-IV: $105 \pm 8\%$, V-VI: $99 \pm 7\%$, Figura 39A, 39B), calpaína-1 (Control: $100 \pm 7\%$, I-II: $112 \pm 5\%$, III-IV: $120 \pm 8\%$, V-VI: $120 \pm 4\%$, Figura 39C, 39D).

Por último, al analizar las fracciones citosólicas de corteza prefrontal humana, observamos un aumento estadísticamente significativo de P2X2R en los estadios Braak III-IV, en comparación con el grupo control (Control: $100 \pm 9\%$, I-II: $141 \pm 10\%$, III-IV: $151 \pm 18\%$, V-VI: $127 \pm 7\%$, Figura 40A, 40B); mientras que calpaína-1 no mostró diferencias significativas en S2 (Control: $100 \pm 6\%$, I-II: $127 \pm 8\%$, III-IV: $125 \pm 11\%$, V-VI: $110 \pm 5\%$, Figura 40C, 40D).

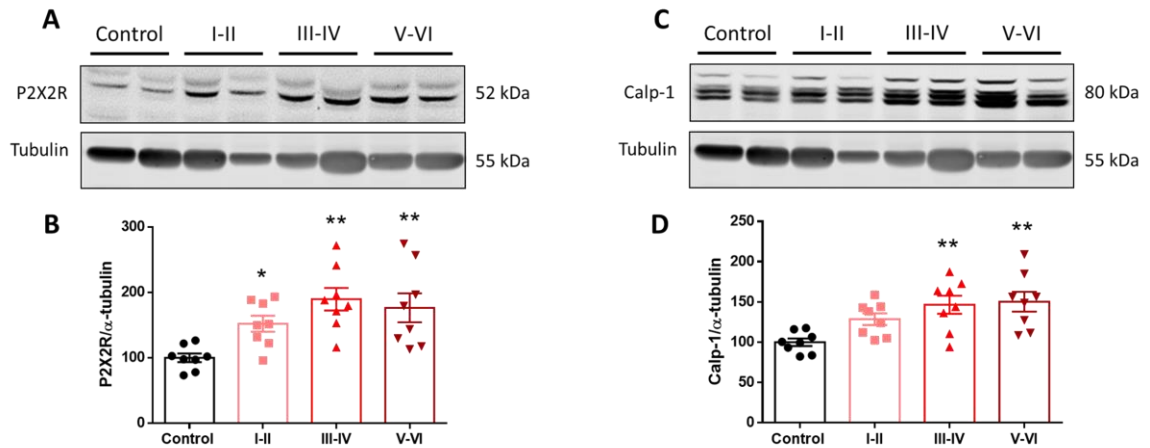


Figura 38. Niveles de P2X2R y calpaína-1 en fracciones TxS de muestras postmortem de pacientes con EA.

A) Imagen de Western blot representativa de los niveles de P2X2R en fracciones TxS (membrana extrasináptica+presináptica) de corteza prefrontal de pacientes control (sin demencia) y pacientes con EA en estadios Braak I-II, III-IV, V-VI. Se utilizó α -tubulina como control de carga. **B)** Cuantificación de la banda de P2X2R (n=8). **C)** Imagen representativa de los niveles de calpaína-1 en las mismas muestras de A. **D)** Cuantificación de la banda de calpaína-1 (n=8). La cuantificación de cada banda se normalizó con su respectiva banda de α -tubulina, y se expresó como porcentaje del control. Mediante ANOVA para múltiples grupos se determinó que *p<0,05, **p<0,01 vs control.

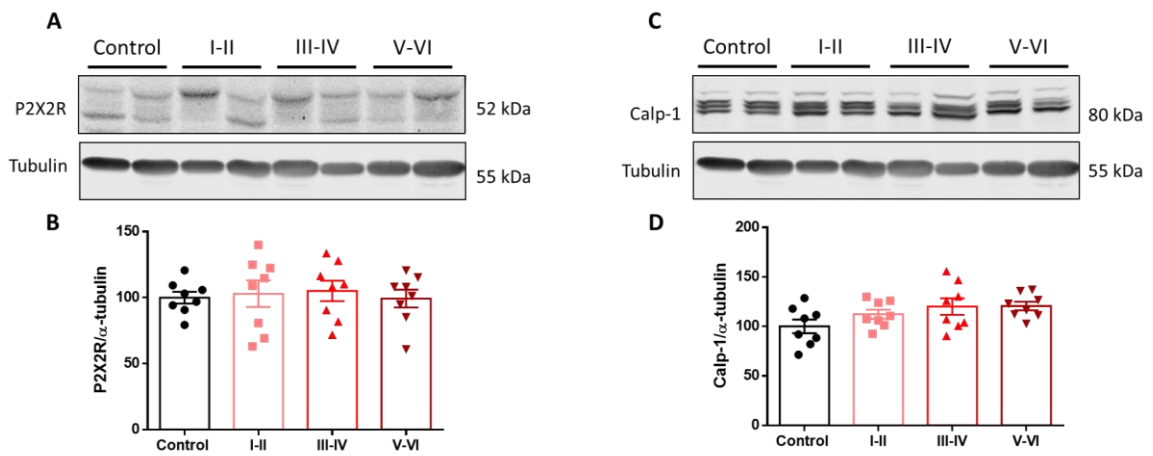


Figura 39. Cuantificación de los niveles de P2X2R y calpaína-1 en fracciones TxP de muestras postmortem de pacientes con EA.

A) Imagen de Western blot representativa de los niveles de P2X2R en fracciones TxP (membrana postsináptica) de corteza prefrontal de pacientes control (sin demencia) y pacientes con EA en estadios Braak I-II, III-IV, V-VI. Se utilizó α -tubulina como control de carga. **B)** Cuantificación de la banda de P2X2R (n=8). **C)** Imagen representativa de los niveles de calpaína-1 en las mismas muestras de A. **D)** Cuantificación de la banda de calpaína-1 (n=8). La cuantificación de cada banda se normalizó con su respectiva banda de α -tubulina, y se expresó como porcentaje del control. No se observaron diferencias estadísticas mediante ANOVA para múltiples grupos.

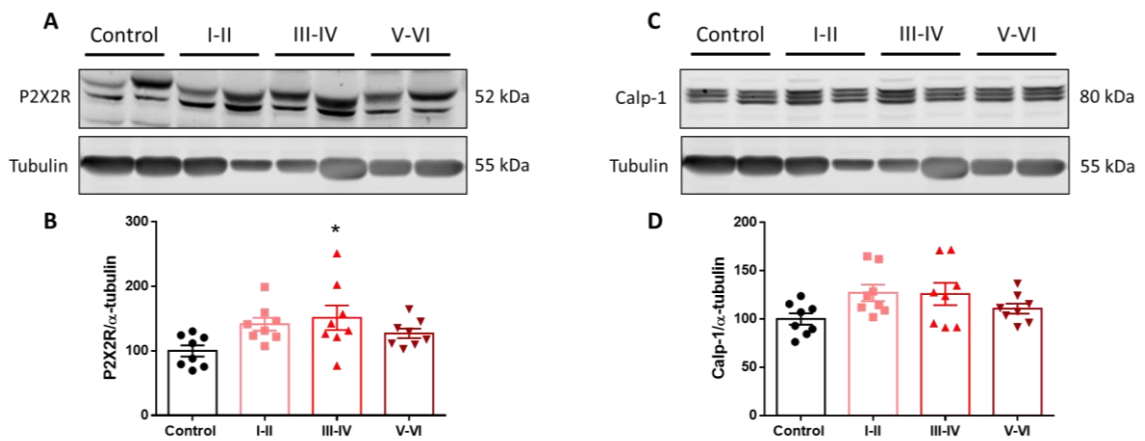


Figura 40. Cuantificación de los niveles de P2X2R y calpaína-1 en fracciones citosólicas de muestras postmortem de pacientes con EA.

A) Imagen de Western blot representativa de los niveles de P2X2R en fracciones citosólicas (S2) de corteza prefrontal de pacientes control (sin demencia) y pacientes con EA en estadios Braak I-II, III-IV, V-VI. Se utilizó α -tubulina como control de carga. **B)** Cuantificación de la banda de P2X2R (n=8). **C)** Imagen representativa de los niveles de calpaína-1 en las mismas muestras de A. **D)** Cuantificación de la banda de calpaína-1 (n=8). La cuantificación de cada banda se normalizó con su respectiva banda de α -tubulina, y se expresó como porcentaje del control. Mediante ANOVA para múltiples grupos se determinó que *p<0,05 vs control.

Debido a que los estadios Braak de la EA se clasifican de acuerdo con la distribución de los ovillos neurofibrilares, y no con los depósitos de A β en el cerebro [19], nos propusimos evaluar los niveles del péptido A β en homogenizados totales de corteza prefrontal humana provenientes de las mismas muestras utilizadas para nuestro protocolo de fraccionamiento subcelular. De esta manera, observamos un aumento en los niveles de A β en todos los estadios Braak de la enfermedad, sin embargo, este aumento fue más significativo en los estadios Braak III-IV y V-VI (Control: 100±10%, I-II: 199±27%, III-IV: 266±22%, V-VI: 302±28%, Figura 41A, 41B), lo que se podría correlacionar

con los incrementos de P2X2R y calpaína-1 observados previamente en los pacientes con EA, y vendría a sustentar nuestra hipótesis en relación a la potenciación de los efectos neurotóxicos del péptido mediados por P2X2R, en la generación de un círculo vicioso y un punto de no retorno en los eventos neurodegenerativos, lo que releva la posibilidad del desarrollo de moduladores selectivos de P2X2R como una potencial estrategia farmacológica.

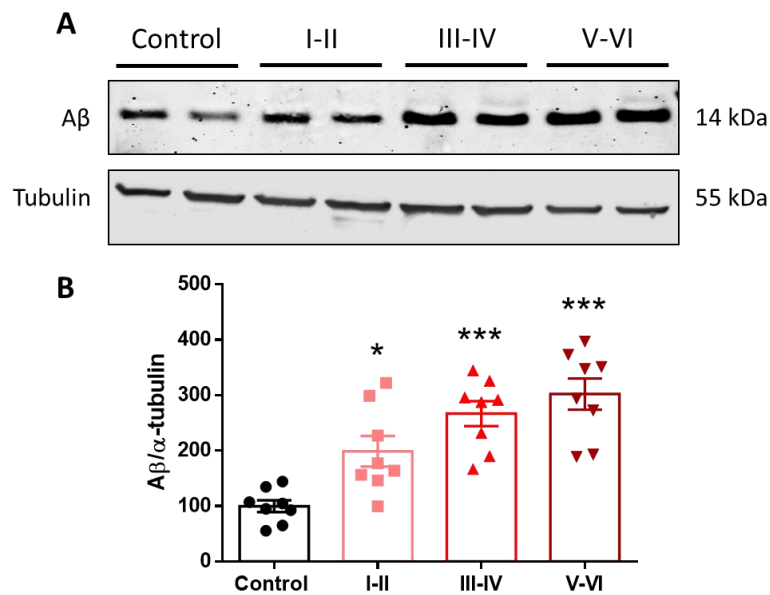


Figura 41. Aumento en los niveles del péptido Aβ en homogenizados totales de corteza prefrontal de muestras postmortem de pacientes con EA.

A) Imagen de Western blot representativa de los niveles de Aβ en muestras de homogenizado total (T) de corteza prefrontal de pacientes control (sin demencia) y pacientes con EA en estadios Braak I-II, III-IV, V-VI. Se utilizó α-tubulina como control de carga. **B)** La cuantificación de la banda de Aβ se normalizó con su respectiva banda de α-tubulina, y se expresó como porcentaje del control, (n=8). Mediante ANOVA para múltiples grupos se determinó que *p<0,05, ***p<0,001 vs control.

VII. DISCUSION

Según la hipótesis amiloide, el péptido A β es un elemento clave en la fisiopatología de la EA, por lo que el curso clínico de la enfermedad evolucionaría de la siguiente manera: acumulación de A β , neuroinflamación, acumulación de tau, disfunción del metabolismo cerebral, atrofia cerebral, deterioro cognitivo (de deterioro cognitivo leve a grave) y aparición de síntomas de demencia [2]. Es por esto que recientemente se han dirigido los esfuerzos a la búsqueda de terapias con anticuerpos contra A β , como los ensayos clínicos de fase III Clarity AD (lecanemab) y EMERGE (aducanumab) [2]. Sin embargo, estos tratamientos sólo han mostrado un beneficio moderado para la salud de los pacientes, por lo que aún persisten interrogantes sobre su eficacia, seguridad y accesibilidad para la población [2]. Esto refleja la necesidad clínica insatisfecha de tales terapias, y refuerza la importancia de la investigación básica para encontrar blancos terapéuticos novedosos que contribuyan al tratamiento efectivo de la EA [2].

En este contexto, nuestro trabajo presenta hallazgos significativos, ya que es la primera vez que se estudia el eje de activación P2X2R/Calpaína-1, y su implicancia como potenciador de la vía amiloidogénica y la formación de A β . Considerando que otros autores previamente han informado que la desregulación del sistema de calpaínas podría ser un evento temprano y presintomático en la

EA [78, 79], nuestros datos permiten abordar posibles causas iniciales para la presencia anormal de agregados del péptido.

En primer lugar, demostramos que la sobreexpresión y activación de P2X2R incrementó los niveles de calpaína-1 en células PC-12. Si bien, mediante western blot observamos que calpaína-1 incrementó proporcionalmente con el tiempo de incubación con ATP (100 μ M), es posible que una corriente inicial de P2X2R sea suficiente para aumentar los niveles de calpaína-1 en el tiempo, ya que es conocido que el ATP induce una desensibilización de las corrientes de P2X2R a altas concentraciones (<100 μ M) en medios que contienen Ca^{2+} [103]. Además, el hecho de que los niveles de calpaína-1 incrementen a tiempos breves (desde los 15 min) podría ser cuestionable, ya que estudios de regulación génica muestran que los niveles de mRNA y proteína de calpaína pueden incrementar desde 2h hasta días, dependiendo del estímulo y modelo celular [104]. Sin embargo, Valimaki y colaboradores reportaron que luego de una estimulación breve con ATP (3mM, 30 min) los niveles de proteína de calpaína-1 y calpaína-2 incrementaron en fracciones citosólicas de la línea celular de leucemia monocítica humana THP-1 [74], lo que estaría en línea con nuestros resultados. Sumado a esto, mediante la técnica de inmunocitoquímica y la selección de células transfectadas con el vector reportero GFP, observamos que solo la sobreexpresión de P2X2R (24 h) ya induce un aumento significativo en los niveles de calpaína-1, lo que sugiere que el aumento en los niveles de proteína de

calpaína-1 comienza con la sobreexpresión de P2X2R y se ve potenciado con un estímulo de ATP.

Así, nuestros datos demuestran que la sobreexpresión y activación de P2X2R produce un aumento específico en los niveles de calpaína-1, sin generar cambios en los niveles de proteína de calpaína-2 y calpastatina. Estos resultados se correlacionaron, a su vez, con incrementos en los niveles de calpaína-1 en hipocampo y corteza de ratones transgénicos APP/PS1, y en corteza prefrontal de pacientes con EA. Estos resultados se alinean con los hallazgos de que el ARNi de calpaína-1 mejoró la viabilidad celular y disminuyó la tasa apoptótica en cultivos de neuronas primarias expuestas a $A\beta_{25-35}$ (10 μ M) [105]. Sumado a esto, se demostró que ratones KO para calpaína-1 poseen una menor degeneración neuronal y apoptosis tras la inducción de una lesión cerebral traumática, en comparación con sus compañeros de camada WT, probablemente debido al bloqueo parcial de la activación de caspasa-3, la entrada de Ca^{2+} extracelular, la permeabilidad de la membrana mitocondrial y la liberación del factor inductor de apoptosis [106]. Si bien estos datos sugieren que la inhibición de calpaína-1 podría tener un efecto neuroprotector, otros autores informaron que la activación de calpaína-2 en neuronas primarias de hipocampo produjo la escisión de la subunidad $\alpha 4$ de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR $\alpha 4$) en un fragmento de ~ 55 kDa y una disminución de las corrientes de nAChR $\alpha 4$, produciendo alteraciones en la transmisión colinérgica [107]. Adicionalmente, en un modelo de rata con diabetes mellitus que muestran deterioro cognitivo similar

a la EA, se observó un aumento en la expresión de calpaína-2 y en los depósitos del péptido A β en hipocampo [108], lo que sugiere que tanto calpaína-1 como calpaína-2 podrían tener un rol clave en la fisiopatología de la EA.

Además de observar aumentos en los niveles de calpaína-1, mediante la técnica de inmunocitoquímica observamos que calpaína-1 presentaba una distribución citosólica y nuclear en células PC-12. Si bien es conocido que las calpaínas tienen distribución principalmente citosólica, también pueden estar presentes en algunos compartimentos celulares [109]. En un estudio se permeabilizaron células A431 con digitonina para introducir calpaínas marcadas con fluoresceína. Así, FITC-calpaína-1 se transportó a los núcleos de una manera dependiente de ATP, presentando una acumulación nuclear máxima a una concentración de 1 μ M de Ca²⁺, mientras que calpaína-2 y calpastatina no mostraron fluorescencia nuclear, lo que sugirió la presencia de un transporte nuclear selectivo para calpaína-1 y la posibilidad de que proteínas nucleares sean sustratos fisiológicos de esta proteasa [110]. Por otro lado, observamos que calpaína-2 estaba mayormente asociada a la membrana. Esto se debe probablemente a que calpaína-2 se acopla a la membrana interna mediante la unión a fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), que actúa como cofactor para la enzima [111, 112]. Además, calpaína-2 desempeña un papel fundamental en la migración celular, permitiendo la disociación de células adherentes mediante la escisión de los componentes estructurales de las placas de adhesión [111, 112].

En seguida, informamos que la activación de P2X2R produjo un aumento en la actividad proteasa de calpaínas, a través de la degradación de los sustratos espectrina y Ac-LLY-AFC. Si bien el aumento en los niveles de calpaína-1 observado previamente nos podría sugerir que la degradación de ambos sustratos es debido a la acción específica de esta proteasa, no podemos descartar la posibilidad de que calpaína-2 podría incrementar su actividad proteasa, sin necesariamente incrementar su expresión, lo que podría representar una limitación en este estudio y la necesidad futura de inmunopurificar ambas proteínas para evaluar su actividad proteasa de forma individual. No obstante, la evidencia muestra que el aumento en la actividad proteasa de calpaínas siempre va de la mano con un aumento en su expresión [79, 113]. Por otro lado, considerando los distintos requerimientos de Ca^{2+} para la activación de calpaínas, que fueron mencionados en la introducción, es más probable encontrar un aumento en la actividad proteasa de calpaína-1, en vez de calpaína-2, debido a los niveles de Ca^{2+} fisiológicos. Sin embargo, se ha informado que calpaína-2 puede ser fosforilada directamente por la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) en su Ser50, y así disminuir la concentración de Ca^{2+} requerida para su activación [114]. Apoyando esto, están los hallazgos de que tanto el factor de crecimiento epidérmico (EGF) como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) podrían activar a calpaína-2 en dendritas de neuronas de hipocampo por fosforilación mediada por ERK [115]. Si

bien, se demostró que proteína quinasa A (PKA) puede fosforilar a calpaína -1 para aumentar su actividad [116], esto aún es controversial, ya que otros autores informaron una disminución de la actividad de calpaína después de la fosforilación por PKA [117], por lo que el principal activador de calpaína-1 es el Ca^{2+} intracelular, mientras que la actividad de calpaína-2 puede ser regulada por ERK.

El ATP actúa como agonista de distintas subunidades de receptores purinérgicos P2Y y P2X, y también puede ser degradado por ectonucleotidasas para formar ADP y adenosina, que activan receptores P2Y y P1, respectivamente [41]. Debido a esto, expusimos células PC-12 que no sobreexpresan P2X2R a tratamientos con ATP, y no encontramos variaciones en los niveles de calpaína-1 o degradación de espectrina. A pesar de que células PC-12 presentan P2X2R endógeno, sus niveles no fueron suficientes para activar a esta proteasa. Esto demuestra que se necesita una sobreexpresión de P2X2R para desregular el sistema de calpaínas, y concuerda con el aumento en la expresión de P2X2R observado en hipocampo de ratones APP/PS1 y en corteza prefrontal de pacientes con EA.

A pesar de ello, la literatura es consistente con el hecho de que las calpaínas pueden ser activadas por otros receptores permeables a Ca^{2+} , como receptores NMDA o receptores de acetilcolina. Así, un estudio demostró que el inhibidor de calpaínas A-705253 prevenía de forma concentración-dependiente la muerte

neuronal inducida por la activación de NMDAR, en el área CA1 de rebanadas de hipocampo en cultivo, y estos efectos protectores fueron comparables con memantina, antagonista de NMDAR clínicamente disponible [118]. Adicionalmente, Kelly y Ferreira mostraron que la afluencia de Ca^{2+} mediada por NMDAR en cultivo de neuronas de hipocampo activaba a calpaínas para degradar a dinamina-1, una proteína que desempeña un papel crítico en el reciclaje de vesículas sinápticas [119]. Recientemente, un estudio informó que la administración oral del antagonista de NMDAR (UB-ALT-EV) a ratones 5XFAD produjo una reducción en los niveles de calpaína-1, y evitó degradación de los sustratos espectrina y p35, confirmando una actividad disminuida de esta proteasa y una reducción en el ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$, así como la cantidad y el tamaño de las placas de $A\beta$ positivas para tioflavina-S. [120]. Por otro lado, se demostró que señales de Ca^{2+} mediadas por el receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ (nAChR $\alpha 7$) en células PC-12 diferenciadas activan a calpaínas, conduciendo a la degradación de la espectrina, la retracción de microtúbulos y la atenuación en el crecimiento de neuritas, sugiriendo que los nAChR $\alpha 7$ regulan la dinámica del citoesqueleto a través de señales locales de Ca^{2+} y la actividad proteasa de calpaínas [121]. Esos antecedentes ponen en el centro de atención al sistema de calpaínas, ya que su activación desregulada podría catalizar una etapa de disfunción sináptica que precede a la pérdida de sinapsis y a la neurodegeneración [119]. Sin embargo, debemos considerar que los tratamientos glutamatérgicos y colinérgicos, como la memantina o galantamina,

respectivamente, se utilizan actualmente para cuidados paliativos en los pacientes, pero no detienen la progresión de la EA [122].

A diferencia del glutamato y la acetilcolina, el ATP puede ser liberado al espacio extracelular a través de distintos mecanismos (vesículas sinápticas, hemicanales de panexina, receptores P2X7, poro formado por A β , etc.) [39, 41], pudiendo activar a receptores P2X a bajas concentraciones, y generando corrientes purinérgicas constantes que contribuyen en gran medida a aumentar los niveles de Ca²⁺ intracelular y a la activación de calpaínas [40], por lo que consideramos importante seguir estudiando la contribución de la señalización purinérgica y P2X2R a la fisiopatología de la EA, como un posible blanco terapéutico.

Luego de comprobar que la activación de P2X2R incrementa los niveles de calpaína-1, el siguiente paso fue estudiar si estos componentes están involucrados en el procesamiento amiloidogénico de APP y la formación de A β . Así, nuestra primera observación fue que la activación de P2X2R produjo un aumento en los niveles de p25 en células PC-12, y también encontramos niveles elevados de p25 en el hipocampo de ratones APP/PS1. p25 es un fragmento que deriva de la escisión de la proteína reguladora neuronal p35 mediada por calpaína, y se encarga de regular la actividad de la quinasa neuronal Cdk5 [87]. Wen y colaboradores demostraron que ratones que sobreexpresaban p25 presentaron niveles elevados de pSTAT3 y BACE1, y un procesamiento

amiloidogénico mejorado que aumentó la concentración de los péptidos A β ₄₀ y A β ₄₂, eventos que pudieron revertirse mediante un inhibidor de Cdk5 [84]. En apoyo a esto, ratones deficientes en Cdk5 presentaron niveles reducidos de pSTAT3 y BACE1. Mientras que ratones con una mutación específica en el sitio de fosforilación de STAT3 por Cdk5 presentaron niveles más bajos de BACE1, dado que pSTAT3 actúa como un activador de la transcripción de BACE1 [84].

Debido a estos antecedentes, nos propusimos evaluar los niveles de Cdk5 y pSTAT3 luego de la activación de P2X2R con ATP en células PC-12. Así, nuestros resultados muestran que Cdk5 no tuvo cambios, no obstante, la fosforilación de STAT3 en la serina 727, un sitio de fosforilación mediado por Cdk5 [88], aumentó en un 263% con respecto al control. Esto demuestra que Cdk5 no aumenta sus niveles, pero se encuentra hiperactivada por p25 para fosforilar a STAT3. Adicionalmente, encontramos niveles elevados de Cdk5 y pSTAT3 en el hipocampo de ratones APP/PS1. Cabe destacar que además de activar la transcripción de BACE1, pSTAT3 también es un regulador transcripcional de presenilina-1, la cual forma el sitio catalítico de γ -secretasa, enzima involucrada en la escisión final de APP para la producción del péptido A β [85]. En consecuencia, la activación de P2X2R incrementó los niveles de BACE1 y A β en células PC-12, y estos aumentos se evitaron cuando las células fueron tratadas con el inhibidor de calpaínas MDL28170.

En 2018, Zhou y col., reportaron que el micro ARN miR-124-3p, que inhibe funcionalmente la traducción proteica de calpaína-1, redujo la escisión de p35 en p25 y la apoptosis celular de manera dosis-dependiente en una línea celular de neuronas corticales humanas HCN-2. Además, la inyección intracraneal de virus adenoasociado que expresa miR-124-3p en ratones APP/PS1 redujo significativamente la deposición de A β y mejoró las pruebas de reconocimiento y memoria [123]. Así, nuestros resultados nos permiten proponer una posible vía por la cual la activación de P2X2R incrementa la actividad de calpaína-1 de una forma Ca²⁺-dependiente para formar el complejo p25/Cdk5 que fosforila a STAT3, controlando transcripcionalmente la expresión de BACE1 y el procesamiento amiloidogénico de APP.

Dado que previamente informamos que la exposición de células hipocampales a A β produce un aumento en la expresión de P2X2R [45], y que, además, Liang y colaboradores reportaron que tratamientos con A β en cultivo de neuronas corticales producen un incremento tiempo-dependiente en la expresión de BACE1 [86], es viable considerar la posibilidad de que el péptido A β induzca una sobreexpresión de P2X2R para generar una retroalimentación positiva que aumenta su producción, a través de la vía de señalización calpaína-1/ p25-Cdk5/ pSTAT3/ BACE1. Además de la vía de señalización productora de A β estudiada en esta tesis, Siman y colaboradores informaron que calpaína-1 y APP colocalizan extensamente en un gran número de neuronas distribuidas por todo

el cerebro de la rata, con niveles especialmente altos en la capa neocortical [124]. Estos autores también informaron que APP purificada presentó tres sitios de escisión por calpaína-1, produciendo fragmentos de ~105-85 kDa, 60 kDa y 16 kDa. Siendo este último el fragmento carboxi-terminal de APP que contiene el péptido A β [124]. Mientras que otros autores informaron que calpaína-1 está involucrada en el procesamiento no amiloidogénico de APP, pudiendo actuar como una α -secretasa [125]. Estas observaciones sugieren que calpaína-1 está involucrada en el procesamiento normal o patológico de APP, pudiendo contribuir de forma directa a aumentar los niveles de A β .

Aquí, demostramos por primera vez que tanto P2X2R como calpaína-1 están distribuidos principalmente en membranas presinápticas y extrasinápticas (TxS) de cerebros humanos, lo que podría sugerir un rol regulatorio conjunto de estas proteínas. De acuerdo con estos hallazgos, se informó que P2X2R se encuentra en la región presináptica en cerebro de rata, colocalizando con el marcador presináptico sinapsina-1 [126]. Sin embargo, Kanjhan y col., demostraron una distribución pre y postsináptica de P2X2R en cerebro de rata, informando que su localización en espinas dendríticas es compatible con que el ATP extracelular actúa como un neurotransmisor excitatorio rápido, mientras que la localización presináptica es consistente con la modulación de la liberación de neurotransmisores [54], donde P2X2R se encontraría regulando la transmisión sináptica inhibitoria [126] y excitatoria [127].

Si bien, en cerebro de rata se ha demostrado que, dentro del elemento presináptico, calpaína-1 se localiza entre vesículas sinápticas, la inmunorreactividad de calpaína-1 ha sido fuertemente asociada a densidades postsinápticas y espinas dendríticas [128], lo que está en desacuerdo con nuestra observación de que calpaína-1 se localiza predominantemente en membranas presinápticas y extrasinápticas de cerebros humanos. Por otra parte, el hecho de que calpaína-1 sea más abundante en membranas presinápticas y extrasinápticas que en citosol podría ser cuestionable. Sin embargo, se ha descrito que en células no estimuladas, las calpaínas se distribuyen ampliamente dentro del citoplasma, y que luego de una estimulación por Ca^{2+} podrían translocar a la membrana plasmática [109]. Adicionalmente, se ha informado que calpaína-1 sería más abundante en neuronas [129], al igual que P2X2R [55], mientras que calpaína-2 es prominente en células gliales [129].

Debido a que hay una correlación entre los aumentos de P2X2R y calpaína-1, en TxS y homogenizados totales de corteza prefrontal de pacientes con EA, sugerimos que los aumentos de P2X2R y calpaína-1 observados en homogenizados totales se deben a los aumentos de estas proteínas en TxS, y no en membranas postsinápticas o citosol, donde no observaron variaciones significativas entre pacientes sanos y los distintos estadios Braak de la EA.

Nuestros hallazgos de que calpaína-1 aumenta a partir de los estadios Braak III-IV en la EA concuerda con los resultados obtenidos por Kurbatskaya y col., quienes informaron que la regulación positiva de calpaína-1 se produce en etapas tempranas de la EA (Braak III) y precede a las elevaciones globales en la fosforilación de tau y la pérdida de marcadores postsinápticos [78]. Por otro lado, el aumento en los niveles de P2X2R fue un evento más temprano que calpaína-1, que se observó a partir de los estadios Braak I-II, lo que sugiere que la activación de este receptor estaría contribuyendo en las siguientes etapas de la enfermedad a la actividad regulada al alza de calpaína-1. Sin embargo, Godoy y col., en 2021, observaron aumentos en los niveles de proteína de P2X2R en etapas terminales de la EA, en los estadios Braak V-VI, lo que estaría en discrepancia con nuestros resultados [53]. No obstante, estos autores encontraron niveles elevados de ARNm de P2X2 en etapas más tempranas de la EA [53], lo que podría explicar el aumento de P2X2R como un evento temprano en las muestras humanas utilizadas en este estudio.

Sumado a esto, encontramos niveles elevados de A β en todos los estadios Braak de la EA, sin embargo, estos aumentos fueron más significativos en los estadios Braak III-IV V-VI, lo que coincide con la regulación positiva de calpaína-1. Esta idea se sostiene en el hecho de que previamente se encontraron aumentos simultáneos en los niveles de calpaína-1 y A β ₁₋₄₂ en el estadio III de Braak [78]. Además, considerando que A β aumenta su producción a partir de los estadios

Braak I-II, es factible volver a especular que A β incrementa la expresión de P2X2R, lo que genera una hiperactivación de calpaína-1 y una retroalimentación positiva en la producción del péptido A β .

Dado que las calpaínas se han implicado en varias afecciones patológicas, estas enzimas son atractivos targets terapéuticos para enfermedades humanas, incluidos los trastornos neurodegenerativos. Es por esto que en los últimos años se han diseñado una amplia gama de inhibidores de calpaína de distinta naturaleza química y se ha probado su eficacia en estudios preclínicos [130]. Alicapostat (ABT-957) es un inhibidor de calpaínas que avanzó a ensayos clínicos de fase I y se administró a sujetos sanos y a pacientes con EA leve a moderada, mostrando perfiles farmacocinéticos y de seguridad aceptables, similares a los grupos placebo. Sin embargo, los estudios de farmacodinamia sobre parámetros del sueño sugirieron que las concentraciones en el SNC fueron inadecuadas debido a una mala distribución en el cerebro, y no se continuó con el estudio clínico [131]. A pesar de ello, estos estudios fueron un avance significativo en el campo y podría resultar interesante investigar análogos de Alicapostat vinculados a agentes que promuevan la permeación de la barrera hematoencefálica [130].

Aunque se ha demostrado en diversos estudios el rol de las calpaínas en la neurodegeneración, también se ha planteado la hipótesis de que calpaína-1 y calpaína-2 tienen funciones opuestas en el cerebro. Así, la activación de la

calpaína-1 podría promover la neuroprotección e inducir una cascada de señalización que resulte en cambios en la estructura sináptica y la potenciación a largo plazo, mientras que la activación de calpaína-2 sería neurodegenerativa [132], por lo que no se puede descartar que la regulación al alza de calpaína-1 en la EA sea una respuesta dirigida a controlar el daño celular, como un mecanismo neuroprotector, en lugar de ser parte del mecanismo patogénico [133]. Esto demuestra que a pesar de que las calpaínas se han estudiado durante décadas, todavía existen lagunas sobre la comprensión de su función y se necesitan más estudios, preferiblemente en células humanas, para establecer si la inhibición específica de calpaína-1 podría ser una buena estrategia para el tratamiento de la EA [133].

Para finalizar, el esquema de la Fig. 42 presenta el resumen de los resultados expuestos en esta tesis, que nos permiten concluir que:

- La activación de P2X2R produce un aumento específico en los niveles de calpaína-1, sin alterar los niveles de calpaína-2 y calpastatina.
- La activación de P2X2R incrementa la actividad proteasa de calpaínas.
- El eje de activación P2X2R/calpaína-1 incrementa la producción de péptido beta-amiloide a través de la vía de señalización intracelular: calpaína-1/ p25-Cdk5/ pSTAT3/ BACE1.
- P2X2R y calpaína-1 se localizan principalmente en membranas presinápticas y extrasinápticas de corteza prefrontal humana.
- P2X2R y calpaína-1 se encuentran sobreexpresados en cerebros de ratones APP/PS1 y en cerebros de pacientes con EA.

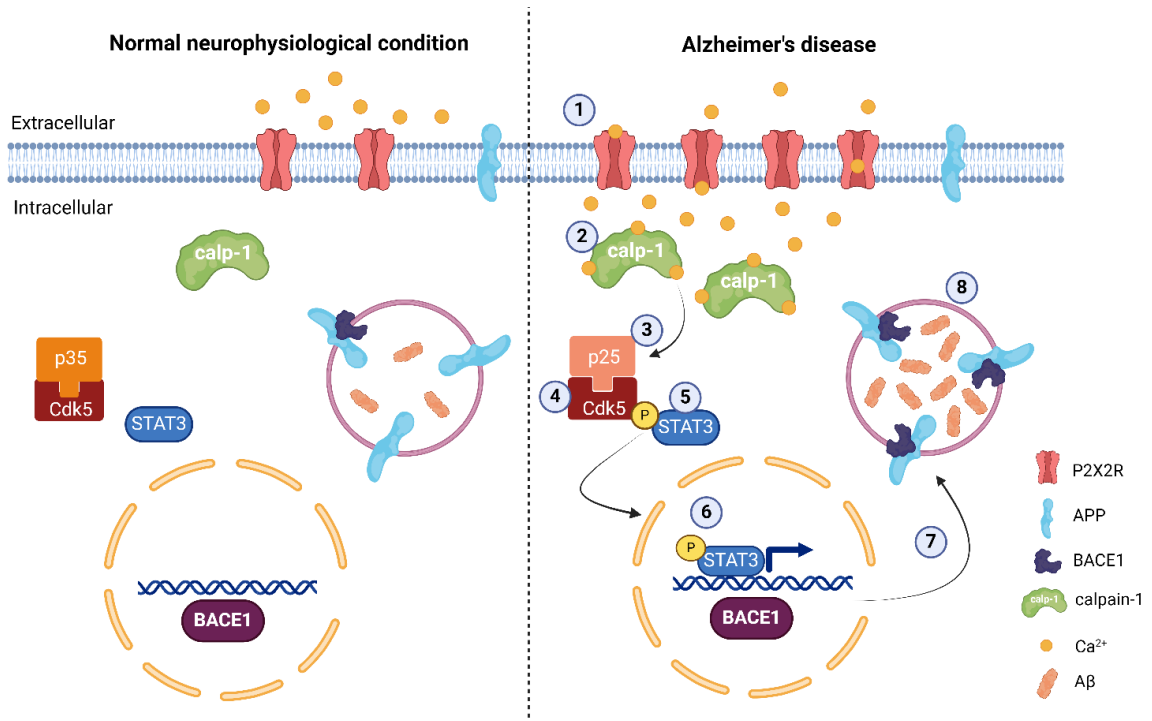


Figura 42. Esquema integrativo de la tesis doctoral.

En la Enfermedad de Alzheimer, la activación del receptor P2X2 (1) produce una activación calcio-dependiente de calpaína-1 (2). Cuando se activa, esta proteasa escinde la proteína p35 (3) para generar el fragmento p25, que activa permanentemente la quinasa dependiente de ciclina Cdk5 (4). A su vez, Cdk5 fosforila el factor de transcripción STAT3 (5), y pSTAT3 va al núcleo para regular al alza la expresión de BACE1 (6). El aumento de la expresión de BACE1 genera un aumento de la proteólisis de APP por la vía amiloidogénica (7) y, en consecuencia, se produce un aumento en la producción del péptido Aβ (8).

VII. CONCLUSIONES

En esta investigación se ha establecido por primera vez el rol del receptor purinérgico P2X2R sobre la desregulación del eje de señalización de calpaínas, dejando en evidencia que la activación P2X2R/calpaína-1 contribuye a un aumento en la producción del péptido A β . Este nuevo e inexplorado mecanismo se conecta con elementos clave en la patogenicidad de la EA, como la dishomeostasis del calcio y la toxicidad amiloide, por lo que nuestros hallazgos respecto al eje P2X2R/calpaína-1 representan una posible diana farmacológica y un punto de partida para investigaciones futuras que contribuyan al desarrollo de herramientas terapéuticas para el tratamiento de la EA.

VIII. REFERENCIAS

1. Zhang, X.-X., et al., *The epidemiology of Alzheimer's disease modifiable risk factors and prevention*. The journal of prevention of Alzheimer's disease, 2021. **8**: p. 313-321.
2. Huang, L.-K., et al., *Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease: a 2020–2023 update*. Journal of Biomedical Science, 2023. **30**(1): p. 83.
3. Scheltens, P., et al., *Alzheimer's disease*. The Lancet, 2016. **388**(10043): p. 505-517.
4. Davis, M., et al., *Estimating Alzheimer's disease progression rates from normal cognition through mild cognitive impairment and stages of dementia*. Current Alzheimer Research, 2018. **15**(8): p. 777-788.
5. Gauthier, S., et al., *Alzheimers Disease International: World Alzheimer Report 2022–Life after diagnosis*. Alzheimer's Dis. Int, 2022: p. 208-211.
6. BETTER, M.A., *alzheimer's disease facts and figures*. Alzheimer's Dement, 2024. **20**: p. 3708-3821.
7. Cummings, J.L., et al., *The costs of developing treatments for Alzheimer's disease: A retrospective exploration*. Alzheimer's & Dementia, 2022. **18**(3): p. 469-477.
8. Chen, X.-Q. and W.C. Mobley, *Alzheimer disease pathogenesis: insights from molecular and cellular biology studies of oligomeric A β and tau species*. Frontiers in Neuroscience, 2019. **13**: p. 659.
9. Sperling, R., E. Mormino, and K. Johnson, *The evolution of preclinical Alzheimer's disease: implications for prevention trials*. Neuron, 2014. **84**(3): p. 608-622.
10. Dorszewska, J., et al., *Molecular basis of familial and sporadic Alzheimer's disease*. Current Alzheimer Research, 2016. **13**(9): p. 952-963.
11. Wiseman, F.K., et al., *Trisomy of human chromosome 21 enhances amyloid- β deposition independently of an extra copy of APP*. Brain, 2018. **141**(8): p. 2457-2474.
12. Corder, E.H., et al., *Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families*. Science, 1993. **261**(5123): p. 921-923.
13. Farrer, L.A., et al., *Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: a meta-analysis*. Jama, 1997. **278**(16): p. 1349-1356.
14. Kim, J., J.M. Basak, and D.M. Holtzman, *The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease*. Neuron, 2009. **63**(3): p. 287-303.
15. Bertram, L., C.M. Lill, and R.E. Tanzi, *The genetics of Alzheimer disease: back to the future*. Neuron, 2010. **68**(2): p. 270-281.
16. Karch, C.M. and A.M. Goate, *Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis*. Biological psychiatry, 2015. **77**(1): p. 43-51.
17. Montine, T.J. and E.B. Larson, *Late-life dementias: does this unyielding global challenge require a broader view?* JAMA: the journal of the American Medical Association, 2009. **302**(23): p. 2593.
18. 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.

19. Braak, H. and E. Braak, *Neuropathological staging of Alzheimer-related changes*. Acta neuropathologica, 1991. **82**(4): p. 239-259.
20. 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.
21. Jack, C.R., et al., *Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade*. The Lancet Neurology, 2010. **9**(1): p. 119-128.
22. Dickson, D.W., *The pathogenesis of senile plaques*. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 1997. **56**(4): p. 321-339.
23. Mirra, S.S., et al., *The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD) Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease*. Neurology, 1991. **41**(4): p. 479-479.
24. 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.
25. Cho, Y., et al., *Physiology and pharmacology of amyloid precursor protein*. Pharmacology & Therapeutics, 2022. **235**: p. 108122.
26. Müller, U.C., T. Deller, and M. Korte, *Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family*. Nature Reviews Neuroscience, 2017. **18**(5): p. 281-298.
27. Morley, J.E. and S.A. Farr, *The role of amyloid-beta in the regulation of memory*. Biochemical pharmacology, 2014. **88**(4): p. 479-485.
28. 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.
29. Sengupta, U., A.N. Nilson, and R. Kayed, *The role of amyloid- β oligomers in toxicity, propagation, and immunotherapy*. EBioMedicine, 2016. **6**: p. 42-49.
30. Jäkel, L., et al., *Reduced influence of apoE on A β 43 aggregation and reduced vascular A β 43 toxicity as compared with A β 40 and A β 42*. Molecular Neurobiology, 2020. **57**: p. 2131-2141.
31. Krafft, G.A. and W.L. Klein, *ADDLs and the signaling web that leads to Alzheimer's disease*. Neuropharmacology, 2010. **59**(4-5): p. 230-242.
32. Lal, R., H. Lin, and A.P. Quist, *Amyloid beta ion channel: 3D structure and relevance to amyloid channel paradigm*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2007. **1768**(8): p. 1966-1975.
33. Kotler, S.A., et al., *High-resolution NMR characterization of low abundance oligomers of amyloid- β without purification*. Scientific reports, 2015. **5**(1): p. 1-12.
34. Haass, C. and D.J. Selkoe, *Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide*. Nature reviews Molecular cell biology, 2007. **8**(2): p. 101-112.
35. Guivernau, B., et al., *Amyloid- β peptide nitrotyrosination stabilizes oligomers and enhances NMDAR-mediated toxicity*. Journal of Neuroscience, 2016. **36**(46): p. 11693-11703.

36. Hermann, D., et al., *Synthetic A β oligomers (A β 1–42 globulomer) modulate presynaptic calcium currents: Prevention of A β -induced synaptic deficits by calcium channel blockers*. European journal of pharmacology, 2013. **702**(1-3): p. 44-55.
37. 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.
38. Esteras, N. and A.Y. Abramov, *Mitochondrial calcium deregulation in the mechanism of beta-amyloid and tau pathology*. Cells, 2020. **9**(9): p. 2135.
39. Sáez-Orellana, F., et al., *ATP leakage induces P2XR activation and contributes to acute synaptic excitotoxicity induced by soluble oligomers of β -amyloid peptide in hippocampal neurons*. Neuropharmacology, 2016. **100**: p. 116-123.
40. Pankratov, Y., et al., *Vesicular release of ATP at central synapses*. Pflügers Archiv, 2006. **452**(5): p. 589-597.
41. Abbracchio, M.P., et al., *Purinergic signalling in the nervous system: an overview*. Trends in neurosciences, 2009. **32**(1): p. 19-29.
42. Zimmermann, H. *Ectonucleotidases in the nervous system*. in *Purinergic Signalling in Neuron–Glia Interactions: Novartis Foundation Symposium 276*. 2006. Wiley Online Library.
43. Saez-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.
44. Khakh, B.S. and R.A. North, *Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS*. Neuron, 2012. **76**(1): p. 51-69.
45. Sáez-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.
46. 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.
47. 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.
48. Martin, E., et al., *New role of P2X7 receptor in an Alzheimer's disease mouse model*. Molecular psychiatry, 2019. **24**(1): p. 108-125.
49. Ni, J., et al., *Silencing of the P2X7 receptor enhances amyloid- β phagocytosis by microglia*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013. **434**(2): p. 363-369.
50. Sanz, J.M., et al., *Activation of microglia by amyloid β requires P2X7 receptor expression*. The Journal of Immunology, 2009. **182**(7): p. 4378-4385.
51. Varma, R., et al., *Amyloid- β induces a caspase-mediated cleavage of P2X4 to promote purinotoxicity*. Neuromolecular medicine, 2009. **11**: p. 63-75.
52. Suurväli, J., et al., *P2X4: A fast and sensitive purinergic receptor*. Biomedical journal, 2017. **40**(5): p. 245-256.

53. Godoy, P.A., et al., *Increased P2_x 2 receptors induced by amyloid- β peptide participates in the neurotoxicity in alzheimer's disease*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021. **142**: p. 111968.
54. 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.
55. 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.
56. North, R.A., *Molecular physiology of P2X receptors*. Physiological reviews, 2002. **82**(4): p. 1013-1067.
57. Mahaman, Y.A.R., et al., *Involvement of calpain in the neuropathogenesis of Alzheimer's disease*. Medicinal research reviews, 2019. **39**(2): p. 608-630.
58. Goll, D.E., et al., *The calpain system*. Physiological reviews, 2003.
59. Sorimachi, H. and K. Suzuki, *The structure of calpain*. The Journal of Biochemistry, 2001. **129**(5): p. 653-664.
60. Tompa, P., et al., *Domain III of calpain is a Ca²⁺-regulated phospholipid-binding domain*. Biochemical and biophysical research communications, 2001. **280**(5): p. 1333-1339.
61. Moldoveanu, T., et al., *A Ca²⁺ switch aligns the active site of calpain*. Cell, 2002. **108**(5): p. 649-660.
62. Kiss, R., et al., *Local structural preferences of calpastatin, the intrinsically unstructured protein inhibitor of calpain*. Biochemistry, 2008. **47**(26): p. 6936-6945.
63. Hanna, R.A., B.E. Garcia-Diaz, and P.L. Davies, *Calpastatin simultaneously binds four calpains with different kinetic constants*. FEBS letters, 2007. **581**(16): p. 2894-2898.
64. Ono, Y. and H. Sorimachi, *Calpains—An elaborate proteolytic system*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2012. **1824**(1): p. 224-236.
65. Averna, M., et al., *Age-dependent degradation of calpastatin in kidney of hypertensive rats*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(42): p. 38426-38432.
66. Benuck, M., et al., *Changes in brain protease activity in aging*. Journal of neurochemistry, 1996. **67**(5): p. 2019-2029.
67. Richard, I., et al., *Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A*. Cell, 1995. **81**(1): p. 27-40.
68. Wang, T., et al., *Calpain-10 drives podocyte apoptosis and renal injury in diabetic nephropathy*. Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy, 2019. **12**: p. 1811.
69. Harris, F., et al., *Calpains and their multiple roles in diabetes mellitus*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2006. **1084**(1): p. 452-480.
70. Mahajan, V.B., et al., *Calpain-5 mutations cause autoimmune uveitis, retinal neovascularization, and photoreceptor degeneration*. 2012.
71. Davis, B.P., et al., *Eosinophilic esophagitis-linked calpain 14 is an IL-13-induced protease that mediates esophageal epithelial barrier impairment*. JCI insight, 2016. **1**(4).
72. Nixon, R.A., *The calpains in aging and aging-related diseases*. Ageing research reviews, 2003. **2**(4): p. 407-418.

73. Jin, S.W., et al., *Polyhexamethylene guanidine phosphate damages tight junctions and the F-actin architecture by activating calpain-1 via the P2RX7/Ca²⁺ signaling pathway*. *Cells*, 2020. **9**(1): p. 59.
74. Välimäki, E., et al., *Calpain activity is essential for ATP-driven unconventional vesicle-mediated protein secretion and inflammasome activation in human macrophages*. *The Journal of Immunology*, 2016. **197**(8): p. 3315-3325.
75. Del Puerto, A., et al., *ATP-P2X7 receptor modulates axon initial segment composition and function in physiological conditions and brain injury*. *Cerebral Cortex*, 2015. **25**(8): p. 2282-2294.
76. Hwang, S.-M., et al., *Role of purinergic receptor in alpha fodrin degradation in Par C5 cells*. *Journal of dental research*, 2009. **88**(10): p. 927-932.
77. Nishida, K., et al., *Mitochondrial dysfunction is involved in P2X7 receptor-mediated neuronal cell death*. *Journal of neurochemistry*, 2012. **122**(6): p. 1118-1128.
78. Kurbatskaya, K., et al., *Upregulation of calpain activity precedes tau phosphorylation and loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease brain*. *Acta neuropathologica communications*, 2016. **4**(1): p. 1-15.
79. Ahmad, F., et al., *Isoform-specific hyperactivation of calpain-2 occurs presymptomatically at the synapse in Alzheimer's disease mice and correlates with memory deficits in human subjects*. *Scientific reports*, 2018. **8**(1): p. 1-16.
80. Rao, M.V., et al., *Marked calpastatin (CAST) depletion in Alzheimer's disease accelerates cytoskeleton disruption and neurodegeneration: neuroprotection by CAST overexpression*. *Journal of Neuroscience*, 2008. **28**(47): p. 12241-12254.
81. Higuchi, M., et al., *Mechanistic involvement of the calpain-calpastatin system in Alzheimer neuropathology*. *The FASEB Journal*, 2012. **26**(3): p. 1204-1217.
82. Koffie, R.M., et al., *Oligomeric amyloid β associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009. **106**(10): p. 4012-4017.
83. Stern, E.A., et al., *Cortical synaptic integration in vivo is disrupted by amyloid- β plaques*. *Journal of Neuroscience*, 2004. **24**(19): p. 4535-4540.
84. Wen, Y., et al., *Transcriptional regulation of β -secretase by p25/cdk5 leads to enhanced amyloidogenic processing*. *Neuron*, 2008. **57**(5): p. 680-690.
85. Liu, L., et al., *Palmitate induces transcriptional regulation of BACE1 and presenilin by STAT3 in neurons mediated by astrocytes*. *Experimental neurology*, 2013. **248**: p. 482-490.
86. Liang, B., et al., *Calpain activation promotes BACE1 expression, amyloid precursor protein processing, and amyloid plaque formation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease*. *Journal of Biological Chemistry*, 2010. **285**(36): p. 27737-27744.
87. Maitra, S. and B. Vincent, *Cdk5-p25 as a key element linking amyloid and tau pathologies in Alzheimer's disease: Mechanisms and possible therapeutic interventions*. *Life Sciences*, 2022. **308**: p. 120986.
88. Fu, A.K., et al., *Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates signal transducer and activator of transcription 3 and regulates its transcriptional activity*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004. **101**(17): p. 6728-6733.

89. Cruz, J.C., et al., *p25/cyclin-dependent kinase 5 induces production and intraneuronal accumulation of amyloid β in vivo*. *Journal of Neuroscience*, 2006. **26**(41): p. 10536-10541.
90. Iijima, K.i., et al., *Neuron-specific phosphorylation of Alzheimer's β -amyloid precursor protein by cyclin-dependent kinase 5*. *Journal of neurochemistry*, 2000. **75**(3): p. 1085-1091.
91. Liu, F., et al., *Regulation of amyloid precursor protein (APP) phosphorylation and processing by p35/Cdk5 and p25/Cdk5*. *FEBS letters*, 2003. **547**(1-3): p. 193-196.
92. Jankowsky, J.L., et al., *Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase*. *Human molecular genetics*, 2004. **13**(2): p. 159-170.
93. 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.
94. Haque, A., et al., *A novel combination approach to effectively reduce inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis models*. *Neurochemistry International*, 2024: p. 105697.
95. Fuentealba, J., et al., *Synaptic failure and adenosine triphosphate imbalance induced by amyloid- β aggregates are prevented by blueberry-enriched polyphenols extract*. *Journal of neuroscience research*, 2011. **89**(9): p. 1499-1508.
96. Fuentealba, J., et al., *Synaptic silencing and plasma membrane dyshomeostasis induced by amyloid- β peptide are prevented by *Aristolochia chilensis* enriched extract*. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2012. **31**(4): p. 879-889.
97. Lemoine, D., et al., *Optical control of an ion channel gate*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013. **110**(51): p. 20813-20818.
98. Miazek, A., et al., *Age-dependent ataxia and neurodegeneration caused by an *all spectrin* mutation with impaired regulation of its calpain sensitivity*. *Scientific Reports*, 2021. **11**(1): p. 7312.
99. Granic, I., et al., *Calpain inhibition prevents amyloid- β -induced neurodegeneration and associated behavioral dysfunction in rats*. *Neuropharmacology*, 2010. **59**(4-5): p. 334-342.
100. Fernández-Pérez, E., et al., *Changes in neuronal excitability and synaptic transmission in nucleus accumbens in a transgenic Alzheimer's disease mouse model*. *Scientific Reports*, 2020. **10**(1): p. 19606.
101. Carrera, I., et al., *Vaccine development to treat Alzheimer's disease neuropathology in APP/PS1 transgenic mice*. *International journal of Alzheimer's disease*, 2012. **2012**(1): p. 376138.
102. Rao, Y.L., et al., *Hippocampus and its involvement in Alzheimer's disease: a review*. *3 Biotech*, 2022. **12**(2): p. 55.
103. Coddou, C., Z. Yan, and S.S. Stojilkovic, *Role of domain calcium in purinergic P2X2 receptor channel desensitization*. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2015. **308**(9): p. C729-C736.

104. Deshpande, R.V., et al., *Calpain Expression in Lymphoid Cells: INCREASED mRNA AND PROTEIN LEVELS AFTER CELL ACTIVATION (*)*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(6): p. 2497-2505.
105. Zhou, J., et al., *Downregulation of Calpain 1 Causes Neurotoxicity and Apoptosis in Primary Neurons Induced by A β 25-35*. Nanoscience and Nanotechnology Letters, 2019. **11**(5): p. 696-703.
106. Yamada, K.H., et al., *Targeted gene inactivation of calpain-1 suppresses cortical degeneration due to traumatic brain injury and neuronal apoptosis induced by oxidative stress*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(16): p. 13182-13193.
107. Yin, Y., et al., *Accumulation of human full-length tau induces degradation of nicotinic acetylcholine receptor α 4 via activating calpain-2*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 27283.
108. Li, M., et al., *Calpain Inhibitor Calpeptin Improves Alzheimer's Disease-Like Cognitive Impairments and Pathologies in a Diabetes Mellitus Rat Model*. Neurotoxicity Research, 2022. **40**(5): p. 1248-1260.
109. Garcia, M., V. Bondada, and J.W. Geddes, *Mitochondrial localization of μ -calpain*. Biochemical and biophysical research communications, 2005. **338**(2): p. 1241-1247.
110. Mellgren, R.L. and Q. Lu, *Selective nuclear transport of μ -calpain*. Biochemical and biophysical research communications, 1994. **204**(2): p. 544-550.
111. Leloup, L., et al., *m-Calpain activation is regulated by its membrane localization and by its binding to phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(43): p. 33549-33566.
112. Shao, H., et al., *Spatial localization of m-calpain to the plasma membrane by phosphoinositide biphosphate binding during epidermal growth factor receptor-mediated activation*. Molecular and cellular biology, 2006. **26**(14): p. 5481-5496.
113. Laske, C., et al., *Increased cerebrospinal fluid calpain activity and microparticle levels in Alzheimer's disease*. Alzheimer's & Dementia, 2015. **11**(5): p. 465-474.
114. Glading, A., et al., *Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation*. Molecular and cellular biology, 2004.
115. Zadrán, S., et al., *Brain-derived neurotrophic factor and epidermal growth factor activate neuronal m-calpain via mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation*. Journal of Neuroscience, 2010. **30**(3): p. 1086-1095.
116. Du, M., et al., *Phosphorylation regulated by protein kinase A and alkaline phosphatase play positive roles in μ -calpain activity*. Food chemistry, 2018. **252**: p. 33-39.
117. Shiraha, H., et al., *Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain*. Molecular and cellular biology, 2002.
118. Nimrich, V., et al., *Inhibition of calpain prevents NMDA-induced cell death and β -amyloid-induced synaptic dysfunction in hippocampal slice cultures*. British journal of pharmacology, 2010. **159**(7): p. 1523-1531.

119. Kelly, B.L. and A. Ferreira, *β -amyloid-induced dynamin 1 degradation is mediated by N-methyl-D-aspartate receptors in hippocampal neurons*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(38): p. 28079-28089.
120. Companys-Aleman, J., et al., *NMDA receptor antagonists reduce amyloid- β deposition by modulating calpain-1 signaling and autophagy, rescuing cognitive impairment in 5XFAD mice*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2022. **79**(8): p. 408.
121. King, J.R. and N. Kabbani, *Alpha 7 nicotinic receptors attenuate neurite development through calcium activation of calpain at the growth cone*. PLoS One, 2018. **13**(5): p. e0197247.
122. Briggs, R., S.P. Kennelly, and D. O'Neill, *Drug treatments in Alzheimer's disease*. Clinical medicine, 2016. **16**(3): p. 247.
123. Zhou, Y., et al., *Role of post-transcriptional control of calpain by miR-124-3p in the development of Alzheimer's disease*. Journal of Alzheimer's Disease, 2019. **67**(2): p. 571-581.
124. Siman, R., J.P. Card, and L.G. Davis, *Proteolytic processing of beta-amyloid precursor by calpain I*. Journal of Neuroscience, 1990. **10**(7): p. 2400-2411.
125. Chen, M. and H.L. Fernandez, *μ -Calpain is functionally required for α -processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein*. Biochemical and biophysical research communications, 2005. **330**(3): p. 714-721.
126. Bhattacharya, A., et al., *Potentiation of inhibitory synaptic transmission by extracellular ATP in rat suprachiasmatic nuclei*. Journal of Neuroscience, 2013. **33**(18): p. 8035-8044.
127. Khakh, B.S., et al., *ATP modulation of excitatory synapses onto interneurons*. Journal of Neuroscience, 2003. **23**(19): p. 7426-7437.
128. Perlmutter, L.S., et al., *The ultrastructural localization of calcium-activated protease "calpain" in rat brain*. Synapse, 1988. **2**(1): p. 79-88.
129. Hamakubo, T., et al., *Distribution of calpains I and II in rat brain*. Journal of Neuroscience, 1986. **6**(11): p. 3103-3111.
130. Donkor, I.O., *An update on the therapeutic potential of calpain inhibitors: a patent review*. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2020. **30**(9): p. 659-675.
131. Lon, H.K., et al., *Pharmacokinetics, safety, tolerability, and pharmacodynamics of alicapostat, a selective inhibitor of human calpains 1 and 2 for the treatment of Alzheimer disease: an overview of phase 1 studies*. Clinical Pharmacology in Drug Development, 2019. **8**(3): p. 290-303.
132. Baudry, M. and X. Bi, *Calpain-1 and calpain-2: the yin and yang of synaptic plasticity and neurodegeneration*. Trends in neurosciences, 2016. **39**(4): p. 235-245.
133. Gan-Or, Z. and G.A. Rouleau, *Calpain 1 in neurodegeneration: a therapeutic target?* The Lancet Neurology, 2016. **15**(11): p. 1118.