



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**PAPEL DE TRPV1 COMO REGULADOR DE LA INFLAMACIÓN Y
HOMEOSTASIS DE CALCIO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

PRESENTA:

Carlos Humberto Martínez Álvarez

TUTOR PRINCIPAL

**Dra. Leonor Pérez Martínez
Instituto de Biotecnología, UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Magdalena Guerra Crespo
Instituto de Fisiología Celular, UNAM**

**Tamara Luti Rosenbaum Emir
Instituto de Fisiología Celular, UNAM**

Cuernavaca, Morelos. Junio, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

A mi mamá y mi familia, a quienes debo todo.

Agradecimientos

A la Dra. Leonor Pérez Martínez por su confianza, ánimo, y dirección en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Gustavo Pedraza Alva por sus consejos y a todo el laboratorio de Neuroinmunobiología. A Elisa Medrano Jiménez por su asistencia con los protocolos de cultivo. A Eladio Cortes Flores, Bolívar Jesús Arcos Encarnación y Dr. Tomás Villaseñor, por su apoyo con ratones y tejidos. A Sol Díaz de León y el Dr. David Valle por asistencia técnica en experimentos de RT-qPCR

Al comité tutorial, la Dra. Magdalena Guerra Crespo y la Dra. Tamara Rosenbaum Emir, por sus valiosas aportaciones al trabajo. A todo el jurado por sus enriquecedores comentarios sobre este trabajo.

Al personal del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA), y en particular al Dr. Arturo Pimentel por su asistencia técnica.

A Antonio Bolaños y Gloria Villa por la atención en la unidad de docencia.

A mis amistades dentro y fuera del IBT. A Wendy por su constancia, compañía, y cariño, tanto en los momentos alegres como los difíciles.

Al IBT, la UNAM, y la UAEMex.

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Neuroinmunobiología del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la tutoría de la Dra. Leonor Pérez Martínez. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la beca de maestría no.720611 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT. Este proyecto se realizó gracias al financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT IFC 2016-2282) y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN213119, IN213316, IN211719).

Contenidos

Abreviaciones	2
Resumen	3
Introducción y antecedentes	5
Envejecimiento y la salud	5
Enfermedad de Alzheimer	5
Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer	5
Neuroinflamación y Microglía	7
El componente inflamatorio de la enfermedad de Alzheimer	9
Canales iónicos en la regulación de la actividad microglial	10
TRPV1 en el sistema nervioso central	11
TRPV1 en la enfermedad de Alzheimer	13
Hipótesis	15
Objetivos	15
General	15
Particulares	15
Metodología	16
Modelos animales	16
Determinación de genotipo	16
Modelos in-vitro	17
Cultivo mixto de células gliales de neonato	17
Aislamiento de microglía a partir de cultivos gliales mixtos	17
Western blot	18
Extracción de RNA y RT-qPCR	18
Microscopía	19
Tinción de Rojo Oleoso	19
Tinción de BODIPY	20
Inmunofluorescencia	20
Imagenología de Ca ²⁺	20
Análisis estadístico	21
Recursos clave	22
Resultados y Discusión	23
TRPV1 en el cerebro murino	23
TRPV1 en la microglía	28
Regulación de TRPV1 por KChIP3	32
TRPV1 en el contexto de la enfermedad de Alzheimer	40
Consideraciones sobre el anticuerpo Acc030	41
Conclusiones	44
Perspectivas	45
Referencias	46
Anexo 1: Segmentación de cuadrantes conteniendo células (CCC)	58
Anexo 2: Segmentación de cuadrantes reactivos a capsaicina y ionomicina	62

Abreviaciones

Termino en español	Abreviación	Termino en inglés
Sistema nervioso central	CNS	Central nervous system
Enfermedad de Alzheimer	EA	Alzheimer's disease
Enfermedad de Alzheimer familiar	FAD	Familial Alzheimer's disease
Enfermedad de Alzheimer de aparición temprana	EOAD	Early onset Alzheimer's disease
Enfermedad de Alzheimer de aparición tardía	LOAD	Late onset Alzheimer's disease
Reacción en cadena de polimerasa	PCR	Polymerase chain reaction
Patrones moleculares asociados a patógenos	PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
Patrones moleculares asociados a daño	DAMPs	Damage-associated molecular patterns
Receptores de potencial transitorio	TRPs	Transient receptor potential
Ganglio trigeminal	TG	Tigeminal ganglia
Ganglio de la raíz dorsal	DRG	Dorsal root ganglia
Lipopolisacárido	LPS	Lipopolysaccharide
Sistema nervioso periférico	PNS	Peripheral nervous system
Estudio de asociación a escala genómica	GWAS	Genome-wide association study

Resumen

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa de alta incidencia entre la población de adultos mayores y por lo tanto representa un importante problema de salud pública a nivel global. Las lesiones histopatológicas características de la enfermedad de Alzheimer, ovillos neurofibrilares y placas neuríticas, se asocian con pérdida neuronal y con el establecimiento de un estado inflamatorio sostenido en el cerebro. Las células de la microglía son reguladores centrales de la respuesta inflamatoria en el sistema nervioso; en el estado basal vigilan constantemente el parénquima cerebral identificando señales de daño o patógenos, desencadenando una respuesta a fin de contener y reparar el daño al tejido. En la enfermedad de Alzheimer existen alteraciones particulares al fenotipo microglial que resultan en una incapacidad fisiológica de contender con la progresión de la enfermedad. Adicionalmente, se establece un fenotipo proinflamatorio sostenido que contribuye a la neurodegeneración y la deposición de placa amiloide. Consistente con esto, ratones suprimidos de señales proinflamatorias o administrados con agentes antiinflamatorios, son resistentes al desarrollo del déficit cognitivo en modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer.

Parte de las funciones de la microglía en condiciones homeostáticas y de enfermedad dependen de mecanismos mediados por Ca^{2+} . Estas células expresan canales permeables a Ca^{2+} en endomembranas y la membrana plasmática; tanto en el cerebro como en condiciones de cultivo *in vitro*, presentan eventos transitorios de Ca^{2+} de forma espontánea.

El canal catiónico TRPV1 es un receptor polimodal implicado en procesos sensoriales y cuya regulación en el contexto de una respuesta inflamatoria ha sido extensamente implicado en el desarrollo de padecimientos de dolor en el sistema nervioso periférico. TRPV1 facilita la entrada de Ca^{2+} , promoviendo una respuesta nerviosa a través de vías de señalización dependientes de Ca^{2+} . Aunque TRPV1 se expresa ampliamente en el sistema nervioso central, la contribución de la inflamación a la regulación funcional del canal en este contexto no ha sido extensamente estudiada. El modelo murino *knockout* para TRPV1 es resistente al desarrollo de dolor en un contexto inflamatorio, y en el cerebro la microglía presenta un fenotipo anti-inflamatorio. Recientemente se ha reportado a KChIP3, una proteína sensora de Ca^{2+} y modulador de la actividad de canales de potasio de la familia Kv4 y presenilinas, como un regulador de TRPV1. Estudios recientes en nuestro laboratorio indican que el fenotipo del ratón *knockout* de KChIP3 muestra importantes similitudes con el fenotipo del ratón *knockout* para TRPV1 reportado en la literatura. En particular, la ausencia de TRPV1 o de KChIP3 en modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer conlleva a un mejor desempeño en pruebas cognitivas. Esto sugiere que TRPV1 y KChIP3 participan en un mecanismo fisiopatológico similar en el contexto neuroinflamatorio de la enfermedad de Alzheimer y relacionado con la homeostasis intracelular de Ca^{2+} en la microglía.

Por lo anterior, en el presente trabajo se estudió la contribución de TRPV1 sobre los fenómenos neuroinflamatorios asociados a la enfermedad de Alzheimer, así como la relevancia de la interacción entre KChIP3 y TRPV1 en la regulación del fenotipo microglial. Para evaluar la expresión y distribución de TRPV1 en el sistema nervioso central se realizaron ensayos de RT-PCR y de *western blot*. Los datos preliminares obtenidos sugieren que TRPV1 se expresa en niveles bajos en distintas regiones del sistema nervioso central.

La microglía juega un papel central en procesos neuroinflamatorios. Además, reportes previos indican la expresión microglial de TRPV1. Por tanto, evaluamos la expresión de TRPV1 en cultivos primarios enriquecidos en microglía; encontramos niveles bajos del transcrito por ensayos de RT-PCR; sin embargo, la proteína de TRPV1 se detectó únicamente cuando las células fueron sometidas a un esquema de activación inflamatoria con PMA, lo que sugiere una asociación entre la expresión de TRPV1 y el estado de activación microglial.

Dado que las consecuencias fisiológicas de TRPV1 dependen del ensamblado de un canal funcional sobre la membrana, se realizaron experimentos de imagenología de Ca^{2+} con Fluo-4 para identificar

incrementos de Ca^{2+} intracelular en cultivos microgliales en respuesta al agonista canónico del canal de TRPV1, capsaicina. Los datos preliminares obtenidos sugieren la presencia de una subpoblación muy pequeña de células TRPV1⁺ en cultivo. Lo anterior es consistente con los niveles bajos de expresión encontrados tanto a nivel del tejido nervioso como en cultivo primario de microglía. Interesantemente, cuando las células son pre-tratadas con LPS o PMA, se observa una desregulación de los eventos espontáneos de Ca^{2+} , lo que sugiere alteraciones a nivel de pozas intracelulares de Ca^{2+} . Estos resultados son consistentes con estudios previos que muestran que la microglía en condiciones inflamatorias y en cercana asociación con placas seniles en la enfermedad de Alzheimer presentan alteraciones en la dinámica de flujos de Ca^{2+} . El consenso en la literatura indica que en condiciones inflamatorias se incrementa la frecuencia de eventos espontáneos de Ca^{2+} microgliales; sin embargo, diferencias experimentales pueden ser responsables del dato contrario obtenido en nuestros resultados. Considerando la relevancia neuroinflamatoria y la asociación funcional reportadas para TRPV1 y KCHIP3, se realizaron ensayos tipo *western blot* a partir de tejidos de los modelos 5xFAD (modelo transgénico de la enfermedad de Alzheimer) y KCHIP3^{knockout}. Observamos niveles ligeramente reducidos de TRPV1 en el ratón KCHIP3^{knockout}, con una dinámica contraria en el KCHIP3^{knockout};5xFAD.

Conclusiones: Los estudios publicados difieren considerablemente respecto en los patrones de inmunorreactividad y detección del transcrito de TRPV1. En conjunto los datos aquí mostrados aportan evidencias a la controversia que existe sobre la expresión y relevancia fisiológica de TRPV1 en el sistema nervioso central y, en particular en la microglía. Aunque preliminares, estos resultados son consistentes con niveles bajos de expresión de TRPV1 en el sistema nervioso central y la microglía. Los niveles bajos de TRPV1 parecen resultar de la expresión del canal solamente sobre una población minoritaria de células de la microglía. Sin embargo, esto no descarta la relevancia fisiológica de esta subpoblación pequeña de células ni la contribución de TRPV1 a la regulación neuroinflamatoria en el contexto de la enfermedad de Alzheimer. También surge la posibilidad de que el fenotipo antiinflamatorio y neuroprotector asociado con la ausencia de TRPV1 en el ratón *knockout* resulte, además de los escasos elementos del sistema nervioso central con expresión de este canal, de células periféricas donde la expresión de TRPV1 es más prominente. El caso de TRPV1 podría ejemplificar la importancia de proteínas con bajos niveles para definir subpoblaciones biológicamente relevantes. Las tecnologías emergentes de análisis a nivel de célula única han permitido elucidar con gran detalle las poblaciones microgliales definidas por genes altamente expresados, sin embargo, la relevancia de genes con baja expresión para definir subpoblaciones o matizar subpoblaciones predefinidas permanece como una pregunta abierta con importantes retos técnicos.

Introducción y antecedentes

Envejecimiento y la salud

La combinación de los avances tecnológicos y cambios al estilo de vida, han resultado en un dramático incremento en la expectativa de vida. En países industrializados y en vías de desarrollo se espera que la proporción de la población mayor a 65 años de edad se incremente durante los siguientes 20 años, siguiendo la tendencia de la última década (Jaul y Barron, 2017). Estos cambios en la expectativa y calidad de vida asequible en edades avanzadas han despertado un gran interés para el entendimiento de los mecanismos biológicos involucrados en el envejecimiento y enfermedades relacionadas a este proceso.

Actualmente muchas de las enfermedades de mayor prevalencia en la población comparten una correlación positiva entre su incidencia y la edad. Por lo tanto, resulta clara la relación entre el envejecimiento y la mayor vulnerabilidad para el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas, o incluso la conceptualización del envejecimiento como una patología crónica *per se*. Las enfermedades crónicas, sin embargo, no son una consecuencia inescapable del envejecimiento (Fulop et al., 2019), de forma que los mecanismos fisiológicos del envejecimiento representan factores de riesgo que podrían ser blancos de modulación para el control de patologías diversas. El daño oxidativo, la senescencia celular, y cambios en la expresión génica, han sido propuestos como mecanismos acumulativos subyacentes al proceso de envejecimiento en el organismo y que contribuyen al desarrollo de enfermedades crónicas (Chandran et al., 2019). Todos estos mecanismos impactan sobre los procesos de regulación del sistema inmune, que a su vez se han implicado en múltiples enfermedades de carácter crónico-degenerativo (Franceschi y Campisi, 2014).

Enfermedad de Alzheimer

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad crónico-neurodegenerativa que afecta al sistema nervioso central (CNS) y resulta de gran importancia desde una perspectiva de la salud pública por su elevada prevalencia en la población (Reitz y Mayeux, 2014). Los pacientes afectados típicamente sufren una pérdida progresiva de sus capacidades cognitivas y de memoria, pérdida de capacidades visuoespaciales, y trastornos del comportamiento (Cummings y Zarit, 1987; Erkinen et al., 2017). Esta sintomatología, en conjunto, contribuye a la pérdida de las capacidades cognitivas del paciente, de forma que se ve drásticamente afectada su calidad de vida así como la de sus familiares.

La creciente incidencia de la EA y los costos implicados en su atención por los servicios de salud resaltan la importancia de esta enfermedad como un problema prioritario en materia de salud pública. El Alzheimer es la causa más común de demencia senil en la población, con el 70% de los casos de demencia estando asociados con esta patología, y proyecciones indican que existen actualmente alrededor de 50 millones de personas afectadas por la EA (Christina Patterson, 2018).

Actualmente no existe una cura para la EA, los únicos medicamentos apropiados para la enfermedad están solo enfocados en la atenuación de la sintomatología con fines paliativos, y múltiples estrategias terapéuticas diseñadas para contender con la enfermedad han fracasado en ensayos preclínicos y clínicos (Graham et al., 2017). Por lo tanto, el elucidar los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a la enfermedad, la caracterización del desarrollo de la patología, la identificación de factores de riesgo y etiológicos, y el desarrollo de estrategias novedosas para el tratamiento de la enfermedad, son áreas de interés prioritario en el campo biomédico.

Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer

Los trabajos de Alois Alzheimer produjeron la primera descripción clínica-patológica de una paciente afectada por demencia. El análisis post-mortem del cerebro de esta paciente reveló atrofia generalizada en el

cerebro, así como la presencia de agregados proteicos visualizables mediante microscopía (Stelzmann et al., 1995).

Actualmente la descripción histopatológica de la enfermedad se basa en la presencia y abundancia de agregados extracelulares de péptido β -amiloide (βA) en el parénquima cerebral (placa amiloide), así como de agregados intracelulares de proteína Tau hiperfosforilada en el interior de las neuronas (ovillos neurofibrilares o NFTs) (Braak y Braak, 1991; Serrano-Pozo et al., 2011). Bioquímicamente, también se observan niveles elevados de péptido βA y proteína Tau fosforilada, lo que sugiere que la acumulación y agregación de estos productos en el cerebro constituyen eventos importantes para el desarrollo de la enfermedad.

El modelo de la cascada amiloide. El análisis de la ruta bioquímica para la generación del péptido βA reveló que éste es generado mediante procesamiento proteolítico “amiloidogénico” de la proteína precursora amiloide (amyloid precursor protein, APP). Inicialmente la APP es escindida por la enzima β -secretasa dando lugar a un péptido soluble ($APP\beta$) en el exterior de la célula y el fragmento C99 anclado a la membrana; Este producto sirve a su vez como sustrato del complejo enzimático de la γ -secretasa dando lugar al péptido βA (Graham et al., 2017). El péptido βA es propenso a la formación de oligómeros solubles y agregación en placas insolubles que se depositan en el parénquima cerebral, estas formas pueden verse acumuladas con la edad y aparentemente se asocian con cierta toxicidad que puede contribuir al deterioro funcional (G. Bitan et al., 2003; Gal Bitan et al., 2003; Lesne et al., 2013).

Casos raros de la EA, ocurren en edades tempranas (EOAD) y habitualmente siguen un patrón de herencia autosómico dominante (enfermedad de Alzheimer familiar, FAD). Estas formas de la enfermedad son directamente atribuibles a mutaciones genéticas que resultan en un mayor procesamiento amiloidogénico de la APP y generación de péptido βA , esta evidencia implica que, al menos para estos casos, la desregulación de la biogénesis de péptido βA es suficiente para producir una patología neurodegenerativa que afecta de manera adversa las capacidades cognitivas de los sujetos afectados (Shea et al., 2016).

En modelos animales murinos la inserción de las secuencias humanas que codifican las proteínas mutantes asociadas con FAD (APP, presenilina 1, y presenilina 2) resulta en un cuadro neuropatológico progresivo que recapitula algunos de los elementos clave de la EA como son la deposición exacerbada de péptido βA en placa amiloide; el déficit en la capacidad de aprendizaje y memoria de los animales, en pruebas conductuales de aprendizaje y memoria como el laberinto acuático de Morris y la prueba de reconocimiento de objetos novedosos (Hall y Roberson, 2012; Neha et al., 2014; Oakley et al., 2006).

De acuerdo con el modelo de la cascada amiloide, la acumulación de péptido βA resultante de la desregulación de la biogénesis de la proteína APP, así como de las funciones de los complejos β y γ secretasa resultan en la oligomerización del péptido y su agregación en formas insolubles con efectos neurotóxicos. Este insulto inicial desencadena consecuentemente otros fenómenos incluyendo la hiperfosforilación de Tau, la formación de NFTs, la muerte neuronal y en general la disfunción del CNS (Heppner et al., 2015; Karran et al., 2011). El modelo de la cascada amiloide coloca la generación exacerbada de péptido βA como un factor crucial para dar inicio a los eventos fisiopatológicos río abajo que producen la gama completa de consecuencias funcionales y manifestaciones clínicas de la enfermedad (Karran et al., 2011).

Aunque la genética de la forma familiar de la EA es consistente con el modelo de la cascada amiloide o una variante de este, esto no es necesariamente generalizable al análisis de la forma esporádica de la enfermedad que representa la gran mayoría de los casos. Actualmente múltiples líneas de evidencia apuntan hacia un modelo fisiopatológico y etiológico de muy elevada complejidad para la forma esporádica de la EA, el cual seguirá evolucionando en años próximos. Sin embargo, la histopatología de la EA, donde la acumulación de grandes cantidades de péptido βA y la deposición de placa amiloide son elementos característicos, sugiere un papel relevante del péptido βA y de los mecanismos de amiloidogénesis dentro de la fisiopatología de la enfermedad y la progresión del cuadro clínico. Lo anterior resalta

la relevancia del uso de modelos animales basados en la genética de la forma familiar de la EA, en la investigación de los mecanismos asociados con la EA.

Modelos etiológicos complementarios y alternativos Resulta importante destacar que los casos de FAD son raros, representando sólo el 1% de los pacientes diagnosticados con la EA, por lo que para la gran mayoría de los casos la etiología de la enfermedad se encuentra indeterminada y probablemente resulta de una compleja interacción entre factores genéticos y variables relacionadas con el ambiente y estilo de vida de las personas (Reitz y Mayeux, 2014).

La abundancia de casos en los que cantidades considerables de deposición de placa amiloide pueden ser detectadas, ya sea por detección *in-vivo* mediante PET (Johnson et al., 2012), o el análisis histológico *post-mortem* en pacientes cognitivamente intactos, así como lo aprendido por ensayos clínicos en los que la eliminación farmacológica de péptido amiloide es insuficiente para recuperar las capacidades cognitivas en pacientes con demencia, y otras líneas de evidencia ampliamente discutidas en la literatura (Castellani y Smith, 2011), sugieren fuertemente que la deposición del péptido amiloide, por sí solo, es insuficiente para explicar el cuadro fisiopatológico de la EA en su totalidad, e implica que el modelo de la cascada amiloide está limitado en cuanto a su alcance para la descripción de la EA tal como afecta a la gran mayoría de los pacientes. Distintos modelos han sido propuestos como alternativos o complementarios a la cascada amiloide. Entre estos se incluyen modelos basados en la desregulación metabólica con déficit glucolítico en el CNS (Grieb, 2016), modelos relacionados a la presencia de agentes infecciosos (Dominy et al., 2019) y modelos relacionados a la desregulación de la homeostasis de Ca^{2+} (Supnet y Bezprozvanny, 2010), entre otros.

En resumen, existen numerosas líneas de evidencia que sugieren la participación de múltiples y diversos mecanismos biológicos que contribuyen a la fisiopatología y etiología de la EA. Aunque el desarrollo de un modelo etiológico completo permanece como una pregunta abierta a la comunidad científica, la evidencia existente fuertemente apunta a la contribución simultánea de múltiples mecanismos tanto sistémicos como específicos del CNS y su progresiva desregulación con la edad; todo esto sumado a la presencia de factores genéticos de riesgo pudiera ayudar a explicar forma aparentemente esporádica en que aparecen los signos de la EA.

La multiplicidad de factores de riesgo mencionados anteriormente comparten una asociación importante con mecanismos inflamatorios, tanto a nivel sistémico como específicamente en el CNS. Esto plantea la hipótesis de que los procesos inflamatorios exacerbados representan un componente importante en los procesos fisiopatológicos involucrados en el desarrollo de la EA y sugiere una asociación etiológica (Heneka et al., 2015).

Neuroinflamación y Microglía

La barrera hematoencefálica mantiene al parénquima cerebral mayormente aislado de los elementos celulares y humorales del sistema inmune que actúan en la periferia, de esto se deriva la descripción del CNS como un sitio de “privilegio inmunitario”, es decir se trata de un tejido carente de una respuesta inmune “típica” (Muldoon et al., 2013).

En la actualidad existe una amplia descripción de los mecanismos inmunológicos particulares del CNS (Carson et al., 2006). Estos mecanismos permiten una adecuada respuesta a daño y control de infecciones, y dependen tanto de contribuciones reguladas de elementos inmunes periféricos como de funciones propias de CNS. Tanto las neuronas como distintos tipos celulares gliales son capaces de ejercer acciones de tipo inmune, sensando la presencia de DAMPs y PAMPs en el CNS, y produciendo señales inflamatorias en respuesta (L. Tian et al., 2012). La actividad neuronal también tiene consecuencias en la activación inmune en el sistema nervioso (inflamación neurogénica) a través de la liberación de neurotransmisores (Talbot et al., 2016; Xanthos y Sandkühler, 2014). Esto implica que los fenómenos de

inflamación en el CNS, más allá de una aberración, constituyen un elemento integral de la fisiología del organismo.

La microglía cumple un papel inmunológico importante en el cerebro, fungiendo el papel de macrófagos residentes del CNS (Kettenmann et al., 2011). Estas células efectúan papeles de vigilancia inmunológica (Nayak et al., 2014), fagocitosis (Janda et al., 2018), y en general regulación de la respuesta inflamatoria. Estas células ejercen también un papel importante para el desarrollo del sistema nervioso y en la regulación de funciones neuronales mediante la eliminación selectiva y actividad-dependiente de las espinas dendríticas y sinapsis, así como de células apoptóticas (Brown y Neher, 2014; Cowan y Petri, 2018), y la modulación de la excitabilidad neuronal (Klappal et al., 2016).

Dado el amplio panorama de receptores de DAMPs y PAMPs expresados por la microglía (Hickman et al., 2013), estas células son altamente eficientes en la respuesta a insultos, incluyendo daño tisular agudo, isquemia, e infección. En el estado en reposo, las células presentan una morfología altamente arborizada, con procesos alargados que abarcan una región discreta del parénquima cerebral y ejecutan un papel de vigilancia; La activación microglial propicia una morfología amebode carente de procesos finos y alargados, también se estimula la migración direccional, la expresión de mediadores inflamatorios, la fagocitosis y la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Kettenmann et al., 2011).

Tradicionalmente la descripción del fenotipo microglial se ha dado, por analogía con los macrófagos en la periferia, como la distinción dicotómica entre los estados activados M1 (o activación clásica), asociado con funciones proinflamatorias relacionadas a la respuesta inmune elicitada por la detección de DAMPs o PAMPs, y el estado M2 (o alternativamente activado), relacionado con la producción de citocinas antiinflamatorias relacionadas con la regulación negativa de la respuesta inmune y el mantenimiento de la homeostasis (Michell-Robinson et al., 2015).

Un gran volumen de trabajo reciente ha revelado una mayor complejidad en el fenotipo microglial, agregado profundidad al entendimiento de estas células, y revelando la limitada utilidad del modelo M1/M2 (Ransohoff, 2016). El consenso actual en el campo es que el panorama de posibles fenotipos microgliales es amplio e incluye subtipos comunes encontrados en condiciones de homeostasis, así como fenotipos particulares asociados con patologías que afectan al CNS (H. E. Hirbec et al., 2017). El paradigma emergente sobre las células de la microglía es el de un tipo celular altamente dinámico y dependiente del microambiente en el que las células se encuentran insertadas (Gosselin et al., 2017).

Las células microgliales *in vivo* dependen de la constante señalización en su microambiente dentro del CNS. El bloqueo de la señalización por CSF-1 es suficiente para mermar la población microglial en el cerebro (Elmore et al., 2014; Spangenberg et al., 2019), y la señalización a través de TGF- β también ha sido caracterizada como indispensable en el desarrollo de la microglía y la modulación de su actividad *in vivo* (Butovsky et al., 2014; De Simone et al., 2007; Utz et al., 2020). En condiciones *in vitro* en ausencia de suero, la presencia de estos dos factores además de colesterol es indispensable para la supervivencia de cultivos microgliales primarios de alta pureza, mientras que en el cerebro o en condiciones de cultivo glial mixto la astrogliosis es capaz de proporcionar estos componentes al medio (Bohlen et al., 2017). Mientras que macrófagos insertados al parénquima cerebral adquieren un fenotipo más próximo al microglial, estas células no presentan firma transcriptómica que caracteriza a la microglía *in-situ*, destacando la importancia conjunta de la ontogenia de las células y de la señalización contextual para el establecimiento del fenotipo (Hinze y Stolzing, 2011).

En los últimos años, múltiples trabajos basados en el uso de técnicas de transcriptómica con resolución de célula única realizados sobre el cerebro, y en particular sobre la microglía proveen de una visión más clara sobre la alta diversidad transcriptómica encontrada en la población microglial y el carácter dinámico de este perfil. Entre los factores que contribuyen a la definición del fenotipo microglial se incluyen el microbioma (Thion et al., 2018), el sexo Guneykaya et al. (2018), edad (Hammond et al., 2019), región del cerebro (Van Hove et al., 2019), así como el contexto fisiopatológico (Farhadian et al., 2018; H. Hirbec et al., 2018; Keren-Shaul et al., 2017; Tay et al., 2018). De estos trabajos también se destaca la importancia de subconjuntos poco abundantes de células microgliales que surgen en contextos fisiopatológicos

específicos con un fuerte impacto sobre las funciones del CNS.

Aunque las células de la microglía son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis en el sistema nervioso; en distintos contextos, incluyendo desórdenes neurodegenerativos, desórdenes neuropsiquiátricos, y lesiones traumáticas, se han caracterizado efectos detrimentales que resultan de la desregulación de las funciones microgliales (Colonna y Butovsky, 2017; H. E. Hirbec et al., 2017; Prinz y Priller, 2014). Esta característica de “arma de doble filo” de la microglía resalta la importancia de la comprensión de las señales y mecanismos involucrados en la regulación fisiopatológica de las funciones microgliales, incluyendo a aquellas presentes solo en subpoblaciones minoritarias, a fin de diseñar estrategias que permitan dirigir el fenotipo microglial para combatir a enfermedades que afectan al CNS y minimizar los efectos adversos de los procesos neuroinflamatorios.

El componente inflamatorio de la enfermedad de Alzheimer

Desde la descripción inicial de la enfermedad homónima, Alzheimer identificó alteraciones morfológicas en el cerebro afectado consistentes con reactividad glial (Stelzmann et al., 1995). Estas observaciones fueron corroboradas y refinadas posteriormente por Pio del Río Hortega con la descripción morfológica y funcional de las células de la microglía (Sierra et al., 2016). Actualmente se consideran a los procesos neuroinflamatorios como factores inherentes de la EA y que contribuyen de forma importante al cuadro neuropatológico.

Tanto en pacientes que presentan deterioro cognitivo leve (MCI) (a menudo considerado como una manifestación preclínica de la EA), como en múltiples modelos animales de la EA, la neuroinflamación se presenta como un evento temprano que precede, incluso a la deposición de placa amiloide (Heneka et al., 2015). Múltiples trabajos destacan la contribución de factores inflamatorios sobre: la progresión de la EA, la severidad de la sintomatología, y posiblemente su etiopatogenia (Karran et al., 2011; McGeer y McGeer, 2013).

El péptido βA , particularmente en sus formas fibrilares, activa a la microglía. Estas células adquieren un fenotipo hipertrófico con morfología ameboide, e incrementan tanto la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como la expresión de mediadores inflamatorios incluyendo IL-1 β , IL-6, y TNF α (Jekabsone et al., 2006; Mosher y Wyss-Coray, 2014). Este estado activado se caracteriza por incrementada proliferación y migración, resultando en elevada densidad microglial (microgliosis) especialmente en proximidad de placa amiloide.

La microgliosis localizada alrededor de las placas amiloides, sin embargo, correlaciona positivamente con el tamaño de la placa (Betensky y Frosch, 2014), sugiriendo que las funciones de la microglía se ven alteradas de forma que resultan inefectivas en la eliminación fagocítica de los agregados amiloides; En efecto existe una progresiva pérdida de las capacidades fagocíticas de la microglía en modelos transgénicos de la EA (Krabbe et al., 2013), y esta incapacidad de eliminar agregados amiloides se ha propuesto como un posible mecanismo etiológico para la EA (Heneka et al., 2015). Sin embargo, la ablación de la microglía en cultivos organotípicos promueve la deposición de péptido βA sugiriendo un efecto protector de la microglía, carente en cerebros con amiloidosis (Hellwig et al., 2015).

Tanto los oligómeros del péptido βA *per-se* como la neurodegeneración asociada a la enfermedad constituyen estímulos inflamatorios, los cuales contribuyen a la neurodegeneración, estableciendo un sistema de retroalimentación que contribuye al carácter crónico-degenerativo de la EA (Heneka et al., 2015). Estudios epidemiológicos han destacado la asociación del uso de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) con una reducción en la incidencia de la EA, mientras que los factores de riesgo para el desarrollo de la EA incluyen, enfermedades cerebrovasculares, hiperlipidemia, tabaquismo, diabetes, obesidad, y trauma cerebral, y se asocian con procesos inflamatorios sistémicos o específicos al sistema nervioso (Reitz y Mayeux, 2014). Estudios de GWAS han encontrado asociaciones con la EA de genes relevantes en la fisiología microglial, como lo son CD33, la región de HLA-DRB4-DRB1 (complejo mayor de histocompatibilidad clase II) y TREM2 (receptor de activación expresado en células mieloides)

(Mosher y Wyss-Coray, 2014). Recientemente, se ha demostrado la existencia de una subpoblación de microglía asociada con la EA (Disease Associated Microglia, DAMs) caracterizada por un decremento en la expresión de CX3CR1 y aumento en la expresión de marcadores como Apoe, Lpl, CD9, Cst7 y TREM2 (Keren-Shaul et al., 2017).

Por lo tanto, las células de la microglía juegan un papel central en la fisiopatología de la EA, participando activamente en la formación de las placas, mediando procesos inflamatorios que dirigen la respuesta del tejido a la agregación de placa amiloide, y participando de forma aberrante en procesos neurodegenerativos en el cerebro de Alzheimer. De lo anterior se destaca la importancia fisiopatológica de la microglía en la EA por su papel homeostático y en la regulación de la respuesta neuroinflamatoria, y se señala a la microglía como un atractivo blanco en el desarrollo de estrategias terapéuticas enfocadas a la regulación inflamatoria.

Resaltando la importancia de los mecanismos de modulación de la respuesta neuroinflamatoria en la EA, la ausencia de caspasa-1 (caspasa-1^{-/-}) en el modelo 5xFAD, protege al animal contra el desarrollo de la sintomatología asociada con la progresión de la enfermedad (Álvarez-Arellano et al., 2018). La deleción de caspasa-1 reduce la neuroinflamación y la deposición de placa amiloide, además de prevenir el deterioro de la memoria y la acumulación de mitocondrias disfuncionales, todas estas características relacionadas con la edad en el modelo 5xFAD (Álvarez-Arellano et al., 2018; Blanco-Ayala, 2017; Heneka et al., 2015). La caspasa-1 promueve la liberación de la forma madura de IL-1 β dependiente de la activación del inflamasoma NLRP3, por lo que en el modelo *knockout*, la respuesta inflamatoria se encuentra atenuada, y de forma concordante se observa un efecto semejante con la eliminación de otros elementos de la maquinaria de señalización inflamatoria incluyendo NLRP3 y ASC (Heneka et al., 2013; Venegas et al., 2017). Recientemente se ha reportado que en el ratón 5xFAD, la ablación microglial sostenida lograda por métodos farmacológicos es suficiente para impedir la deposición de placa en el cerebro (Spangenberg et al., 2019). Por lo tanto, estrategias enfocadas a la modulación del proceso neuroinflamatorio a través de la microglía pueden tener gran relevancia terapéutica en el control de la progresión de la enfermedad.

Canales iónicos en la regulación de la actividad microglial

La señalización mediada por canales iónicos permite la rápida transducción de señales de naturaleza diversa provocando una respuesta inmediata de la célula. La actividad de canales iónicos es esencial en la determinación del potencial de la membrana, así como eventos de señalización propiciados por cambios en la concentración intracelular de iones metálicos. La diversidad de canales iónicos permite la respuesta modulada a estímulos de naturaleza fisicoquímica diversa, con consecuencias importantes en la función de las células. Diversos canales iónicos son importantes para la transducción de señales en el sistema inmune (Cahalan et al., 2001; Feske et al., 2015); Entre estos se destacan canales de potasio dependientes de voltaje relevantes para el proceso de activación de linfocitos-T (Hu et al., 2007), purinoreceptores de la familia P2X importantes en la identificación de daño tisular a través de la detección del aumento transitorio en la concentración de ATP en el medio extracelular (Di Virgilio et al., 2018), y receptores de neurotransmisores relevantes en el establecimiento de inflamación neurogénica (Xanthos y Sandkühler, 2014). Un creciente volumen de evidencias destacan la importancia de distintos canales iónicos en la respuesta neuroinflamatoria y la regulación de las funciones microgliales (Echeverry et al., 2016; Eder, 2005; Izquierdo et al., 2018; Schilling y Eder, 2007).

El potencial de membrana de las células microgliales en el cerebro joven es significativamente distinto al medido para el cerebro envejecido (Schilling y Eder, 2015), y este último se caracteriza por la presencia de un mayor número de células distróficas/hipertróficas, que contrasta con cerebros jóvenes donde la población microglial presenta una uniforme morfología ramificada (Schilling y Eder, 2015).

De particular importancia para las células de la microglía, como para otros tipos celulares “no-excitables”, son los canales iónicos que regulan la entrada de Ca²⁺ desde el exterior celular y la salida de Ca²⁺ del

retículo endoplásmico. La microglia expresa una amplia gama de receptores capaces de inducir el incremento de Ca^{2+} citosólico a través de vías de señalización que incrementan el IP3 y producen la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico, este proceso puede a su vez inducir la entrada de Ca^{2+} desde el exterior a través del sistema STIM-Orai1 (Sharma y Ping, 2014). Adicionalmente, la microglía expresa distintos canales permeables a Ca^{2+} a nivel de la membrana plasmática cuya activación resulta de forma directa en la entrada rápida de Ca^{2+} al citosol (Sharma y Ping, 2014). Estos mecanismos en conjunto son relevantes para la regulación de la función microglial en condiciones de homeostasis y en la enfermedad.

La desregulación de Ca^{2+} intracelular es un factor común entre múltiples enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EA, y se asocia con el envejecimiento (Bezprozvanny, 2009; Brawek y Garaschuk, 2013b, 2014). La microglía en la EA presenta alteraciones en la señalización mediada por Ca^{2+} (McLarnon et al., 2005), particularmente en proximidad a la placa amiloide en el cerebro murino (Brawek et al., 2014a). Estas células reactivas ameboides presentan eventos transitorios espontáneos de Ca^{2+} con una frecuencia elevada pero con intensidad atenuada y presentan una respuesta a ATP retardada (Brawek et al., 2014a). También en el contexto de la EA, el receptor mieloides TREM2 ha sido intensamente estudiado por la asociación entre variantes de este gen y una elevada probabilidad para el desarrollo de la EA (Ulrich y Holtzman, 2016). Entre los efectos río abajo de la señalización de TREM2 se tiene la generación de pequeños transitorios de Ca^{2+} en la microglía (Sessa et al., 2004)[Note823]. De aquí la relevancia de la regulación de la actividad microglial, y en particular en la regulación mediada por canales permeables a Ca^{2+} en el contexto de la EA.

De entre el repertorio de canales iónicos expresados por la microglía, resulta de particular interés la presencia de canales de la familia TRP por la versatilidad funcional y diversidad de estímulos agonistas para estos canales (Echeverry et al., 2016). Múltiples TRPs están relacionados a la detección de condiciones nocivas de pH, ROS, y temperatura, así como la presencia de sustancias químicas irritantes exógenos y mediadores de señalización endógenos (Moran et al., 2011; Sharma y Ping, 2014).

TRPV1 en el sistema nervioso central

Los canales de la familia TRP que actúan como integradores multimodales de señales de distintos tipos para dirigir la respuesta celular acorde a los estímulos a los que está expuesto. Distintos canales de la familia responde a una variedad de estímulos, tanto endógenos como exógenos con cada miembro de la familia mostrando alta selectividad a agonistas químicos y el múltiples casos sensibilidad a temperaturas en distinto rango (Nilius et al., 2007). Los canales de esta familia se caracterizan adicionalmente por la alta plasticidad funcional que les confiere el panorama regulatorio particular donde se encuentran, esto a través de modificaciones postraduccionales e interacciones directas proteína-proteína capaces de regular la función, localización, y tráfico de los canales.

Particularmente, TRPV1 es un canal que puede ser activado por una amplia gama de ligandos exógenos (prominentemente la capsaicina acumulada en los frutos de las plantas del género *Capsicum*), ligandos endógenos diversos que incluyen metabolitos del ácido araquidónico, endocannabinoides y el ácido lisofosfatídico y factores fisicoquímicos como bajo pH extracelular (<6) y temperaturas elevadas (>43°C) (Ho et al., 2012; Nieto-Posadas et al., 2012).

Debido a la gran importancia de TRPV1 en el fenotipo de condiciones asociadas a dolor incluyendo neuropatías y dolor inflamatorio, existe un amplio volumen de investigación detallando la fisiología del canal en contextos periféricos. TRPV1 funciona como sensor nociceptivo en neuronas aferentes primarias, facilitando la entrada de Ca^{2+} , iniciando la respuesta nerviosa, y desencadenando procesos de señalización río abajo dependientes de Ca^{2+} (Moran et al., 2011). La expresión de TRPV1 se incrementa en diversos tejidos en modelos de inflamación y modelos de dolor asociado a la inflamación, respondiendo tanto a la estimulación con inflamógenos (LPS, CFA y Carragenano) como al daño nervioso W. X. Huang et al. (2015). Adicionalmente también se ve alterada la sensibilidad del canal, disminuyendo sus umbrales de

activación y contribuyendo significativamente al desarrollo de alodinia, hiperalgnesia y dolor espontáneo (Echeverry et al., 2016; Talbot et al., 2016). Modelos *knockout* y *knockdown* para TRPV1, así como tratamiento con antagonistas del canal han mostrado efectos protectores para el desarrollo de neuropatías periféricas asociadas con inflamación (Brandt et al., 2012; Talbot et al., 2016).

Aunque la activación aguda del canal con capsaicina induce una respuesta dolorosa en la periferia, la activación sostenida del canal con agonistas resulta en la desensibilización y tiene un efecto analgésico (Hasan y Zhang, 2018), ejemplificando la complejidad subyacente a la regulación fisiológica del TRPV1. Esta regulación de TRPV1 resulta en variaciones de las respuestas inducidas por ligandos y condiciones ácidas, diferencias en los umbrales de activación por temperatura, y alteraciones en los niveles de expresión del canal sobre la membrana plasmática.

En lo que respecta al CNS, estudios iniciales sugerían altos niveles de expresión del canal TRPV1 ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central, con la mayor densidad observada en el giro dentado hipocámpal, la región CA1, la corteza, y astrocitos perivasculares (Tóth et al., 2005). Sin embargo, los estudios de Cavanaugh et al. (2011) argumentaron en contra de esta perspectiva mediante el uso de un ratón reportero donde la expresión de LacZ está controlada por el promotor de TRPV1. Este ratón reportero sugiere niveles muy bajos de expresión en el SNC altamente restringidos a regiones discretas dentro del cerebro. Estas líneas de evidencia, cabe notar, asumen que la expresión de la forma del promotor insertada en el modelo recapitula fielmente la forma en que el promotor es utilizado en su contexto cromosómico original, aunque esta es una idea muy conservadora, no es una que carezca de crítica. Adicionalmente, esta evidencia sobre la actividad del promotor contrasta considerablemente con múltiples trabajos que caracterizan la expresión de TRPV1 en distintas regiones del SNC a nivel del mRNA codificante, además de los datos existentes sobre expresión a nivel de proteína mediante técnicas basadas en anticuerpos (*western blot*, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia) Otra línea de evidencia surge de los efectos a nivel del SNC de tratamientos con capsaicina; Aunque es posible que algunos de estos efectos pudieran ser resultado de efectos directos de la capsaicina independientes de TRPV1, la ausencia del efecto en el ratón *knockout* para TRPV1, el bloqueo por antagonista y la recapitulación con agonistas altamente específicos han sido validados para distintos de estos fenómenos. Finalmente está la evidencia basada en el fenotipo del ratón *knockout* para TRPV1, que muestra considerables efectos a nivel del CNS, afectando el fenotipo microglial en el estado basal (Marrone et al., 2017) y la función sináptica (Bennion et al., 2011).

TRPV1 se expresa en el hipotálamo (núcleo paraventricular, hipotalámico dorsomedial, e hipotálamo lateral) y tallo cerebral (complejo vagal dorsal). Esta expresión se reduce en ratones alimentados con dieta alta en grasa, e incrementa con dieta suplementada con capsaicina. La función de TRPV1 en circuitos hipotalámicos y del tallo se han visto también alterados en modelos de diabetes (Derbenev y Zsombok, 2016)

Se ha detectado inmunorreactividad contra TRPV1 en cultivos primarios de microglía (S. R. S. R. U. Kim et al., 2006; Miyake et al., 2015), en la línea celular microglial BV2 (W. X. Huang et al., 2015), en microglía retinal (Sappington y Calkins, 2008), y en microglía *in situ* en cortes cerebrales (Marrone et al., 2017), mostrando patrones de expresión no exclusivos a la membrana plasmática. La activación de TRPV1 en la microglía resulta en la elevación de Ca^{2+} intracelular, produce daño mitocondrial, y muerte celular (S. R. S. R. U. Kim et al., 2006). La estimulación de la microglía con agonistas de TRPV1 resulta en niveles elevados de $TNF\alpha$ (Marrone et al., 2017), niveles reducidos de IL-10 (Marrone et al., 2017) e induce comportamiento quimiotáctico (Miyake et al., 2015), componentes clásicos de la respuesta inflamatoria. Interesantemente, en ratones TRPV1^{-/-}, la microglía adquiere un fenotipo caracterizado por hipertrofia basal y niveles elevados de IL-10 (Marrone et al., 2017). Esto es consistente con la descripción clásica del fenotipo microglial M2 activado hacia un fenotipo antiinflamatorio. El tratamiento de rebanadas cerebrales con capsaicina resulta en cambios morfológicos de la microglía, elevación en los niveles de expresión de $TNF\alpha$ y reducción en los niveles de IL-10 (Marrone et al., 2017).

Otros agonistas de TRPV1 también han sido implicados en la regulación de la activación microglial. El

cannabidiol, incrementa la fagocitosis de células microgliales BV2 mediante un mecanismo que puede ser bloqueado en ausencia de Ca^{2+} o con inhibidores de TRPs (Hassan et al., 2014). Tanto la hipertermia como la capsaicina incrementan los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en células BV2 (W. X. Huang et al., 2015). El ácido lisofosfatídico (LPA) es un agonista directo de TRPV1 (Morales-Lazaro y Rosenbaum, 2015), y la administración intratecal de LPA induce la activación microglial y el cambio a morfología hipertrófica (Ma et al., 2010). La estimulación de microglía primaria con LPA induce “ruffling” de la membrana, expresión de BDNF y liberación de ATP (Fujita et al., 2008). Las células microgliales incrementan su actividad quimiotáctica en respuesta a estimulación con capsaicina, respuesta que se elimina en presencia de un inhibidor de TRPV1 o en microglía TRPV1^{-/-} (Miyake et al., 2015).

Recientemente se reportó la expresión de TRPV1 en microglía en el contexto neuroinflamatorio asociado con convulsiones inducidas por hipertermia en ratones jóvenes (P14). En este contexto se incrementa la expresión de TRPV1, y en el modelo TRPV1^{-/-} se disminuye significativamente la generación de citocinas proinflamatorias en respuesta al daño (Kong et al., 2019).

TRPV1 en la enfermedad de Alzheimer

Existen pocos estudios específicos sobre TRPV1 en el contexto de la EA. En astrocitos expuestos a péptido β A, TRPV1 actúa como mediador inflamatorio dado que el bloqueo de este inhibe el aumento de la expresión de marcadores proinflamatorios como iNOS, COX-1 y TNF- α en respuesta al péptido β A. Sin embargo, el modelo utilizado de astrocitos *knockout* para FAAH limita la interpretación de estos resultados a un contexto fisiopatológico (Benito et al., 2012). Otro estudio mostró que en células BV2 microgliales estimuladas con el péptido β A se incrementa la generación de especies reactivas de oxígeno, y esta respuesta puede ser inhibida con la aplicación I-RTX (potente inhibidor de TRPV1) sugiriendo participación de este canal (Schilling y Eder, 2011). Interesantemente, un estudio realizado en ratones tratados con estreptozotocina (un modelo propuesto para la EA dada la desregulación del metabolismo de glucosa) mostró una reducción en la acumulación de placas amiloides al ser tratado con vainillina (un agonista de TRPV1) (Jayant et al., 2016). De acuerdo con esto, otro estudio reciente reportó el efecto neuroprotector de la aplicación de capsaicina a un modelo agudo de neuroinflamación inducida por LPS; esto a través de la regulación del fenotipo microglial (Bok et al., 2018). Estos dos estudios sugieren la participación de TRPV1 en el proceso neuroinflamatorio; sin embargo, hasta el momento se desconocen los mecanismos que subyacen a la modulación de TRPV1 en estos contextos celulares impidiendo una interpretación más profunda a partir de estos datos. Por lo tanto, aunque estos estudios sugieren un papel neuroprotector de la activación exógena de TRPV1 (al menos en algunos contextos celulares y experimentales en particular), no son indicativos de que ese sea el papel del canal *in situ* de forma general.

El trabajo de J. Kim et al. (2019) demuestra la relevancia funcional de TRPV1 en el contexto de un modelo murino de la EA. Ratones modelo de la EA (3Tg-AD 12moa) en el contexto *knockout* para TRPV1 muestran mejor desempeño en pruebas conductuales respecto a los ratones silvestres para TRPV1, estos ratones muestran también una menor cantidad de péptido amiloide acumulado y proteína Tau fosforilada en el hipocampo. En los cultivos primarios de neuronas corticales obtenidos de los ratones 3Tg-AD suplementar el medio con un antagonista de TRPV1 (capsazepina) o con el quelante intracelular de Ca^{2+} BAPTA-AM disminuyen la cantidad de péptido amiloide y proteína tau fosforilada detectados en el cultivo. Sugiriendo que la modulación de TRPV1 puede ser relevante en la regulación de los procesos fisiopatológicos de la EA, aunque no se descartan contribuciones TRPV1-dependientes de otros tipos celulares en este contexto. Recientemente se reportó un fenómeno aparentemente contradictorio utilizando el modelo APP23/PS45 (Du et al., 2020). En este modelo la expresión de TRPV1 en el cerebro se disminuye considerablemente respecto del ratón silvestre y adicionalmente la sobreexpresión de TRPV1 en el hipocampo mediada por virus adenoasociado parece inhibir la deposición de placas amiloides y rescatar el desempeño en pruebas conductuales. Por tanto, aunque múltiples líneas de evidencia apuntan hacia TRPV1 como una proteína relevante para la fisiopatología de la EA, el papel ejecutado por esta proteína

a nivel del CNS no ha sido aún claramente elucidado, particularmente considerando los distintos nichos celulares que esta proteína puede ocupar en el cerebro, tanto en las neuronas como células gliales. A la luz de trabajos previos que muestran el potencial de TRPV1 como modulador de mecanismos inflamatorios, y particularmente en las células de la microglía, resulta de interés caracterizar la expresión y el impacto de TRPV1 en células de la microglía, y particularmente en el contexto de neuroinflamación y la EA.

Hipótesis

La función del canal TRPV1 promueve la activación microglial en el contexto inflamatorio que se produce en la enfermedad de Alzheimer

Objetivos

General

Determinar la contribución de la función del canal TRPV1 sobre el estado de activación de la microglía en el contexto neuroinflamatorio de la enfermedad de Alzheimer

Particulares

- Evaluar la expresión cerebral del canal TRPV1 en un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer (5xFAD).
- Evaluar el papel del canal TRPV1 sobre la activación microglial.
- Evaluar el papel de la interacción KChIP3-TRPV1 sobre la regulación del canal en el contexto de la enfermedad de Alzheimer.
- Evaluar la actividad del canal TRPV1 en el proceso neuroinflamatorio asociado con la enfermedad de Alzheimer.

Metodología

Modelos animales

El ratón 5xFAD es un modelo transgénico bien establecido para el estudio de los mecanismos asociados con la neurodegeneración y la neuroinflamación en la EA. Estos animales portan transgenes para las proteínas humanas APP, con las mutaciones Swedish(K670N, M671L), Florida(I716V), y London(V717I), y PS1 con dos mutaciones (M146L y L286V); Todas estas mutaciones han sido asociadas con Alzheimer familiar (Oakley et al., 2006). Este modelo se caracteriza por el acelerado curso temporal del desarrollo de la patología en comparación con otros modelos como el triple transgénico (3Tg), adicionalmente este modelo presenta una buena recapitulación de eventos fisiopatológicos en la EA ausentes en otros modelos animales como la fosforilación de la proteína Tau y muerte neuronal en etapas avanzadas de la patología (Eimer y Vassar, 2013; Hall y Roberson, 2012; Nazem et al., 2015). Los animales 5xFAD de 1.5 meses de edad, siendo esta una edad previa a la deposición de placa amiloide y muerte neuronal, muestran un fenotipo moderado. A los 6 meses de edad, el ratón 5xFAD muestra un pronunciado deterioro de la memoria, existe extensiva deposición de placa amiloide en el cerebro, el proceso neuroinflamatorio está establecido, e inicia la muerte neuronal (Álvarez-Arellano et al., 2018; Eimer y Vassar, 2013).

Determinación de genotipo

Para todos los tejidos provenientes de ratones genéticamente modificados, los genotipos de los especímenes fueron verificados por PCR realizada sobre DNA obtenido a partir de la digestión de una porción de cola con Pronasa y extraído por precipitación etanólica.

Genotipo TRPV1

Protocolo de genotipificado fue modificado a partir del protocolo de Jackson Lab

Oligo 1: 5'- TGG CTC ATA TTT GCC TTC AG -3' 19922 Wild type Forward

Oligo 2: 5'- CAG CCC TAG GAG TTG ATG GA -3' 19923 Common

Oligo 3: 5'- TAA AGC GCA TGC TCC AGA CT -3' oIMR1627 Mutant Forward

Programa:

- Desnaturalización 94°C 2min
- Touchdown (x10)
- 94°C 30s
- 65°C $\Delta=-0.5^\circ\text{C}$ 15s
- 68°C 30s
- Amplificación
- 94°C 30s
- 60°C 15s
- 72°C 30s
- Finalización
- 72°C 45s
- 10°C Hold

Parámetros: Reacciones realizadas en volumen final de 12 μl con 6.5% de glicerol y reactivos convencionales para Taq-Polimerasa. Concentración final de 500nM para cada Oligonucleótido

Genotipo KCHIP3

Oligo 1: 5'- CTG GGA CAT ATT TGG AAC AAG C -3' Wild type Forward

Oligo 2: 5'- CTG CAT ACG CCC TAA GGA ATA GAG C -3' Common

Oligo 3: 5'- CTG CAG CGC ATC GCC TTC TAT C -3' Mutant Forward

Genotipo 5xFAD

Oligo 1: 5'- AAT AGA GAA CGG CAG GAG CA -3' PSEN1 Forward

Oligo 2: 5'- GCC ATG AGG GCA CTA ATC AT -3' PSEN1 Reverse

Modelos in-vitro

Cultivo mixto de células gliales de neonato

Con base en protocolos previamente reportados (Medrano-Jiménez et al., 2019; Saura et al., 2003; Tamashiro et al., 2012), ratones neonatales (P0-P4) fueron rápidamente sacrificados por decapitación y el cerebro extraído del cráneo. Las meninges fueron separadas mediante rodamiento del cerebro sobre papel filtro estéril (cualquier sitio donde tejido meníngeo permanezca adherido puede ser manualmente removido con pinzas finas). Para cada ensayo 10-12 cerebros fueron recolectados, produciendo una caja petri (100mm) de cultivo mixto por cada dos cerebros. Dentro de la campana de cultivo los cerebros fueron recolectados en HBSS estéril (10ml); Una vez recolectados todos los cerebros, estos fueron centrifugados a 1200 rpm por 3 min, permitiendo eliminar el sobrenadante por decantación. Este proceso de lavado del tejido fue repetido 2 veces más. Los cerebros fueron transferidos a una caja petri y mecánicamente triturados con uso de una navaja de bisturí o navaja de afeitar. Al tejido triturado se le adicionaron 200 μ l/cerebro de solución de digestión (Tripsina III/DNasa I) y se transfirió a un tubo para centrifuga. El tejido fue incubado a 37°C por 30 minutos, agitando el tubo cada 5 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se inactivó la tripsina mediante adición de medio completo (mismo volumen respecto del volumen de solución de digestión utilizado) y se agregó por cada ml de medio 200 μ l adicionales de DNasa I. El tejido fue incubado por 5 min a 37°C para completar la digestión de DNasa. El medio fue entonces eliminado por centrifugación (1200 rpm, 5 min) y las células se resuspendieron en medio completo. Utilizando una punta de micropipeta de 1 ml se mezcló vigorosamente la solución para disgregar el tejido, y una vez eliminadas las piezas grandes de tejido el procedimiento fue repetido con 3 diámetros progresivamente menores de pipetas pasteur pulidas al fuego. El disgregado resultante fue filtrado para eliminar piezas residuales de tejido y centrifugado (1200 rpm, 5 min), el medio eliminado por decantación, las células resuspendidas en medio suplementado y sembradas en cajas de cultivo (2 cerebros por caja de 100mm). Los cultivos fueron mantenidos en condiciones estándar por 24 horas. Los cultivos fueron observados para verificar la adhesión de las células, y el medio cambiado después de dos lavados con PBS. Las células en cultivo fueron monitoreadas constantemente y el medio cambiado cada 4 días o según fuera requerido. Al llegar a confluencia el cultivo mixto fue resembrado en cajas más grandes mediante la tripsinización (10 min, 37°C).

Medio completo: Medio DMEM/F12 suplementado con: 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 2mM glutamina, y antibióticos.

Solución de digestión: Tripsina tipo III (0.25 mg/ml), DNasa tipo I (0.28 mg/ml)

Aislamiento de microglía a partir de cultivos gliales mixtos

Se pueden obtener cultivos de microglía con alto nivel de pureza mediante selección negativa de los cultivos mixtos por tripsinización moderada (Saura et al., 2003). Cultivos mixtos confluentes fueron lavados dos veces con PBS y sometidos a tripsinización por 7 min a 37°C. Bajo un tratamiento de este tipo, las células desprendidas por la tripsinización son primordialmente astrocitos con alto nivel de pureza,

dejando a las células microgliales adheridas sobre la superficie de cultivo. Medio completo fue adicionado para inactivar la tripsina, esta solución fue recolectada y la caja lavada una vez, teniendo cuidado de no desprender a la microglía. Se adicionó medio nuevamente a la caja y se pipeteó repetidas veces para desprender a las células, y las células firmemente adheridas fueron desprendidas mecánicamente. Las células fueron recolectadas, centrifugadas, resuspendidas en medio completo, la concentración de células determinada por conteo en cámara de Neubauer, y las células fueron sembradas para experimentación a la densidad deseada. Los experimentos fueron iniciados al menos 24 horas después del aislamiento de la microglía para permitir su adhesión y recuperación de la manipulación.

Western blot

Los tejidos colectados fueron rápidamente congelados sobre hielo seco tras la disección. Las muestras fueron disgregadas mediante ultrasonido en buffer TLB suplementado con inhibidores de proteasas, DTT y ortovanadato de potasio, para obtener un lisado total del tejido. Los lisados fueron clarificados por centrifugación a 13000g por 15 minutos a 4°C recolectando el sobrenadante, y fueron almacenados a -70°C hasta su uso. Para células cultivadas, el medio fue retirado y las células lavadas 2 veces con PBS. El PBS fue retirado meticulosamente y las células lisadas con buffer TLB suplementado con inhibidores de proteasas y procesos mecánicos. Los lisados fueron recolectados, clarificados por centrifugación y almacenados a -70°C hasta su uso. La concentración de proteína en los extractos fue determinada por método de Bradford y 30 μ g de proteína (a menos que lo contrario sea indicado) para cada muestra fue corrida en electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) en sistema amortiguante de Tris-Glicina. Las proteínas fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa por transferencia húmeda en buffer con 20% de metanol o 10% etanol en frío. La transferencia fue verificada por tinción de Ponceau sobre la membrana. Las membranas fueron bloqueadas por 1 hora en agitación en leche en polvo sin grasa reconstituida al 5% en TBS y los anticuerpos fueron incubados toda la noche en formato de cámara húmeda a 4°C. El anticuerpo primario fue lavado 3 veces con TBS-tween y el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano fue incubado en agitación a temperatura ambiente por 1 hora y lavado 3 veces con TBS-tween. Las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia en un fotodocumentador digital Li-Cor C-DiGit® y niveles de expresión evaluados por densitometría en Image Studio™ Software de Li-Cor. Para el anticuerpo anti-TRPV1 la especificidad del anticuerpo fue verificada mediante la ausencia de una banda detectable por quimioluminiscencia en ausencia del anticuerpo primario o en condiciones donde el anticuerpo primario es bloqueado con una cantidad igual por peso del péptido antigénico que corresponde a un fragmento de la cola N-terminal de TRPV1.

Cuadro 2: Anticuerpos para *western blot*

Anticuerpo primario	Dilución 1°	Anticuerpo Secundario	Dilución 2°
TRPV1	1:1000	antiRabbit-HRP	1:10000
GAPDH	1:5000	antiRabbit-HRP	1:20000
Actina	1:5000	antiRabbit-HRP	1:20000

Extracción de RNA y RT-qPCR

Siguiendo la disección, tejidos de interés incluyendo la corteza cerebral, hipocampo, cerebelo, y médula espinal fueron congelados en hielo seco y almacenados a -70°C hasta su procesamiento. RNA total del tejido fue obtenido mediante extracción por tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo de acuerdo al protocolo de Chomczynski y Sacchi (2006). El tejido fue inmerso inmediatamente en solución D disgregado mediante sonicación hasta lograr la homogeneización completa del tejido. La cantidad y pureza del RNA obtenido fue evaluada por espectrofotometría en nanoDrop, y la integridad del material fue verificada por electroforesis en gel desnaturante de Agarosa. Las muestras de RNA fueron tratados con

DNasa (Promega) y sometidas a reacción de retrotranscripción con oligo-dT como cebador. La calidad del cDNA obtenido fue verificada mediante la amplificación exitosa por PCR punto final del cDNA de Actina (amplicón de 250 pb), aquellos cDNAs que produjeran a una banda definida para el producto de PCR fueron determinadas aptas para análisis subsecuente. Análisis de RT-qPCR fue realizado en reacciones de 12 μ l por química de SYBR-Green(Thermo Scientific, Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2x) en un termociclador RealStepone AppliedBiosystems. Para las reacciones de RT-qPCR se utilizaron oligonucleótidos cebadores previamente reportados en la literatura, que cumplieran con los criterios de buen diseño para qPCR en cuanto al tamaño del amplicón generado, la proporción de bases G y C, y especificidad evaluada por alineamiento de secuencias.

Cuadro 3: (Oligonucleótidos para RT-qPCR)

Diana	Dirección	Secuencia
mNdufa10_2	F	CCGCCTTCTTCAGTATGCAGA
mNdufa10_2	R	TGCTTTCGGATATAGCCCTGG
mGAPDH	F	GGGAAGCTCACTGGCATGG
mGAPDH	R	CTTCTTGATGTCATCATACTTGGCAG
TRPV1	F	CCCATTGTGCAGATTGAGCAT
TRPV1	R	TTCCTGCAGAAGAGCAAGAAGC
mTRPV1	F	CCCATTGTGCAGATTGAGCAT
mTRPV1	R	TTCCTGCAGAAGAGCAAGAAGC
mTRPV1_2	F	CCACTGGTGTGAGACGCC
mTRPV1_2	R	TCTGGGTCTTTGAACTCGCTG
mTRPV1_3	F	CTCTACTACACCCGAGGATTC
mTRPV1_3	R	TTCCCATCCTCGATCAG
Kcnd1	F	GGATGAGGTTCTGGTGGTGAAT
Kcnd1	R	TCCTTCTTACGGTCCCTGTA
Kcnd2	F	ACAAGGACCGCAGGCGGGAGA
Kcnd2	R	ACGACTAGGTGCTGCGGCCA

Microscopía

Tras el enriquecimiento microglial de los cultivos, las células fueron sembradas en cubreobjetos preparados para cultivo.

Preparación de cubreobjetos para cultivo

- Lavado en SDS 1% en agua destilada
- Enjuagado 2 veces en agua destilada
- Lavado en ácido (24 horas en HCl 2M)
- Enjuagado 2 veces en agua destilada y 2 veces en agua miliQ
- Desinfectado en EtOH 70% e introducido a campana de flujo laminar
- Irradiado con luz ultravioleta por 30 min y secado por completo bajo flujo laminar

Tinción de Rojo Oleoso

Stock de colorante Oil Red O (Sigma) 0.5% fue preparada en isopropanol. Solución de tinción fue preparada al momento mediante dilución del stock de colorante 2:3 en agua destilada. La solución fue filtrada antes de su uso. Células cultivadas sobre cubreobjetos fueron lavadas con PBS y fijadas con PFA 4% en PBS frío por 30 minutos. Terminada la fijación, los cubreobjetos fueron lavados en PBS y almacenados en PBS en refrigeración hasta su uso. Los cubreobjetos fueron transferidos cada uno a un pozo de una

placa de 24 pozos, las células fueron enjuagadas con 60% isopropanol en agua destilada e incubadas con la solución de tinción por 15 min. Las células fueron enjuagadas en isopropanol 60% para eliminar el colorante excedente y posteriormente extensivamente en agua destilada.

Tinción de BODIPY

Células fijadas con PFA fueron lavadas en PBS y teñidas con una dilución 1:500 de la solución stock de BODIPY-493/503(3.8mM) por 1 hora. Los cubreobjetos fueron lavados 2 veces con PBS y contra teñidos por 20 min con DAPI 1:10000 en PBS. después de lavado con PBS las células fueron montadas sobre un portaobjetos con medio de montaje Fluroshield™ y visualizadas por microscopía de fluorescencia (Zeiss Axioscope 10X/0.3,20X/0.5, filtro FITC, camara CCD Photometrics CoolSnapcf Monocromática).

Inmunofluorescencia

Para la identificación de astrocitos (GFAP+) y microglía (F4/80+), las células fijadas en 4% PFA fueron permeabilizadas con una solución de 0.1% Triton x-100 por 30 min, bloqueadas con 10% BSA por 1 hora. Los anticuerpos primarios fueron utilizados a dilución de 1:200 para F4/80 y 1:250 para GFAP en presencia de 5% BSA y 0.1% Tritón e incubados toda la noche. Tras lavado de anticuerpos primarios se incubaron anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforo anti-Rat-Alexa594(1:400) y anti-Mouse-Alexa488 (1:400) en 5% BSA 0.1% Tritón por 1 hora. Tinción nuclear con DAPI fue aplicada por 15 min a una dilución de 1:10000. Las muestras se montaron en medio Fluroshield™ y fueron observadas con microscopía de fluorescencia(Zeiss Axioscope 10X/0.3,20X/0.5, filtros FITC y Rodamina, camara CCD Photometrics CoolSnapcf Monocromática).

Imagenología de Ca²⁺

Para el cargado de las células con el marcador de Ca²⁺ permeable a la célula Fluo-4 AM (Invitrogen), una alícuota fresca de solución stock del marcador fue preparada mediante la dilución de 50 µg del reactivo (un vial) en 50µl de DMSO. Esta solución fue vigorosamente mezclada en Vortex para lograr la completa solubilización del marcador. Células cultivadas sobre cubreobjetos fueron lavadas 2 veces con PBS y cubiertas con solución 3µM de Fluo-4 AM en medio DMEM/F12 sin suplementación. El marcador fue cargado en las células por 1 hora a 37° protegido de la luz. Posteriormente las células fueron lavadas 2 veces en solución extracelular amortiguada con HEPES(ECS; ver Cuadro 4) e incubadas 20 minutos para permitir la completa desesterificación del marcador. Para la evaluación preliminar del cargado de las células: Cada cubreobjetos con las células adheridas en la superficie fue montado sobre una cámara de imagenología(Warner Instruments), y las células fueron sumergidas en 400µl de ECS y observadas en un microscopio equipado con línea de fluorescencia de 488nm en iluminación LED a aumento de 60x (PlanApo N 60X/1.42NA). Con iluminación de campo claro fue localizada una célula aislada y morfológicamente consistente con lo esperado para la microglía cultivada. Cambiando a modo de fluorescencia se observa la fluorescencia basal de la célula. Durante aproximadamente 120 segundos con una captura realizada por segundo(exposición de 100ms por imagen, cámara EMCCD Andor iXon). Tras 60 segundos de adquisición de las condiciones basales se adicionaron 50µL de solución de ionomicina(Sigma) para lograr una concentración de 10µM de ionomicina en la cámara. Células apropiadamente cargadas con Fluo-4 deben presentar un notorio incremento de fluorescencia en respuesta al tratamiento con ionomicina por la entrada de Ca²⁺ facilitada por este ionóforo. Para la cuantificación de la respuesta celular a estímulos: Cubreobjetos portando las células fueron montados en la cámara para microscopía (Attofluor™, Invitrogen™) y visualizadas en microscopio confocal invertido de disco giratorio (3i Marianas Yokohawa, LNMA). La adquisición se realizó en z-stacks de 8 imágenes con separación de 1.5µm para una profundidad total de 12µm, capturando z-stacks de forma secuencial con Δt de 1.285s (Laser 488nm, objetivo 20X/0.8, cámara EMCCD Andor iXon). Durante la adquisición se hicieron pausas permitiendo la adición de estímulos diluidos en ECS para alcanzar la dilución deseada

en la cámara. Para análisis de datos, ROIs fueron determinados manualmente en ImageJ en base a la fluorescencia en su punto máximo. Datos de intensidad media obtenidos de estos ROIs y de ROIs de tamaño comparable pero carentes en células fueron utilizados para análisis. Para análisis basado en cuadrícula, un conjunto de 1024 ROIs formando una cuadrícula fueron sobrepuestos sobre cada serie de tiempo en ImageJ para extraer datos con resolución espacial y temporal. Los datos resultantes fueron Analizados en Jupyter-notebook haciendo uso de las paqueterías de Pandas, Scipy, Numpy, y Matplotlib (Figura 1).

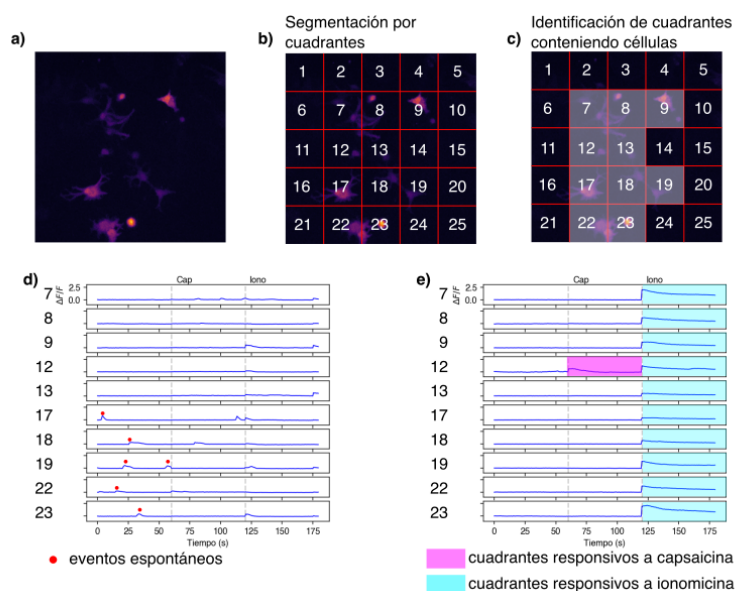


Figura 1: **Procesamiento de las imágenes:** a) Imágenes obtenidas por microscopía confocal mostrando la señal producida por Fluo-4 en cultivos enriquecidos en microglía; b) Cada imagen fue segmentada en cuadrantes; c) Detección de cuadrantes conteniendo células con la aplicación de umbral; d) Las series de tiempo para cada cuadrante fueron procesadas para identificar eventos espontáneos en el periodo previo a la aplicación de estímulos; e) Las series de tiempo para cada cuadrante fueron procesadas para identificar incrementos en la señal en periodo posterior a la aplicación de capsaicina o ionomicina.

Cuadro 4: Solución extracelular amortiguada con HEPES (ECS)(Kong et al., 2019) *pH 7.2*

Compuesto	Información	Concentración
NaCl	Sigma	145 mM
KCl	Sigma P5405	5 mM
CaCl ₂	Sigma C7902	2 mM
MgCl ₂	Sigma	1 mM
HEPES	Sigma H403	10mM
Glucose	Sigma G702	10 mM

Análisis estadístico

Gráficas y análisis estadístico (ANOVA-1 vía) fueron generados en Python con la interfaz de Jupyter-Notebook con uso de las paqueterías Numpy, Seaborn, Pandas, Matplotlib y Scipy.

Recursos clave

Cuadro 5: Recursos clave

Categoría	Nombre	Información
Anticuerpo	Anti-TRPV1 (VR1)	Alomone ACC-030
Anticuerpo	Anti-KChIP3	NeuroMab K66/38
Anticuerpo	TRPV1	Alomone
Anticuerpo	GAPDH	Cell Signaling D16H11
Anticuerpo	GFAP (GA5)	Cell Signaling #3670
Anticuerpo	F4/80	Abcam ab6640
Reactivo	Fluo-4 AM	Invitrogen™
Reactivo	Ionomycin	Sigma
Reactivo	PMA (phorbol myristate acetate)	Sigma
Ratón	5xFAD (C57BL6)	Tg(APP ^{SwFILon} , PSEN1 ^{M146LL286V}) 6799Vas 34848-JAX, Oakley et al. (2006)
Ratón	KChIP3 ^{-/-} (C57BL6)	Donación Alexander et al. (2009)
Ratón	TRPV1 ^{-/-} (C57BL6)	Trpv1 ^{tm1^{Jul}} , 003770-JAX, Donación: Tamara Rosenbaum M. J. Caterina et al. (2000)

Resultados y Discusión

TRPV1 en el cerebro murino

La expresión de TRPV1 ha sido ampliamente reportada en el sistema nervioso periférico, con los niveles más altos de la proteína encontrados en lisados de DRG y TG (D. Huang et al., 2012; Menigoz y Boudes, 2011; Ono et al., 2015; Quartu et al., 2016). Adicionalmente se han reportado niveles considerables de expresión de TRPV1 en diversos tejidos periféricos incluyendo el intestino (Csekő et al., 2019), piel (Gouin et al., 2017), hígado (Li et al., 2012), tejido adiposo (Chen et al., 2015), y pulmón (Mitchell et al., 2005; Omar et al., 2017; Zhao et al., 2016), consistente con el carácter multifuncional de la proteína y su participación en procesos fisiológicos diversos. Sin embargo, en lo que respecta al sistema nervioso central existen reportes contradictorios sobre los niveles de expresión de TRPV1; algunos trabajos reportan considerables niveles de expresión ampliamente distribuidos en el cerebro (Roberts et al., 2004; Tóth et al., 2005), mientras que otros reportan niveles de expresión muy bajos y altamente compartimentados (Cavanaugh et al., 2011). Agregando a esta discrepancia, existe considerable discordancia en la literatura sobre los patrones de inmunorreactividad obtenidos con distintos anticuerpos comerciales (Marrone et al., 2017). Por lo tanto, resultó necesario evaluar en nuestras manos la presencia de la proteína TRPV1 en el CNS del ratón. Para esto, de manera inicial se realizaron ensayos tipo *western blot* revelados mediante reacción de quimioluminiscencia con el anticuerpo ACC030 (Alomone Lab). Este es un anticuerpo policlonal diseñado para reconocer un segmento de la cola C-terminal del canal TRPV1 de la rata. Este segmento presenta alta identidad con la proteína del ratón (93.33%) y el humano, pero no está conservado en otros miembros de la familia de canales TRP. Este anticuerpo ha sido utilizado en más de 180 publicaciones a la fecha, y previamente se han reportado datos que validan su especificidad a través del bloqueo antigénico del anticuerpo con el péptido que corresponde a los residuos 824-838 del TRPV1 de la rata, así como la carencia de inmunorreactividad en el ratón TRPV1^{-/-} (TRPV1^{tm1Jul}) (Chen et al., 2015).

Bajo nuestras condiciones identificamos una banda principal de ~90 kDa a partir de extractos proteicos del cerebro total. Extractos proteicos del ganglio trigeminal se usaron como control positivo, ya que este tejido presenta robusta expresión de TRPV1 dado a que aquí se localizan los somas de neuronas sensoriales TRPV1⁺ (Figura 3). Lo anterior es consistente con los patrones de inmunorreactividad reportados previamente para el canal en tejido murino (Chen et al., 2015), y en células HEK transfectadas con TRPV1 (Nieto-Posadas et al., 2012; Ortíz-Rentería et al., 2018) y concuerda con el peso teórico de TRPV1 (~95 kDa) y la información proporcionada por el fabricante del anticuerpo. Adicionalmente, detectamos una banda de mayor peso molecular lo cual concuerda con lo reportado en otros trabajos y que corresponde a la forma N-glicosilada (en la posición Asn604) de TRPV1 (Rosenbaum et al., 2002; Veldhuis et al., 2012) (Figura 3, flechas negras). En experimentos futuros esto podría ser verificado mediante el tratamiento de los extractos proteicos con la enzima PNGasaF para escindir los glicanos de la proteína y obtener un patrón de bandeo monodisperso. Estas dos bandas inmunorreactivas principales no se observan en ausencia del anticuerpo primario (descartando artefactos resultantes de inespecificidad del anticuerpo secundario utilizado), ni tampoco se pueden visualizar cuando el anticuerpo primario es incubado bajo las mismas condiciones pero en presencia del péptido bloqueante que corresponde a los aminoácidos 824-832 de la proteína TRPV1 de la rata y que corresponde a un segmento de la cola intracelular C-terminal del canal (péptido antigénico contra el que fue generado el anticuerpo en cuestión) (Figura 3).

Una tercera banda más ligera es detectable (Figura 3, flecha blanca), que pudiera ser consistente con reportes previos sobre variantes pequeñas de TRPV1. Por ejemplo, la variante TRPV1-5'sv, una variante de *splicing* que se genera por omisión exónica y que produce una proteína carente de un segmento de 60 aminoácidos en la cola N-terminal de la proteína (Schumacher y Eilers, 2010). Sin embargo, la inmunorreactividad observada en presencia del anticuerpo bloqueante (Figura 3, asterisco) sugiere un marcaje inespecífico.

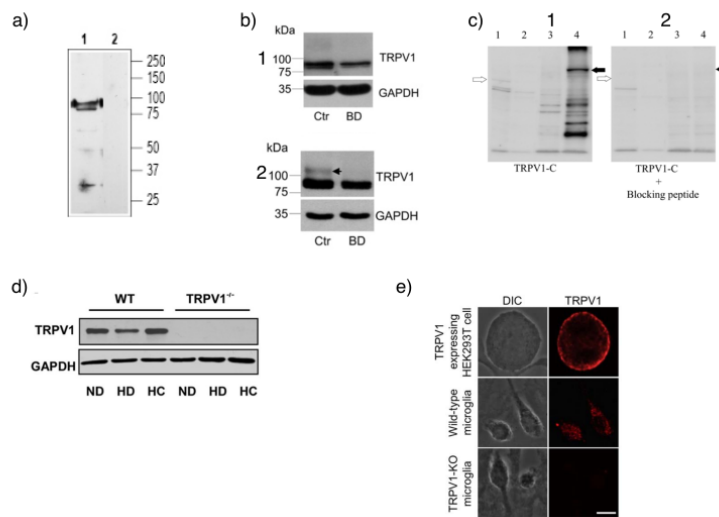


Figura 2: **Datos disponibles en la literatura respaldan la efectividad del anticuerpo Acc030 dirigido contra TRPV1** **a)** Inmunoreactividad producida por el anticuerpo sobre lisados de DRGs de la rata, reportada por el fabricante (Alomone Lab) muestra dos bandas inmunorreactivas (~90 kDa) (carril 1) que no pueden ser observadas en presencia del péptido antigénico (carril 2). **b)** 1) Inmunoreactividad sobre DRG de ratón recapitula el patrón reportado por el fabricante 2) Inmunoreactividad sobre células HEK transfectadas con TRPV1 muestran una banda adicional de mayor peso (flecha) correspondiendo a la forma del canal asociado a glicanos complejos (Ortiz-Rentería et al., 2018). **c)** Inmunoreactividad observada sobre: DRG de rata (carril 1), arteria carótida de la rata (carril 2), células HEK no transfectadas (carril 3), células HEK transfectadas con la proteína TRPV1 fusionada a GFP (carril 4) (Tóth et al., 2013). **d)** Inmunoreactividad sobre tejido adiposo de ratones tipo silvestre y TRPV1^{-/-} (Chen et al., 2015). **e)** Inmunofluorescencia sobre células HEK transfectadas con TRPV1 (Miyake et al., 2015)

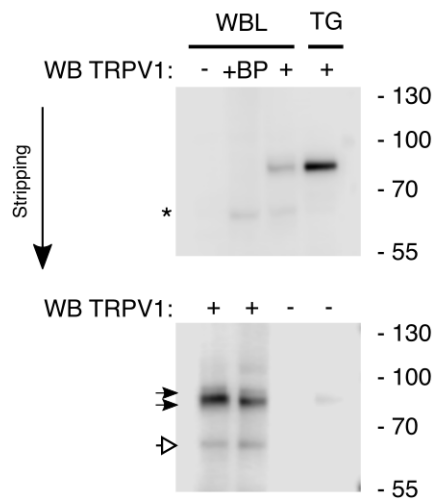


Figura 3: **Inmunoreactividad específica para TRPV1 en tejidos del sistema nervioso del ratón.** Panel superior: La inmunorreactividad observada para ganglios trigeminales (TG), donde los niveles de expresión de TRPV1 son altos, y lisados de cerebro completo (WBL)(carril 3) no se observa cuando la membrana se incuba en ausencia del anticuerpo primario (carril 1) o con el anticuerpo primario en presencia del péptido bloqueante(BP). Panel inferior: Al lavar los anticuerpos unidos a la membrana y repetir la incubación de los primeros dos carriles en presencia del anticuerpo contra TRPV1 se observa la señal previamente ausente.

Para comparar niveles de TRPV1 entre distintas regiones del CNS del ratón, se evaluaron tejidos de la médula espinal, cerebelo, hipocampo, y corteza. Nuestros datos sugieren que los niveles de TRPV1 son detectables en todas las regiones del CNS probadas, lo que sugiere una amplia distribución de este canal en el sistema nervioso central (Figura 4). Estos niveles de expresión son comparables con tejidos del intestino, donde la expresión de TRPV1 ha sido previamente reportada (Buckinx et al., 2013; Csekő et al., 2019), y cabe destacar que los niveles de TRPV1 observados en el intestino están elevados respecto de los tejidos del CNS (2.4 veces mayores respecto a la corteza). Adicionalmente los niveles observados en los lisados de los ganglios trigeminales son de igual manera mayores a los observados en el CNS en lisados totales del cerebro (7.5 veces)(Figura 4) consistente con los reportes previos que identifican a los ganglios sensoriales como los principales sitios de expresión de TRPV1 (Michael J. Caterina et al., 1997; Cavanaugh et al., 2011). Estos datos contrastan con lo reportado por Cavanaugh et al. (2011), cuyo estudio sugiere una distribución altamente compartimentalizada de TRPV1 en el cerebro adulto, donde TRPV1 se encuentra únicamente en el hipotálamo y una subpoblación de neuronas hipocampales. La discrepancia del trabajo de Cavanaugh et al. (2011) con nuestros datos y los reportados por otros grupos (W. X. Huang et al., 2014; Tóth et al., 2005), sugiere que los niveles de TRPV1 en el cerebro adulto son muy bajos (relativo a otros tejidos) y estos niveles bajos pueden quedar por debajo del límite de detección del modelo reportado por Cavanaugh et al. (2011), como ha sido propuesto previamente en otros trabajos (Marrone et al., 2017; Menigoz y Boudes, 2011).

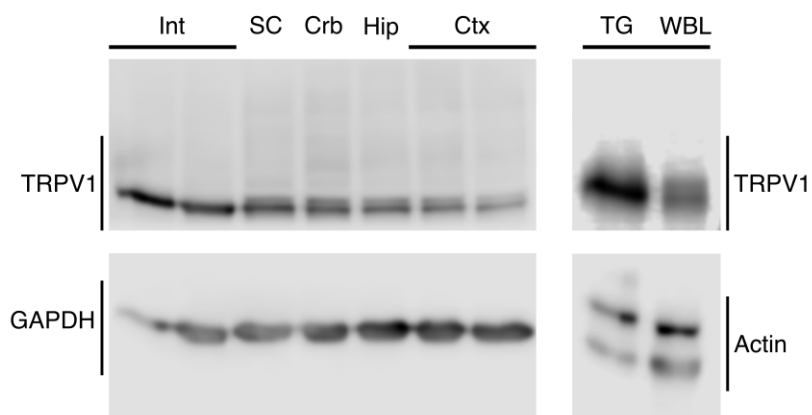


Figura 4: Niveles de TRPV1 en distintos tejidos. Los Niveles de TRPV1 fueron evaluados por *western blot*. Consistente con lo reportado en la literatura, los ganglios trigeminales y el intestino(Int) muestran prominente expresión de TRPV1. Distintos tejidos del CNS del ratón presentan niveles comparables de TRPV1. (SC: médula espinal, Crb: cerebelo, Hip: hipocampo, TG: ganglios trigeminales, WBL: lisado del cerebro completo)

Previamente se ha reportado expresión de TRPV1 en el cerebro hasta 4 meses de edad en el fondo

C57BL/6, con niveles máximos a los 2 meses de edad (W. X. Huang et al., 2014), sin embargo datos comparativos que incluyan edades más avanzadas no han sido reportados. Considerando que los niveles de TRPV1 pueden cambiar considerablemente a lo largo del desarrollo Michael J. Caterina et al. (1997) e incluso presentarse de forma transitoria en un tejido (Cavanaugh et al., 2011) resulta necesario evaluar el perfil de expresión de TRPV1 a diferentes edades en la etapa adulta. Por lo tanto, para evaluar cambios en los niveles de TRPV1 en función de la edad en el CNS del ratón adulto se realizaron ensayos de tipo *western blot* con muestras de la corteza cerebral de ratones de 2, 4, 9, y 12 meses de edad (Figura 5). Nuestros datos indican que TRPV1 es detectable en todas las edades evaluadas sugiriendo que los niveles de TRPV1 son relativamente estables en el cerebro adulto, sin diferencias estadísticamente significativas entre las edades con el número de muestras limitado que fue usado (ANOVA 1-vía, $n=3$, $p=0.43$).

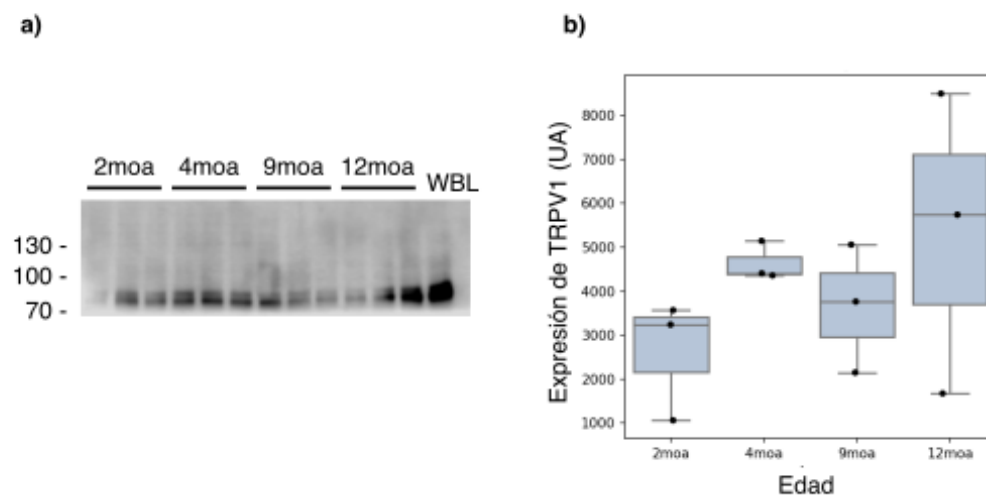


Figura 5: **Niveles corticales de TRPV1 en el ratón adulto.** Mediante ensayos de *western blot* se evaluaron los niveles de TRPV1 en la corteza cerebral de ratones de 2, 4, 9, y 12 meses de edad(MOA) (Resultados preliminares $n=3$)

Con el fin de analizar los niveles de expresión de TRPV1 mediante otra técnica, se realizaron pruebas de RT-PCR en tiempo real con química de SYBR-green para determinar la expresión del transcrito que codifica para TRPV1. Se evaluaron distintos juegos de oligonucleótidos previamente reportados en la literatura, oligonucleótidos diseñados *de novo*, y una combinación de oligonucleótidos seleccionada para generar un amplicon de mayor tamaño que los normalmente amplificados para RT-PCR cuantitativa (Cuadro 3). Bajo nuestras condiciones amplificamos de manera consistente el fragmento con el tamaño esperado para el cDNA de *Trpv1*. Desafortunadamente, debido a la presencia de amplicones no-específicos, eficiencias de amplificación subóptimas, y amplificación con valores de Ct elevados, no fue posible realizar cuantificación de los niveles del transcrito de *Trpv1* con los tejidos de interés del CNS o células en cultivo. (Figura 7). Sin embargo, los valores de Ct elevados son consistentes con los niveles

bajos de expresión reportados en la literatura y observados en este trabajo mediante ensayos de *western blot*.

En conjunto, los datos aquí mostrados sugieren que la expresión de TRPV1 en el sistema nervioso central (corteza, médula espinal, cerebelo, hipocampo) es menor a la presente en tejidos periféricos como el intestino, e incluso, el ganglio trigeminal. Estos niveles no descartan la posible relevancia fisiológica de este canal para estos tejidos; sería interesante conocer los componentes celulares donde se localiza esta expresión.

TRPV1 en la microglía

Existen múltiples reportes previos en la literatura que proveen evidencia sobre la expresión de TRPV1 en las células de la microglía (Marrone et al., 2017; Miyake et al., 2015; Schilling y Eder, 2011). Sin embargo, otros estudios, particularmente aquellos realizados mediante técnicas de secuenciación masiva, no identifican la presencia del transcrito de *Trpv1* en este tipo celular (Hammond et al., 2019; Van Hove et al., 2019). Para proveer evidencia independiente bajo nuestras condiciones, cultivos enriquecidos en microglía se obtuvieron por tripsinización desde cultivos gliales mixtos y fueron cultivados a baja densidad (100 células/mm²) en cubreobjetos para evaluar el estado de activación de la microglía y el registro de entrada de Ca²⁺. Así mismo, cultivamos a una alta densidad celular para lograr confluencia y realizar ensayos de *western blot*, y RT-PCR.

Para evaluar la pureza de los cultivos, se realizaron tinción con inmunofluorescencia contra la proteína GFAP, marcador astrocítico, y con F4/80, marcador microglial. Bajo nuestras condiciones experimentales, el enriquecimiento microglial se demostró al identificar una mayoría de células positivas para F4/80 (59% de las células) a pesar de que se detectó una cantidad considerable de astrocitos GFAP⁺ (31% de las células) residuales en el cultivo (Figura 6 a).

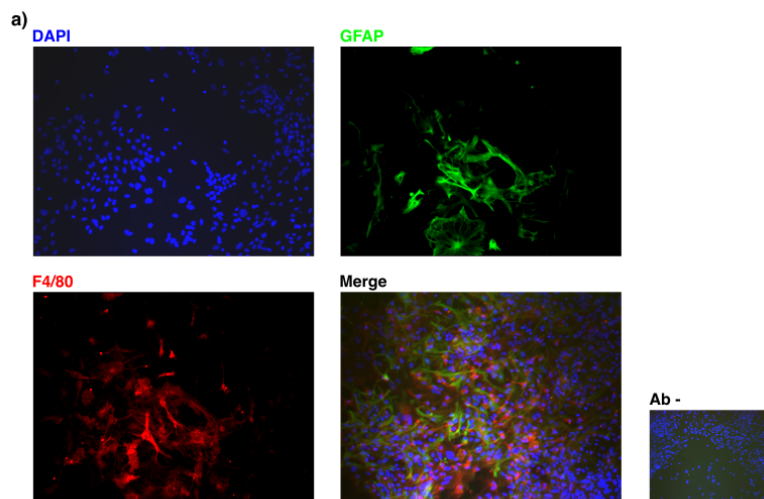


Figura 6: **Evaluación del enriquecimiento microglial en cultivos primarios.** Cultivos primarios enriquecidos en microglía fueron sembrados sobre cubreobjetos de 25mm a densidad de 100 células por mm². Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia contra microglía (F4/80, antiRat-Alexa594) y astrocitos (GFAP, antiMouse-Alexa488).

Para evaluar los niveles de TRPV1 en la microglía, así como cambios resultantes de la activación inflamatoria de la microglía, se realizaron cultivos primarios enriquecidos en microglía sembrando las células

a alta densidad (100% de confluencia) y 24 horas después se trataron con estímulos pro-inflamatorios (LPS (100 μ g/ml) o PMA(20ng/ml)). El uso de LPS (agonista de TLR4 e inductor de la activación inflamatoria) y PMA (activador de la vía de PKC e inductor de la actividad de NADPH oxidasa)(Smith et al., 1998), recapitula de forma parcial la activación microglial inducida por el péptido beta amiloide en el contexto de la EA (Jekabsone et al., 2006; Reed-Geaghan et al., 2009; Walter et al., 2007). Al final de 24 horas de estimulación, las células se lavaron dos veces con PBS y se congelaron rápidamente sobre hielo seco para la posterior obtención de lisados.

En una prueba preliminar de *western blot* no fue posible identificar la expresión de TRPV1 en cultivos primarios en ausencia de estimulación o ante estimulación con LPS, mientras que en células estimuladas con PMA observamos, de manera interesante, inmunorreactividad de una banda de ~110 kDa consistente con el peso esperado para el canal TRPV1 en su forma glicosilada (Figura 7 c)). El peso (~110 kDa) observado en este experimento para las células en cultivo contrasta con el bandedo de ~95 kDa observado para muestras de tejido cerebral, sin embargo diferencias de este tipo pueden ser resultado de las condiciones distintas entre ambas muestras (*in vitro* contra *in vivo*) que podrían resultar en un diferente procesamiento postraduccional del canal, y específicamente para TRPV1 diferencias de este tipo han sido previamente reportadas y atribuidas a diferencias en los patrones de glicosilación (Rosenbaum et al., 2002; Schumacher y Eilers, 2010; Wang et al., 2018). En este caso, el peso observado es consistente con la forma de TRPV1 asociada a glicanos complejos sensibles a corte por PNGasaF pero invulnerables al procesamiento con endoglicosidasa-H, como ha sido previamente observado en otros trabajos (Jahnel et al., 2001; Veldhuis et al., 2012). Estos resultados sugieren que al menos ciertos esquemas de activación inflamatoria son capaces de inducir la expresión de niveles proteicos de TRPV1 en cultivos enriquecidos en microglía, sin embargo experimentos adicionales serían necesarios para complementar y corroborar estos datos, incluyendo la replicación de los mismos, la validación cruzada con distintos anticuerpos anti-TRPV1, el tratamiento de los lisados con N-glicosidasa F(PNGasaF) para corroborar que las diferencias observadas en el peso molecular son atribuibles a diferencias en el estado de glicosilación de la proteína, y la comparación de la inmunorreactividad observada con el producido por células transfectadas con TRPV1 para su expresión heteróloga. Adicionalmente, el uso de agonistas de la vía de PKC adicionales a PMA podrían apoyar a esta como una ruta de señalización relevante para la regulación de la expresión de TRPV1 en estas células gliales.

Considerando que hemos identificado la presencia del transcrito de TRPV1 a partir de cultivos primarios de microglía mediante RT-PCR, aunque este no ha sido amplificado con la eficiencia necesaria para su cuantificación (Figura 7 a) y b)), esto sugiere que los niveles bajos de expresión basal de TRPV1 en estos cultivos pudiera quedar por debajo del límite de detección para los ensayos de *western blot* utilizados. Sin embargo, las pruebas de *western blot* sugieren que estos niveles de expresión podrían incrementar con la activación inflamatoria (al menos con el esquema de activación con PMA).

Durante la realización de este trabajo, fue publicado un reporte sobre la expresión de TRPV1 en cultivos microgliales primarios, así como el incremento de su expresión en respuesta al tratamiento con capsaicina, LPS, o hipertermia (Kong et al., 2019), aunque cabe destacar que la estimulación con LPS utilizada por Kong et al. (2019) es mucho mayor (1 μ g/ml) a la utilizada en este experimento.

La expresión de TRPV1 resulta en el ensamblado de un canal funcional sobre la membrana que, en respuesta a un agonista, permite el flujo catiónico y la entrada de Ca^{2+} al citoplasma, por lo tanto, la expresión y función de este canal en la microglía puede ser demostrada mediante el registro de fluctuaciones en la concentración de Ca^{2+} intracelular inducidas por capsaicina. La evaluación de los flujos de Ca^{2+} requiere de un sensor intracelular fluorescente que pueda ser detectado mediante microscopía. En este caso, el marcador intracelular fluorescente sensible a Ca^{2+} , Fluo-4 AM (Invitrogen) fue incubado con las células en cultivo para permitir su internalización y la desesterificación que resulta en la forma activa del sensor y atrapa a la molécula al interior de la célula. Pruebas de estandarización del proceso de cargado de las células con Fluo-4 AM realizadas con microscopía de epifluorescencia muestran un incremento de fluorescencia en respuesta a ionomicina (ionóforo de Ca^{2+}) en presencia de Ca^{2+} en el

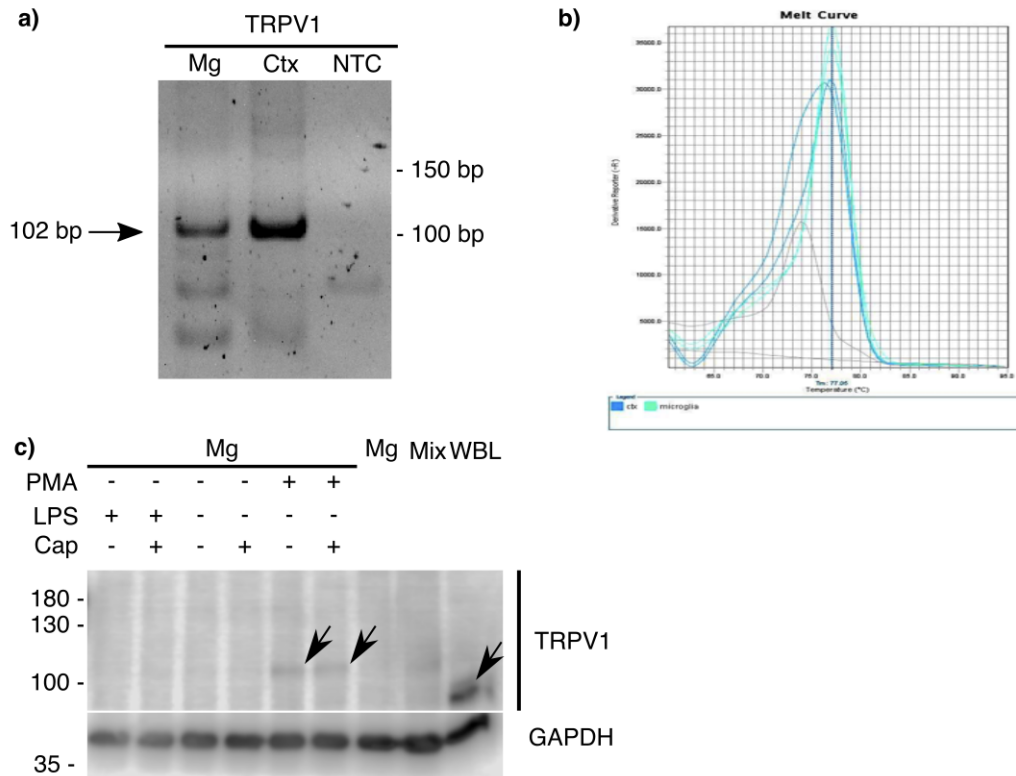


Figura 7: **Expresión de TRPV1 en cultivos primarios de microglía.** Mediante RT-PCR fue posible identificar la expresión de TRPV1 en cultivos primarios de microglía (a), sin embargo la generación de amplicones inespecíficos y la baja eficiencia de la reacción dificultan la cuantificación del transcrito (b). Mediante *western blot* se identifica inmunorreactividad en un peso de ~110 kDa para células tratadas con PMA, contrastado con inmunorreactividad en ~95 kDa observada en muestras obtenidas de tejido (c)

medio (ECS), indicando el correcto cargado y desesterificación de Fluo-4 con las condiciones utilizadas (Figura 8). En pruebas preliminares realizadas con microscopía confocal de disco giratorio se observaron eventos espontáneos de Ca^{2+} intracelular en condiciones basales, así como eventos que coinciden con la adición de capsaicina al medio solo en una población pequeña de células (3/61 células) (Figura 9). Aunque por sí solo este resultado no es conclusivo sobre la presencia de células responsivas a capsaicina en nuestras condiciones de cultivo, en experimentos subsecuentes, con una muestra más grande, se observa un claro incremento en la frecuencia de eventos de Ca^{2+} en respuesta al tratamiento con capsaicina (Figura ??).

Para evaluar la dinámica de Ca^{2+} en condiciones de estimulación inflamatoria y considerando los resultados previos sobre el incremento en los niveles de TRPV1 en la microglía activada, se utilizó un esquema de tratamiento con LPS ($1\ \mu\text{g}/\text{ml}$) y PMA ($20\text{ng}/\text{ml}$) por 24 horas previo al lavado de las células, seguido por el cargado con Fluo-4AM y la preparación de las células para microscopía. En estos experimentos, para facilitar y estandarizar el procesamiento de datos, cada imagen obtenida fue dividida en una cuadrícula 1024 cuadrantes (32×32). Cada cuadrante fue evaluado individualmente para identificar aquellos cuadrantes que contienen células (señal de Fluo-4), así como cuadrantes en los que los tratamientos con capsaicina o ionomicina resultan en un incremento rápido de fluorescencia indicando un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} .

Los datos obtenidos durante la primera fase del experimento, previo a los tratamientos, fueron analizados para identificar y comparar los eventos espontáneos de Ca^{2+} que ocurren (Figura 10). De manera interesante los resultados muestran que los eventos espontáneos de Ca^{2+} observados en condiciones control se ven drásticamente atenuados en condiciones de activación inflamatoria (Figura 10 b y d).

Estas fluctuaciones espontáneas de Ca^{2+} intracelular en la microglía han sido previamente reportadas en modelos *in vitro* e *in vivo*, y dependen de pozas intracelulares de Ca^{2+} , por lo que la reducción de estos eventos pudiera indicar desregulación o merma de estos reservorios (Brawek et al., 2014a; Korvers et al., 2016). Sin embargo, las pruebas realizadas hasta el momento no permiten la distinción entre el incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} resultante de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular, o el debido a la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico. Pruebas subsecuentes deberán realizarse para distinguir entre la entrada de Ca^{2+} a la célula y la liberación desde pozas intracelulares, así como la posible potenciación o inhibición de estos eventos de Ca^{2+} como función del estado de activación inflamatoria de las células. Para esto, se tendrá que evaluar la actividad espontánea de las células en ausencia de Ca^{2+} extracelular, así como posteriormente al tratamiento con tapsigargina para vaciar las pozas intracelulares de Ca^{2+} .

La relativa abundancia de eventos espontáneos observados bajo nuestras condiciones experimentales, en el orden del 50% de los cuadrantes conteniendo células en condiciones control durante un periodo de observación de 1 minuto, resulta interesante en el contexto de la literatura disponible que indica que en condiciones basales estos eventos de Ca^{2+} microgliales son infrecuentes, ya que solo se observan en el orden del 20% de las células durante un periodo de medición de 15 minutos (Brawek et al., 2014b; Brawek y Garaschuk, 2013a; Korvers et al., 2016). Dadas las condiciones del experimento existe la posibilidad de que exista daño celular incurrido durante el montaje de las células en la cámara de microscopía, en este caso, estos eventos de Ca^{2+} podrían ser de carácter reactivo y posiblemente resultantes de la liberación de ATP por células dañadas y la activación de corrientes de Ca^{2+} en la microglía mediadas por receptores P2X y P2Y (Brawek et al., 2014b; Brawek y Garaschuk, 2013a; Verkhatsky et al., 2012). En experimentos futuros esto podría ser evaluado mediante el tratamiento de las células con antagonistas químicos de estos receptores (PPADS, TNP-ATP) y modificando la metodología de cultivo con el fin de reducir el daño a las células.

Utilizando el mismo análisis basado en cuadrícula se continuó el análisis para las siguientes fases del experimento con el propósito de identificar los eventos de Ca^{2+} en respuesta a los tratamientos (capsai-

cina y PMA) aplicados a las células (Figura 11). Un evento de Ca^{2+} producto del estímulo fue definido cómo un cuadrante donde la diferencial máxima de la fluorescencia ($\max(\delta F/\delta t)$) en los 20 segundos subsecuentes al tratamiento excede un umbral definido como la media más 4 veces la desviación estándar de los puntos máximos en experimentos carentes de eventos espontáneos. Este enfoque permite identificar cuadrantes conteniendo respuesta a capsaicina, respuesta a ionomicina y ambas respuestas de forma subsecuente (Figura 11 b y c). Contrario a lo esperado con base en los experimentos previos de *western blot*, los datos obtenidos sugieren que la estimulación inflamatoria, tanto para la estimulación con LPS como PMA, reduce la respuesta a capsaicina en cultivos enriquecidos en microglía. Evidentemente, se requieren experimentos adicionales utilizando esquemas inflamatorios adicionales, además de experimentos con antagonistas de TRPV1 y agonistas alternativos a la capsaicina para corroborar estas observaciones.

En conjunto los datos presentados sobre la expresión del canal sugieren niveles bajos de expresión, lo que podría ser consistente con la expresión en bajos niveles distribuida uniformemente en la población de células, o con la expresión del canal TRPV1 en un subconjunto de las células analizadas. Trabajos previos, realizados tanto en condiciones *in vitro* como en cortes cerebrales, reportan inmunorreactividad contra TRPV1 solo en una fracción de las células microgliales observadas (Marrone et al., 2017; Miyake et al., 2015). Lo anterior es consistente con nuestros resultados de imagenología de Ca^{2+} donde solo se observa respuesta a capsaicina en una fracción de las células observadas en cultivos enriquecidos en microglía. Adicionalmente, los datos obtenidos son consistentes con la idea de que la expresión de TRPV1 puede ser modulada por el contexto inflamatorio en estas células. Por consiguiente, resulta de gran interés caracterizar el mecanismo a través del cual señales inflamatorias incluidas aquellas asociadas a la EA modulan la expresión de TRPV1 en el contexto microglial.

Recientemente se ha descrito la presencia de microglía cargada con gotas lipídicas en pacientes con Alzheimer, así como en modelos animales de la enfermedad (ratón 5xFAD) y ratones envejecidos (Marschallinger et al., 2020). Para evaluar la acumulación de gotas lipídicas *in-vitro* como parámetro fenotípico de la microglía disfuncional en el contexto neuroinflamatorio, cultivos primarios de microglía fueron cultivadas sobre cubreobjetos y estimulados con LPS(100ng/ml) por 24 o 48 horas. Posterior al tratamiento, las células estimuladas por 24 horas se fijaron y sometieron a la tinción de rojo oleoso, mientras que las células estimuladas por 48 horas fueron adicionalmente teñidas con BODIPY para evaluación de gotas lipídicas por microscopía de fluorescencia. Datos preliminares sugieren la acumulación de gotas lipídicas en células tratadas con LPS por 24 horas (Figura 12). Sin embargo, es necesario confirmar estas observaciones en experimentos independientes. Adicionalmente, en pruebas preliminares realizadas sobre cultivos microgliales estimulados por 48 horas con LPS no fue posible visualizar gotas lipídicas teñidas con BODIPY(Figura no incluida). Cabe mencionar que el esquema de estimulación utilizado (LPS 100ng/ml 24-48 horas) es comparativamente débil al usado por Marschallinger et al. (2020), por lo que se requieren experimentos subsecuentes para probar esquemas más agresivos de estimulación inflamatoria para la caracterización de este fenotipo, así como la evaluación de este fenómeno en células provenientes de ratones TRPV1^{-/-}.

Regulación de TRPV1 por KChIP3

La proteína KChIP3 es un sensor de Ca^{2+} y una subunidad accesoria de canales de potasio de la familia Kv4. Además, se ha demostrado que está involucrada en la fisiopatología de la EA, ya que se encuentran niveles elevados de esta proteína en el contexto de la enfermedad tanto en humanos como en modelos animales (Dong-Gyu et al., 2004; Jin et al., 2005). Adicionalmente, la carencia de KChIP3 en el modelo *knockout* mejora el desempeño de los animales en pruebas de memoria y previene la aparición de cambios asociados al envejecimiento en el cerebro (Fontán-Lozano et al., 2009). Estudios recientes identifican a KChIP3 como un regulador negativo del tráfico y retención de TRPV1 en la membrana plasmática en las neuronas del DRG (N.-X. Tian et al., 2018). Estas observaciones apuntan a KChIP3 como un potencial regulador de TRPV1 en el contexto microglial. Para evaluar los niveles de TRPV1

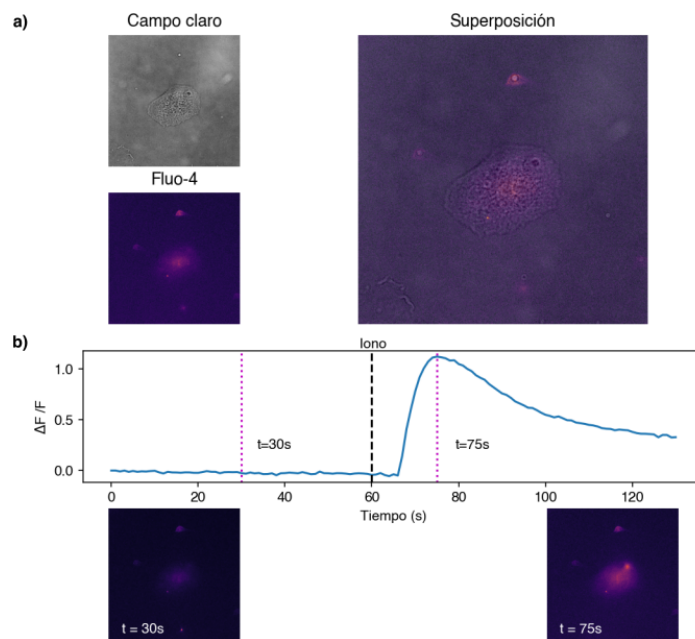


Figura 8: **Evaluación de fluctuaciones de Ca^{2+} intracelular en la microglía** Cultivos primarios de microglía sembrados sobre cubreobjetos fueron cargados con el sensor de la concentración intracelular de Ca^{2+} Fluo-4. La gráfica muestra el curso temporal de la fluorescencia intracelular en respuesta al tratamiento con el ionóforo de Ca^{2+} ionomicina(Iono) evaluado por microscopía de epifluorescencia sobre una célula.

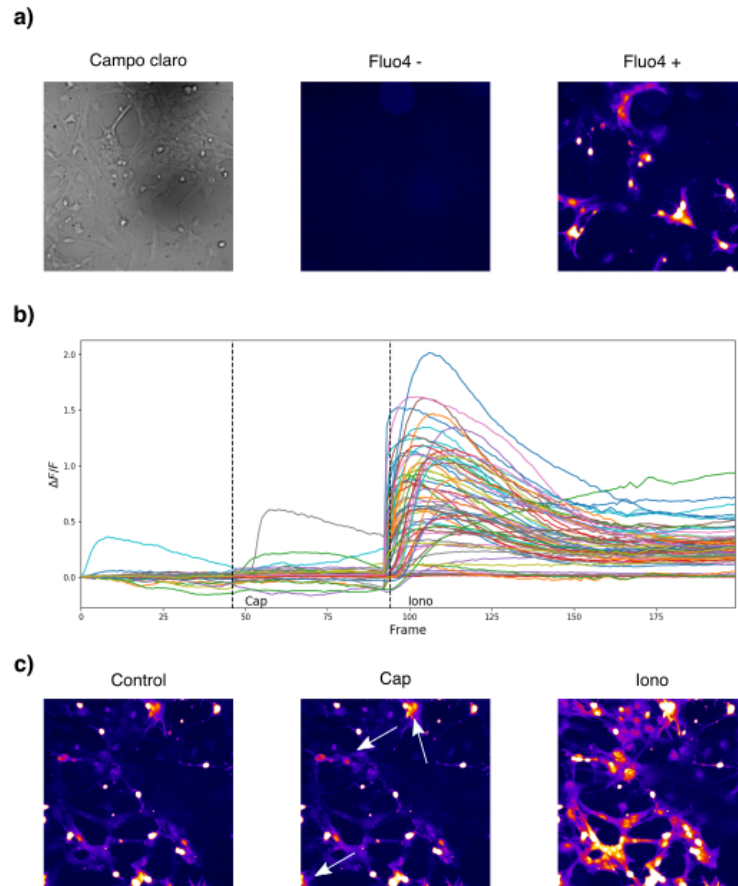


Figura 9: **Evaluación de fluctuaciones de Ca^{2+} intracelular inducidas por capsaicina en la microglía.** Cultivos primarios de microglía sembrados sobre cubreobjetos ($100 \text{ células por mm}^2$) fueron cargados con el marcador intracelular de Ca^{2+} Fluo-4. a) Niveles basales de fluorescencia para Fluo4. b) y c) Curso temporal de la intensidad de fluorescencia en respuesta al tratamiento con capsaicina (Cap, $4 \mu\text{M}$) y ionomicina ($10 \mu\text{M}$), flechas blancas indican eventos de Ca^{2+} en presencia de capsaicina.

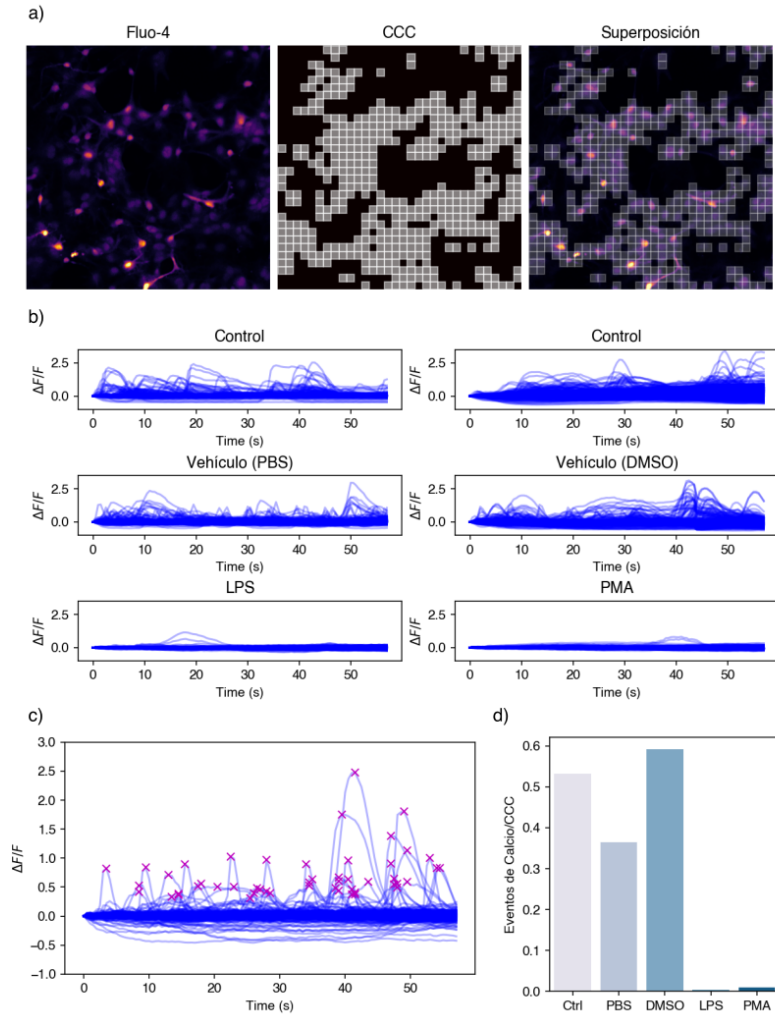


Figura 10: Eventos de calcio espontáneos en cultivos enriquecidos en microglía Cultivos primarios enriquecidos en microglía fueron sembrados sobre cubreobjetos y sometidos a tratamientos proinflamatorios durante 24 horas previo al cargado con el marcador intracelular de Ca^{2+} Fluo-4. Para facilitar el análisis de los datos, las imágenes fueron divididas en una cuadrícula de 1024 cuadrantes y cada cuadrante fue analizado. **a)** Los cuadrantes que contienen la señal de Fluo-4 (y que por lo tanto putativamente contienen segmentos de células) fueron identificados. **b)** Previo a la adición de cualquier tratamiento las células presentan eventos espontáneos de calcio, pero este fenómeno se ve atenuado en células activadas con LPS o PMA. **c)** y **d)** Identificación y cuantificación de eventos espontáneos de calcio.

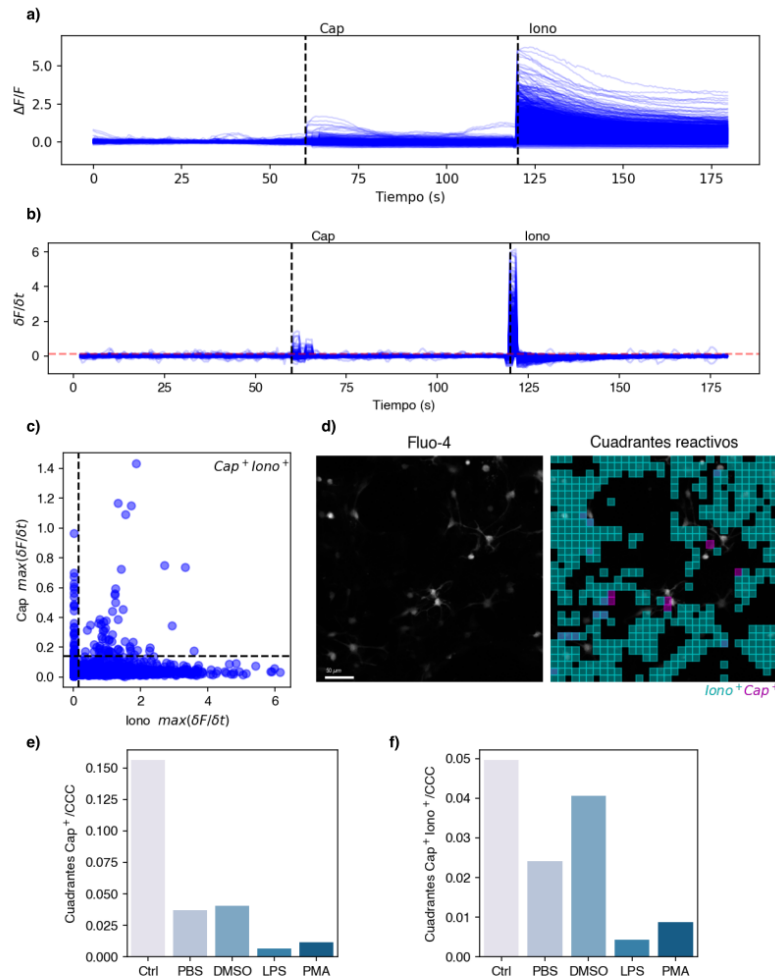


Figura 11: Respuesta a capsaicina de cultivos enriquecidos en microglía en condiciones de activación inflamatoria Cultivos primarios enriquecidos en microglía fueron estimulados con LPS o PMA por 24 horas, y cargados con Fluo-4. **a)** Señal normalizada para cada cuadrante en muestras pretratadas con PMA indicando los puntos de adición de capsaicina e ionomicina al cultivo en observación. **b)** Representación de la derivada numérica de los trazos mostrados en “a”, esto facilita la identificación de picos de actividad. **c)** Correlación entre los puntos máximos de los trazos mostrados en b. **d)** Localización de los cuadrantes reactivos a ionomicina (cian) y capsaicina (magenta). **e)** Numero normalizado de cuadrantes responsivos a Capsaicina.

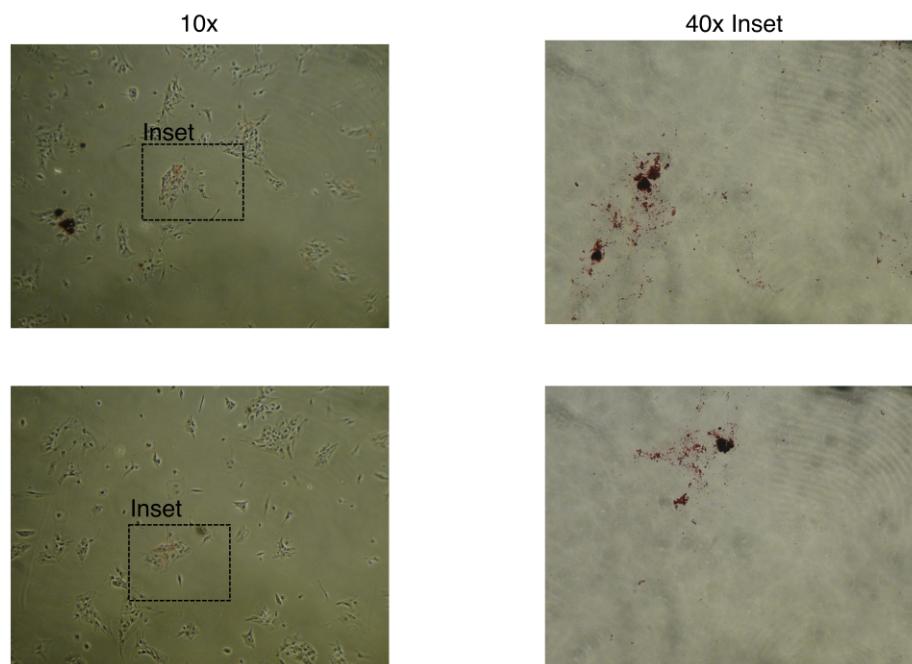


Figura 12: **Identificación preliminar de gotas lipídicas en la microglía.** Ejemplo de marcaje observado con tinción de rojo oleoso sobre cultivos microgliales estimulados con LPS por 24 horas. La tinción sugiere la presencia de gotas lipídicas

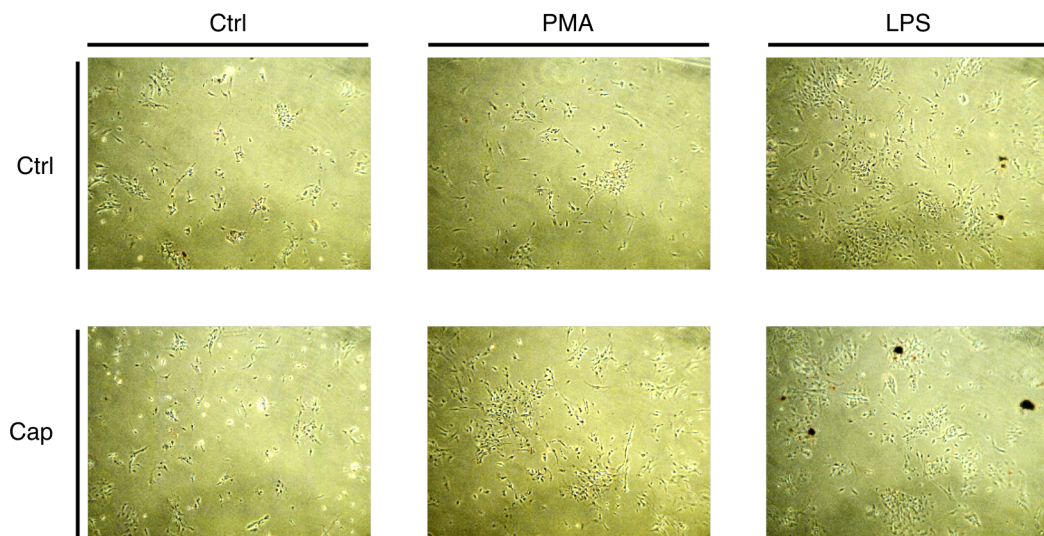


Figura 13: **Impacto de la activación microglial y la capsaicina sobre la acumulación de gotas lipídicas** Cultivos primarios de microglía fueron expuestos a estimulación con LPS o PMA en presencia o ausencia de capsaicina por 24 horas, y después las células se fijaron y fueron teñidas con rojo oleoso. Interesantemente se observa mayor deposición de rojo oleoso en células tratadas con LPS en contraste con las células control o las tratadas con PMA. El tratamiento simultáneo con capsaicina no parece tener un efecto obvio sobre la morfología celular o la deposición de rojo oleoso

en el contexto *knockout* para KChIP3 se realizaron ensayos de tipo *western blot* sobre muestras de la corteza cerebral de ratones *wildtype* y KChIP3^{-/-}. En ratones de 2 (Figura 14) y 9 meses de edad (Figura 15), los tejidos del ratón KChIP3^{-/-} presentan niveles significativamente disminuidos de TRPV1 en la corteza cerebral respecto del ratón *wildtype*. Este comportamiento no es consistente con el modelo de N.-X. Tian et al. (2018) que propone a KChIP3 como un regulador negativo de TRPV1 mediante interacción proteína-proteína, y sugiere distintas posibilidades:

1. La regulación de TRPV1 dependiente de KChIP3 se asocia al tipo celular. Mientras que a nivel de neuronas sensoriales periféricas (DRG), KChIP3 regula negativamente la abundancia de TRPV1 en la membrana celular (N.-X. Tian et al., 2018); mientras tanto, en el CNS, KChIP3 podría promover la retención de TRPV1 a nivel de membrana celular, de forma analógica a su actividad sobre canales Kv4.
2. TRPV1 pudiera ser blanco de regulación por KChIP3 a nivel transcripcional.
3. La baja expresión de TRPV1 observada en el contexto KChIP3^{-/-} podría ser un efecto secundario de la carencia de KChIP3 a través de la regulación de elementos señaladores intermedios o posiblemente mediante un mecanismo no-autónomo de la célula.

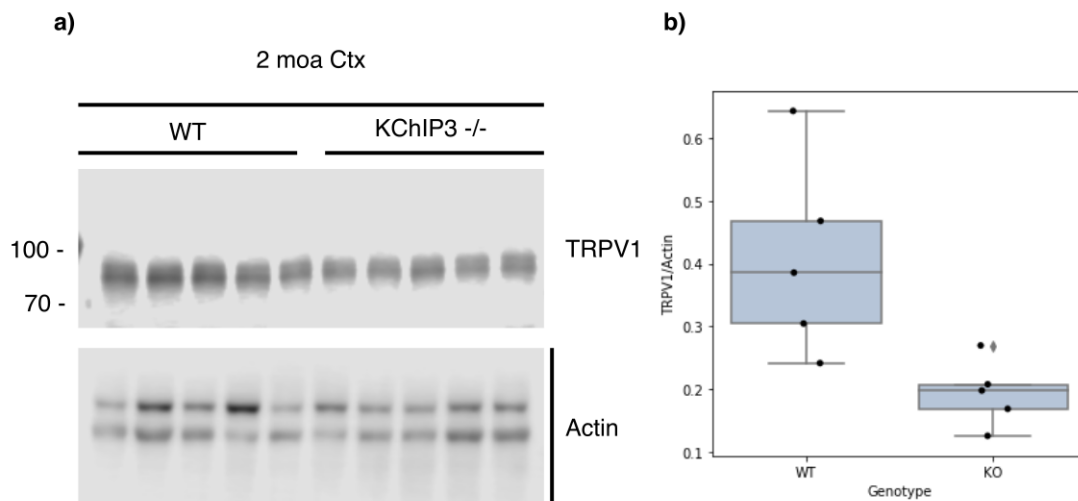


Figura 14: **Expresión de TRPV1 en la corteza cerebral del ratón KChIP3-knockout.** Ensayos tipo *western blot* realizados sobre muestras corticales de ratones de 2 meses de edad (n=5) indican que en el ratón KChIP3^{-/-} existe una expresión significativamente reducida (p=0.019) de TRPV1. a) Ensayos de *western blot* contra TRPV1 y Actina como control de carga. b) Cuantificación de “a)” normalizando los niveles de TRPV1 contra la señal total de Actina

TRPV1 en el contexto de la enfermedad de Alzheimer

Para identificar cambios en los niveles de TRPV1 en el contexto neuroinflamatorio del cerebro del ratón 5xFAD (modelo de la EA) y el ratón 5xFAD-KChIP3^{-/-}, se realizaron ensayos de tipo *western blot* sobre muestras de la corteza cerebral de estos modelos a 9 meses de edad (Figura 15). En el ratón 5xFAD no se observaron cambios significativos respecto del ratón *wild-type* en cuanto a los niveles de TRPV1. Sin embargo, de forma interesante, el ratón KChIP3^{-/-} presenta una tendencia a la baja en los niveles de TRPV1 cortical, consistente con lo observado previamente para los ratones de 2 meses de edad (Figura 14). Adicionalmente, el fondo 5xFAD-KChIP3^{-/-}, muestra una tendencia a la alta en los niveles de TRPV1 respecto del ratón KChIP3^{-/-}, aunque esta tendencia no alcanza significancia estadística ($0.1 > p > 0.05$). Este último fenómeno es consistente con el modelo de N.-X. Tian et al. (2018) descrito en neuronas sensoriales de los DRGs, donde se observa que KChIP3 actúa como regulador negativo de TRPV1 cuando existe inflamación, por lo que observaron respuestas exacerbadas dependientes de TRPV1, como la nocicepción térmica asociada a inflamación, en ausencia de KChIP3. Por lo tanto, aunque no hay cambios significativos en los niveles de TRPV1 entre los ratones *wild-type* y 5xFAD, estos resultados sugieren que KChIP3 está involucrado en mantener niveles bajos de TRPV1 dependiendo del contexto inflamatorio celular. Esto pudiera ser consistente con la función de KChIP3 como represor transcripcional, aunque aún no existe una caracterización de la regulación de KChIP3 sobre el promotor de TRPV1.

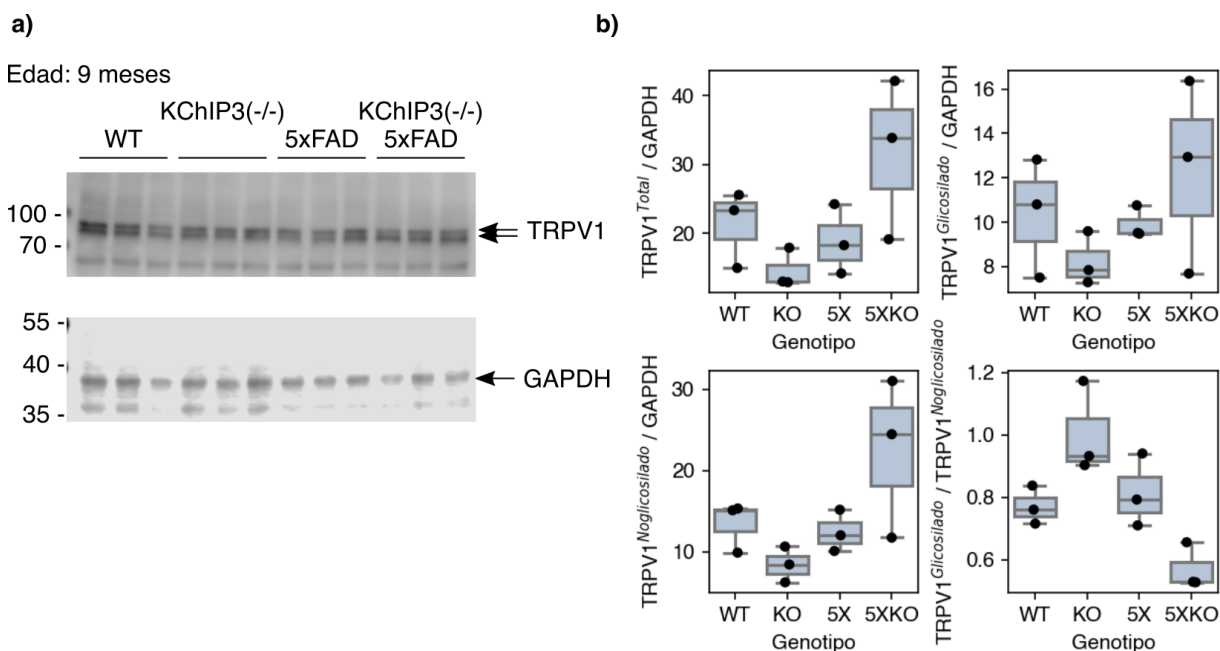


Figura 15: **Niveles de TRPV1 en el ratón 5xFAD** a) Ensayos de *western blot* contra TRPV1 en la corteza cerebral de ratones de 9 meses de edad (n=3). b) Cuantificación de TRPV1 total, TRPV1 no glicosilado, TRPV1 glicosilado, y la relación entre estas dos formas.

Con base en los datos que resultaron de este estudio, resulta interesante analizar con mayor profundidad las alteraciones en los niveles de TRPV1 en el modelo KChIP3^{-/-}, aumentando el número de experimentos y utilizando otros anticuerpos, además de complementar este enfoque con qPCR para evaluar el mensajero que codifica TRPV1, y extender la evaluación hacia otros tejidos y contextos inflamatorios. Adicionalmente, es necesaria la evaluación de estas dos proteínas en las células de la microglía a resolución de célula única (inmunofluorescencia y citometría de flujo) para evaluar la coexpresión de ambas proteínas en las mismas células lo que permitiría su interacción directa. Estudios de secuenciación ma-

siva (Zhang et al., 2014) muestran altos niveles (30 veces) del transcrito de KCHIP3 en astrocitos con respecto a la microglía, por lo que resulta posible que la regulación de TRPV1 por KCHIP3 *in vivo* sea mediada por comunicación parácrina y no interacción directa proteína-proteína.

Consideraciones sobre el anticuerpo Acc030

Hasta este punto, los resultados obtenidos con el bloqueo antigénico del anticuerpo sugieren que este es altamente específico por la secuencia de la proteína TRPV1. Sin embargo, con la intención de obtener evidencias adicionales sobre la especificidad del anticuerpo, se realizaron pruebas de *western blot* para comparar los ratones *wild-type* y TRPV1^{-/-} previamente caracterizado (M. J. Caterina et al., 2000). Previamente se ha reportado que este ratón *knockout* no expresa TRPV1, es deficiente en la función de TRPV1, y no presenta inmunorreactividad en el DRG (M. J. Caterina et al., 2000). Para verificar el genotipo del ratón *knockout* se realizaron ensayos de PCR en punto final siguiendo las condiciones estandarizadas. Este modelo *knockout* fue establecido mediante la inserción de un gen de resistencia a neomicina, lo que resulta en la interrupción del gen *Trpv1*; por lo tanto, el protocolo de genotipificación utiliza tres oligonucleótidos en una misma reacción de PCR, con dos de los oligonucleótidos formando un par productivo sobre el locus *wild-type* y genera un producto de 289pb, mientras que en el locus *knockout* el oligonucleótido *forward* es remplazado por uno complementario a la construcción introducida al gen y genera un producto de 179bp, lo que permite diferenciarlos fácilmente (Figura 16). Bajo nuestras condiciones experimentales, tanto los ratones TRPV1^{-/-} como los ratones *wild-type* mostraron un patrón de inmunorreactividad muy similar usando el anticuerpo Acc030 (Figura 16). Estos resultados ponen en duda la especificidad de este anticuerpo para reconocer a TRPV1, al menos bajo las condiciones experimentales usadas en este trabajo. Este resultado se opone directamente a múltiples reportes publicados en la literatura que utilizan este mismo anticuerpo; así también, se opone a estudios previos donde caracterizan la ausencia de TRPV1 en esta línea de ratones *knockout* (Bertin et al., 2014; M. J. Caterina et al., 2000; Chen et al., 2015; H. S. Kim et al., 2014). Revisando con detenimiento la literatura sobre el anticuerpo ACC030 identificamos un reporte previo (Sand et al., 2015) donde encontraron resultados semejantes usando el mismo anticuerpo y la misma línea de ratones *knockout*, tanto en muestras de aorta como en los DRGs. Por otro lado, Hurtado-Zavala et al. (2017) analizaron la expresión de TRPV1 en el hipocampo del ratón y encontraron que en los ratones TRPV1^{-/-} de esta línea presentan niveles detectables del transcrito que codifica TRPV1 cuando estos son evaluados con oligonucleótidos que corresponden a las secuencias que codifican para el N-terminal y el C-terminal de la proteína, mientras que el uso de oligonucleótidos complementarios a la región del poro (eliminada en el *knockout*) no produce una señal detectable. Adicionalmente, mientras que un anticuerpo dirigido contra el N-terminal de TRPV1 marca una subpoblación de neuronas hipocampales y no produce inmunorreactividad en los ratones *knockout*, un anticuerpo dirigido contra el C-terminal de TRPV1 marca las mismas neuronas de forma selectiva, pero produce inmunorreactividad en los ratones *knockout*; por lo que estos autores plantean la posibilidad de que los ratones *knockout*, aunque desprovistos de la función de TRPV1, retienen la expresión del segmento C-terminal de la proteína, posiblemente a través de procesos naturales o aberrantes de *splicing* (Hurtado-Zavala et al., 2017) Considerando estos datos contradictorios es necesario diseñar experimentos adicionales que nos permitan evaluar de manera definitiva la especificidad del anticuerpo Acc030. Para ello se deberá:

1. Comparar la reactividad de Acc030 con otros anticuerpos desarrollados contra TRPV1, e incrementar la resolución con la que proteínas individuales son separadas, optimizando las condiciones de electroforesis para los ensayos de *western blot*, o de ser necesario incluyendo ensayos de *western blot* bidimensionales.
2. Validar la ausencia de TRPV1 en la línea TRPV1^{-/-} utilizada en este estudio, y descartar efectos relacionados a la deriva genética de la línea utilizada, usando una fuente alternativa de tejido *knockout*.
3. Caracterizar la composición del inmunoprecipitado que produce el anticuerpo ACC030 sobre la corteza cerebral y el ganglio trigeminal mediante técnicas de proteómica (cromatografía líquida

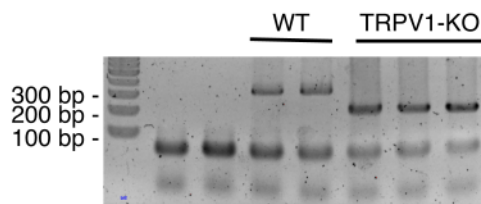
acoplada a espectrometría de masas en tándem)

4. Verificar los resultados obtenidos de los ratones 5xFAD, y KChIP3^{-/-} mediante técnicas ortogonales como RT-qPCR e imagenología de Ca²⁺.

Para este propósito iniciamos las pruebas preliminares de estandarización para dos anticuerpos comerciales adicionales: Santa Cruz Biotech E-8 (SC-398417) y Neruomab N221/17. Adicionalmente, utilizamos células HEK293 para la expresión heteróloga de TRPV1 a fin de proporcionar un segundo control de especificidad en la evaluación de los anticuerpos analíticos. Sin embargo, bajo las condiciones probadas hasta el momento, ninguno de estos fue capaz de producir un patrón claro de inmunorreactividad en el ganglio trigeminal y células HEK293-TRPV1 (controles positivos de la expresión de TRPV1), ni distinguir entre tejidos *wild type* y TRPV1^{-/-}, por lo que actualmente estamos optimizando las condiciones para estos los ensayos. Alternativamente, y con el propósito de obtener otro eje de evidencia sobre las consecuencias inflamatorias de la activación de TRPV1 en el contexto mieloide, realizamos pruebas de transfección sobre células Raw-Blue, una línea celular de macrófagos que expresa fosfatasa alcalina secretada (SEAP) bajo el control de los factores transcripcionales proinflamatorios NF-κB y AP-1, y sirve entonces como un reportero *in vitro* de la activación inflamatoria. Sin embargo, con las condiciones de transfección probadas (Lipofectamina-2000) no pudimos obtener una eficiencia de transfección suficiente para continuar con estos experimentos.

Considerando los siguientes puntos: que el patrón de inmunorreactividad observado es idéntico al que sería esperado para TRPV1, que los niveles de inmunorreactividad en los ganglios sensoriales son mas altos que en tejidos del CNS, que el la inmunorreactividad producida puede ser desplazada por completo con el péptido antigénico, que este péptido antigénico no presenta homología con otras proteínas, y que por PCR usando oligonucleótidos complementarios hemos detectado transcritos que codifican para TRPV1; hemos incluido los resultados obtenidos como tal, en calidad de preliminares y pendientes de pruebas adicionales de validación de los anticuerpos utilizados y de la línea de ratones TRPV1^{-/-}.

a) PCR



b) WB: anti-TRPV1

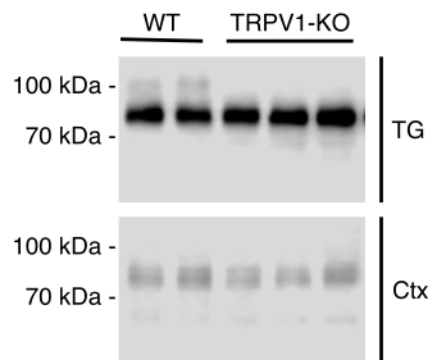


Figura 16: **Evaluación de inmunorreactividad en tejidos TRPV1^{-/-}**. **a)** El genotipo de los ratones fue verificado por PCR; gDNA obtenido de ratones TRPV1^{-/-} produce un amplicón de ~200bp, mientras que gDNA de ratones *wildtype* produce un amplicón de ~300bp consistente con lo esperado (ver sección de métodos). **b)** En ensayos de tipo *western blot* se observa inmunorreactividad para TRPV1 independientemente del genotipo.

Conclusiones

Los estudios publicados difieren considerablemente respecto a los patrones de inmunorreactividad contra TRPV1 y detección del transcrito que lo codifica. En conjunto los datos aquí mostrados aportan a la controversia en la literatura sobre la expresión y relevancia fisiológica de TRPV1 en el sistema nervioso central y la microglía. En este trabajo se presentan resultados preliminares que, de ser corroborados con muestras mas grandes y técnicas ortogonales, apoyan la expresión de TRPV1 en tejidos del CNS de ratón, así como la presencia de TRPV1 en cultivos primarios enriquecidos en microglía. Con el uso de imagenología de Ca^{2+} se identificaron células responsivas al tratamiento con capsaicina que están presentes en baja proporción en cultivos enriquecidos en microglía.

Aunque preliminares, estos resultados son consistentes con niveles bajos de expresión de TRPV1 en el sistema nervioso central y en la microglía. Los niveles bajos de TRPV1 parecen resultar de la expresión del canal en una población minoritaria de células gliales. Sin embargo, esto no descarta la relevancia fisiológica de esta subpoblación pequeña de células ni la contribución de TRPV1 a la regulación neuroinflamatoria en el contexto de la EA. También surge la posibilidad de que el fenotipo antiinflamatorio y neuroprotector asociado a la ausencia de TRPV1 en el ratón *knockout* resulte, además de los escasos elementos del sistema nervioso central con expresión de este canal, de actores periféricos donde la expresión de TRPV1 es más prominente.

El caso del canal TRPV1 podría ejemplificar la importancia de proteínas con bajos niveles para definir subpoblaciones biológicamente relevantes. Las tecnologías emergentes de análisis a nivel de célula única han permitido elucidar con gran detalle las poblaciones microgliales definidas por genes altamente expresados, sin embargo, el papel biológico de genes con baja expresión para definir subpoblaciones o matizar subpoblaciones predefinidas, permanece como una pregunta abierta cuya resolución presenta importantes retos técnicos.

Perspectivas

Verificar la expresión microglial de TRPV1

- Evaluación de anticuerpos alternativos para apoyar los ensayos de western blot realizados.
- Acoplamiento de imagenología de Ca^{2+} a inmunofluorescencia o uso de ratones reporteros microgliales para lograr la atribución inequívoca de los resultados de imagenología específicamente a células microgliales.
- Realizar experimentos de citometría de flujo con anticuerpos contra TRPV1 y marcadores de distintos tipos celulares del CNS para identificar subpoblaciones TRPV1⁺.
- Uso de citometría de flujo para identificar poblaciones TRPV1⁺ por inmunorreactividad y respuestas a capsaicina por reportero sensible a Ca^{2+} , con el procesamiento de un número elevado de células.
- Aislamiento por FACS de células TRPV1⁺ para caracterización molecular.
- Extender los experimentos de imagenología de Ca^{2+} a células expuestas a una gama más amplia de estímulos inflamatorios.

Evaluar el Impacto fisiológico de TRPV1 para las células microgliales

- Realizar transfección de TRPV1 sobre líneas celulares mieloides, líneas celulares de microglía, y cultivos primarios de microglía, para evaluar el impacto de la expresión de este canal sobre la respuesta inflamatoria de estas células (durante el desarrollo de este trabajo se realizaron experimentos preliminares de transfección, pero no obtuvimos eficiencias de transfección lo suficientemente altas para realización de experimentos subsecuentes).

Evaluar el Impacto fisiológico de TRPV1 en el contexto de la Enfermedad de Alzheimer

- Caracterización conductual del ratón 5xFAD TRPV1 *knockout* para evaluar si el fenotipo preservante de la capacidad cognitiva reportada recientemente para el ratón se extiende a este modelo.
- Evaluación del fenotipo del ratón 5xFAD-TRPV1KO, y ratones *knockout* específicos de la microglía.
- Realizar experimentos para caracterizar los eventos de Ca^{2+} inducidos por capsaicina como mediados por entrada de calcio desde el exterior celular o dependientes de pozas intracelulares de calcio.
- Realizar experimentos de imagenología de Ca^{2+} sobre células microgliales provenientes de ratones TRPV1^{-/-} y Kchip3^{-/-}.
- Realizar transfección de TRPV1 sobre cultivos microgliales y astrocíticos para evaluar el impacto de este canal sobre el estado inflamatorio en respuesta a péptido beta amiloide.

Referencias

- Alexander, Jon C., McDermott, Carmel M., Tunur, Tumay, Rands, Vicky, Stelly, Claire, Karhson, Debra, ... Schrader, Laura A. (2009). The role of calsenilin/DREAM/KChIP3 in contextual fear conditioning. *Learning and Memory*, 16(3), 167-177. doi:10.1101/lm.1261709
- Álvarez-Arellano, Lourdes, Pedraza-Escalona, Martha, Blanco-Ayala, Tonali, Camacho-Concha, Nohe-mí, Cortés-Mendoza, Javier, Pérez-Martínez, Leonor, y Pedraza-Alva, Gustavo. (2018). Autophagy impairment by caspase-1-dependent inflammation mediates memory loss in response to β -Amyloid peptide accumulation. *Journal of Neuroscience Research*, 96(2), 234-246. doi:10.1002/jnr.24130
- Benito, Cristina, Tolón, Rosa María, Castillo, Ana Isabel, Ruiz-Valdepeñas, Lourdes, Martínez-Orgado, José Antonio, Fernández-Sánchez, Francisco Javier, ... Romero, Julián. (2012). β -Amyloid exacerbates inflammation in astrocytes lacking fatty acid amide hydrolase through a mechanism involving PPAR- α , PPAR- γ and TRPV1, but not CB1 or CB2 receptors. *British Journal of Pharmacology*, 166(4), 1474-1489. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01889.x
- Bennion, Douglas, Jensen, Tyron, Walther, Curtis, Hamblin, John, Wallmann, Andrew, Couch, Jason, ... Edwards, Jeffrey G. (2011). Transient receptor potential vanilloid 1 agonists modulate hippocampal CA1 LTP via the GABAergic system. *Neuropharmacology*, 61(4), 730-738. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.05.018
- Bertin, Samuel, Aoki-Nonaka, Yukari, De Jong, Petrus Rudolf, Nohara, Lilian L., Xu, Hongjian, Stanwood, Shawna R., ... Raz, Eyal. (2014). The ion channel TRPV1 regulates the activation and proinflammatory properties of CD4+T cells. *Nature Immunology*, 15(11), 1055-1063. doi:10.1038/ni.3009
- Betensky, Rebecca A., y Frosch, Matthew P. (2014). Differential relationships of Reactive Astrocytes and Microglia to fibrillar amyloid deposits in Alzheimer Disease, 72(6), 462-471. doi:10.1097/NEN.0b013e3182933788.Differential
- Bezprozvanny, Ilya. (2009). Calcium signaling and neurodegenerative diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 15(3), 89-100. doi:10.1016/j.molmed.2009.01.001
- Bitan, G., Kirkitadze, M. D., Lomakin, A., Vollers, S. S., Benedek, G. B., y Teplow, D. B. (2003). Amyloid beta -protein (A β) assembly: A β 40 and A β 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(1), 330-335. doi:10.1073/pnas.222681699
- Bitan, Gal, Vollers, Sabrina S., y Teplow, David B. (2003). Elucidation of primary structure elements controlling early amyloid β -protein oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), 34882-34889. doi:10.1074/jbc.M300825200
- Blanco-Ayala, Tonali. (2017). Efecto del proceso inflamatorio inducido por la presencia de péptidos β -amiloides sobre la función mitocondrial en células de la microglía en un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer.
- Bohlen, Christopher J., Bennett, F. Chris, Tucker, Andrew F., Collins, Hannah Y., Mulinyawe, Sara B., y Barres, Ben A. (2017). Diverse Requirements for Microglial Survival, Specification, and Function Revealed by Defined-Medium Cultures. *Neuron*, 94(4), 759-773.e8. doi:10.1016/j.neuron.2017.04.043
- Bok, Eugene, Chung, Young Cheul, Kim, Ki Suk, Baik, Hyung Hwan, Shin, Won Ho, y Jin, Byung Kwan. (2018). Modulation of M1/M2 polarization by capsaicin contributes to the survival of dopaminergic neurons in the lipopolysaccharide-lesioned substantia nigra in vivo. *Experimental and Molecular Medicine*, 50(7). doi:10.1038/s12276-018-0111-4
- Braak, H., y Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica*, 82(4), 239-259. doi:10.1007/BF00308809

- Brandt, Michael R., Beyer, Chad E., y Stahl, Stephen M. (2012). TRPV1 antagonists and chronic pain: Beyond thermal perception. *Pharmaceuticals*, 5(2), 114-132. doi:10.3390/ph5020114
- Brawek, Bianca, y Garaschuk, Olga. (2013a). Cell Calcium Microglial calcium signaling in the adult , aged and diseased brain. *Cell Calcium*, 53(3), 159-169. doi:10.1016/j.ceca.2012.12.003
- Brawek, Bianca, y Garaschuk, Olga. (2013b). Microglial calcium signaling in the adult, aged and diseased brain. *Cell Calcium*, 53(3), 159-169. doi:10.1016/j.ceca.2012.12.003
- Brawek, Bianca, y Garaschuk, Olga. (2014). Network-wide dysregulation of calcium homeostasis in Alzheimer's disease. *Cell and Tissue Research*, 357(2), 427-438. doi:10.1007/s00441-014-1798-8
- Brawek, Bianca, Schwendele, Bernd, Riester, Karin, Kohsaka, Shinichi, Lerdkrai, Chommanad, Liang, Yajie, y Garaschuk, Olga. (2014a). Impairment of in vivo calcium signaling in amyloid plaque - associated microglia. *Acta Neuropathol.* doi:10.1007/s00401-013-1242-2
- Brawek, Bianca, Schwendele, Bernd, Riester, Karin, Kohsaka, Shinichi, Lerdkrai, Chommanad, Liang, Yajie, y Garaschuk, Olga. (2014b). Impairment of in vivo calcium signaling in amyloid plaque-associated microglia. *Acta Neuropathologica*, 127(4), 495-505. doi:10.1007/s00401-013-1242-2
- Brown, Guy C., y Neher, Jonas J. (2014). Microglial phagocytosis of live neurons. *Nature Publishing Group*, 15(4), 209-216. doi:10.1038/nrn3710
- Buckinx, Roeland, Nassauw, Luc van, Avula, Leela R., Alpaerts, Katrien, Adriaensen, Dirk, y Timmermans, Jean Pierre. (2013). Transient receptor potential vanilloid type 1 channel (TRPV1) immunolocalization in the murine enteric nervous system is affected by the targeted C-terminal epitope of the applied antibody. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 61(6), 421-432. doi:10.1369/0022155413484764
- Butovsky, Oleg, Jedrychowski, Mark P., Moore, Craig S., Cialic, Ron, Lanser, Amanda J., Gabriely, Galina, ... Weiner, Howard L. (2014). Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nature Neuroscience*, 17(1), 131-143. doi:10.1038/nn.3599
- Cahalan, Michael D., Wulff, Heike, y Chandy, K. G. (2001). Molecular Properties and Physiological Roles of Ion Channels in the Immune System. *Journal of Clinical Immunology*, 21(4). doi:10.1023/a:1010958907271
- Carson, Monica J., Doose, Jonathan M., Melchior, Benoit, Schmid, Christoph D., y Ploix, Corinne C. (2006). CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunological reviews*, 213, 48-65. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00441.x
- Castellani, Rudy J., y Smith, Mark A. (2011). Compounding artefacts with uncertainty, and an amyloid cascade hypothesis that is 'too big to fail'. *Journal of Pathology*, 224(2), 147-152. doi:10.1002/path.2885
- Caterina, M. J., Leffler, A., Malmberg, A. B., Trafton, J., Koltzenburg, M., Basbaum, A. I., y Julius, D. (2000). Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor, 288(April), 306-314.
- Caterina, Michael J., Schumacher, Mark A., Tominaga, Makoto, Rosen, Tobias A., Levine, Jon D., y Julius, David. (1997). The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653), 816-824. doi:10.1038/39807
- Cavanaugh, D. J., Chesler, A. T., Jackson, A. C., Sigal, Y. M., Yamanaka, H., Grant, R., ... Basbaum, A. I. (2011). Trpv1 Reporter Mice Reveal Highly Restricted Brain Distribution and Functional Expression in Arteriolar Smooth Muscle Cells. *Journal of Neuroscience*, 31(13), 5067-5077. doi:10.1523/JNEUROSCI.6451-10.2011
- Chandran, Remya, Kumar, Mantosh, Kesavan, Lakshmi, Jacob, Reena Sarah, Gunasekaran, Sowmya, Lakshmi, Sethu, ... Omkumar, R. V. (2019). Cellular calcium signaling in the aging brain. *Journal of*

- Chemical Neuroanatomy*, 95(May), 95-114. doi:10.1016/j.jchemneu.2017.11.008
- Chen, Jian, Li, Li, Li, Yingsha, Liang, Xia, Sun, Qianqian, Yu, Hao, ... Zhao, Zhigang. (2015). Activation of TRPV1 channel by dietary capsaicin improves visceral fat remodeling through connexin43-mediated Ca²⁺ + Influx. *Cardiovascular Diabetology*, 1-14. doi:10.1186/s12933-015-0183-6
- Chomczynski, Piotr, y Sacchi, Nicoletta. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nature Protocols*, 1(2), 581-585. doi:10.1038/nprot.2006.83
- Christina Patterson. (2018). *World Alzheimer Report 2018 - The state of the art of dementia research: New frontiers* (pp. 1-48). London: Alzheimer's Disease International. doi:10.3354/meps143077
- Colonna, Marco, y Butovsky, Oleg. (2017). Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annual Review of Immunology*, 35(1), 441-468. doi:10.1146/annurev-immunol-051116-052358
- Cowan, Maureen, y Petri, William A. (2018). Microglia: Immune Regulators of Neurodevelopment. *Frontiers in Immunology*, 9(November), 1-8. doi:10.3389/fimmu.2018.02576
- Csekő, Kata, Beckers, Bram, Keszthelyi, Daniel, y Helyes, Zsuzsanna. (2019). Role of TRPV1 and TRPA1 Ion Channels in Inflammatory Bowel Diseases: Potential Therapeutic Targets? *Pharmaceuticals*, 12(2), 48. doi:10.3390/ph12020048
- Cummings, Jeffrey L., y Zarit, Judy M. (1987). Probable Alzheimer 's Disease in Artist. *JAMA*, 258(19).
- De Simone, R., Ambrosini, E., Carnevale, D., Ajmone-Cat, M. A., y Minghetti, L. (2007). NGF promotes microglial migration through the activation of its high affinity receptor: Modulation by TGF-?? *Journal of Neuroimmunology*, 190(1-2), 53-60. doi:10.1016/j.jneuroim.2007.07.020
- Derbenev, Andrei V., y Zsombok, Andrea. (2016). Potential therapeutic value of TRPV1 and TRPA1 in diabetes mellitus and obesity. *Semin Immunopathol*, 38(3), 397-406. doi:10.1007/s00281-015-0529-x.Potential
- Di Virgilio, Francesco, Sarti, Alba Clara, y Grassi, Fabio. (2018). Modulation of innate and adaptive immunity by P2X ion channels. *Current Opinion in Immunology*, 52, 51-59. doi:10.1016/j.coi.2018.03.026
- Dominy, Stephen S., Lynch, Casey, Ermini, Florian, Benedyk, Malgorzata, Marczyk, Agata, Konradi, Andrei, ... Potempa, Jan. (2019). Porphyromonas gingivalis in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Science Advances*, 5(1), 1-22. doi:10.1126/sciadv.aau3333
- Dong-Gyu, Jo, Joo-Yong, Lee, Yeon-Mi, Hong, Sungmin, Song, Inhee, Mook-Jung, Jae-Young, Koh, y Yong-Keun, Jung. (2004). Induction of pro-apoptotic calsenilin / DREAM / KChIP3 in Alzheimer 's disease and cultured neurons after amyloid-beta exposure. *Journal of Neurochemistry*, 88(3), 604-611. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.02159.x
- Du, Yehong, Fu, Min, Huang, Zhilin, Tian, Xin, Li, Junjie, Pang, Yayan, ... Dong, Zhifang. (2020). TRPV1 activation alleviates cognitive and synaptic plasticity impairments through inhibiting AMPAR endocytosis in APP23/PS45 mouse model of Alzheimer's disease. *Aging Cell*, (July 2019), 1-12. doi:10.1111/accel.13113
- Echeverry, Santiago, Rodriguez, María Juliana, y Torres, Yolima P. (2016). Transient Receptor Potential Channels in Microglia: Roles in Physiology and Disease. *Neurotoxicity Research*, 30(3), 467-478. doi:10.1007/s12640-016-9632-6
- Eder, Claudia. (2005). Regulation of microglial behavior by ion channel activity. *Journal of Neuroscience Research*, 81(3), 314-321. doi:10.1002/jnr.20476

- Eimer, William A., y Vassar, Robert. (2013). Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal A β 42 accumulation and Caspase-3 activation. *Molecular Neurodegeneration*, 8(1), 2. doi:10.1186/1750-1326-8-2
- Elmore, Monica R. P., Najafi, Allison R., Koike, Maya A., Dagher, Nabil N., Spangenberg, Elizabeth E., Rice, Rachel A., ... Green, Kim N. (2014). Colony-Stimulating Factor 1 Receptor Signaling Is Necessary for Microglia Viability , Unmasking a Microglia Progenitor Cell in the Adult Brain. *Neuron*, 82(2), 380-397. doi:10.1016/j.neuron.2014.02.040
- Erkkinen, Michael G., Kim, Mee-ohk, y Geschwind, Michael D. (2017). Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. doi:10.1101/cshperspect.a033118
- Farhadian, Shelli F., Mehta, Sameet S., Zografou, Chrysoula, Robertson, Kevin, Price, Richard W., Pappalardo, Jenna, ... Spudich, Serena S. (2018). Single-cell RNA sequencing reveals microglia-like cells in cerebrospinal fluid during virologically suppressed HIV, 3(18), 1-7.
- Feske, Stefan, Wulff, Heike, y Skolnik, Edward Y. (2015). *Ion Channels in Innate and Adaptive Immunity* (Vol. 33, pp. 291-353). doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112212
- Fontán-Lozano, Ángela, Romero-Granados, Rocío, Del-Pozo-Martín, Yaiza, Suárez-Pereira, Irene, Delgado-García, José María, Penninger, Josef M., y Carrión, Ángel Manuel. (2009). Lack of DREAM Protein Enhances Learning and Memory and Slows Brain Aging. *Current Biology*, 19(1), 54-60. doi:10.1016/j.cub.2008.11.056
- Franceschi, Claudio, y Campisi, Judith. (2014). Chronic inflammation (Inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 69, S4-S9. doi:10.1093/gerona/glu057
- Fujita, Ryouyuke, Ma, Yan, y Ueda, Hiroshi. (2008). Lysophosphatidic acid-induced membrane ruffling and brain-derived neurotrophic factor gene expression are mediated by ATP release in primary microglia. *Journal of Neurochemistry*, 107(1), 152-160. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05599.x
- Fulop, Tamas, Larbi, Anis, Khalil, Abdelouahed, Cohen, Alan A., y Witkowski, Jacek M. (2019). Are We Ill Because We Age? *Frontiers in Physiology*, 10(December). doi:10.3389/fphys.2019.01508
- Gosselin, David, Skola, Dylan, Coufal, Nicole G., Holtman, Inge R., Schlachetzki, Johannes C. M., Sajti, Eniko, ... Glass, Christopher K. (2017). An environment-dependent transcriptional network specifies human microglia identity. *Science*, 356(6344), 1248-1259. doi:10.1126/science.aal3222
- Gouin, Olivier, L'Herondelle, Killian, Lebonvallet, Nicolas, Gall-Ianotto, Christelle Le, Sakka, Mehdi, Buhé, Virginie, ... Garrec, Raphael Le. (2017). TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation : pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. *Protein & Cell*, 8(9), 644-661. doi:10.1007/s13238-017-0395-5
- Graham, W. Vallen, Bonito-Oliva, Alessandra, y Sakmar, Thomas P. (2017). Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies. *Annual Review of Medicine*, 68(1), 413-430. doi:10.1146/annurev-med-042915-103753
- Grieb, Paweł. (2016). Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. *Molecular Neurobiology*, 53(3), 1741-1752. doi:10.1007/s12035-015-9132-3
- Guneykaya, Dilansu, Ivanov, Andranik, Hernandez, Daniel Perez, Haage, Verena, Wojtas, Bartosz, Meyer, Niklas, ... Wolf, Susanne A. (2018). Transcriptional and Translational Differences of Microglia from Male and Female Brains. *Cell Reports*, 24(10), 2773-2783.e6. doi:10.1016/j.celrep.2018.08.001
- Hall, Alicia M., y Roberson, Erik D. (2012). Mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*, 88(1), 3-12. doi:10.1016/j.brainresbull.2011.11.017

- Hammond, Timothy R., Dufort, Connor, Dissing-Olesen, Lasse, Giera, Stefanie, Young, Adam, Wysoker, Alec, ... Stevens, Beth. (2019). Single-Cell RNA Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes. *Immunity*, 50(1), 253-271.e6. doi:10.1016/j.immuni.2018.11.004
- Hasan, Raquibul, y Zhang, Xuming. (2018). Ca²⁺ Regulation of TRP Ion Channels. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1256. doi:10.3390/ijms19041256
- Hassan, Samia, Eldeeb, Khalil, Millns, Paul J., Bennett, Andrew J., Alexander, Stephen P. H., y Kendall, David A. (2014). Cannabidiol enhances microglial phagocytosis via transient receptor potential (TRP) channel activation. *British Journal of Pharmacology*, 171(9), 2426-2439. doi:10.1111/bph.12615
- Hellwig, Sabine, Masuch, Annette, Nestel, Sigrun, Katzmarski, Natalie, Meyer-Luehmann, Melanie, y Biber, Knut. (2015). Forebrain microglia from wild-type but not adult 5xFAD mice prevent amyloid-beta plaque formation in organotypic hippocampal slice cultures. *Scientific reports*, 5(April), 14624. doi:10.1038/srep14624
- Heneka, Michael T., Golenbock, Douglas T., y Latz, Eicke. (2015). Innate immunity in Alzheimer ' s disease. *Nature immunology*, 16(3), 229-236. doi:10.1038/ni.3102.A
- Heneka, Michael T., Kummer, Markus P., Stutz, Andrea, Delekate, Andrea, Saecker, Ana, Griep, Angelika, ... Golenbock, Douglas. (2013). NLRP3 is activated in AD and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*, 493(7434), 674-678. doi:10.1038/nature11729.NLRP3
- Hepner, Frank L., Ransohoff, Richard M., y Becher, Burkhard. (2015). Immune attack : the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nature Publishing Group*, 16(6), 358-372. doi:10.1038/nrn3880
- Hickman, Suzanne E., Kingery, Nathan D., Ohsumi, Toshiro K., Borowsky, Mark L., Wang, Li Chong, Means, Terry K., y El Khoury, Joseph. (2013). The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nature Neuroscience*, 16(12), 1896-1905. doi:10.1038/nn.3554
- Hinze, Arnd, y Stolzing, Alexandra. (2011). Differentiation of mouse bone marrow derived stem cells toward microglia-like cells. *BMC Cell Biology*, 1-10.
- Hirbec, H el ene E., Noristani, Harun N., y Perrin, Florence E. (2017). Microglia responses in acute and chronic neurological diseases: What microglia-specific transcriptomic studies taught (and did not teach) Us. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9(JUL). doi:10.3389/fnagi.2017.00227
- Hirbec, H el ene, Marmai, Camille, Duroux-Richard, Isabelle, Roubert, Christine, Esclangon, Arnaud, Croze, S everine, ... Rassendren, Fran ois. (2018). The microglial reaction signature revealed by RNAseq from individual mice. *Glia*, 66(5), 971-986. doi:10.1002/glia.23295
- Ho, Karen W., Ward, Nicholas J., y Calkins, David J. (2012). TRPV1: a stress response protein in the central nervous system. *American journal of neurodegenerative disease*, 1(1), 1-14. Recuperado de: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3560445%7B/&%7Dtool=pmcentrez%7B/&%7Drendertype=abstract>
- Hu, Lina, Pennington, Michael, Jiang, Qiong, Whartenby, Katharine A., y Calabresi, Peter A. (2007). Characterization of the Functional Properties of the Voltage-Gated Potassium Channel Kv1.3 in Human CD4 + T Lymphocytes . *The Journal of Immunology*, 179(7), 4563-4570. doi:10.4049/jimmunol.179.7.4563
- Huang, Dongyue, Li, Shuyang Y., Dhaka, Ajay, Story, Gina M., y Cao, Yu-Qing Q. (2012). Expression of the transient receptor potential channels TRPV1, TRPA1 and TRPM8 in mouse trigeminal primary afferent neurons innervating the dura. *Molecular Pain*, 8(1), 66. doi:10.1186/1744-8069-8-66
- Huang, Wen Xian, Min, Jia Wei, Liu, Yu Qiang, He, Xiao Hua, y Peng, Bi Wen. (2014). Expression of TRPV1 in the C57BL/6 mice brain hippocampus and cortex during development. *NeuroReport*, 25(6), 379-385. doi:10.1097/WNR.000000000000105

- Huang, Wen Xian, Yu, Fang, Sanchez, Russell M., Liu, Yu Qiang, Min, Jia Wei, Hu, Jiang Jian, ... Peng, Bi Wen. (2015). TRPV1 promotes repetitive febrile seizures by pro-inflammatory cytokines in immature brain. *Brain, Behavior, and Immunity*, 48, 68-77. doi:10.1016/j.bbi.2015.01.017
- Hurtado-Zavala, Joaquin I., Ramachandran, Binu, Ahmed, Saheeb, Halder, Rashi, Bolleyer, Christiane, Awasthi, Ankit, ... Dean, Camin. (2017). TRPV1 regulates excitatory innervation of OLM neurons in the hippocampus. *Nature Communications*, 8(May), 1-20. doi:10.1038/ncomms15878
- Izquierdo, Pablo, Attwell, David, y Madry, Christian. (2018). Ion Channels and Receptors as Determinants of Microglial Function. *Trends in Neurosciences*, 1-15. doi:S0166223618303205
- Jahnel, Ricarda, Dreger, Mathias, Gillen, Clemens, Bender, Olaf, Kurreck, Jens, y Hucho, Ferdinand. (2001). Biochemical characterization of the vanilloid receptor 1 expressed in a dorsal root ganglia derived cell line. *European Journal of Biochemistry*, 268(21), 5489-5496. doi:10.1046/j.1432-1033.2001.02500.x
- Janda, Elzbieta, Boi, Laura, y Carta, Anna R. (2018). Microglial phagocytosis and its regulation: A therapeutic target in parkinson's disease? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11(April), 1-8. doi:10.3389/fnmol.2018.00144
- Jaul, Efraim, y Barron, Jeremy. (2017). Age-Related Diseases and Clinical and Public Health Implications for the 85 Years Old and Over Population. *Frontiers in Public Health*, 5(December), 1-7. doi:10.3389/fpubh.2017.00335
- Jayant, Shalini, Sharma, B. M., y Sharma, Bhupesh. (2016). Protective effect of transient receptor potential vanilloid subtype 1 (TRPV1) modulator, against behavioral, biochemical and structural damage in experimental models of Alzheimer's disease. *Brain Research*, 1642, 397-408. doi:10.1016/j.brainres.2016.04.022
- Jekabsone, Aiste, Mander, Palwinder K., Tickler, Anna, Sharpe, Martyn, y Brown, Guy C. (2006). Fibrillar beta-amyloid peptide A β 1-40 activates microglial proliferation via stimulating TNF- α release and H 2 O 2 derived from NADPH oxidase: a cell culture study. doi:10.1186/1742-2094-3-24
- Ji, Ru Rong, Samad, Tarek A., Jin, Shan Xue, Schmoll, Raymond, y Woolf, Clifford J. (2002). p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron*, 36(1), 57-68. doi:10.1016/S0896-6273(02)00908-X
- Jin, Jae Kwang, Choi, Jin Kyu, Wasco, Wilma, Buxbaum, Joseph D., Kozlowski, Piotr B., Carp, Richard I., ... Choi, Eun Kyoung. (2005). Expression of calsenilin in neurons and astrocytes in the Alzheimer's disease brain. *NeuroReport*, 16(5), 451-455. doi:10.1097/00001756-200504040-00007
- Johnson, Keith A., Fox, Nick C., Sperling, Reisa A., y Klunk, William E. (2012). Brain imaging in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(4), 1-23. doi:10.1101/cshperspect.a006213
- Karran, Eric, Mercken, Marc, y Strooper, Bart De. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: An appraisal for the development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(9), 698-712. doi:10.1038/nrd3505
- Keren-Shaul, Hadas, Spinrad, Amit, Weiner, Assaf, Matcovitch-Natan, Orit, Dvir-Szternfeld, Raz, Ulland, Tyler K., ... Amit, Ido. (2017). A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell*, 169(7), 1276-1290.e17. doi:10.1016/j.cell.2017.05.018
- Kettenmann, Helmut, Hanisch, Uwe-karsten, Noda, Mami, y Verkhratsky, Alexei. (2011). Physiology of Microglia. *Physiological reviews*, 91, 461-553. doi:10.1152/physrev.00011.2010.
- Kim, Hun Sik, Kwon, Hyung Joon, Kim, Gye Eun, Cho, Mi Hyang, Yoon, Seung Yong, Davies, Alexander J., ... Kim, Yoo Kyum. (2014). Attenuation of natural killer cell functions by capsaicin through a direct and TRPV1-independent mechanism: Capsaicin-induced NK cell dysfunction. *Carcinogenesis*, 35(7), 1652-1660. doi:10.1093/carcin/bgu091

- Kim, Juyong, Lee, Siyoung, Kim, Jaekyoon, Ham, Sangwoo, Park, Jung Han Yoon, Han, Seungbong, ... Jung-Soo Han⁷, Ki Won Lee^{1, 3}, & Jiyoung Kim. (2019). Ca²⁺-permeable TRPV1 pain receptor knockout rescues memory deficits and reduces amyloid- β and tau in a mouse model of Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, 00(00), 1-33.
- Kim, Sang R. Seung R. U., Kim, Sang R. Seung R. U., Oh, Uhtaek, y Jin, Byung K. (2006). Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates microglial cell death in vivo and in vitro via Ca²⁺-mediated mitochondrial damage and cytochrome c release. *The Journal of Immunology*, 177(7), 4322-4329. doi:10.4049/jimmunol.177.7.4322
- Klapal, Lars, Igelhorst, Birte A., y Dietzel-Meyer, Irmgard D. (2016). Changes in Neuronal Excitability by Activated Microglia: Differential Na⁺ Current Upregulation in Pyramid-Shaped and Bipolar Neurons by TNF- α and IL-18. *Frontiers in Neurology*, 7(March), 1-13. doi:10.3389/fneur.2016.00044
- Kong, Weilin, Wang, Xin, Yang, Xingliang, Huang, Wenxian, Han, Song, Yin, Jun, y Hayley, Shawn. (2019). Activation of TRPV1 Contributes to Recurrent Febrile Seizures via Inhibiting the Microglial M2 Phenotype in the Immature Brain, 13(October), 1-16. doi:10.3389/fncel.2019.00442
- Korvers, Laura, de Andrade Costa, Amanda, Mersch, Martin, Matyash, Vitali, Kettenmann, Helmut, y Semtner, Marcus. (2016). Spontaneous Ca²⁺ transients in mouse microglia. *Cell Calcium*, 60(6), 396-406. doi:10.1016/j.ceca.2016.09.004
- Krabbe, Grietje, Halle, Annett, Matyash, Vitali, Rinnenthal, Jan L., Eom, Gina D., Bernhardt, Ulrike, ... Heppner, Frank L. (2013). Functional Impairment of Microglia Coincides with Beta-Amyloid Deposition in Mice with Alzheimer-Like Pathology. *PLoS ONE*, 8(4). doi:10.1371/journal.pone.0060921
- Lesne, Sylvain E., Sherman, Mathew A., Grant, Marianne, Kuskowski, Michael, Schneider, Julie A., Bennett, David A., y Ashe, Karen H. (2013). Brain amyloid-b oligomers in ageing and Alzheimer's disease. *Brain*, 136(5), 1383-1398. doi:10.1093/brain/awt062
- Li, Li, Chen, Jing, Ni, Yinxing, Feng, Xiaoli, Zhao, Zhigang, Wang, Peijian, ... Zhu, Zhiming. (2012). TRPV1 activation prevents nonalcoholic fatty liver through UCP2 upregulation in mice. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 463(5), 727-732. doi:10.1007/s00424-012-1078-y
- Ma, Lin, Nagai, Jun, y Ueda, Hiroshi. (2010). Microglial activation mediates de novo lysophosphatidic acid production in a model of neuropathic pain. *Journal of Neurochemistry*, 115(3), 643-653. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06955.x
- Marrone, Maria Cristina, Morabito, Annunziato, Giustizieri, Michela, Chiurchiù, Valerio, Leuti, Alessandro, Mattioli, Marzia, ... Marinelli, Silvia Sara. (2017). TRPV1 channels are critical brain inflammation detectors and neuropathic pain biomarkers in mice. *Nature Communications*, 8(May), 1-21. doi:10.1038/ncomms15292
- Marschallinger, Julia, Iram, Tal, Zardeneta, Macy, Lee, Song E., Lehallier, Benoit, Haney, Michael S., ... Wyss-Coray, Tony. (2020). Lipid-droplet-accumulating microglia represent a dysfunctional and proinflammatory state in the aging brain. *Nature Neuroscience*, 23(2), 194-208. doi:10.1038/s41593-019-0566-1
- Mcgeer, Patrick L., y Mcgeer, Edith G. (2013). The amyloid cascade - inflammatory hypothesis of Alzheimer disease : implications for therapy. *Acta Neuropathol*, 126, 479-497. doi:10.1007/s00401-013-1177-7
- McLarnon, James G., Choi, Hyun B., Lue, Lih Fen, Walker, Douglas G., y Kim, Seung U. (2005). Perturbations in calcium-mediated signal transduction in microglia from Alzheimer's disease patients. *Journal of Neuroscience Research*, 81(3), 426-435. doi:10.1002/jnr.20487
- Medrano-Jiménez, Elisa, Jiménez-Ferrer Carrillo, Itzia, Pedraza-Escalona, Martha, Ramírez-Serrano, Cristina E., Álvarez-Arellano, Lourdes, Cortés-Mendoza, Javier, ... Pérez-Martínez, Leonor. (2019).

- Malva parviflora extract ameliorates the deleterious effects of a high fat diet on the cognitive deficit in a mouse model of Alzheimer's disease by restoring microglial function via a PPAR- γ -dependent mechanism. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 1-26. doi:10.1186/s12974-019-1515-3
- Menigoz, A., y Boudes, M. (2011). The Expression Pattern of TRPV1 in Brain. *Journal of Neuroscience*, 31(37), 13025-13027. doi:10.1523/JNEUROSCI.2589-11.2011
- Michell-Robinson, Mackenzie A., Touil, Hanane, Healy, Luke M., Owen, David R., Durafourt, Bryce A., Bar-Or, Amit, ... Moore, Craig S. (2015). Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain*, 138(5), 1138-1159. doi:10.1093/brain/awv066
- Mitchell, Jennifer E., Campbell, Anne P., New, Norman E., Sadofsky, Laura R., Kastelik, Jack A., Mulrennan, Siobhan A., ... Morice, Alyn H. (2005). Expression and characterization of the intracellular vanilloid receptor (TRPV1) in bronchi from patients with chronic cough. *Experimental Lung Research*, 31(3), 295-306. doi:10.1080/01902140590918803
- Miyake, Takahito, Shirakawa, Hisashi, Nakagawa, Takayuki, y Kaneko, Shuji. (2015). Activation of mitochondrial transient receptor potential vanilloid 1 channel contributes to microglial migration. *Glia*. doi:10.1002/glia.22854
- Morales-Lazaro, Sara L., y Rosenbaum, Tamara. (2015). A painful link between the TRPV1 channel and lysophosphatidic acid. *Life Sciences*, 125, 15-24. doi:10.1016/j.lfs.2014.10.004
- Moran, Magdalene M., McAlexander, Michael Allen, Bíró, Tamás, y Szallasi, Arpad. (2011). Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nature reviews. Drug discovery*, 10(8), 601-20. doi:10.1038/nrd3456
- Mosher, Kira Irving, y Wyss-Coray, Tony. (2014). Microglial Dysfunction in Brain Aging and Alzheimer's Disease. *Biochem Pharmacol*, 88(4), 594-604. doi:10.1016/j.bcp.2014.01.008. Microglial
- Muldoon, Leslie L., Alvarez, Jorge I., Begley, David J., Boado, Ruben J., Del Zoppo, Gregory J., Doolittle, Nancy D., ... Neuwelt, Edward a. (2013). Immunologic privilege in the central nervous system and the blood-brain barrier. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 33(1), 13-21. doi:10.1038/jcbfm.2012.153
- Nayak, Debasis, Roth, Theodore L., y McGavern, Dorian B. (2014). Microglia Development and Function. *Annual Review of Immunology*, 32(1), 367-402. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120240
- Nazem, Amir, Sankowski, Roman, Bacher, Michael, y Al-Abed, Yousef. (2015). Rodent models of neuroinflammation for Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation*, 1-15. doi:10.1186/s12974-015-0291-y
- Neha, Sodhi, Rupinder K., Jaggi, Amteshwar S., y Singh, Nirmal. (2014). Animal models of dementia and cognitive dysfunction. *Life Sciences*, 109(2), 73-86. doi:10.1016/j.lfs.2014.05.017
- Nieto-Posadas, Andrés, Picazo-juárez, Giovanni, Llorente, Itzel, Jara-oseguera, Andrés, Morales-Lázaro, Sara, Escalante-Alcalde, Diana, ... Rosenbaum, Tamara. (2012). Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site. *Nature chemical biology*, 8(1), 78-85. doi:10.1038/nchembio.712
- Nilius, Bernd, Owsianik, Grzegorz, Voets, Thomas, y Peters, John a. J. a. (2007). *Transient receptor potential cation channels in disease* (Vol. 87, pp. 165-217). doi:10.1152/physrev.00021.2006.
- Oakley, Holly, Cole, Sarah L., Logan, Sreemathi, Maus, Erika, Shao, Pei, Craft, Jeffery, ... Vassar, Robert. (2006). Intraneuronal β -amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: Potential factors in amyloid plaque formation. *Journal of Neuroscience*, 26(40), 10129-10140. doi:10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006

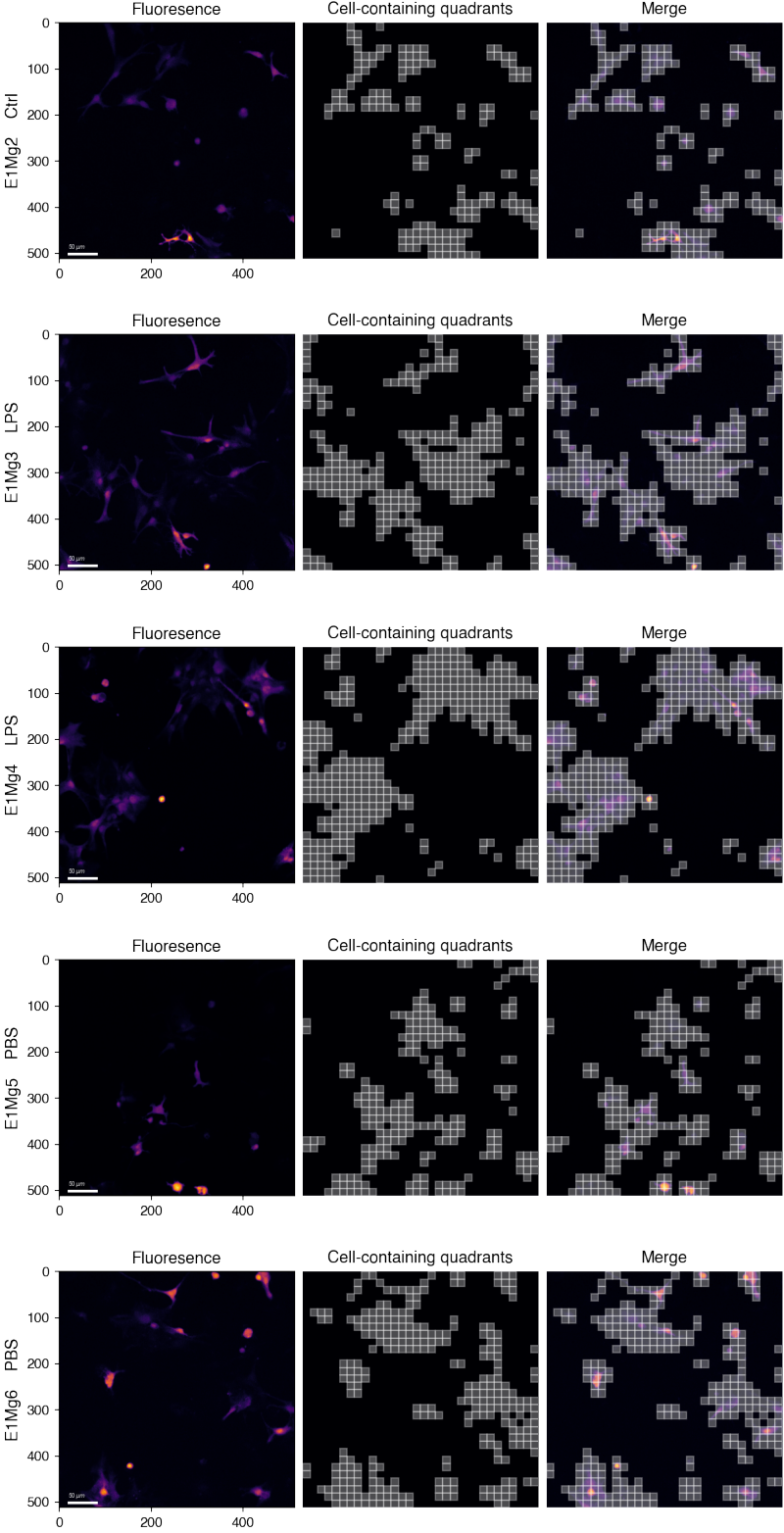
- Omar, Shadia, Clarke, Rebecca, Abdullah, Haniah, Brady, Clare, Corry, John, Winter, Hanagh, ... Cosby, S. Louise. (2017). Respiratory virus infection up-regulates TRPV1, TRPA1 and ASIC3 receptors on airway cells. *PLoS ONE*, 12(2), 1-21. doi:10.1371/journal.pone.0171681
- Ono, Kentaro, Ye, Yi, Viet, Chi T., Dang, Dongmin, y Schmidt, Brian L. (2015). TRPV1 expression level in isolectin B ₄-positive neurons contributes to mouse strain difference in cutaneous thermal nociceptive sensitivity. *Journal of Neurophysiology*, 113(9), 3345-3355. doi:10.1152/jn.00973.2014
- Ortíz-Rentería, Miguel, Juárez-Contreras, Rebeca, González-Ramírez, Ricardo, Islas, León D., Sierra-Ramírez, Félix, Llorente, Itzel, ... Morales-Lázaro, Sara L. (2018). TRPV1 channels and the progesterone receptor Sig-1R interact to regulate pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1(26), 201715972. doi:10.1073/pnas.1715972115
- Prinz, Marco, y Priller, Josef. (2014). Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 15(5), 300-12. doi:10.1038/nrn3722
- Quartu, Marina, Serra, Maria Pina, Boi, Marianna, Poddighe, Laura, Picci, Cristina, Demontis, Roberto, y Del Fiacco, Marina. (2016). TRPV1 receptor in the human trigeminal ganglion and spinal nucleus: immunohistochemical localization and comparison with the neuropeptides CGRP and SP. *Journal of Anatomy*, 229(6), 755-767. doi:10.1111/joa.12529
- Ransohoff, Richard M. (2016). A polarizing question: Do M1 and M2 microglia exist. *Nature Neuroscience*, 19(8), 987-991. doi:10.1038/nn.4338
- Reed-Geaghan, Erin G., Savage, Julie C., Hise, Amy G., y Landreth, Gary E. (2009). CD14 and toll-like receptors 2 and 4 are required for fibrillar A β -stimulated microglial activation. *Journal of Neuroscience*, 29(38), 11982-11992. doi:10.1523/JNEUROSCI.3158-09.2009
- Reitz, Christiane, y Mayeux, Richard. (2014). Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), 640-651. doi:10.1016/j.bcp.2013.12.024
- Roberts, Jennifer C., Davis, John B., y Benham, Christopher D. (2004). [3H]Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution. *Brain Research*, 995(2), 176-183. doi:10.1016/j.brainres.2003.10.001
- Rosenbaum, Tamara, Awaya, Mika, y Gordon, Sharona E. (2002). Subunit modification and association in VR1 ion channels. *BMC Neuroscience*, 3, 1-10. doi:10.1186/1471-2202-3-4
- Sand, Claire A., Grant, Andrew D., y Nandi, Manasi. (2015). Vascular Expression of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 63(6), 449-453. doi:10.1369/0022155415581014
- Sappington, Rebecca M., y Calkins, David J. (2008). Contribution of TRPV1 to Microglia-Derived IL-6 and NF κ B Translocation with Elevated Hydrostatic Pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 49(7), 3004-3017. doi:10.1167/iops.07-1355.Contribution
- Saura, Josep, Tusell, Josep Maria, y Serratosa, Joan. (2003). High-Yield Isolation of Murine Microglia by Mild Trypsinization. *Glia*, 44(3), 183-189. doi:10.1002/glia.10274
- Schilling, Tom, y Eder, Claudia. (2007). Ion channel expression in resting and activated microglia of hippocampal slices from juvenile mice. *Brain Research*, 1186(1), 21-28. doi:10.1016/j.brainres.2007.10.027
- Schilling, Tom, y Eder, Claudia. (2011). Amyloid- β -induced reactive oxygen species production and priming are differentially regulated by ion channels in microglia. *Journal of Cellular Physiology*, 226(12), 3295-3302. doi:10.1002/jcp.22675
- Schilling, Tom, y Eder, Claudia. (2015). Microglial K⁺ channel expression in young adult and aged mice. *Glia*, 63(4), 664-672. doi:10.1002/glia.22776

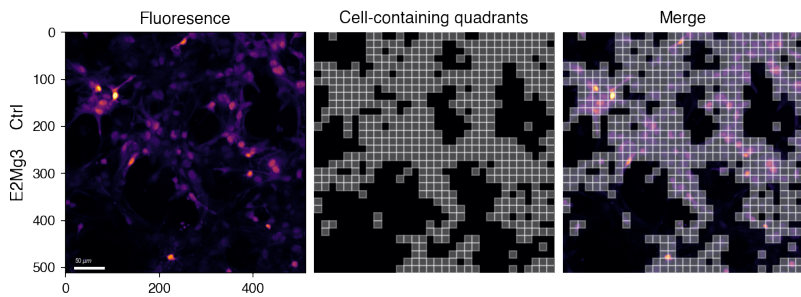
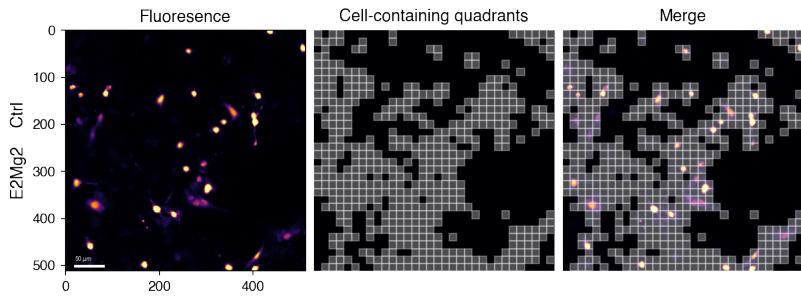
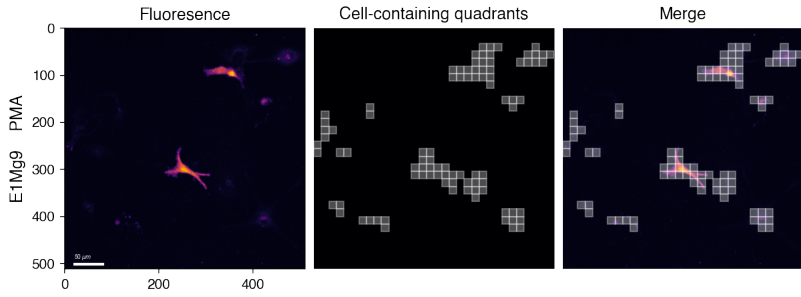
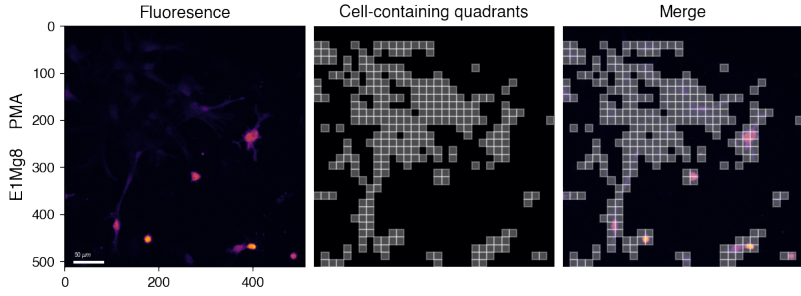
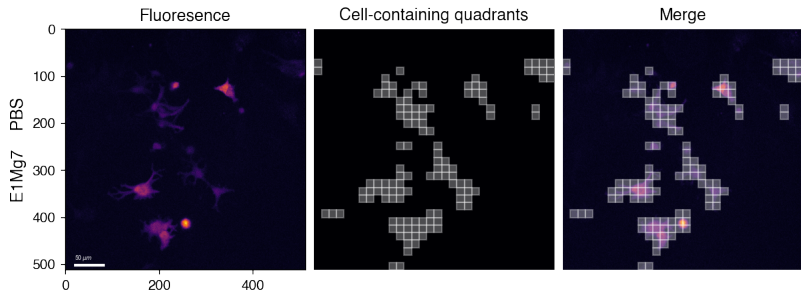
- Schumacher, Mark a., y Eilers, Helge. (2010). TRPV1 splice variants: structure and function. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 15(Box 0427), 872-882. doi:10.2741/3651
- Serrano-Pozo, Alberto, Frosch, Matthew P., Masliah, Eliezer, y Hyman, Bradley T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 1(1), 1-23. doi:10.1101/cshperspect.a006189
- Sessa, Giuseppina, Podini, Paola, Mariani, Margherita, Meroni, Alessandra, Spreafico, Roberto, Sinigaglia, Francesco, ... Meldolesi, Jacopo. (2004). Distribution and signaling of TREM2/DAP12, the receptor system mutated in human polycystic lipomembraneous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy dementia. *European Journal of Neuroscience*, 20(10), 2617-2628. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03729.x
- Sharma, Purnima, y Ping, Liao. (2014). Calcium ion influx in microglial cells: Physiological and therapeutic significance. *Journal of Neuroscience Research*, 92(4), 409-423. doi:10.1002/jnr.23344
- Shea, Yat-fung, Chu, Leung-wing, Chan, Angel On-kei, Ha, Joyce, Li, Yan, y Song, You-qiang. (2016). A systematic review of familial Alzheimer 's disease : Differences in presentation of clinical features among three mutated genes and potential ethnic differences. *Journal of the Formosan Medical Association*, 115(2), 67-75. doi:10.1016/j.jfma.2015.08.004
- Sierra, Amanda, Castro, Fernando de, Río-Hortega, Juan del, Rafael Iglesias-Rozas, José, Garrosa, Manuel, y Kettenmann, Helmut. (2016). The «Big-Bang» for modern glial biology: Translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia*, 64(11), 1801-1840. doi:10.1002/glia.23046
- Smith, D. H., Pepin, J., y Stich, a. H. (1998). Human African trypanosomiasis: an emerging public health crisis. *British medical bulletin*, 54(2), 341-55. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9830201>
- Spangenberg, Elizabeth, Severson, Paul L., Hohs, Lindsay A., Crapser, Joshua, Zhang, Jiazhong, Burton, Elizabeth A., ... Green, Kim N. (2019). Sustained microglial depletion with CSF1R inhibitor impairs parenchymal plaque development in an Alzheimer's disease model. *Nature communications*, (2019), 1-21. doi:10.1038/s41467-019-11674-z
- Stelzmann, Rainulf A., Norman Schnitzlein, H., y Reed Murtagh, F. (1995). An english translation of alzheimer's 1907 paper, «über eine eigenartige erkankung der hirnrinde». *Clinical Anatomy*, 8(6), 429-431. doi:10.1002/ca.980080612
- Supnet, Charlene, y Bezprozvanny, Ilya. (2010). The dysregulation of intracellular calcium in Alzheimer disease. *Cell Calcium*, 47(2), 183-189. doi:10.1016/j.ceca.2009.12.014
- Talbot, Sebastien, Foster, Simmie L., y Woolf, Clifford J. (2016). Neuroimmunity : Physiology and Pathology. *Annu. Rev. Immunol.* doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055340
- Tamashiro, Tami T., Dalgard, Clifton Lee, y Byrnes, Kimberly R. (2012). Primary Microglia Isolation from Mixed Glial Cell Cultures of Neonatal Rat Brain Tissue. *Journal of Visualized Experiments*, (66), 1-5. doi:10.3791/3814
- Tay, Tuan Leng, Dautzenberg, Jana, Grün, Dominic, y Prinz, Marco. (2018). Unique microglia recovery population revealed by single-cell RNAseq following neurodegeneration, 1-11.
- Thion, Morgane Sonia, Low, Donovan, Silvin, Aymeric, Chen, Jinmiao, Grisel, Pauline, Schulte-Schrepping, Jonas, ... Garel, Sonia. (2018). Microbiome Influences Prenatal and Adult Microglia in a Sex-Specific Manner. *Cell*, 172(3), 500-516.e16. doi:10.1016/j.cell.2017.11.042
- Tian, Li, Ma, Li, Kaarela, Tiina, y Li, Zhilin. (2012). Neuroimmune crosstalk in the central nervous system and its significance for neurological diseases. *Journal of Neuroimmunology*, 9(155). doi:10.1016/j.jneuroim.2007.09.010

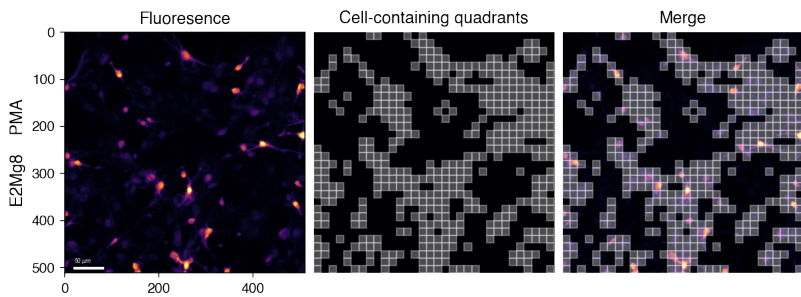
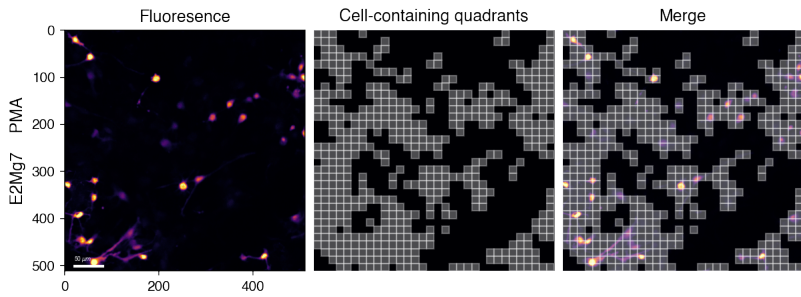
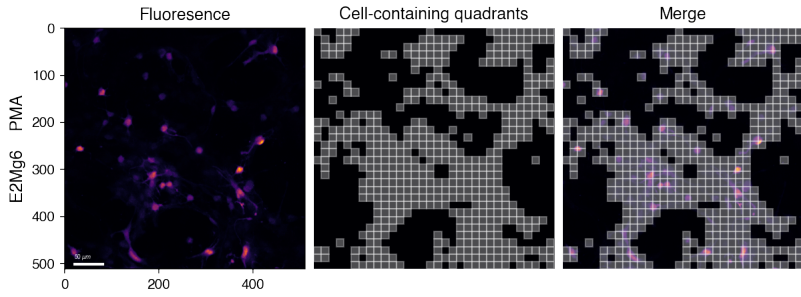
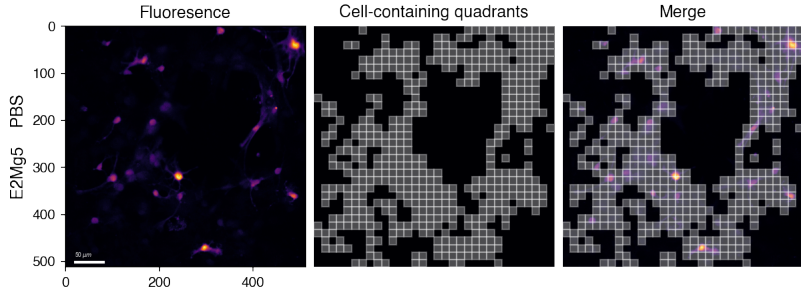
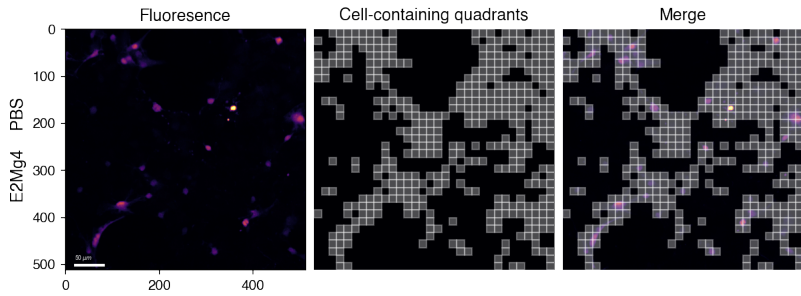
- Tian, Na-Xi, Xu, Yu, Yang, Jin-Yu, Li, Lu, Sun, Xiao-Hong, Wang, Yun, y Zhang, Ying. (2018). KChIP3 N-Terminal 31-50 Fragment Mediates Its Association with TRPV1 and Alleviates Inflammatory Hyperalgesia in Rats. *The Journal of Neuroscience*, 38(7), 1756-1773. doi:10.1523/JNEUROSCI.2242-17.2018
- Tóth, Attila, Boczán, Judit, Kedei, Noémi, Lizanecz, Erzsébet, Bagi, Zsolt, Papp, Zoltán, ... Blumberg, Peter M. (2005). Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Molecular Brain Research*, 135(1-2), 162-168. doi:10.1016/j.molbrainres.2004.12.003
- Tóth, Attila, Czikora, Ágnes, Pásztor, Eniko T., Dienes, Beatrix, Bai, Péter, Csernoch, László, ... Boczán, Judit. (2013). Vanilloid Receptor-1 (TRPV1) Expression and Function in the Vasculature of the Rat. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 62(2), 129-144. doi:10.1369/0022155413513589
- Ulrich, Jason D., y Holtzman, David M. (2016). TREM2 Function in Alzheimer's Disease and Neurodegeneration. *ACS chemical neuroscience*, 7(4), 420-7. doi:10.1021/acscchemneuro.5b00313
- Utz, Sebastian G., See, Peter, Mildenerger, Wiebke, Thion, Morgane Sonia, Silvin, Aymeric, Lutz, Mirjam, ... Greter, Melanie. (2020). Early Fate Defines Microglia and Non-parenchymal Brain Macrophage Development. *Cell*, 181(3), 557-573.e18. doi:10.1016/j.cell.2020.03.021
- Van Hove, Hannah, Martens, Liesbet, Scheyltjens, Isabelle, De Vlaminck, Karen, Pombo Antunes, Ana Rita, De Prijck, Sofie, ... Movahedi, Kiavash. (2019). A single-cell atlas of mouse brain macrophages reveals unique transcriptional identities shaped by ontogeny and tissue environment. *Nature Neuroscience*, 22(June). doi:10.1038/s41593-019-0393-4
- Veldhuis, Nicholas A., Lew, Michael J., Abogadie, Fe C., Poole, Daniel P., Jennings, Ernest A., Ivanusic, Jason J., ... McIntyre, Peter. (2012). N-glycosylation determines ionic permeability and desensitization of the TRPV1 capsaicin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 287(26), 21765-21772. doi:10.1074/jbc.M112.342022
- Venegas, Carmen, Kumar, Sathish, Franklin, Bernardo S., Dierkes, Tobias, Brinkschulte, Rebecca, Tejera, Dario, ... Heneka, Michael T. (2017). Microglia-derived ASC specks crossseed amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature*, 552(7685), 355-361. doi:10.1038/nature25158
- Verkhatsky, Alexei, Pankratov, Yuri, y Lalo, Ulyana. (2012). P2X receptors in neuroglia, 1(April). doi:10.1002/wmts.12
- Villa, Alessandro, Della Torre, Sara, y Maggi, Adriana. (2019). Sexual differentiation of microglia. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 52(November 2018), 156-164. doi:10.1016/j.yfrne.2018.11.003
- Walter, Silke, Letiembre, Maryse, Liu, Yang, Heine, Holger, Penke, Botond, Hao, Wenlin, ... Faßbender, Klaus. (2007). Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 20(6), 947-956. doi:10.1159/000110455
- Wang, Yan, Gao, Yingwei, Tian, Quan, Deng, Qi, Wang, Yangbo, Zhou, Tian, ... Li, Yong. (2018). Author Correction: TRPV1 SUMOylation regulates nociceptive signaling in models of inflammatory pain (Nature Communications (2018) DOI: 10.1038/s41467-018-03974-7). *Nature Communications*, 9(1), 1-17. doi:10.1038/s41467-018-05022-w
- Xanthos, Dimitris N., y Sandkühler, Jürgen. (2014). Neurogenic neuroinflammation: Inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(1), 43-53. doi:10.1038/nrn3617
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., O'Keeffe, S., ... Wu, J. Q. (2014). An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience*, 34(36), 11929-11947. doi:10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014

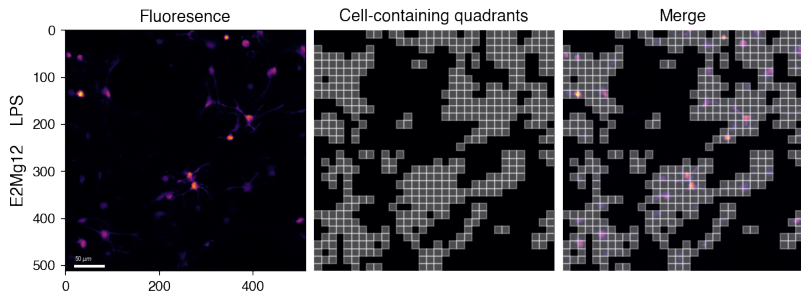
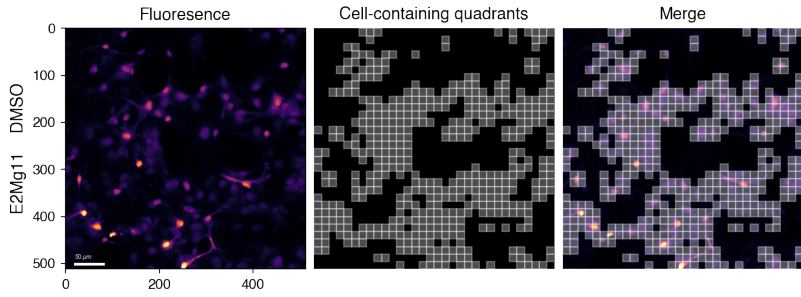
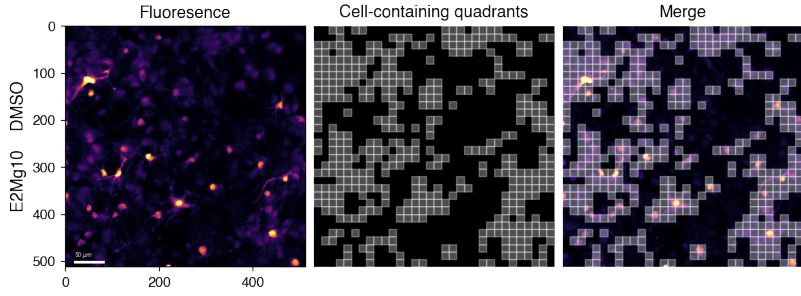
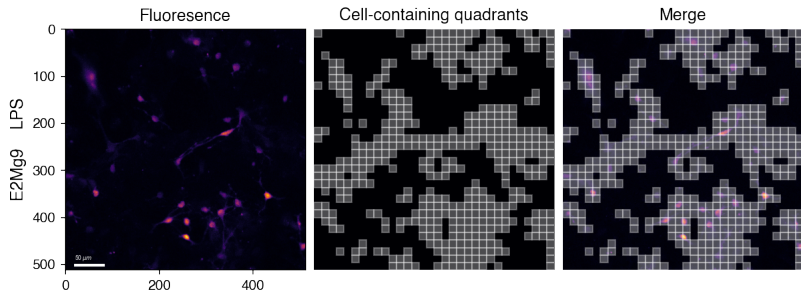
Zhao, Qiong, Wang, Wenjian, Wang, Rurong, y Cheng, Yan. (2016). TRPV1 and neuropeptide receptor immunoreactivity and expression in the rat lung and brainstem after lung ischemia-reperfusion injury. *Journal of Surgical Research*, 203(1), 183-192. doi:10.1016/j.jss.2016.03.050

Anexo 1: Segmentación de cuadrantes conteniendo células (CCC)









Anexo 2: Segmentación de cuadrantes reactivos a capsaicina y ionomicina

