



Alteraciones de la cinética del poro de fusión exocitótico en células cromafines de modelos murinos de enfermedades neurodegenerativas

TESIS DOCTORAL

ENRIQUE CALVO GALLARDO

Director: Antonio García García

Madrid, Junio de 2015

ÍNDICE

1	ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	4
2	MARCO EN EL QUE SE HA REALIZADO ESTA TESIS	6
3	INTRODUCCIÓN	8
3.1	La célula cromafín	9
3.1.1	Acoplamiento excitación-secreción en la CC	11
3.1.2	El proceso de exocitosis en la CC	13
3.2	Estímulos secretagogos	16
3.3	Enfermedades neurodegenerativas	19
3.3.1	Enfermedad de Alzheimer	20
3.3.2	Esclerosis lateral amiotrófica	26
4	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
5	MATERIALES Y MÉTODOS	36
5.1	Animales utilizados	36
5.2	Cultivo de CC	37
5.3	Técnica de amperometría	39
5.3.1	Descripción de la técnica	39
5.3.2	Electrodos de amperometría	41
5.4	Técnica de patch-clamp	43
5.4.1	Descripción de la técnica	43
5.4.2	Pipetas de patch-clamp	45
5.5	Medida de los transientes de $[Ca^{2+}]_c$ por fluorescencia	45
5.6	Sistema de perfusión	47
5.7	Análisis estadístico	47
5.8	Soluciones y productos químicos	48

5.8.1	Soluciones para cultivo celular	48
5.8.2	Soluciones para amperometría y medición de $[Ca^{2+}]_c$ por fluorescencia	49
5.8.3	Soluciones para patch-clamp	50
6	RESULTADOS	52
6.1	Secreción cuantal de catecolaminas por estimulación con ACh, ACh + atropina y ACh + FCCP en CC de C57	52
6.2	Secreción cuantal de catecolaminas por estimulación con DMPP y muscarina en CC de C57	57
6.3	Secreción cuantal de catecolaminas por estimulación con cafeína, histamina y K^+ en CC de C57	59
6.4	Transientes de $[Ca^{2+}]_c$ generados por varios secretagogos en CC de ratones C57	63
6.5	Secreción cuantal de catecolaminas por estimulación con K^+ comparada en CC de ratones C57 y APP/PS1	66
6.6	Excitabilidad de la membrana comparada en CC de ratones C57 y SOD1 ^{G93A}	68
6.7	Corrientes iónicas de célula completa comparadas en CC de C57 y SOD1 ^{G93A}	70
6.8	Transientes de $[Ca^{2+}]_c$ generados por ACh y K^+ comparados en CC de C57 y SOD1 ^{G93A}	73
6.9	Secreción cuantal de catecolaminas por estimulación con ACh y K^+ comparada en CC de C57 y SOD1 ^{G93A}	74
6.10	Análisis cinético de eventos exocitóticos individuales que tienen lugar en las respuestas secretoras evocadas por ACh y K^+ comparado en CC de C57 y SOD1 ^{G93A}	80
7	DISCUSIÓN	84

7.1	Variaciones del poro de fusión excitotico y de los transientes de $[Ca^{2+}]_c$ en CC de ratón C57 estimuladas con ACh y otros secretagogos _____	84
7.2	Menor tamaño cuantal y cinética acelerada en CC de ratón APP/PS1 con respecto a C57 _____	88
7.3	Disminución de la excitabilidad celular y corrientes iónicas ligada a ralentización del poro de fusión en CC de ratón SOD1 ^{G93A} con respecto a C57 _____	90
8	CONCLUSIONES _____	95
9	BIBLIOGRAFÍA _____	97

1 ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

[Ca²⁺]_c:	Concentración de Ca ²⁺ en el citosol.
ABC:	Área bajo la curva.
ACh:	Acetilcolina.
ANOVA:	Test de análisis de la varianza.
APP:	Proteína precursora de amiloide.
ATP:	Trifosfato de adenosina.
Aβ:	Péptido amiloide β.
Aβ1-42:	Péptido Aβ de 42 aminoácidos.
Aβ1-40:	Péptido Aβ de 40 aminoácidos.
CC:	Célula cromafín.
CCDV:	Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje.
CICR:	Liberación de Ca ²⁺ inducida por Ca ²⁺ .
DMEM:	Medio basal de Eagle modificado por Dulbecco.
DMPP:	Dimetil-fenil-piperazinio.
EA:	Enfermedad de Alzheimer.
EAF:	Enfermedad de Alzheimer familiar.
EE:	Error estándar.
EGTA:	Ácido etilenglicol tetraacético.
ELA:	Esclerosis lateral amiotrófica.
FCCP:	Carbonil cianuro-p-trifluorometoxifenil hidrazona.
HEPES:	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-etanosulfónico de piperazinio.
I_{ACh}:	Corriente nicotínica.
I_{Ca}:	Corriente de Ca ²⁺ .
IFTH:	Instituto-Fundación Teófilo Hernando de I+D del Medicamento.
I_K:	Corriente de K ⁺ .
I_{K(Ca)}:	Componente dependiente de Ca ²⁺ de la corriente de K ⁺ .
I_{K(V)}:	Componente dependiente de voltaje de la corriente de K ⁺ .
I_{max}:	Altura máxima (amplitud) de la espiga amperométrica.
I_{Na}:	Corriente de Na ⁺ .
IP₃:	Inositol 1,4,5-trifosfato.
IP₃R:	Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato.
I_{pie}:	Amplitud del pie de la espiga amperométrica.
IRP:	Contingente de vesículas inmediatamente listas para ser liberadas.
MDCE:	Micro-dominios de Ca ²⁺ elevado.
MDCR:	Micro-dominios de Ca ²⁺ reducido.
ON:	Ovillos neurofibrilares de proteína Tau agregada.
PA:	Potencial de acción.
PS1:	Proteína presenilina 1.

PS2:	Proteína presenilina 2.
Q:	Contenido cuantal de la espiga amperométrica.
Q_{amp}:	Contenido cuantal total del registro amperométrico.
Q_{pie}:	Contenido cuantal del pie de la espiga amperométrica.
Ratón APP/PS1:	Ratón modelo de EA que lleva las mutaciones Hu PS1-A246E y Mo/Hu APP 695.
Ratón C57:	Ratón de cepa silvestre.
Ratón SOD1^{G93A}:	Ratón modelo de ELA que lleva la mutación SOD1-G93A.
RE:	Retículo endoplásmico.
RRP:	Contingente de vesículas rápidamente listas para ser liberadas.
RVP:	Contingente de vesículas de reserva.
RyR:	Receptor de rianodina.
SNAP-25:	Proteína asociada al sinaptosoma-25.
SNC:	Sistema nervioso central.
SOD1:	Proteína Cu,Zn superóxido dismutasa 1.
SRP:	Contingente de vesículas de liberación lenta.
Stx1:	Proteína syntaxina-1.
Sbv2:	Proteína sinaptobrevina-2.
Syt1:	Proteína sinaptotagmina-1.
Syt7:	Proteína sinaptotagmina-7.
t_{1/2}:	Duración de la espiga amperométrica al 50% de su altura máxima.
TEA:	Tetraetilamonio.
T_{pie}:	Duración del pie de la espiga amperométrica.
UPP:	Contingente de vesículas atracadas no listas para ser liberadas.
V_m:	Voltaje de membrana.
τ_a:	Constante de tiempo de activación.
τ_i:	Constante de tiempo de inactivación/desaparición.
[Ca²⁺]_c:	Concentración de Ca ²⁺ en el citosol.

2 MARCO EN EL QUE SE HA REALIZADO ESTA TESIS

El trabajo para la obtención del grado de Doctor presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Instituto-Fundación Teófilo Hernando de I+D del Medicamento (IFTH) y el Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. A lo largo de más de 30 años, el IFTH se ha preocupado por cultivar líneas de investigación relacionadas con la caracterización de los principales mecanismos celulares en los que se implica el catión calcio (Ca^{2+} , mediador y mensajero intracelular más importante y versátil), siendo la comunicación sináptica y la muerte neuronal los principales.

Para situarse correctamente alrededor del tema de este estudio, tenemos que pensar en la afectación de un enfermo de alzhéimer o de un enfermo de esclerosis lateral amiotrófica, claro está. En las numerosas diatribas que se han realizado sobre por qué se desarrollan estas dos enfermedades (y de otras tantas), en la gran mayoría de las teorías e hipótesis, las sinapsis se encuentran en el foco de la discusión, de uno u otro modo. Pero claro, al pensar en una sinapsis, es decir, el contacto para la transmisión de un impulso nervioso entre dos células, las células que todos ponemos en la imagen son neuronas. ¿Se han parado a pensar alguna vez en lo difícil que sería medir la cinética del poro de fusión y la exocitosis en una sinapsis neuronal? Es, de hecho, francamente difícil y complejo, y hoy en día aún no disponemos de la tecnología para hacerlo.

Así, ponemos la mirada en otra célula, la cromafín. Esta célula ha sido durante más de 3 décadas, y sigue siendo, el modelo experimental por excelencia de nuestro grupo de investigación y el centro de la gran mayoría de sus estudios. La célula cromafín no es una neurona, estrictamente hablando, es una “neurona simpática periférica modificada”, es decir, es una paraneurona. Se sitúa en la médula de la glándula adrenal (sobre el riñón en humanos) y es, además, excitable (posee los mismos canales iónicos que las neuronas) y secreta catecolaminas por un mecanismo de exocitosis Ca^{2+} -dependiente, similar al que utilizan las neuronas para la liberación de sus neurotransmisores al espacio sináptico. Si volvemos al problema anterior, evaluar la actividad en una sinapsis neuronal, la cromafín nos permite, gracias a sus características neuronales, medir la secreción por exocitosis, y ya que las dos

enfermedades objeto de este estudio cursan con deterioros sinápticos, es de esperar que todas las sinapsis del organismo se encuentren afectadas y, por ende, también la cromafín; de hecho, la maquinaria proteica de la exocitosis es común en las células secretoras en general.

Por ello, en este estudio, nos centraremos en describir las alteraciones del poro de fusión exocitótico en sendos modelos murinos de enfermedad de Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica. Esto lo llevaremos a cabo con secreción evocada comparativamente tanto con el neurotransmisor fisiológico de la célula cromafín (la acetilcolina) como con un despolarizante clásico (el potasio elevado).

Además, dadas las alteraciones encontradas en estos modelos y, atendiendo a las alteraciones celulares que presentan debidas a sus mutaciones y que afectan al manejo del Ca^{2+} intracelular (que es responsable en primera y última instancia de la exocitosis), realizaremos un estudio monográfico sobre las distintas sustancias usadas para provocar secreción (secretagogos) en la cepa de ratón que es más usada globalmente para el desarrollo de modelos de enfermedades y que usaremos como control en los experimentos de nuestro estudio, el C57. Esto nos permitirá recabar información acerca de las diferentes características de la secreción según se use un secretagogo u otro, ya que los mecanismos que desencadenan son completamente distintos, lo que consideramos de gran importancia. Los resultados de estos experimentos en ratones silvestres C57 servirán a modo de “plantilla” o referencia, para los estudios que se están desarrollando en el laboratorio L1-IFTH del Prof. Antonio García, en células cromafines de ratones transgénicos de modelos de enfermedades neurodegenerativas.

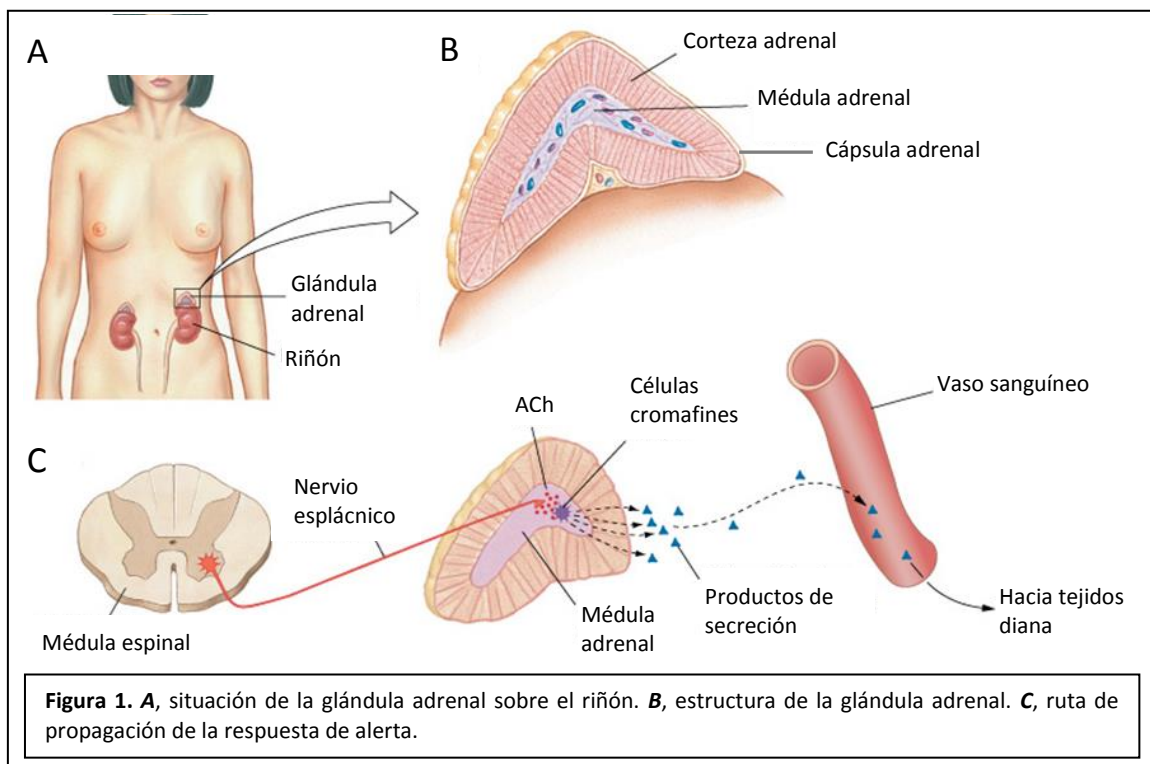
3 INTRODUCCIÓN

Este trabajo de Tesis Doctoral se ha realizado en el Instituto-Fundación Teófilo Hernando de I+D del Medicamento (IFTH) de la Universidad Autónoma de Madrid. Se enmarca en un grupo que se preocupa por indagar en los fenómenos que acoplan el estímulo fisiológico con la respuesta exocitótica de células neurosecretoras (células cromafines de la médula suprarrenal) con el fin de relacionarlos con los mecanismos de algunas de las enfermedades neurodegenerativas de mayor relevancia en los últimos tiempos, siendo en este estudio la enfermedad de Alzheimer (EA) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) las protagonistas. Por ello, en la introducción de este trabajo, revisaré los aspectos genéticos y fisiopatológicos de ambas enfermedades, con el fin de entender las bases en las que se fundamenta la génesis de los modelos murinos usados aquí: el ratón APP/PS1, modelo de EA, y el ratón SOD1^{G93A}, modelo de ELA. Por otro lado, comentaré el modelo celular elegido para este estudio, la célula cromafín (CC) y el sistema de secreción de la misma.

3.1 La célula cromafín

Considerada como una paraneurona, este tipo celular constituye un excelente modelo para el estudio del almacenamiento y exocitosis de neurotransmisores y de la modulación y cinética de transientes de calcio (Ca^{2+}), tanto intracelulares como intercelulares, entre otros.

La célula cromafín (CC) se ubica en la médula de la glándula suprarrenal o adrenal, formando racimos llamados “acinos”. Estos acinos de células están rodeados por vasos sanguíneos que las nutren y a la vez, recogen sus productos de secreción (por ejemplo, las arterias diafragmática superior y renal) (Figura 1). La acetilcolina (ACh) liberada por las terminaciones del nervio esplácnico actúa sobre diferentes subtipos de receptores nicotínicos ubicados en la membrana de la CC, activando así una pléyade de eventos que terminan con la liberación de las catecolaminas que, a su vez, activarán una respuesta de alerta en el sujeto (que involucra por ejemplo, un aumento del tono muscular, una redistribución del volumen sanguíneo y un aumento de la frecuencia cardíaca), que desencadenará la respuesta de lucha o huida ante una amenaza o situación de estrés.



Las cromafines son básicamente células secretoras. El proceso secretor comprende dos fases: La primera consiste en la fabricación de las vesículas cromafines, que se lleva a cabo en el aparato de Golgi y atañe no solo a la membrana vesicular, sino además a los transportadores de membrana y los componentes proteicos intragranulares (cromograninas, dopamina β -hidroxilasa, trifosfato de adenosina (ATP)) y buena parte de los péptidos opioides. La otra fase es la maduración, que se lleva a cabo una vez que la membrana de la vesícula se ha sellado y que consiste en la acidificación del medio intragranular y la incorporación del ácido ascórbico y de las catecolaminas (Winkler y Smith, 1968).

La CC constituye un excelente modelo de estudio de determinados fenómenos por una serie de características propias, como por ejemplo el cambio morfológico que experimenta cuando se mantiene en cultivos primarios, pasando de una forma poliédrica que es posible observar cuando se encuentra en la médula adrenal, a una forma completamente esférica cuando se mantiene en cultivo primario. Estas características, además de considerar su origen (capa neuroectodérmica del tejido embrionario), su similitud con las neuronas (canales, receptores) y su capacidad de disparar potenciales de acción (PA) espontáneos, la convierten en un excelente modelo de estudio, tanto para fenómenos de exocitosis de neurotransmisores, como de señales de Ca^{2+} intracelulares acopladas a diferentes estímulos. Además, en la CC se ha descrito la existencia de una amplia gama de estructuras capaces de regular muy finamente los movimientos de Ca^{2+} intracelular. Así, posee una serie de vías para la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular, como son los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) y los receptores nicotínicos, e indudablemente los orgánulos celulares mitocondria y retículo endoplásmico (RE), que son fundamentales en el control de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} (de Diego y col., 2008).

Como ya he mencionado antes, la CC en el tejido intacto es inervada por terminaciones del nervio esplácnico. El ciclo de activación de la células comienza por la liberación de ACh al espacio sináptico por estas terminaciones, que activan los receptores nicotínicos y muscarínicos. La activación de los receptores nicotínicos permite la entrada a la célula principalmente de Na^+ , que inducirá la despolarización de la membrana celular, lo que permitirá que los CCVD se abran y se produzca una

entrada masiva de Ca^{2+} a la célula. Así, se activan los procesos dependientes de Ca^{2+} , como por ejemplo la exocitosis rápida de catecolaminas. Paralelamente, la activación de los receptores muscarínicos inducirá la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), y la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares (RE y mitocondria). Durante este proceso de activación celular, la mitocondria y el RE participan ejerciendo un riguroso control de los niveles de Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) generados. La terminación del proceso cuenta con la hidrólisis de la ACh en el espacio sináptico, y en la célula, la activación de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} que ayudarán a la restitución del potencial de reposo de la célula (de Diego y col., 2008).

3.1.1 Acoplamiento excitación-secreción en la CC

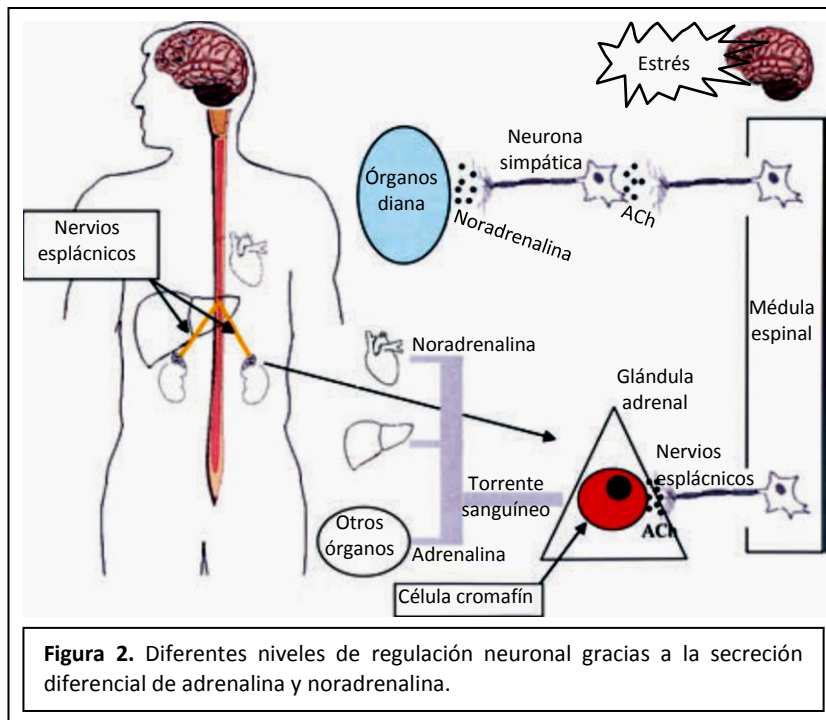
Cuando un estímulo despolarizante invade la CC, se van a producir una serie de fenómenos que concluyen con el vertido del contenido granular al exterior. El papel relevante del calcio en la contracción muscular había motivado el acuñado término “acoplamiento excitación-contracción” (Sandow, 1952). Por analogía, en 1961 Douglas y Rubin propusieron el de “acoplamiento excitación-secreción” para explicar la liberación por exocitosis de las catecolaminas y su dependencia absoluta del Ca^{2+} (Douglas y Rubin, 1961).

ACh es el principal estímulo secretagogo de la CC. Una vez liberada al espacio sináptico va a combinarse con receptores nicotínicos y muscarínicos ubicados en la superficie celular. Aunque el porcentaje de uno y otro colinoceptor varía de una especie animal a otra y se altera en situaciones de estrés crónico, en los mamíferos predomina la acción de los receptores nicotínicos.

El receptor nicotínico se compone de varias subunidades que forman un ionóforo, o canal iónico, que se abre cuando la ACh se une a la subunidad α . Por este ionóforo penetran iones Na^+ y, en menor medida, Ca^{2+} . La entrada de iones Na^+ va a provocar la despolarización de la membrana que provoca la apertura de CCDV. Ca^{2+} es el segundo mensajero más general e importante implicado en la secreción de cualquier célula. La secuencia precisa desde la entrada de calcio hasta la exocitosis no está aún del todo clara. El proceso finaliza cuando la membrana se repolariza mediante el

concurso de los canales de K^+ y el nivel de calcio libre intracelular retorna a concentraciones submicromolares.

Los diferentes patrones de estimulación de los nervios esplácnicos sobre los receptores nicotínicos y muscarínicos provocan la liberación selectiva de adrenalina o noradrenalina, para preparar al organismo para la respuesta de “lucha o huida”, en situaciones de estrés o durante hipoglucemias graves, hemorragias, frío, infarto agudo de miocardio u otros conflictos graves (Figura 2). La ACh que libera endógenamente el nervio esplácnico en la sinapsis con la CC, actúa sobre los receptores nicotínicos y muscarínicos y provoca la despolarización de la membrana desde su estado de reposo (entre -50 y -60 mV) y el disparo de PA (de Diego y col., 2008). Sin embargo, cuando se trata de correlacionar los cambios en las propiedades eléctricas de las CC provocados por ACh con la respuesta excitotóxica, se presenta un panorama complejo ya que la despolarización sostenida de la membrana, con o sin presencia de PA, provocará la apertura de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje para aumentar la entrada de calcio, elevar la concentración de Ca^{2+} citosólico y activar la exocitosis (Douglas, 1968; Neher, 1998; Garcia y col., 2006). El refinamiento de la técnica de *patch-clamp* ha permitido describir varios subtipos de canales de Ca^{2+} (T, L, N, P/Q, R) cuya especialización y condiciones para permitir la entrada de Ca^{2+} y provocar señales para desencadenar la exocitosis es, aún a día de hoy, bastante polémica y fuertemente dependiente del patrón de estimulación y del tipo de preparación en la que nos encontremos (Garcia y col., 2006), por lo que aún sigue bajo estudio.

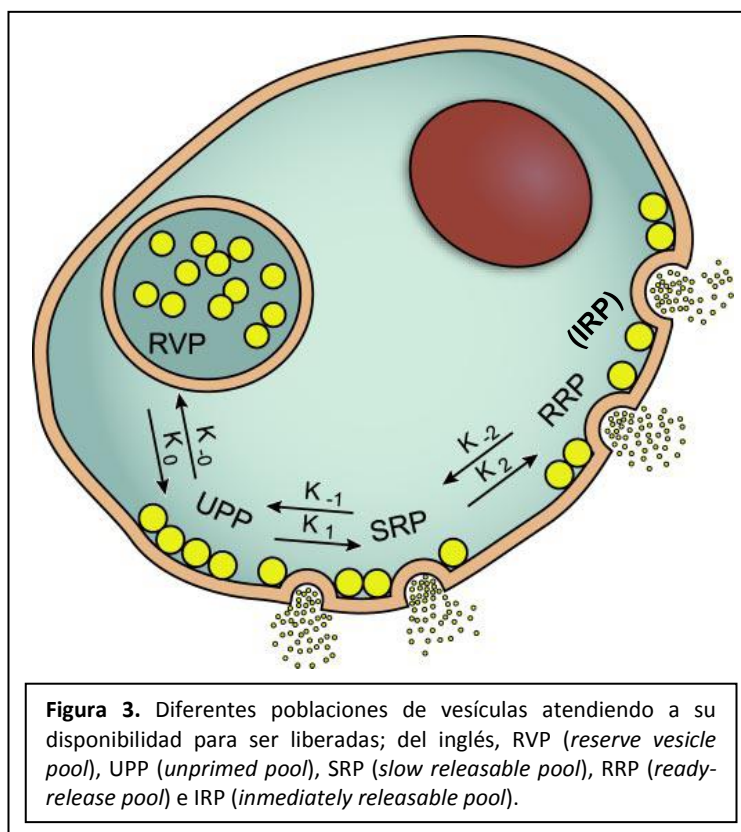


3.1.2 El proceso de exocitosis en la CC

El proceso de exocitosis consiste en la liberación del contenido de las vesículas secretoras hacia el espacio intercelular como consecuencia de la fusión de las membranas de la vesícula y del plasmalema, provocando la apertura de un poro por el que difunden las sustancias almacenadas en dichas vesículas a gran concentración. En la CC, la ACh estimula los receptores nicotínicos de la membrana plasmática, abriendo un poro por el que pasan cationes que provocan la despolarización de la membrana, lo que provoca la apertura de CCDV y la entrada de Ca^{2+} , que dispara el proceso de fusión de vesículas a la membrana.

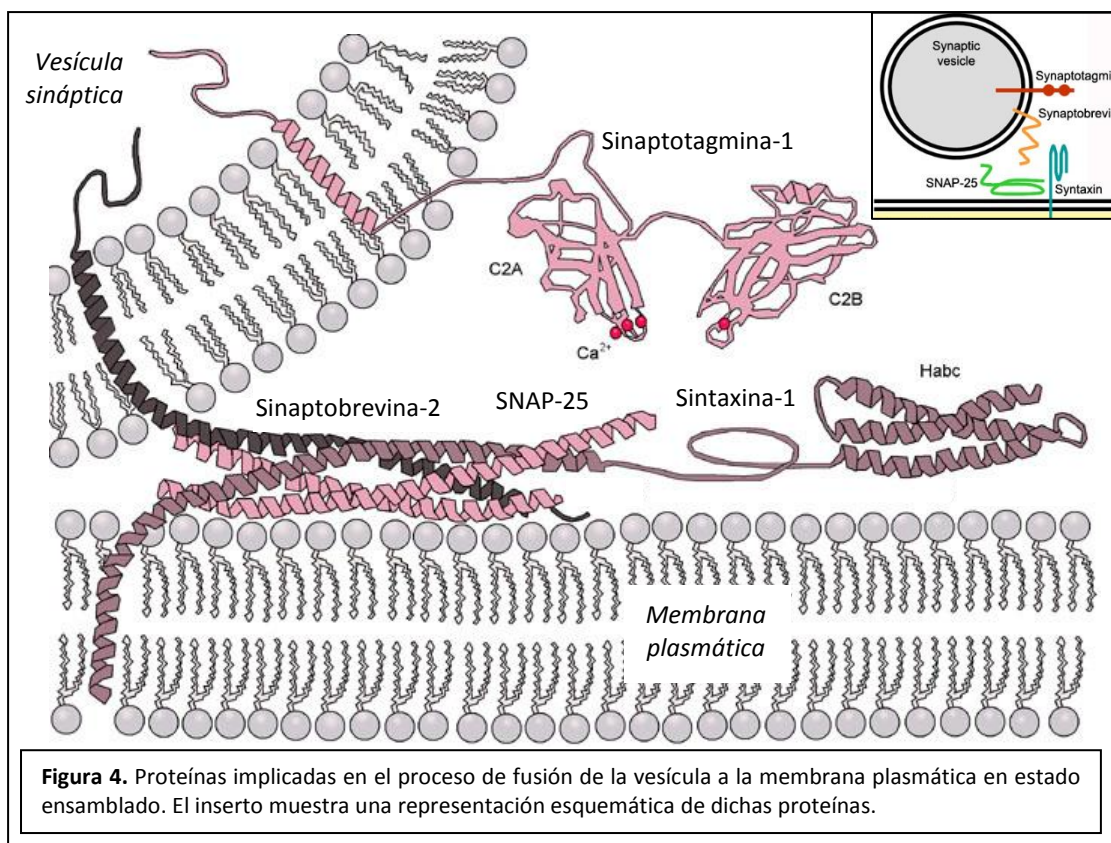
La CC contiene alrededor de 20.000 vesículas de núcleo denso (Burgoyne, 1995) que expulsan su contenido al exterior celular por un proceso de exocitosis dependiente de Ca^{2+} . Pevio a este fenómeno, las vesículas deben ser transportadas y sufrir un proceso de maduración subordinado al Ca^{2+} y/o al ATP (Holz y col., 1989; Bittner y Holz, 1992; Sorensen, 2004). Según la propuesta de von Räden y Neher (von Ruden y Neher, 1993), podemos explicar estos procesos mediante un modelo que agrupa las vesículas según si están o no “maduras” (es decir, si están listas para sufrir exocitosis). Así, desde un punto de vista amplio, habría una población de vesículas de

reserva (RVP, de sus siglas inglesas) que se desplazarían bajo determinadas condiciones hacia la membrana, quedando allí atracadas o ancladas, y estarían a la espera de que la $[Ca^{2+}]_c$ se viera incrementada para sufrir inmediatamente exocitosis. Más concretamente, existen diferentes estadios funcionales de maduración vesicular, y podemos diferenciar, además de la población de reserva, entre el contingente de vesículas atracadas no listas para ser liberadas (UPP, de sus siglas inglesas), el contingente de vesículas de liberación lenta (SRP, en inglés, de liberación en pocos segundos) al haber sufrido el proceso de “priming”, y el contingente de vesículas rápidamente listas para liberación (RRP, en inglés, de liberación en milisegundos), dentro del que diferenciamos además el contingente de vesículas inmediatamente listas para ser liberadas (IRP, en inglés, de liberación en muy pocos milisegundos) que se encuentra más cerca de los CCDV; ordenados de más tardía a más inmediata en términos de exocitosis (Figura 3) (Voets y col., 1999; Sorensen, 2004). Hay que destacar también que el transporte de una población a otra es muy dinámico, bidireccional y dependiente de Ca^{2+} . Por otra parte, están las vesículas recicladas, que son aquellas que han sufrido exocitosis pero no de forma completa, y que regresan a formar parte del resto de poblaciones.



3.1.2.1 Fusión vesicular

El proceso de fusión de las vesículas a la membrana y su regulación está controlado por proteínas que se encuentran ancladas a las membranas: en primer lugar, el complejo SNARE, encargado de fusionar la membrana vesicular a la membrana plasmática, está formado por las proteínas SNAP-25 (proteína asociada al sinaptosoma-25) y sintaxina-1 (Stx1) en la membrana plasmática, y por sinaptobrevina-2 (Sbv2) en la vesícula; y en segundo lugar, por sinaptotagmina-1 (Syt1), que se ha postulado como sensor de Ca^{2+} (se une en sus dominios C2A y C2B) y encargada de comenzar el proceso de fusión uniéndose a Stx1 (Sorensen y col., 2003) (Figura 4). Dicha formación del complejo SNARE provoca la formación de una unión tipo puente que permite que las dos bicapas lipídicas entren en contacto y se induzca su fusión, que es completada por la entrada de Ca^{2+} gracias al sensor sinaptotagmina.



De acuerdo con la hipótesis “cremallera”, la unión se inicia con los extremos N-terminal de las proteínas SNARE hacia los C-terminal anclados en sendas membranas, formando una estructura en espiral helicoidal de 4 hebras (Jahn y Scheller, 2006). La

formación del complejo comienza con la unión de SNAP-25 y Stx1, para después acomodar a Sbv2. El proceso ocurre mediado por las proteínas Munc18-1 y Munc13, que al unirse a Stx1 permiten que el complejo SNARE se complete y dé paso a la fusión de las membranas (Gerber y col., 2008; Ma y col., 2013; Zhou y col., 2013). La energía resultante de la unión proteica del complejo SNARE sería utilizada en vencer las fuerzas de repulsión entre las membranas. Dado que se ha demostrado, en experimentos *in vitro*, que Stx1 es suficiente para producir la fusión espontánea de vesículas independiente de Ca^{2+} , se especula con que Syt1 tendría un doble papel regulador: en ausencia de Ca^{2+} inhibiría la dinámica del complejo SNARE, y en presencia de Ca^{2+} actuaría como agonista del proceso de fusión vesicular (Woodbury y Rognlien, 2000).

Una hipótesis alternativa conocida como “sello” implica a la proteína complexina dentro del complejo SNARE y postula su interacción con Syt1: la complexina se encontraría unida a Syt1 inhibiendo la fusión de la vesícula a la membrana, pero la unión del Ca^{2+} a Syt1 provocaría que la complexina se inactivara/liberara, permitiendo a la sinaptotagmina realizar su función con normalidad (Kummel y col., 2011).

3.2 Estímulos secretagogos

En el proceso secretor es imprescindible el Ca^{2+} , el cual se encuentra estrictamente regulado en CC (García y col., 2006). En el mecanismo responsable de la homeostasia del Ca^{2+} intervienen varios procesos (Berridge y col., 2003). En la membrana plasmática, una bomba de alta afinidad por el Ca^{2+} y un intercambiador de baja afinidad por el Na^+ - Ca^{2+} son los encargados en la salida de Ca^{2+} de la célula (Kao y Cheung, 1990; Liu y Kao, 1990; Chern y col., 1992). Los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , es decir, el RE y la mitocondria, captan el Ca^{2+} mediante una Ca^{2+} -ATPasa y el uniportador, respectivamente. En el caso del RE, este Ca^{2+} es liberado a través del receptor de IP_3 (IP_3R) y del receptor de rianodina (RyR); por otro lado, la mitocondria se vale de un intercambiador Na^+ - Ca^{2+} para este proceso. Dependiendo del tipo celular y del secretagogo que se use, los depósitos internos de Ca^{2+} actuarán como fuente de

Ca^{2+} para disparar reacciones fisiológicas, o bien servirán como sumidero de Ca^{2+} para secuestrar la sobrecarga de Ca^{2+} citosólico (Rizzuto, 2001; Rose y Konnerth, 2001)

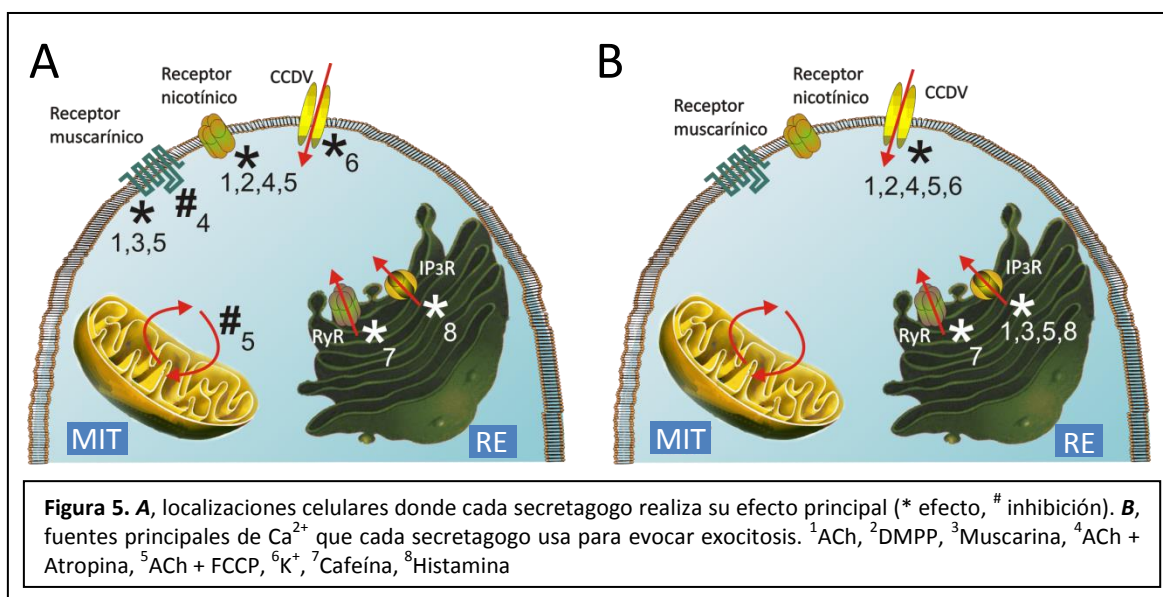
Se ha descrito la presencia de varios mecanismos reguladores de Ca^{2+} en las CC. Sin embargo, el papel de los mecanismos individuales es diferente en células aisladas de distintas especies. Por ejemplo, en CC bovinas se ha descrito un fenómeno de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR, en sus siglas inglesas) (Alonso y col., 1999) mediante el cual se incrementa $[\text{Ca}^{2+}]_c$ por la apertura de los RyR de la membrana del RE gracias a un aumento inicial transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Verkhatsky, 2002). Sin embargo, no se ha encontrado evidencia de que este fenómeno de CICR ocurra en CC de ratón (Rigual y col., 2002); más aún, las respuestas en los cambios de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y en la exocitosis provocadas por agentes que movilizan Ca^{2+} desde depósitos internos son diferentes entre CC de rata y bovinas (Finnegan y col., 1996). También se ha descrito que la mitocondria tiene diferentes funciones en las CC de distintas especies en lo que a la exocitosis se refiere (Ales y col., 2005). En CC de ratón, la inhibición de la captación de Ca^{2+} por la mitocondria supone una disminución del nivel máximo en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y en la secreción inducida por despolarización; sin embargo, en CC bovinas, el efecto es mucho menor (Ales y col., 2005).

El laboratorio de W. Douglas demostró que tanto la ACh (Douglas y Rubin, 1961) como el K^+ elevado (Douglas y Rubin, 1963) provocaban una respuesta secretora similar mediante despolarización y entrada de Ca^{2+} por CCDV (Douglas, 1968), lo que provocó el uso indistinto de ambos secretagogos en CC en los subsiguientes estudios centrados en la secreción y la señalización de Ca^{2+} (García y col., 2006; García-Sancho y col., 2012; García y col., 2012). Posteriormente, Cuchillo-Ibáñez y colaboradores (Cuchillo-Ibanez y col., 2002) demostrarían que ACh y K^+ provocan respuestas muy diferentes en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y en la exocitosis de CC bovinas: mientras que la ACh provocaba elevaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ pequeñas y localizadas en regiones cercanas a la membrana, el K^+ provocaba elevaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que se dispersaban rápidamente en el citosol; la secreción evocada por ambos secretagogos, sin embargo, fue muy similar en carga; el bloquear la captación de Ca^{2+} por el RE disminuyó la respuesta secretora de ACh a la mitad sin afectar a la provocada por K^+ , y al bloquear la captación de Ca^{2+} de la

mitocondria la respuesta secretora de ACh aumentó drásticamente afectando mínimamente a la de K^+ .

A pesar de estos estudios y de que las CC de ratones *knockout* y transgénicos han sido ampliamente usadas en estudios recientes sobre los mecanismos moleculares implicados en la secreción vesicular dependiente de Ca^{2+} , las etapas finales de la exocitosis y el poro de fusión y su relación con el origen del Ca^{2+} necesario para la exocitosis no han sido bien caracterizadas en la CC de ratón y es posible que existan diferencias de notable importancia, basándonos en la dependencia del Ca^{2+} para el funcionamiento del poro de fusión (Fernandez-Chacon y Alvarez de Toledo, 1995; Ales y col., 1999). Es por ello que en este estudio se va a profundizar en las características comparadas de la exocitosis evocada por varios secretagogos (Figura 5):

1. El neurotransmisor fisiológico de la sinapsis entre el nervio esplácnico y la CC, la ACh
2. Un agonista del receptor nicotínico, el dimetil-fenil-piperazinium (DMPP)
3. Un agonista del receptor muscarínico, la muscarina
4. ACh más un antagonista muscarínico, la atropina
5. ACh más un protonóforo mitocondrial, el carbonil cianuro-p-trifluorometoxifenil hidrazona (FCCP)
6. El despolarizante clásico más usado, el K^+ elevado
7. Un agonista del RyR, la cafeína
8. Un agonista del IP_3R , la histamina



Esta prospección se llevará a cabo en la cepa de ratón C57BL/6 (en adelante C57), que es ampliamente usada para el desarrollo de modelos de enfermedad y para silenciar o sobreexpresar proteínas de la maquinaria de la exocitosis, y sus CC han sido y son ampliamente empleadas como modelos para el estudio de los aspectos moleculares de la maquinaria exocitótica (Sorensen y col., 2003) y la regulación de la cinética del poro de fusión mediante sinaptotagminas silvestres y mutadas (Segovia y col., 2010).

3.3 Enfermedades neurodegenerativas

Con el aumento de la esperanza de vida y la demografía cambiante de la población en el siglo XXI, se espera que aumente significativamente la incidencia de enfermedades del sistema nervioso central (SNC). Las más graves de las enfermedades del SNC son las enfermedades neurodegenerativas, que se caracterizan por la disminución gradual de las funciones neuronales con la edad, a menudo acompañada de la muerte neuronal. La EA, la ELA o la demencia fronto-temporal son algunos ejemplos de enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, las estrategias que se siguen para el tratamiento eficaz de estas enfermedades son muy limitadas por el momento (Fratiglioni y col., 2004; Lee y col., 2007).

Hoy se acepta que las enfermedades neurodegenerativas tienen una naturaleza multisistémica, lo que presenta numerosas dificultades para un posible tratamiento de las mismas. La muerte de determinados tipos de neuronas en enfermedades neurodegenerativas se produce mediante una compleja secuencia de eventos moleculares y celulares. La situación es aún más complicada, debido al difícil acceso de los fármacos para atravesar la barrera hematoencefálica; por otra parte, el 98% de los fármacos administrados para el tratamiento de estas enfermedades tiene una cinética de liberación que causa efectos secundarios a nivel periférico (Lockman y col., 2002).

3.3.1 Enfermedad de Alzheimer

La EA se conoce también como mal de Alzheimer o demencia senil de tipo Alzheimer, o simplemente como alzhéimer. La neuropatología característica de la enfermedad fue observada por primera vez por Alois Alzheimer en 1907 (Alzheimer, 1907). El alzhéimer es una enfermedad neurodegenerativa y es frecuente en la población de edad avanzada; la enfermedad cursa con un deterioro cognitivo y trastornos conductuales. Se caracteriza en su forma típica por una pérdida progresiva de la memoria y de otras capacidades mentales; a medida que las neuronas mueren se atrofian diferentes zonas del cerebro, principalmente la corteza cerebral. La causa principal de la EA es desconocida.

La EA es una enfermedad devastadora; y lo es desde las ópticas familiar, social, sanitaria y económica. Hay 5 millones de enfermos en los EEUU, 7 millones en la UE y más de 600.000 en España. El envejecimiento progresivo de la población podría duplicar estas cifras para 2025, y considerando que los costes resultantes del cuidado de un paciente ascienden a 30.000 euros/año, podemos calcular el enorme impacto económico de la enfermedad; puesto que los pacientes diagnosticados pueden vivir 10-20 años, la prevalencia de la EA se incrementa con los años y por consiguiente, también lo hacen los costes y la carga familiar y social.

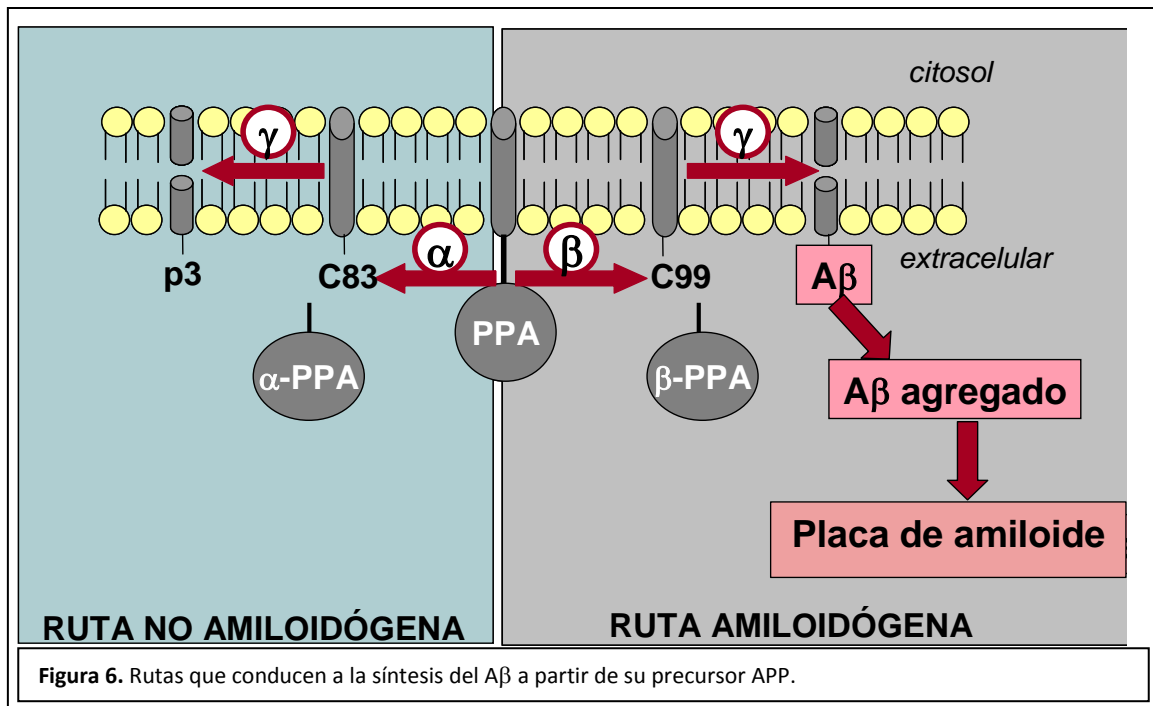
Se han identificado más de 20 mutaciones diferentes relacionadas con la enfermedad. Destacan las de presenilina-1 (PS1), presenilina-2 (PS2) y genes de la proteína precursora de amiloide (APP, en inglés) que directamente causan la EA, y se vinculan con la fisiopatología de la misma, siendo por lo menos responsables del 1% de todos los casos de la EA de tipo familiar (EAF) (Borchelt y col., 1996). La mayor parte de los enfermos de EA (hasta el 98%) padece la enfermedad esporádica. En general, los enfermos presentan una amplia pérdida de las neuronas, debido a la existencia de placas seniles y ovillos neurofibrilares en la corteza cerebral y el hipocampo.

3.3.1.1 *Fisiopatología de la enfermedad*

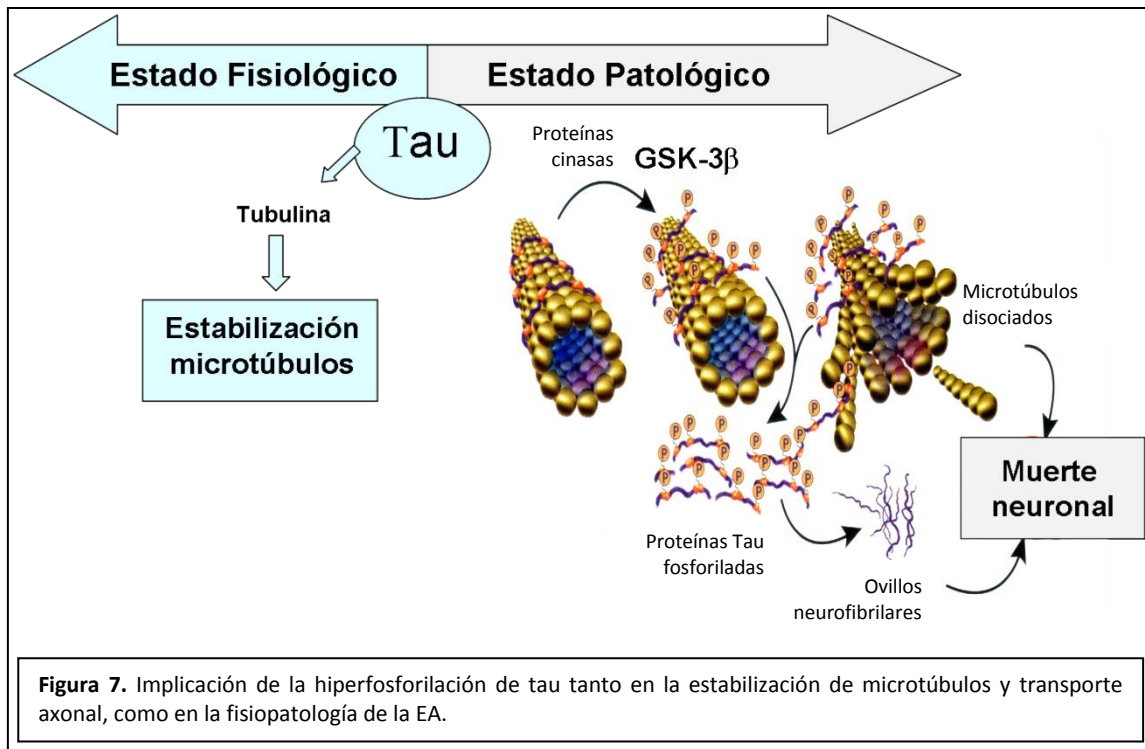
Las características neuropatológicas de la EA son las placas seniles, la angiopatía amiloidea y los ovillos neurofibrilares (ON) (Terry y Katzman, 1983). Estos cambios,

aunque fisiopatológicamente relacionados con el desarrollo de la EA y que, además se exigen para el diagnóstico definitivo, no son específicos para la enfermedad, porque pueden también encontrarse en otros tipos de enfermedades neurodegenerativas (Boller y col., 1980; Bierer y col., 1995; Scherzinger y col., 1997; Brown y col., 1998; Edison y col., 2008; Gomperts y col., 2008).

El péptido principal en la placa amiloidea es el β -amiloide ($A\beta$) ; es un péptido hidrofóbico con 39-43 residuos aminoacídicos. La isoforma 42 del péptido (llamada $A\beta_{1-42}$) es la más abundante en la placa amiloidea, mientras que la isoforma de 40 aminoácidos ($A\beta_{1-40}$) es el péptido preferentemente acumulado en la angiopatía amiloidea. El $A\beta$ es el resultado del procesamiento de APP, una proteína transmembrana (Hardy y Selkoe, 2002; Zheng y Koo, 2006). APP se expresa en todo tipo de células y se metaboliza por dos vías alternativas, vía no amiloidogénica y vía amiloidogénica (Figura 6). En la primera, la enzima α -secretasa corta APP produciendo APP soluble y la γ -secretasa corta el fragmento del C-terminal en su parte intramembranosa produciendo el péptido p3. El papel fisiológico de APP y sus fragmentos es desconocido, pero algunos investigadores sugieren un papel crucial del mismo en la regeneración neuronal (Small y col., 1994; Sabo y col., 2001) y otros creen que está directamente implicado en la fisiopatología de la EA (Haass y col., 1997). En la vía amiloidogénica, APP es procesado primero por la β -secretasa, produciendo el β -APP que a continuación se procesa por la γ -secretasa y de esta manera se produce el péptido $A\beta$ (Octave, 1995).



Además de la agregación del A β extracelular, en la EA también se encuentra la formación de los ON en el interior de la célula. Estructuralmente, los ON son filamentos helicoidales pareados y rectos (Rubenstein y col., 1986), que son el resultado de una fosforilación anormal de la proteína tau (Goedert y col., 1988; Goedert y col., 2006). La unión de la proteína tau a la tubulina favorece la estabilidad de los microtúbulos (Goedert, 1993); por el contrario, la proteína tau hiperfosforilada disocia los microtúbulos y secuestra la tau normal. Esta estructura insoluble de tau hiperfosforilada daña las funciones celulares tanto en el citoplasma como en el transporte axonal, lo que conduce a la muerte celular (Mudher y Lovestone, 2002). La proteína tau es fosforilada por la enzima glucógeno sintasa cinasa (Figura 7) (Hanger y col., 2009).



3.3.1.2 Hipótesis amiloidea

En la actualidad, la hipótesis amiloidea, presentada hace más de dos décadas, es la más utilizada para explicar la fisiopatología de la EA (Hardy y col., 1992). Según esta hipótesis, la acumulación patológica de A β en el cerebro conduce al estrés oxidativo, la destrucción de las neuronas y por último, al síndrome clínico de la EA. Aunque la base de esta hipótesis está ampliamente documentada, existen teorías alternativas en las que el A β no es la causa del estrés oxidativo sino que puede incluso ejercer una acción neuroprotectora, relacionada con una respuesta adaptativa de las neuronas al estrés oxidativo causado por otros factores (Lee y col., 2007).

El A β tiene tendencia a agregarse en oligómeros, cuya formación provoca inflamación local y neurotoxicidad. Como resultado de este proceso, la proteína tau se plegará en ovillos intraneuronales, que resulta en la muerte celular. La destrucción neuronal progresiva lleva a la escasez y desequilibrio entre los diferentes neurotransmisores, y a la deficiencia cognitiva característica de la EA. A raíz de esta hipótesis, algunos investigadores plantearon la idea de que la prevención secundaria de la EA pudiera hacerse a través de alguna de las estrategias siguientes:

- Disminuyendo la producción de A β ;
- Estimulando el aclaramiento del A β formado;
- Previniendo la agregación de A β en placas amiloideas;
- Previniendo la lesión neuronal mediante la limitación de la inflamación y la neurotoxicidad causada por A β .

Asimismo se estimó que la terapia de reemplazo de la pérdida de los neurotransmisores es la última opción, después de la cascada amiloidea (van Marum, 2008).

3.3.1.3 Hipótesis colinérgica

Esta hipótesis sugiere que la EA se debe a una reducción en la síntesis del neurotransmisor ACh, lo que genera un déficit en la transmisión nerviosa. No ha mantenido apoyo global debido a que los medicamentos que tratan una deficiencia colinérgica tienen poca efectividad en la prevención o cura de la EA. Se ha propuesto que los bajos niveles de ACh darían inicio a una acumulación de A β a unos niveles tales que desembocan en una neuroinflamación generalizada que deja de ser tratable simplemente promoviendo la síntesis del neurotransmisor (Francis y col., 1999; Wenk, 2003; Shen, 2004).

3.3.1.4 Mutación APP/PS1 y modelo murino de EA utilizado en este estudio

Un subconjunto de los casos de EA se producen relativamente pronto (de la cuarta a la sexta década de vida) y son trastornos autosómicos dominantes de tipo familiar (EAF) causados por mutaciones en el gen de la proteína PS1 en el cromosoma 14, en el gen de la proteína PS2 en el cromosoma 1 o en el de APP en el cromosoma 21, y aproximadamente el 30% de las genealogías de EAF de aparición temprana se segregan conjuntamente con mutaciones en PS1.

Como hemos comentado anteriormente, los péptidos A β son endoproteolíticamente generados a partir de APP y pueden presentarse de 40 aminoácidos (llamados A β 1-40) o de 42 (A β 1-42). Ciertas mutaciones ligadas a EAF en APP provocan

un aumento en la cantidad, longitud o en las propiedades fibrillogénicas de A β y estudios recientes indican que algunas variantes de la PS1 vinculadas a EAF alteran el procesamiento de APP aumentando la generación de péptidos A β 1-42, que parecen ser más fibrillogénicos que los A β 1-40.

Tanto en plasma de pacientes, en medio de cultivo condicionado de fibroblastos procedentes de pacientes de EA con variantes de PS1 y PS2 ligadas a EAF, y en medio condicionado de células de mamífero transfectadas que expresan variantes mutantes de PS1 y PS2, se ha demostrado que existen niveles de A β 1-42 más altos que en los controles pertinentes. Con el fin de examinar el efecto que tiene la PS1 mutante en los niveles de A β 1-42 en un entorno *in vivo*, Borchelt y colaboradores generaron en 1997 ratones transgénicos que co-expresan la proteína mutante de humanos PS1-A246E ligada a EAF (Hu PS1-A246E) y la proteína quimérica ratón/humano APP695 (Mo/Hu APP 695, que alberga un dominio A β humano y las mutaciones K595N y M596L ligadas al fenotipo EAF sueco (APP_{SWE} (Borchelt y col., 1996)) (Borchelt y col., 1997). Estos autores demostraron que, en una variedad de experimentos en entornos *in vivo* e *in vitro*, en comparación con los ratones transgénicos que solo expresaban APP_{SWE} y con los que co-expresaban *wild type* Hu PS1 y APP_{SWE}, los nuevos transgénicos que generaron presentaban concentraciones mayores de A β 1-42 en el tejido cerebral y que, del mismo modo, la PS1 mutante influía selectivamente en el procesamiento de la APP endógena murina y de la APP *wild type* humana, aumentando la generación de A β 1-42 en los cerebros de los ratones transgénicos (Borchelt y col., 1997). Desde 1997, este modelo de ratón ha sido ampliamente utilizado para estudios de la EA, relacionados con la conducta, la etiopatogenia y la búsqueda de medicaciones para tratar la EA.

<i>Mutación</i>	<i>Localización</i>	<i>Fenotipo</i>
A246E	En presenilina 1 humana	Concentración elevada del péptido 1-42 de β -amiloide en cerebro con formación de depósitos a los 6-7 meses de edad
K595N y M596L	En APP murina con dominio A β humano	

Tabla 1. Mutaciones de pacientes de EAF expresadas en el ratón APP/PS1.

3.3.2 Esclerosis lateral amiotrófica

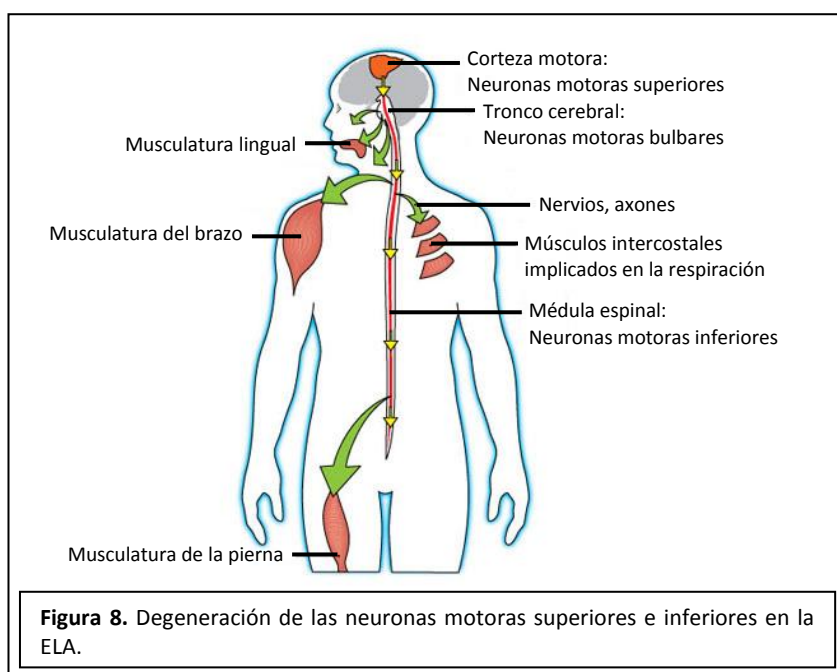
La esclerosis lateral amiotrófica (ELA), también conocida como enfermedad de la motoneurona o enfermedad de Charcot (al ser éste, Jean Martin Charcot, su descubridor en 1869 (Charcot y Joffroy, 1869)), es una enfermedad degenerativa de tipo neuromuscular. Se caracteriza por una pérdida de neuronas motoras superiores e inferiores en la médula espinal, tronco cerebral y corteza motora. Esta pérdida de neuronas motoras provoca atrofia muscular, parálisis de la musculatura voluntaria y posterior muerte en 3 a 5 años desde la aparición de la enfermedad por fallo en los músculos respiratorios. Lo que hace de esta enfermedad un proceso tan cruel es el hecho de que, aunque el cuerpo sufre una parálisis completa y se pierde la capacidad de comunicación, la mente y los sentidos permanecen intactos, ya que las neuronas sensoriales o autónomas no se ven afectadas.

En el 5 al 10% de los casos de ELA existe un componente familiar (hereditario), aunque el resto (la mayoría) resultan ser esporádicos (Kurland y Mulder, 1955). La edad a la que normalmente aparecen los síntomas es 46 y 56 años para las variantes familiar y esporádica, respectivamente, con una prevalencia de aproximadamente 4 a 6 por cada 100.000 individuos al año (Yoshida y col., 1986; Camu y col., 1999). Las causas para la mayoría de los casos de ELA son desconocidas, y el curso clínico es altamente variable, lo que sugiere que el mecanismo de la enfermedad está controlado por múltiples factores.

Aunque la ELA es una enfermedad menos común que la EA, el hecho de que fuera descubierta casi 40 años antes enfatiza la importancia del sistema motor, aunque también hay que considerar que la ELA es más visible y sus huellas son más evidentes. Lo que Charcot describió hace ya 146 años fue la observación de lo que él denominó “una inconfundible palidez mielínica” en las porciones laterales de la médula espinal, que representaban la degeneración y la pérdida de neuronas motoras a medida que descendían desde el cerebro para conectar con las neuronas motoras dentro de la médula.

3.3.2.1 Fisiopatología de la enfermedad

Los rasgos clínicos de la ELA engloban debilidad, atrofia y espasticidad musculares progresivas, resultando al final en una parálisis completa de los músculos voluntarios a medida que las neuronas motoras sufren degeneración (Figura 8). La debilidad y atrofia musculares están causadas principalmente por la degeneración de las neuronas motoras inferiores, mientras que la espasticidad es un reflejo de la pérdida de neuronas superiores. El fallo respiratorio causado por la denervación de los músculos respiratorios o por neumonía es normalmente un episodio fatal (Kandel y col., 1991).



La debilidad y atrofia musculares se extienden desde las partes distales de las extremidades hasta las partes proximales, y luego a otros miembros, para continuar hacia los músculos que se encargan de la respiración y terminar en la región bulbar. En este caso, el primer síntoma más común es la debilidad de un brazo o una pierna y una torpeza evidente en las manos, así como posibles calambres en las piernas. También es posible que la debilidad muscular ocurra en el sentido opuesto, partiendo de la región bulbar, siendo entonces el primer síntoma advertible la dificultad en el habla y el tragar. Dado que el sistema nervioso autónomo no se ve afectado, no existen síntomas de tipo sensorial ni cognitivo. Sin embargo, existe una selectividad en la degeneración

de las neuronas motoras, ya que aquellas encargadas de controlar la vejiga y los esfínteres así como las del movimiento de los ojos están relativamente poco afectadas, fallando sólo en las etapas muy finales de la enfermedad (Kandel y col., 1991).

3.3.2.2 *ELA familiar y esporádica*

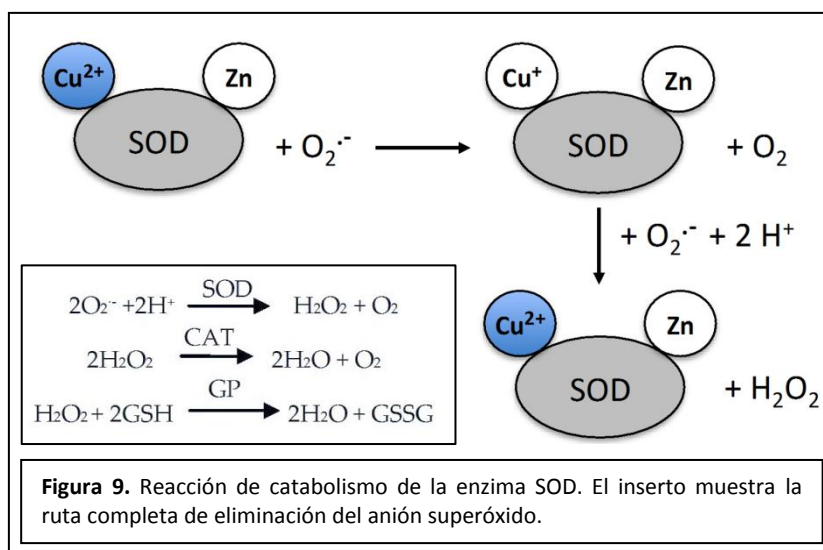
Al hablar de ELA tenemos que considerar que, en realidad, no se trata de una sola enfermedad, sino que engloba un grupo de trastornos heterogéneos que afectan tanto a las neuronas motoras superiores como a las inferiores. La mayoría de casos de ELA (en torno al 90%) son de tipo esporádico y aparecen sin ningún componente genético conocido. El 10% de casos restante son heredados de forma dominante, llamados ELA familiar. A pesar de las diferencias en la genética, ELA familiar y ELA esporádica son clínicamente indistinguibles, por lo que identificar la forma familiar normalmente depende del diagnóstico de la enfermedad en otros miembros de la familia. Solo existen pequeñas variaciones entre ambas formas: en cuanto a la edad de aparición (46 años de media en la familiar y 56 en la esporádica (Camu y col., 1999)), inexplicable relación en cuanto al sexo (1:1 hombre-mujer en la familiar, 1.5:1 en la esporádica (Haverkamp y col., 1995)), supervivencia y frecuencia con la que la aparición se produce en los miembros inferiores.

La idea de dividir la enfermedad en esporádica y familiar obedece al descubrimiento inicial y publicación de Kurland y Mulder en 1955, que observaron que en torno a un 10% de los casos de ELA tenían antecedentes familiares con genética mendeliana (Kurland y Mulder, 1955). Sin embargo, esta separación puede verse afectada a medida que el conocimiento de los genes de efecto menor y de los factores ambientales ha mejorado, y que los casos de ELA que parecían de tipo esporádico pueden presentar componentes y vinculaciones genéticas (Blauw y col., 2008; Sreedharan y col., 2008).

3.3.2.3 *ELA ligada a SOD1 y modelo murino de ELA usado en este estudio*

La forma más común de ELA familiar (supone alrededor de un 20% de los casos) está causada por mutaciones en el locus 21q22.1 del gen que codifica la proteína Cu,Zn

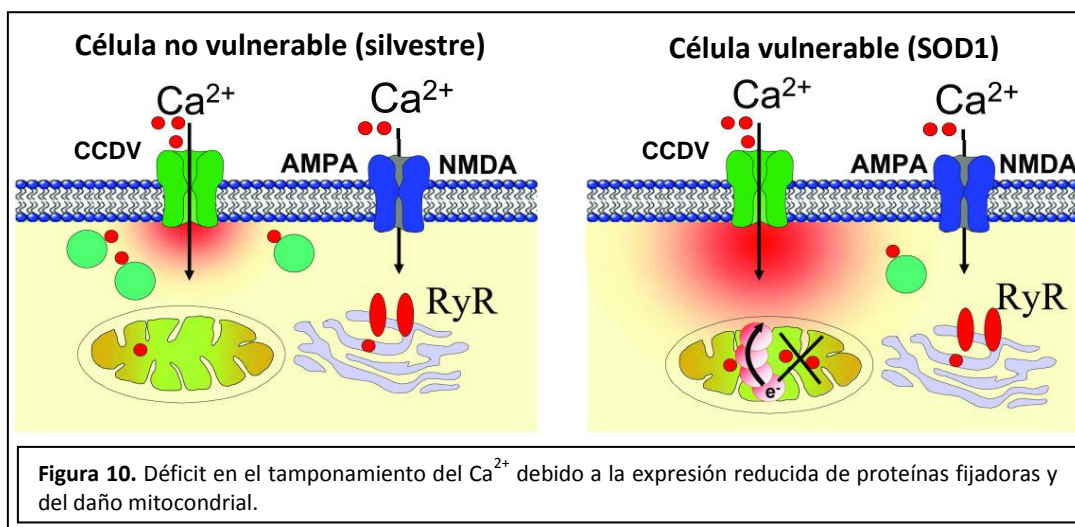
superóxido dismutasa 1 (SOD1), y corresponde por tanto al 2% de los casos totales de ELA. La función de esta enzima homodimérica citoplasmática de 153 aminoácidos y expresión ubicua es la de convertir los aniones superóxido (radical libre de la familia de los radicales de oxígeno) en agua y peróxido de hidrógeno, que es más tarde metabolizado por la catalasa y la glutatión peroxidasa (Figura 9) (Fridovich, 1986). El descubrimiento de que las mutaciones en SOD1 causan ELA supuso un hito, ya que fue el primer gen identificado como causa dominante para la ELA (Rosen y col., 1993), aunque no era nada obvio el cómo SOD1, una enzima antioxidante expresada en todas las células y tejidos, podía causar una degeneración de las neuronas motoras.



Tanto en la ELA humana como en los modelos de ratones transgénicos generados se han descrito estados de hiperexcitabilidad sináptica y de hiperexcitabilidad intrínseca de las motoneuronas (Pieri y col., 2003; Quinlan y col., 2011). Esta hiperexcitabilidad podría estar vinculada a la mayor vulnerabilidad de las motoneuronas, que expresan receptores glutamatérgicos tipo AMPA y NMDA, que son permeables al Ca^{2+} ; esta vulnerabilidad se ha asociado también a una débil capacidad tamponadora del catión, debida a la baja expresión de las proteínas fijadoras de Ca^{2+} parvalbúmina y calbindina D-28K (Alexianu y col., 1994; Vanselow y Keller, 2000; von Lewinski y col., 2008). La morfología y función de las mitocondrias también se encuentran alteradas, por lo que la captación mitocondrial de Ca^{2+} se encuentra disminuida en los transgénicos de SOD1, lo que incrementa el estado de excitotoxicidad

(Kruman y col., 1999; Vila y col., 2003; Jaiswal y col., 2009; Coussee y col., 2011) (Figura 10).

Las mutaciones sin sentido en el gen de SOD1 conducen al reemplazo de residuos simples de aminoácido en la proteína y, con alguna excepción, provoca herencia dominante de la enfermedad. No se han encontrado mutaciones de SOD1 en pacientes sanos, a excepción de la mutación D90A, donde una alanina ocupa el lugar del ácido aspártico en la posición 90 de la proteína, aunque bajo determinadas condiciones también provoca la herencia de la enfermedad, de forma dominante y recesiva (Andersen y col., 1995; Sjalander y col., 1995).



En conjunto, se han identificado más de 150 mutaciones responsables de la enfermedad (Valentine y col., 2005; Banci y col., 2008). Aunque tras el descubrimiento de SOD1 se describió una disminución de la actividad de SOD1 en los pacientes de ELA (Deng y col., 1993; Orrell y col., 1995), la falta de actividad dismutasa no puede ser la causa primaria de ELA, ya que las mutaciones no afectan a la actividad enzimática normal de SOD1. Por lo tanto, se ha planteado la hipótesis de que las mutaciones en SOD1 causan la enfermedad a través de una ganancia tóxica de función (Wong y col., 1995) de naturaleza desconocida, aunque se han descubierto bastantes mecanismos patogénicos putativos, como la formación de agregados de proteína, saturación de las chaperonas y proteasomas, deslocalización y agregación de neurofilamentos, inflamación, generación de radicales libres aumentada y daño oxidativo, disfunción

mitocondrial, y alteraciones pro-apoptóticas (Boillee y col., 2006). A pesar de los numerosos mecanismos propuestos para la enfermedad, la causa de la toxicidad de la mutación en SOD1 es aún desconocida. Las mutaciones en SOD1 pueden afectar a la estabilidad de la enzima, haciéndola más propensa a la agregación, o bien pueden alterar el sitio catalítico permitiendo que ciertas sustancias aberrantes entren en él y causen reacciones de oxidación indeseadas (Cleveland y Rothstein, 2001). En estudios recientes, se ha implicado la SOD1 mitocondrial en la patogénesis de la ELA (Liu y col., 2004; Vijayvergiya y col., 2005; Bergemalm y col., 2006; Deng y col., 2006; Ferri y col., 2006) y un incremento en el reclutamiento de SOD1 mutante a la mitocondria en la médula espinal puede ser la base de la muerte específica de las neuronas motoras. Sin embargo, los mecanismos exactos de esta selectividad y de la toxicidad aún no han sido esclarecidos.

Todas las mutaciones de SOD1 son dominantes (a excepción de D90A, que también puede ser recesiva dependiendo de la población estudiada), y las diferentes mutaciones pueden causar distintos fenotipos atendiendo a la edad de aparición, progresión y síntomas clínicos. La mutación A4V es la más común y, desgraciadamente, también la que provoca la variante más agresiva de la ELA familiar con una supervivencia media de solo 1 año tras el inicio de la enfermedad (Deng y col., 1993). En contraste, la mutación H46R localizada dentro del dominio de unión a cobre provoca una forma leve de ELA con una esperanza de vida media de 18 años desde el inicio (Aoki y col., 1993; Ratovitski y col., 1999), dato curioso ya que la mutación adyacente a esta, H48Q, provoca una forma grave de ELA de rápida progresión (Enayat y col., 1995). Por otra parte, las mutaciones G37R y L38V se predice que tienen un inicio más temprano de forma diferente que las asociadas a un fenotipo agresivo, como la A4V (Cudkowicz y col., 1997). Considerando la variación en la progresión de la enfermedad entre las diferentes mutaciones y el hecho de que la D90A causa ELA tanto de forma dominante como recesiva dependiendo de la población estudiada, es evidente que el fenotipo clínico puede verse afectado por la genética o por los factores ambientales aparte de por las mutaciones sin sentido en SOD1.

Desafortunadamente, aún no ha sido posible encontrar genes modificadores válidos para la enfermedad (Broom y col., 2006). A pesar del hecho de que las

diferentes mutaciones en SOD1 causan variaciones notables en el fenotipo de la enfermedad y que estas mutaciones solo explican el 1-2% de todos los casos de ELA, la investigación de esta patología se ha centrado fuertemente en esta enzima, principalmente debido a que las mutaciones en SOD1 han permitido a los científicos desarrollar modelos animales transgénicos que expresan la SOD1 mutada (Gurney y col., 1994; Ripps y col., 1995; Wong y col., 1995; Bruijn y col., 1997; Nagai y col., 2001; Howland y col., 2002; Wang y col., 2003; Jonsson y col., 2004; Wang y col., 2005).

Concretamente, el primer modelo animal de la enfermedad es el que Gurney y colaboradores desarrollaron en 1994 en ratón, siendo del que más estudios se han realizado y, gracias a ello, del que mejor conocimiento se tiene, y por ello será el elegido en este estudio (Gurney y col., 1994). Este ratón sobreexpresa la proteína SOD1 con la mutación G93A (alanina por glicina en el codón 93) bajo el control del promotor endógeno humano de SOD1. Esta cepa presenta un fenotipo similar al de la ELA en humanos: sufren parálisis en uno o más miembros debido a la pérdida de motoneuronas en la médula espinal, y tienen una esperanza de vida bastante reducida. El ratón SOD1^{G93A} comienza a expresar déficits motores normalmente a partir de los 90-100 días de edad (Fuchs y col., 2010), presentando una pérdida de motoneuronas del 10% (Chiu y col., 1995), habiéndose descrito una pérdida de hasta el 70% de las motoneuronas de la médula espinal a los 120 días de edad (Schutz, 2005) (Tabla 2).

<i>Fenotipo</i>	<i>Progreso temporal</i>
Inicio clínico de la enfermedad (temblores)	90-110 días de edad
Esperanza de vida media (50%)	130-150 días de edad
Tiempo desde aparición de parálisis hasta muerte	15-20 días
Pérdida del 70% de motoneuronas	120-130 días de edad

Tabla 2. Resumen de las características fenotípicas del ratón mutante SOD1^{G93A}.

4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El trabajo expuesto en esta Tesis Doctoral se enmarca dentro de una de las líneas principales de investigación del laboratorio IFTH-1 del Instituto-Fundación Teófilo Hernando, a cuyo timón se encuentra el Profesor Antonio García García: la neurosecreción. Al hablar de este concepto, el modelo celular por excelencia es la CC, que será el empleado en este estudio, ya que su principal función fisiológica es la de verter catecolaminas al torrente sanguíneo cuando el organismo así lo requiere.

Este estudio surge a partir de una pregunta muy básica al respecto de la secreción en la CC: ¿son similares las respuestas excitóticas evocadas por distintos estímulos secretores? Acudiendo a la bibliografía podemos ver que los varios y variados trabajos que han requerido secreción por parte de la CC han acudido a una mirada de sustancias distintas, asumiendo su equivalencia a la hora de provocar la secreción, ya que no había ninguna razón para creer lo contrario. De hecho, este no es un tema de estudio exhaustivo por parte de la comunidad científica, ya que apenas existen un par de trabajos que ahonden en esta cuestión, y sin siquiera analizar la cinética fina del poro de fusión excitótico. Por ello, dado que dimos con un nicho de investigación casi virgen, decidimos adentrarnos en él y explorarlo.

En primer lugar, la cuestión fue clara: ¿es la cinética del poro de fusión de la secreción provocada por la ACh, estímulo fisiológico de la CC, similar a la provocada por el alto K^+ , estímulo secretor que más se ha usado en la bibliografía? Elegimos para ello el ratón más utilizado para desarrollar modelos de enfermedades neurodegenerativas y el más usado como control en los estudios, el C57. Una vez respondida esta pregunta, la progresión era muy fácil: si esta cinética fuera diferente, ¿será diferente también al estimular la CC con agonistas colinérgicos parciales? ¿Y si el Ca^{2+} desencadenante de la secreción proviene exclusivamente de los depósitos celulares? ¿Y si inutilizamos el principal tampón de Ca^{2+} de la célula, la mitocondria, se verá afectado el poro de fusión? Así, el objetivo del primer estudio de los que consta esta Tesis Doctoral, la comparación de varios secretagogos a fin de ver si la forma en la que provocan secreción es similar, quedaba claro.

Por otro lado, aprovechando tanto la información que obtuvimos de la investigación anterior como la oportunidad que se nos brindaba al poder trabajar con un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer, el APP/PS1, decidimos ver si debido a la mutación presente en este ratón, que provoca daños a nivel sináptico en las neuronas colinérgicas, los daños también estaban presentes a nivel del sistema nervioso periférico en nuestra célula modelo. Dado que la población de ratones era reducida, nuestra pregunta en este caso se redujo: ¿existen diferencias a nivel de poro de fusión excitotico entre las CC del ratón APP/PS1 modelo de EA y las del ratón control C57? Usamos para ello alto K^+ solamente.

Para finalizar, ya que teníamos información positiva de nuestro primer estudio en el ratón C57 y de nuestro segundo estudio con el ratón APP/PS1, nos decantamos por ser ambiciosos y apuntamos hacia otro ratón modelo de enfermedad neurodegenerativa, en este caso la ELA: el ratón SOD1^{G93A}. La mutación presente en este ratón también afectaba a los componentes de la triada funcional del calcio (García y col., 2006), por lo que era de esperar que la secreción se viera afectada. En este estudio contamos con un número mayor de ratones, por lo que nuestra pregunta se vio ampliada con respecto al estudio del ratón modelo de EA: ¿existen diferencias a nivel de poro de fusión excitotico entre el ratón SOD1^{G93A} modelo de ELA y el ratón control C57 usando ACh como agente secretor? ¿Y usando alto K^+ ? ¿Habrá diferencias al comparar los dos secretagogos? ¿Pueden estar relacionadas entre sí las diferencias como síntoma del daño celular provocado por la mutación?

El resultado y la respuesta a todas estas preguntas se encuentran plasmados en este trabajo de Tesis Doctoral, que agrupamos en tres objetivos concretos:

1. Estudio de la cinética del poro de fusión excitotico y su correlación con la cinética de los transitorios de Ca^{2+} citosólico, generados por el neurotransmisor fisiológico ACh y otros secretagogos, en CC de ratón silvestre C57.
2. Estudio comparativo de la cinética del poro de fusión excitotico en CC de ratones silvestres C57 y ratones mutantes APP/PS1, modelo de EA.
3. Estudio de la cinética del poro de fusión excitotico, de las señales de $[Ca^{2+}]_i$ y de la excitabilidad celular y las corrientes iónicas en CC de

ratones silvestres C57 y ratones mutantes SOD1^{G93A}, modelo de ELA familiar.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales utilizados

Todos los experimentos fueron llevados a cabo bajo las recomendaciones del Comité de Ética de la Universidad Autónoma de Madrid sobre el uso de animales para la experimentación en laboratorio, de acuerdo con el código de ética y las directrices establecidas por la Directiva de la Comunidad Europea (2010/63/EU) y la legislación Española (RD 1201/2005 y 53/2013). Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales y para utilizar el menor número de animales permitido por el protocolo experimental y el poder estadístico de los datos del grupo. Los animales se alojaron en condiciones controladas de temperatura e iluminación con comida y agua *ad libitum*, y manteniendo ciclos de luz-oscuridad de 12:12h.

Para la obtención de las CC utilizadas en los protocolos experimentales de este trabajo, se usaron ratones de las siguientes cepas:

- Para el estudio de estimulación de CC mediante distintos secretagogos, se usaron ratones de tipo silvestre macho de la cepa C57BL/6 con edades comprendidas entre 90 y 120 días, provenientes del estabulario del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.
- Para el estudio del ratón modelo de enfermedad de Alzheimer, se usaron ratones de la cepa APP/PS1 con mutación doble (APP_{SWE}/PS1-A246E) de 20 meses de edad, cedidos gentilmente por el Dr. Ricardo Martínez-Murillo. Como control se usaron ratones de la cepa C57BL/6 de la misma edad, provenientes del estabulario del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.
- Para el estudio del ratón modelo de esclerosis lateral amiotrófica, se usaron ratones transgénicos macho de la cepa SOD1^{G93A} (B6.Cg-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J) con edades comprendidas entre 90 y 120 días, adquiridos de “The Jackson Laboratory” (Bar Harbor, ME, EEUU). Como control se usaron ratones de la cepa C57BL/6 de la misma edad, provenientes del

estabulario del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

5.2 Cultivo de CC

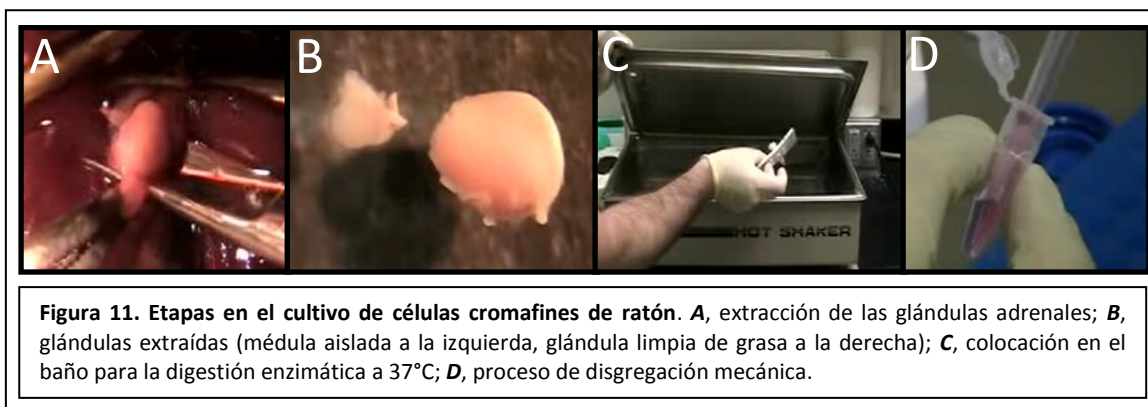
Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y las glándulas adrenales fueron inmediatamente extraídas mediante laparotomía (Figura 11A) y colocadas en solución Locke fría (en hielo) (véase apartado de soluciones para composición). Posteriormente se procedió a la retirada de grasa de las glándulas y al diseccionado de la médula, que conlleva la extracción de la cápsula y la corteza que la rodean (Figuras 1B y 11B). Seguidamente, para el proceso de digestión enzimática, las médulas se colocan en 200 μ l de solución Locke que contiene papaína (P4762, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en una concentración de 25 U/ml, durante 30 minutos a 37°C en el baño (Figura 11C), tiempo en el que la papaína digerirá las uniones intercelulares, facilitando la liberación de las CC.

Tras este proceso de digestión, se extrae y descarta el máximo posible de la solución de papaína en solución Locke con cuidado de no aspirar las médulas, y se aplica rápidamente 1 ml de solución de cultivo de Eagle modificada por Dulbecco (DMEM, véase apartado de soluciones para composición detallada) a 37°C a las médulas digeridas, para diluir y lavar la papaína, tras lo cual retiramos y descartamos el DMEM dejando las médulas, y añadimos 1 ml de DMEM nuevo. Este lavado lo repetimos 2 veces más (3 lavados en total).

Una vez retirado y descartado el DMEM del tercer lavado, pasamos a añadir rápidamente 100 μ l de DMEM nuevo a las médulas, y procedemos a realizar la disgregación mecánica. Para ello, utilizando una micropipeta de 1 ml (p1000) con un volumen seleccionado de 100 μ l y una punta de 1 ml, procedemos a realizar unos 20 pases suaves y lentos al volumen con las médulas, con cuidado de no introducir burbujas, de forma que las médulas pasen repetidamente por la punta de la micropipeta, lo que ocasionará que las células se desprendan (Figura 11D). Tras estos 20 pases, retiramos el máximo volumen posible con cuidado (que ya contendrá células) y sin absorber las médulas, y lo depositamos en un vial *ependorf* de 2 ml.

Seguidamente, añadimos 80 μl de DMEM a los restos de médulas que quedan y procedemos a repetir el proceso anterior usando la micropipeta de 200 μl en este caso, con un volumen seleccionado de 80 μl ; realizamos unos 20 pases suaves y lentos al volumen con las médulas, con cuidado de no introducir burbujas, y tras acabar, retiramos el máximo volumen posible con cuidado y sin absorber las médulas, y lo depositamos en el vial *eppendorf* anterior junto con los 100 μl de la disgregación previa (unos 180 μl en total). Realizaremos una última disgregación con el volumen residual (en torno a 10 μl) y las médulas con una micropipeta de 20 μl con un volumen seleccionado de 10 μl , realizamos unos 20 pases suaves y lentos al volumen con las médulas, con cuidado de no introducir burbujas, y tras acabar, retiramos el máximo volumen posible con cuidado y sin absorber las médulas, y lo depositamos en el vial *eppendorf* anterior junto con los 180 μl de las dos disgregaciones anteriores (en torno a 190 μl en total), obteniendo así la solución final de cultivo de CC de ratón.

Para terminar, descartamos los restos de médulas, y procedemos al sembrado de las CCR en gotas de 10 a 18 μl (dependiendo de la cantidad de pocillos a utilizar) sobre cubreobjetos de 12 (para experimentos de patch-clamp o amperometría) ó 25 mm (para experimentos de detección de variaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_c$) de diámetro en placas multipocillo. Para ello, previamente debemos haber tratado los cubreobjetos con una solución de poli-D-lisina a 0.1 mg/ml, que permitirá que las células se adhieran mejor al cubreobjetos. Una vez realizado el sembrado de las CC de ratón, procedemos a colocar la placa multipocillo en el incubador a una temperatura de 37°C, una concentración del 5% de CO_2 y una atmósfera saturada de humedad (95%) durante 30 minutos - 1 hora, tiempo en el que las células se adherirán. Pasado este tiempo, procederemos a añadir a cada pocillo 700 μl (para placas de 24 pocillos) o 1 ml (para placas de 12 pocillos) de DMEM



5.3 Técnica de amperometría

Esta técnica fue descrita y utilizada por primera vez por el grupo de Mark Wightman a principios de los años 90, cuando fue capaz de registrar la secreción de catecolaminas de una CC aislada y de distinguir la secreción correspondiente a cada vesícula aislada (Leszczyszyn y col., 1990, 1991; Wightman y col., 1991). Este descubrimiento se llevó a cabo gracias a la puesta a punto de los microelectrodos de fibra de carbono, que siendo sensores electroquímicos de tamaño muy reducido, permiten medir directamente la secreción en la superficie de la membrana celular.

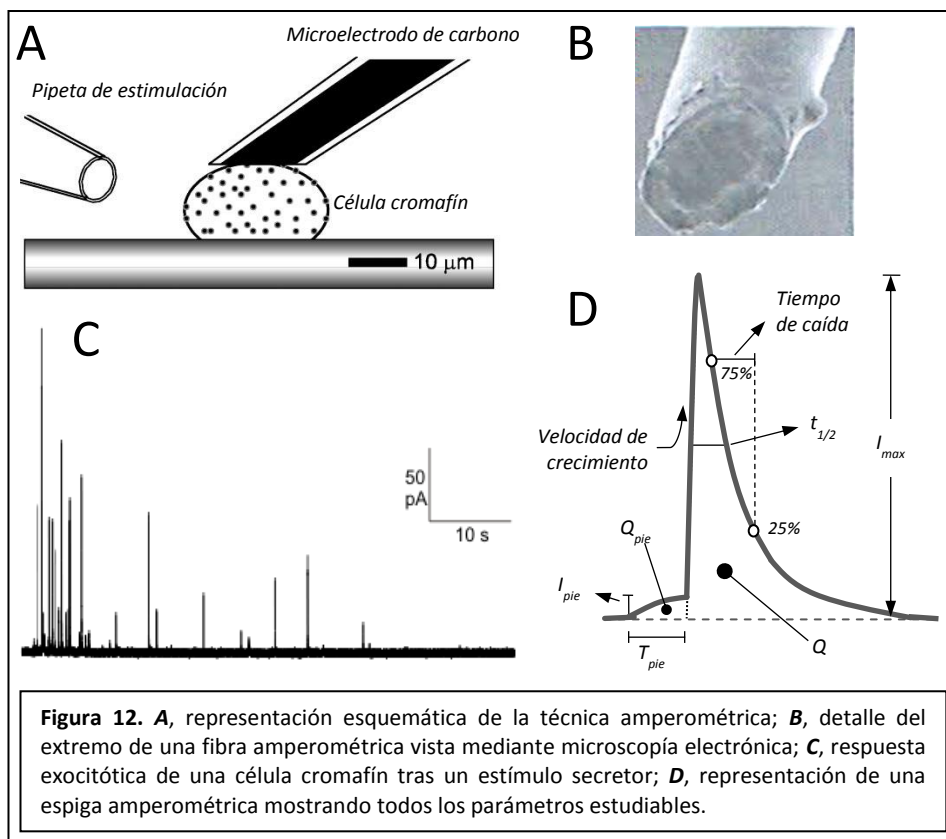
La amperometría es una técnica no invasiva con una elevada sensibilidad y gran resolución temporal sin afectar de manera alguna a la respuesta secretora celular, pero posee una limitación importante, ya que solo es capaz de detectar sustancias que ya han sido secretadas por la célula en el proceso de exocitosis y han difundido hacia la superficie del electrodo de carbono. Por lo tanto, no es capaz de proporcionar información acerca de lo que acontece antes del proceso excitotico. Además, solo podremos detectar aquellas sustancias (productos de secreción) susceptibles de sufrir oxidación en el electrodo de carbono: las catecolaminas.

5.3.1 Descripción de la técnica

La técnica de amperometría consiste en poner en contacto un electrodo polarizado a un voltaje superior al potencial de oxidación de las catecolaminas (unos 700 mV) con la superficie de alguna célula que libere alguna de estas aminas (Figura 12A y 12B). Las moléculas liberadas en las inmediaciones del electrodo serán

rápidamente oxidadas produciendo especies reducidas y electrones (dos por molécula de catecolamina), los cuales se verán atraídos irremediablemente hacia el electrodo de carbono, debido a que este se encuentra a un potencial positivo. Este trasiego de electrones generará unas elevaciones de corriente (las llamadas espigas amperométricas) que serán amplificadas por el amperómetro y registradas por el ordenador, y que finalmente veremos como un registro amperométrico (Figura 12C).

Las características cinéticas de estas corrientes con forma de espiga proporcionarán información acerca de la cantidad de moléculas liberadas y sobre la forma en la que se han liberado (rápida o lentamente) a través de un poro de fusión excitotóxico que se abre y cierra de forma progresiva, siendo posible analizar gran cantidad de parámetros cinéticos, a saber: la velocidad de crecimiento es calculada con la pendiente de la fase de crecimiento de la espiga medida en pA/ms; I_{\max} representa la altura de la espiga medida en pA; $t_{1/2}$ es la anchura de la espiga al 50% de su altura medido en ms; Q es el área de la espiga, una indicación del contenido y/o liberación de catecolaminas de la vesícula (tamaño cuantal), medida en pC; el tiempo de caída es obtenido con el tiempo entre el 75 y el 25% de la altura de la espiga en la fase de descenso (Figura 12D). Además, es posible estudiar características propias de los llamados pies de espiga (amplitud de pie, tiempo de pie y liberación cuantal de catecolaminas durante el pie, representados por I_{pie} , T_{pie} y Q_{pie} , respectivamente), que se producen cuando el poro de fusión se abre previamente a la expansión completa y libera una pequeña cantidad de catecolaminas. Una espiga amperométrica individual representa el contenido de catecolaminas que libera una vesícula de secreción individual.



5.3.2 Electrodo de amperometría

5.3.2.1 Construcción

El método utilizado para construir los electrodos de amperometría que se han usado en el desarrollo de esta Tesis ha seguido el descrito por Kawagoe y colaboradores (Kawagoe y col., 1993). Comenzaremos introduciendo el electrodo de grafito de 10 μm de diámetro (Amoco, Whiting, IN) en un capilar de cristal de borosilicato de 1.8 mm de diámetro exterior y 1.5 de luz interior (Kimble-Kontes, Querétaro, México) que luego estiraremos en un estirador de pipetas (modelo PC-10, Narishige, Tokio, Japón) con valores de calor establecidos en 69.7 (valor 1) y 47.2 (valor 2) hasta que se separa en dos pipetas. De las puntas de ambas pipetas separadas sobresale la fibra de carbono, que se corta obteniéndose así dos pipetas con sendas fibras sobresaliendo por la punta. Seguidamente prepararemos una mezcla de resina epoxi (86% p/p de resina EPIKOTE-828 (Miller-Spethenson, Danbury, CT) y 14% p/p restante del curante m-fenildiamina (Aldrich, Steimheim, Germany)) que prepararemos calentándola en un tubo de ensayo al baño maría a unos 90°C, y

moviendo la mezcla suavemente con una pipeta pasteur hasta que pasa a ser una mezcla homogénea. En ese momento, procedemos a introducir la punta (parte estrechada) de cada pipeta en la mezcla de resina mientras aún se encuentra en estado líquido gracias a la alta temperatura (que debe mantenerse durante el máximo tiempo posible para evitar que la mezcla de resina epoxi se endurezca prematuramente). Una vez hecho esto con todas las puntas, y tras dejar secar la resina durante 24 h, las puntas se introducen en un horno durante 2 h a 100°C y otras 2 h a 150°C para que la mezcla de resina se endurezca, quedando así el electrodo terminado. Gracias a este proceso conseguimos aislar eléctricamente la fibra de carbono y aislar la punta de la pipeta impidiendo el paso de líquidos entre el interior y el exterior de la misma.

Dado que toda la fibra que sobresale de la punta de la pipeta está recubierta de resina, a la hora de utilizar las pipetas se debe cortar la punta de la fibra dejando no más de 1 mm de fibra, para dejar expuesta una zona libre de resina que será conductora de la electricidad y que estará en contacto con la célula. Los electrodos (fibras) fueron pulidos en ángulo (Figuras 12A y 12B) con un pulidor de electrodos (modelo EG-44, Narishige, Tokio, Japón) según indican Machado y colaboradores (Machado y col., 2008), para generar una superficie lo más uniforme posible que permita maximizar así el área de contacto con la célula.

5.3.2.2 Calibrado

Para asegurar sensibilidades homogéneas y medidas de amplitud similares entre los registros de unas células y otras, es recomendable calibrar los electrodos con una solución que contiene 50 μM de noradrenalina (Machado y col., 2008). Se utilizaron pipetas que, una vez colocadas en nuestro sistema amperométrico (Segainvex UAM, Madrid, España) y posicionado por medio de un micromanipulador (modelo MHW-3, Narishige) frente a la salida del sistema de perfusión, produjeran una corriente entre 250 y 300 pA con el flujo detenido tras ser perfundidas con la solución de noradrenalina.

5.4 Técnica de patch-clamp

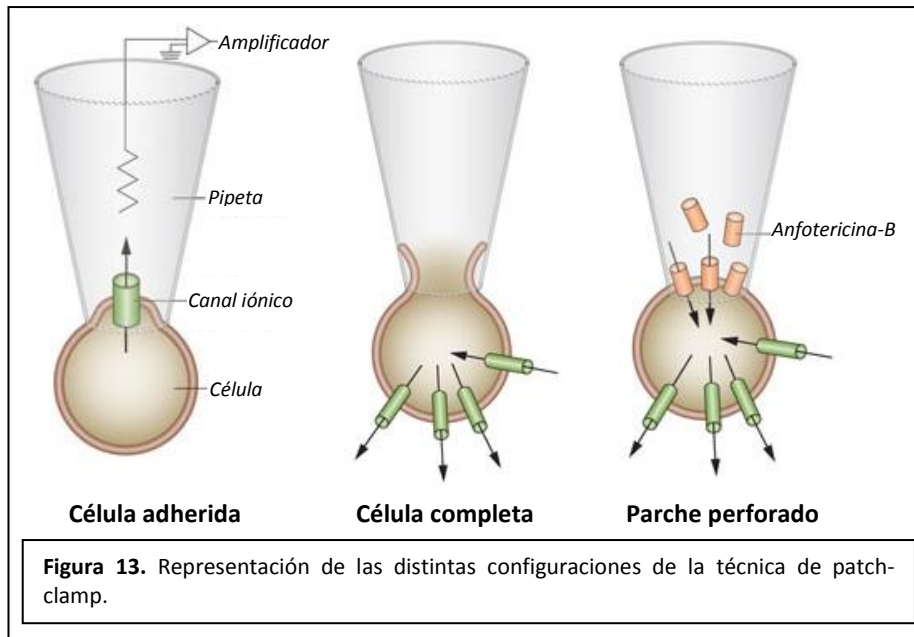
La técnica de *patch-clamp* (Hamill y col., 1981), traducido como “técnica de pinzamiento zonal de membrana”, se usa para medir las corrientes iónicas que atraviesan la membrana de la célula.

5.4.1 Descripción de la técnica

En esencia, esta técnica consiste en incluir a la célula objeto de estudio en un circuito eléctrico que está conectado a un amplificador (modelo EPC-9, HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemania). Asumiendo que se cumple la ley de Ohm ($V = Corriente (A) \cdot Resistencia (\Omega)$), los cambios de voltaje serán proporcionales a los cambios en la corriente en este circuito, siendo la constante de proporcionalidad la resistencia eléctrica de la membrana celular. Se puede optar por que el amplificador mantenga fijo el voltaje del circuito, encargándose de compensar eléctricamente la corriente que fluye creada por la apertura de los canales iónicos; en tal caso nos encontramos en el modo de “fijación de voltaje” y nos permitirá medir las corrientes que atraviesan la membrana. Por otro lado, si se ordena al amplificador que no compense corriente alguna o que mantenga una corriente constante, nos encontraremos en el modo de “fijación de corriente”, que nos permitirá detectar los cambios en la diferencia de potencial transmembrana que producen las corrientes nativas de la célula.

El amplificador se conecta a una pipeta que contiene una solución salina y que se pone en contacto con la membrana celular, generándose lo que se denomina “sello”. Nos encontramos en la configuración llamada “célula adherida” (Figura 13A), en la cual es posible medir el trasiego iónico de un solo canal, gracias a la gran sensibilidad de esta técnica. Si ejercemos una succión brusca, la membrana situada en la zona que rodea la pipeta se romperá, mezclándose el contenido salino de la pipeta con el citoplasma en un solo compartimento y generando la conformación de “célula completa”, la cual nos permitirá medir las corrientes iónicas que pasan por todos los canales de la membrana plasmática a la vez (Figura 13B). Si, por el contrario, en lugar de aplicar succión, incorporamos el ionóforo anfotericina-B a la solución salina de la pipeta (solución intracelular), se crearán poros en la membrana en el interior del sello,

lo que evitará el intercambio directo de las soluciones entre la pipeta y el citoplasma y nos encontraremos en la configuración de “parche perforado” (Lindau y Fernandez, 1986; Horn y Marty, 1988; Rae y col., 1991), siendo esta configuración un método menos invasivo y agresivo para la célula pero de resultados similares, ya que se trata de una modificación de la configuración de célula adherida pero que permite el acceso eléctrico al interior celular (Figura 13C).



5.4.1.1 Medición de la excitabilidad celular

Para la medición del potencial de membrana (V_m) y de los PA, se usó el modo de fijación de corriente en la configuración de célula completa, que permite la observación de variaciones espontáneas en el V_m . Las células fueron perfundidas con solución Tyrode para patch-clamp y en las pipetas se introdujo solución intracelular 1 (véase apartado de soluciones para composiciones).

5.4.1.2 Medición de las corrientes iónicas.

Para la medición de las corrientes entrantes a través de los receptores nicotínicos (de Na^+ , I_{ACh}), de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje (I_{Ca}), de los canales de sodio dependientes de voltaje (I_{Na}), de los canales de potasio dependientes

de voltaje ($I_{K(V)}$) y de los canales de potasio dependientes de Ca^{2+} ($I_{K(Ca)}$) se usó el modo de fijación de voltaje en la configuración de célula completa. Las células fueron perfundidas con una solución Tyrode para patch-clamp (véase apartado de soluciones para composición); en el caso de la medición de I_{Na} , o una vez establecido el sello y la configuración de célula completa, la célula en estudio se superfundió rápidamente con solución Tyrode para patch-clamp similar a la usada anteriormente pero conteniendo 0 mM de Ca^{2+} nominal. Las células fueron dializadas internamente con la solución intracelular 2 para la medición de I_{Na} , I_{Ca} y I_{ACh} ; para la medición de I_K se usó la solución intracelular 3 (véase apartado de soluciones para composiciones).

Para la medición de las diferentes corrientes iónicas, las células se mantuvieron a -80 mV. I_{Na} se generó a partir de un pulso despolarizante de 10 ms a -10 mV, I_{Ca} se generó a partir de un pulso despolarizante de 50 ms a -10 ó 0 mV, I_{ACh} se generó mediante aplicación de 250 ms de ACh a 100 μ M de concentración, y I_K se generó a partir de la aplicación de un pre-pulso despolarizante de 10 ms a $+30$ mV seguido de otro de 400 ms a $+120$ mV.

5.4.2 Pipetas de patch-clamp

Las pipetas se obtuvieron a partir de capilares de cristal de borosilicato de 1.8 mm de diámetro exterior y 1.5 de luz interior (Kimble-Kontes) que luego estiraremos en un estirador de pipetas (modelo PC-10, Narishige) con valores de calor establecidos en 72 (valor 1) y 52 (valor 2) (valores sujetos a cierta variación) hasta que se separa en dos pipetas. Estas pipetas se pulen aplicando calor con una microforja (modelo MF-830, Narishige) y tienen una resistencia entre 2.5 y 3 M Ω . A la hora de su uso, se rellenan con la solución intracelular correspondiente a la configuración que se vaya a usar.

5.5 Medida de los transientes de $[Ca^{2+}]_c$ por fluorescencia

Para llevar a cabo este estudio, se utilizó la sonda ratiométrica fura-2-acetoximetil éster (fura-2AM). Se trata de un derivado permeable a la membrana

plasmática del indicador de Ca^{2+} ratiométrico fura-2 (Grynkiewicz y col., 1985), que fue la primera sonda fluorescente ampliamente utilizada para la experimentos que involucraran imagen de Ca^{2+} . Esta sonda es excitada a longitudes de onda de 340 y 387 nm y emite a 540 nm; mediante el ratio entre la emisión provocada las dos longitudes de onda de excitación obtendremos una lectura del nivel de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ presente, y que gracias a su naturaleza ratiométrica nos evitará la aparición de artefactos en las mediciones que están presentes al usar sondas de Ca^{2+} convencionales (no ratiométricas).

De esta manera, las CC se pre-incubaron con fura-2AM a una concentración de 10 μM a 37°C durante 1 h. Tras este período de incubación, los cubreobjetos con las células cargadas de sonda fueron montados en una cámara y bañados por solución Tyrode. El equipo utilizado se compone de un microscopio de luz invertida Leica modelo DMI 4000 B (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) equipado con un objetivo de inmersión de aceite Leica 40x Plan Apo (apertura numérica 1.25, Leica Microsystems).

La sonda Fura-2 fue excitada alternativamente a 340 ± 10 y 387 ± 10 nm usando una lámpara de xenón (Küber CODIX, Leica Microsystems). La fluorescencia emitida fue recogida a través de un filtro de emisión de 540 ± 20 nm y medida con una cámara con controlador de medición de carga intensificada acoplado (modelo C10600 orca R2, Hamamatsu, Ciudad de Hamamatsu, Japón).

Al estimular las CC obtenemos entonces una señal de fluorescencia en forma de elevaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que son posteriormente analizadas y de las que extraemos los siguientes parámetros: pico de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (máxima señal del transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_c$, medido como unidades arbitrarias de fluorescencia del ratio de 340/387 nm de longitud de onda, $\text{UAF}_{340/387}$), tiempo al pico (tiempo desde el inicio del transiente hasta que alcanza el pico de $[\text{Ca}^{2+}]_c$, en segundos), área bajo la curva (ABC, representa la cantidad de Ca^{2+} presente en el transiente, en $\text{UAF}_{340/387} \cdot \text{s}$), constante de tiempo de inactivación/desaparición (τ_i , da información acerca tiempo que tarda en desaparecer o aclararse el transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y alcanzar valores cercanos a la basal, en segundos) y meseta (valor calculado de la asíntota cuando la curva regresa a valores cercanos a la basal, en $\text{UAF}_{340/387}$).

5.6 Sistema de perfusión

Las células fueron superfundidas constante y localmente durante la duración de los experimentos mediante un sistema de perfusión de fabricación manual, el cual se compone de varias vías que convergen en una salida común. Los intercambios de soluciones que era necesario perfundir se realizaron mediante un sistema de electroválvulas (The Lee Company, Essex, CT) que era controlado por un sistema de apertura y cierre de electroválvulas (controlador de electroválvulas, Segainvex UAM). La salida de la perfusión se colocó en todo momento a una distancia de unos 50-100 μM de la célula en estudio y el intercambio de soluciones se llevaba a cabo en unos 100 ms aproximadamente. La velocidad del flujo fue de 750 $\mu\text{L}/\text{min}$ aproximadamente, regulado por gravedad.

5.7 Análisis estadístico

Los datos amperométricos fueron registrados usando los softwares Pulse v8.74 (HEKA Elektronik) y Chart v5.5.1 (AD Instruments, Dunedin, Nueva Zelanda) y analizados en un ordenador personal usando el software Excel (Microsoft, Redmond, WA), el software IgorPro v4.0.8 (Wavemetrics, Lake Oswego, OR) y el software GraphPad Prism v5.01 (GraphPad Prism Software, San Diego, CA). Solo se consideraron para el análisis las espigas mayores de 5 pA de amplitud. El análisis cinético de los eventos amperométricos individuales se realizó usando una macro escrita en IgorPro y gentilmente cedida a la comunidad científica por el grupo de Eugene Mosharov (Mosharov y Sulzer, 2005), siendo posible analizar parámetros cinéticos indicadores de la cantidad de moléculas liberadas y de la forma en la que se han liberado (Figura 12D). La carga amperométrica total se ha calculado por suma de las cargas amperométricas de las espigas individuales presentes durante el periodo de estimulación correspondiente en cada caso. Se obtuvieron los valores de mediana de todas las espigas de cada célula y luego se agruparon para realizar la comparación estadística; este método es útil para manejar la larga variabilidad en el número de espigas y en los parámetros cinéticos, ya que cada célula tiene la misma importancia independientemente del número de espigas que presente.

Los datos correspondientes a las corrientes iónicas y a la excitabilidad celular fueron adquiridos con una frecuencia de muestreo de 20 kHz mediante el software PULSE v8.74 (HEKA Elektronik). El análisis de los datos se llevó a cabo con el software Igor Pro v4.0.8 (Wavemetrics) y con el software GraphPad Prism v5.01.

Los datos procedentes de los cambios en $[Ca^{2+}]_c$ fueron obtenidos con el software Leica Application Suite Advanced Fluorescence v2.6 (Leica Microsystems). Los gráficos y el análisis matemático fueron llevados a cabo usando el software GraphPad Prism v5.01. El ABC fue calculada mediante la integración del transiente de $[Ca^{2+}]_c$ sobre la duración del tiempo del estímulo.

Las diferencias entre las medias de los grupos que se ajustaban a una distribución normal (lo que se comprobó aplicando un test de Kolmogorov-Smirnov) fueron evaluadas por test de ANOVA (análisis de la varianza) con test *post-hoc* de Neuman-Keuls en el caso de comparación múltiple entre varios grupos y por una *t* de Student en el caso de comparación entre dos grupos. En el caso de que las medias no se ajustaran a una distribución normal, se evaluaron por test de Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns en el caso de comparación múltiple entre varios grupos y por test de Mann-Whitney en el caso de comparación entre dos grupos. Los análisis *post-hoc* adecuados fueron elegidos en cada caso. En todos los casos se exigió un nivel de confianza del 95%, es decir, $P < 0.05$; se establecieron 2 límites estadísticos adicionales, situados en $P < 0.01$ y $P < 0.001$.

5.8 Soluciones y productos químicos

Todos los productos químicos listados aquí han sido adquiridos de Sigma-Aldrich y de GIBCO-Invitrogen (Barcelona, Spain).

5.8.1 Soluciones para cultivo celular

5.8.1.1 *Solución Locke*

Preparación en agua bi-destilada a partir de:

- NaCl 154 mM
- KCl 5.5 mM

- HNaCO_3 3.6 mM
- HEPES 10 mM
- Glucosa 5.5 mM

Su pH se ajustó a 7.35 usando NaOH.

5.8.1.2 Solución de cultivo DMEM

Esta solución consiste en medio DMEM convencional de alta glucosa (Medio Eagle modificado por Dulbecco, D5796, Sigma-Aldrich) suplementada con suero bovino fetal (PAA, Linz, Austria) en una concentración del 4% v/v, 50 UI/ml de penicilina-estreptomicina (15140-122, Gibco-Invitrogen), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina (15750-045, Gibco-Invitrogen) y 10 mM de HEPES. Su pH se ajustó a 7.35 usando NaOH y se esterilizó mediante filtrado de 0.22 μm de luz.

5.8.2 Soluciones para amperometría y medición de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ por fluorescencia

5.8.2.1 Solución Tyrode estándar

Preparación en agua bi-destilada a partir de:

- NaCl 137 mM
- KCl 5.3 mM
- MgCl_2 1 mM
- CaCl_2 2 mM
- HEPES 10 mM
- Glucosa 10 mM

Su pH se ajustó a 7.35 usando NaOH.

5.8.2.2 Solución Tyrode alto potasio

Preparación en agua bi-destilada a partir de:

- NaCl 67.3 mM
- KCl 75 mM
- MgCl_2 1 mM

- CaCl_2 2 mM
- HEPES 10 mM

Su pH se ajustó a 7.35 usando KOH.

5.8.3 Soluciones para patch-clamp

5.8.3.1 *Solución Tyrode para patch-clamp*

Preparación en agua bi-destilada a partir de:

- NaCl 137 mM
- MgCl_2 1 mM
- CaCl_2 2 mM
- HEPES/ 10 mM

Su pH se ajustó a 7.35 usando NaOH.

5.8.3.2 *Solución intracelular 1*

Preparación en agua bi-destilada a partir de:

- KCl 135 mM
- NaCl 10 mM
- MgCl_2 1 mM
- Mg-ATP 5 mM
- HEPES 10 mM

Su pH se ajustó a 7.35 usando KOH.

5.8.3.3 *Solución intracelular 2*

Preparación en agua bi-destilada a partir de:

- CsCl 100 mM
- NaCl 10 mM
- EGTA 14 mM

- Mg-ATP 5 mM
- Na-GTP 0.3 mM
- TEA-Cl 20 mM
- HEPES 20 mM

Su pH se ajustó a 7.35 usando CsOH.

5.8.3.4 Solución intracelular 3

Preparación en agua bi-destilada a partir de:

- KCl 135 mM
- NaCl 10 mM
- EGTA 14 mM
- Mg-ATP 5 mM
- Na-GTP 0.3 mM
- HEPES 20 mM

Su pH se ajustó a 7.35 usando KOH.

6 RESULTADOS

Para discernir si los distintos secretagogos evocaban una respuesta estímulo-secreción diferente al usar uno u otro, se procedió primero a explorar la liberación de catecolaminas por exocitosis en el ratón C57, incluyendo el análisis cinético de las espigas amperométricas individuales, para luego estudiar los transientes de $[Ca^{2+}]_c$ evocados por los secretagogos. Seguidamente, aplicando los conocimientos adquiridos y como aproximación al ratón transgénico, se examinó y comparó la liberación cuantál de catecolaminas por despolarización con K^+ en los ratones APP/PS1 y C57. Finalmente, como conclusión de la investigación de esta Tesis, se estudiaron a fondo las diferencias en el acoplamiento estímulo-secreción entre el ratón $SOD1^{G93A}$ y el ratón C57 a través de varias etapas de la cascada de eventos que tienen lugar en este proceso, que incluye la excitabilidad celular y el disparo de PA espontáneos, corrientes iónicas, y transientes de $[Ca^{2+}]_c$ y liberación de catecolaminas por exocitosis, incluyendo el análisis cinético de las espigas amperométricas individuales, evocados por ACh y K^+ .

6.1 **Secreción cuantál de catecolaminas por estimulación con ACh, ACh + atropina y ACh + FCCP en CC de C57**

En primer lugar, estudiamos la secreción cuantál de catecolaminas en CC de ratón C57 estimuladas con ACh a una concentración supramáxima de 100 μ M durante 1 minuto, lo que nos permitió maximizar el número de eventos exocitóticos individuales para poder realizar un análisis estadísticamente fuerte de los parámetros cinéticos del poro de fusión. Adicionalmente, este largo periodo de estimulación permitió explorar los distintos ritmos de decaimiento/desaparición de la exocitosis con los distintos estímulos usados.

El inserto de la Figura 14A muestra la respuesta registrada mediante amperometría de la estimulación con ACh. La ráfaga inicial de espigas amperométricas en los 10 primeros segundos del estímulo fue seguida de una tasa de secreción más lenta con unas pocas espigas repartidas en el resto del tiempo de estimulación. En la Figura 14A se encuentran graficado el número de espigas acumulado agrupado en

intervalos de 5 segundos del estímulo, obtenido de 44 CC de 8 ratones, que se ajusta a una curva exponencial con una fase inicial rápida en los primeros 10–15 segundos (constante de tiempo de activación 1, τ_{a1} , de 7.8 s) y una segunda fase asintótica que muestra una tasa de secreción de catecolaminas más lenta (constante de tiempo de activación 2, τ_{a2} , 38.5 s) (Figura 14A, ordenada izquierda). Se obtuvo una curva bastante similar cuando graficamos el contenido cuantitativo total (Q_{amp} , medida como suma de todas las espigas secretadas durante el estímulo), que representa el contenido cuantitativo total de catecolaminas secretado durante el estímulo (medida en pC, ordenada derecha de Figura 14A). De nuevo, se observó una fase inicial rápida (τ_{a1} de 6.69 s) seguida de una fase lenta (τ_{a2} de 42.6 s). El número de espigas por célula generado por la aplicación de ACh fue de 23.87 ± 2.2 . En la figura 14B se muestra la espiga media modelo que resulta del análisis cinético de los datos resumidos en la Tabla 3 de 1051 espigas obtenidas de 44 células estimuladas con ACh. Dicha espiga tiene las siguientes características: velocidad de crecimiento de 25.29 ± 2.79 pA/ms, I_{max} de 38.45 ± 3.17 pA, tiempo de caída de 6.17 ± 0.44 , $t_{1/2}$ de 5.83 ± 0.41 y Q de 0.31 ± 0.02 pC. La espiga se encontraba precedida de pie en un $57.67 \pm 2.28\%$ de los casos (Tabla 4), que tenía las siguientes características: I_{pie} de 3.67 ± 0.21 pA, T_{pie} de 3.54 ± 0.33 ms y Q_{pie} de 16.31 ± 1.53 fC.

Estímulo	Número de espigas (células)	Espigas por célula durante el estímulo	$t_{1/2}$ (ms)	Velocidad de crecimiento (pA/ms)	Tiempo de caída (ms)	Q (pC)	I_{max} (pA)
ACh	1051 (44)	23.87 ± 2.2	5.83 ± 0.41	25.29 ± 2.79	6.17 ± 0.44	0.31 ± 0.02	38.45 ± 3.17
ACh + atropina	316 (19)	16.63 ± 2.06 * (30.37% menor)	5.38 ± 0.69 (7.59% menor)	27.41 ± 5.13 (8.37% mayor)	5.12 ± 0.68 (17.12% menor)	0.28 ± 0.03 (8.85% menor)	43.13 ± 4.95 (12.03% mayor)
ACh + FCCP	538 (22)	24.46 ± 5.25 (2.38% mayor)	12.53 ± 1.41 *** (115.12% mayor)	11.61 ± 2.06 *** (54.1% menor)	12.64 ± 1.07 *** (104.8% mayor)	0.53 ± 0.05 *** (70.09% mayor)	29.26 ± 3.04 * (24% menor)
DMPP	629 (34)	18.5 ± 2 * (22.55% menor)	9.23 ± 0.91 ** (58.44% mayor)	12.06 ± 1.47 *** (52.33% menor)	8.88 ± 0.82 ** (43.85% mayor)	0.4 ± 0.05 (28.45% mayor)	27.15 ± 1.91 ** (29.48% menor)
Muscarina	570 (21)	10.76 ± 2.39 *** (54.95% menor)	8.92 ± 1.12 * (53.07% mayor)	15.99 ± 3.61 ** (36.77% menor)	8.32 ± 1.07 (34.76% mayor)	0.37 ± 0.03 * (21.17% mayor)	31.44 ± 4.09 (18.33% menor)
Cafeína	280 (20)	15.56 ± 2.03 ** (34.88% menor)	8.23 ± 0.52 *** (41.19% mayor)	15.86 ± 2.68 * (37.29% menor)	9.15 ± 0.8 ** (48.24% mayor)	0.37 ± 0.03 (18.65% mayor)	29.15 ± 3.65 * (24.29% menor)
Histamina	280 (21)	13.33 ± 1.49 *** (44.18% menor)	8.5 ± 0.96 ** (45.88% mayor)	16.96 ± 2.85 (32.96% menor)	9.99 ± 1.11 ** (61.85% mayor)	0.42 ± 0.04 * (34.22% mayor)	30.42 ± 3.66 (20.98% menor)
K ⁺	838 (42)	20.44 ± 1.98 (14.43% menor)	6.84 ± 0.32 ** (17.43% mayor)	17.45 ± 1.46 * (31.01% menor)	7.48 ± 0.42 * (21.19% mayor)	0.4 ± 0.03 *** (30.9% mayor)	34.83 ± 2.03 (9.53% menor)

Tabla 3. Parámetros cinéticos de espigas individuales calculados a partir de las respuestas de CC de ratones C57 al ser estimuladas con ACh, ACh + atropina, ACh + FCCP, DMPP, muscarina, cafeína, histamina y K⁺. Los datos se presentan como medias \pm EE con el cambio relativo con respecto a ACh entre paréntesis. Los datos de espigas amperométricas fueron analizados y promediados, los datos medios finales son así expresados como medias de todas las células (entre paréntesis). Las CC estimuladas con los distintos secretagogos (filas) se compararon estadísticamente para cada parámetro de espiga única (columnas) frente a ACh mediante el test de Mann-Whitney usando para ello la media de al menos 10 espigas por célula y para cada parámetro. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ con respecto a ACh.

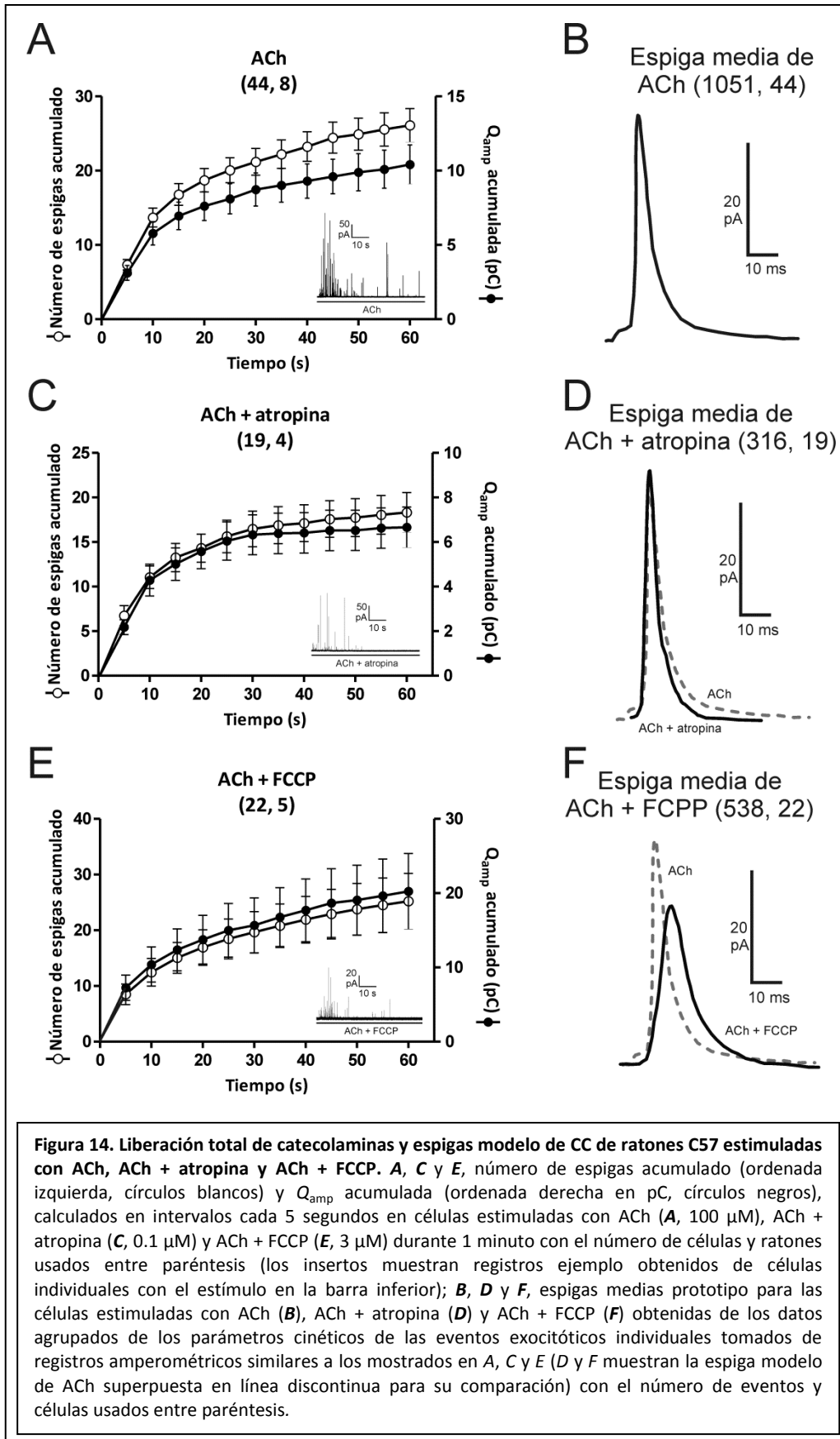
La respuesta secretora a ACh tiene un componente nicotínico así como un componente muscarínico, descrito por primera vez en la glándula adrenal perfundida de gato (Douglas y Poisner, 1965), aunque aún no ha sido posible demostrar si este doble componente se encuentra presente en las CC de ratón (Nassar-Gentina y col., 1988). En una segunda tanda de experimentos, se aplicó ACh a CC que habían sido perfundidas durante 30 segundos previos con solución Tyrode que contenía 100 nM de atropina (también presente durante la aplicación de ACh), bloqueante de receptores muscarínicos y que provocará, por tanto, que la respuesta a ACh esté mediada enteramente por los receptores nicotínicos. El inserto de la Figura 14C muestra un registro ejemplo de una CC estimulada con ACh en presencia de atropina, donde vemos que la ráfaga inicial de espigas amperométricas es menos pronunciada y la célula se vuelve silente durante los últimos 30 segundos del periodo de estímulo. Este perfil de secreción se encuentra mejor ilustrado en el gráfico de secreción total acumulada expresada como número de espigas (ordenada izquierda en Figura 14C) o como suma de la carga de las espigas (ordenada derecha en Figura 14C). Estas curvas de secreción acumulada alcanzaron una meseta en torno a los 30 segundos del periodo de estimulación con ACh más atropina, en contraste con las obtenidos al estimular con ACh solo (Figura 14A). Parece, por tanto, que el componente muscarínico de la respuesta secretora a ACh está contribuyendo a mantener la actividad secretora tardía. La disminución en la secreción de las CC cuando se les aplicaban conjuntamente ACh y atropina fue corroborado por un menor número de espigas totales durante el estímulo (16.63 ± 2.06 , un 30.37% menos que ACh sola). Sin embargo, no se observaron diferencias entre la estimulación con ACh más atropina y con ACh sola en lo que se refiere a los parámetros cinéticos de las espigas amperométricas modelo, como se observa en las espigas superpuestas de la Figura 14D y en la Tabla 3. La presencia de pie fue un 14.53% mayor en células estimuladas conjuntamente con ACh + atropina con respecto a ACh, aunque los parámetros de pie de espiga (I_{pie} , T_{pie} y Q_{pie}) fueron similares.

Los protonóforos como el FCCP y el CCCP son bien conocidos por aumentar la respuesta secretora por ACh en CC bovinas (Montero y col., 2000) y de rata (Miranda-Ferreira y col., 2010). Esta capacidad es atribuida al desacoplamiento del

tamponamiento de Ca^{2+} por la despolarización de la mitocondria y a que haya mayor cantidad de Ca^{2+} disponible para producir exocitosis, por lo que resulta de interés el investigar la respuesta secretora con ACh en CC de ratón expuestas a 3 μM de FCCP. En el inserto de la Figura 14E observamos un registro ejemplo donde se aprecia una ráfaga inicial brusca de espigas seguida de espigas dispersas durante el registro, comportamiento que se ve corroborado por los datos acumulados de secreción graficados, que indican una respuesta de saturación lenta que recuerda vagamente a la producida por ACh. Sin embargo, en la cinética del poro de fusión donde encontramos diferencias drásticas en ACh más FCCP frente a ACh sola: velocidad de crecimiento 54.1% menor, I_{max} 24% menor, tiempo de caída 104.8% más lento, $t_{1/2}$ 115.12% mayor y Q 70.09% mayor. Así, la espiga media resultante de ACh más FCCP fue más pequeña, más lenta y con mayor tamaño cuantal en comparación con la espiga media de ACh (Figura 14F). La frecuencia de los pies que preceden a las espigas amperométricas estaba disminuida en un 45.68%, I_{pie} fue un 35.86% menor, T_{pie} un 141.39% más largo y Q_{pie} un 41.2% menor en CC estimuladas con ACh + FCCP en comparación con solo ACh, lo que indica que las primeras tienen una apertura de poro de fusión más sostenida pero con menor cantidad de catecolaminas liberadas antes de que se dé la expansión completa del poro.

Estímulo	Número de espigas (células)	Presencia de pie (%)	I_{pie} (pA)	T_{pie} (ms)	Q_{pie} (fC)
ACh	1051 (44)	57.67 ± 2.28	3.67 ± 0.21	3.54 ± 0.33	16.31 ± 1.53
ACh + atropina	316 (19)	66.05 ± 3.74 * (14.53% mayor)	3.9 ± 0.37 (6.26% mayor)	3.51 ± 0.42 (0.76% menor)	15.84 ± 2.82 (2.88% menor)
ACh + FCCP	538 (22)	31.33 ± 8.29 * (45.68% menor)	2.36 ± 0.28 *** (35.86% menor)	8.55 ± 1.12 *** (141.39% mayor)	9.59 ± 3.73 *** (41.2% menor)
DMPP	629 (34)	62.95 ± 3.2 (9.15% mayor)	2.5 ± 0.21 *** (31.91% menor)	7.41 ± 1.64 * (109.3% mayor)	24 ± 5.33 (47.15% mayor)
Muscarina	570 (21)	73.79 ± 4.31 *** (27.96% mayor)	2.97 ± 0.4 ** (19.22% menor)	6.69 ± 1.71 * (89.06% mayor)	19.09 ± 3.21 (17.07% mayor)
Cafeína	280 (20)	49.43 ± 7.25 (14.29% menor)	1.74 ± 0.19 *** (52.69% menor)	4.16 ± 0.58 (17.41% mayor)	5.81 ± 1.37 *** (64.38% menor)
Histamina	280 (21)	39.92 ± 7.57 (30.79% menor)	2.66 ± 0.29 *** (27.65% menor)	7.57 ± 0.95 *** (113.91% mayor)	8.24 ± 1.74 ** (49.46% menor)
K ⁺	838 (42)	68.44 ± 2.47 *** (18.67% mayor)	2.9 ± 0.25 *** (20.95% menor)	4.2 ± 0.27 ** (18.64% mayor)	15.09 ± 1.33 (7.45% menor)

Tabla 4. Parámetros cinéticos de los pies de espigas calculados a partir de las respuestas de CC de ratones C57 al ser estimuladas con ACh, ACh + atropina, ACh + FCCP, DMPP, muscarina, cafeína, histamina y K⁺. Los datos se presentan como medias ± EE con el cambio relativo con respecto a ACh entre paréntesis. Los datos de espigas amperométricas fueron analizados y promediados, los datos medios finales son así expresados como medias de todas las células (entre paréntesis). Las CC estimuladas con los distintos secretagogos (filas) se compararon estadísticamente para cada parámetro de espiga única (columnas) frente a ACh mediante el test de Mann-Whitney usando para ello la media de al menos 10 espigas por célula y para cada parámetro. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ con respecto a ACh.



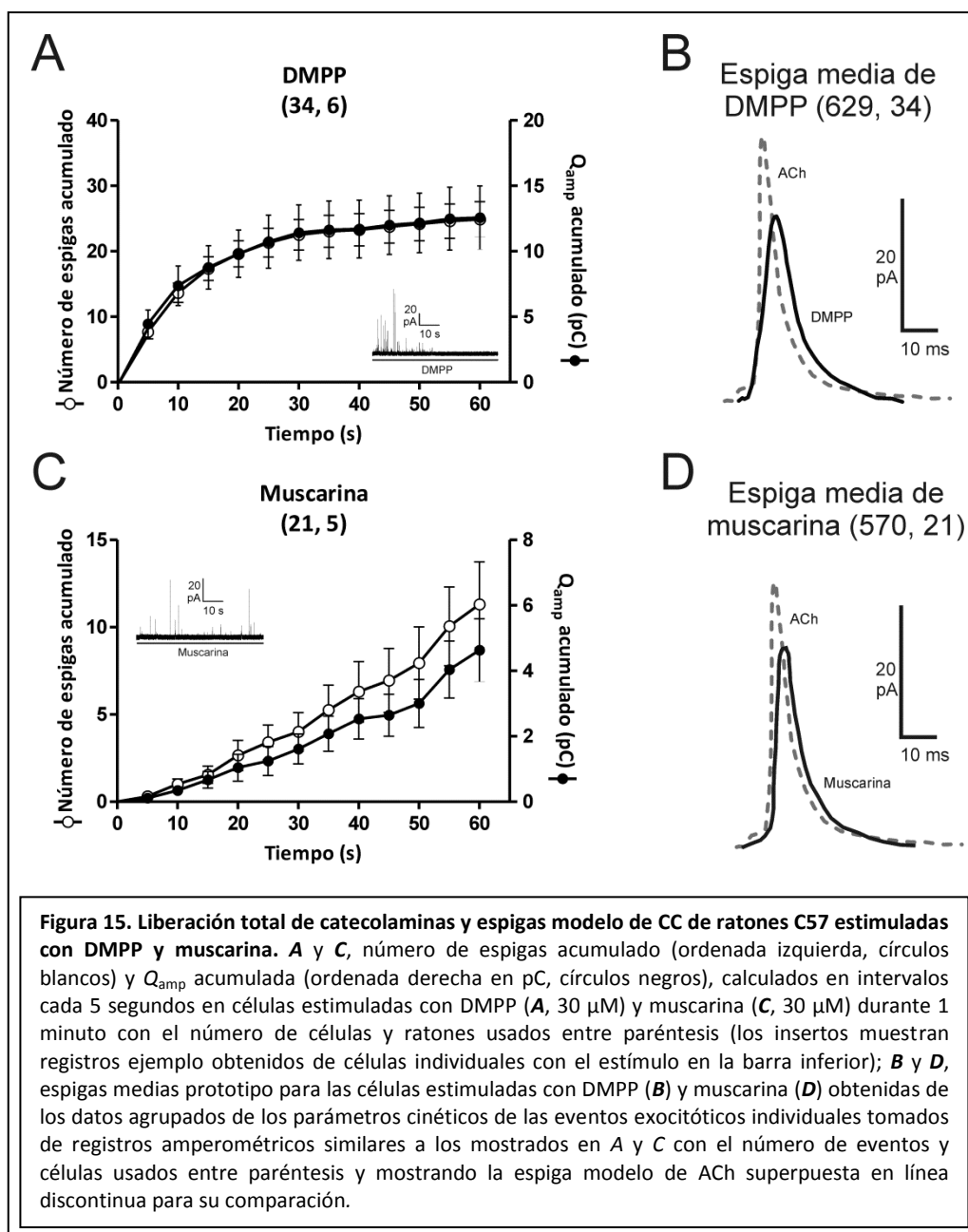
6.2 Secreción cuantitativa de catecolaminas por estimulación con DMPP y muscarina en CC de C57

El DMPP es considerado como un agonista puro de los receptores nicotínicos en los ganglios simpáticos y parasimpáticos (Suzuki y Volle, 1979) y en la médula adrenal (Kayaalp y McIsaac, 1968). Este compuesto ha sido ampliamente usado para estimular la secreción en cultivos primarios de CC de varias especies (Finnegan y col., 1996; Wu y col., 2010). En este estudio hemos usado DMPP 30 μ M, una concentración elevada suficiente para provocar liberación de catecolaminas en CC.

El inserto de la Figura 15A muestra un registro original de espigas secretoras de una CC estimulada con DMPP durante 1 minuto. Observamos una ráfaga inicial de espigas secretoras seguida de espigas más pequeñas e infrecuentes y de un periodo silente en los 30 segundos finales. En las curvas superpuestas de secreción acumulada medida como número de espigas (ordenada izquierda) y Q_{amp} (ordenada derecha) obtenidas de 34 células de 6 cultivos de la Figura 15A es posible apreciar este comportamiento de mejor manera. Partiendo de 629 espigas de 34 células, se procedió a analizar la cinética del poro de fusión exocitótico, obteniéndose las siguientes diferencias (frente a los datos de ACh): 58.44% mayor $t_{1/2}$, 52.33% menor velocidad de crecimiento, tiempo de caída 43.85% más largo, I_{max} 29.48% menor y 28.45% mayor Q . Resumiendo, la espiga media de DMPP era más lenta y de menor amplitud que la de ACh, como se observa en las espigas superpuestas de la Figura 15B. La frecuencia de los pies de espiga fue similar al estimular con DMPP o ACh, pero I_{pie} fue un 31.91% mayor y T_{pie} un 109.3% más largo, lo que indica una apertura de poro de fusión más larga con cierto aumento en la liberación de catecolaminas al estimular CC con DMPP en comparación con ACh (Tabla 4)

A través de la activación selectiva de los receptores muscarínicos, la muscarina provoca una respuesta secretora de menor importancia, en comparación con ACh o DMPP en CC de glándulas adrenales de gato (Kirpekar y col., 1982) y de rata (Wakade y col., 1986). En las CC de este estudio, 30 μ M de muscarina provocaron una respuesta secretora leve compuesta de espigas dispersas durante la estimulación de 1 minuto (inserto de la Figura 15C). Dado que esta respuesta se desarrolló gradualmente, la secreción acumulada no sufrió saturación, como se puede ver en las gráficas para el

número de espigas y para Q_{amp} de la Figura 15C (ordenadas izquierda y derecha, respectivamente). Con respecto a ACh, el número de espigas secretadas se redujo en un 54.95%, mostrando además algunas diferencias en los parámetros de la cinética del poro de fusión (Tabla 3): $t_{1/2}$ 53.07% más largo, velocidad de crecimiento 36.77% mayor, 34.76% menor tiempo de caída, 18.33% menor I_{max} y 21.17% mayor Q . Así, la espiga media de muscarina obtenida de 570 eventos de 21 células fue más lenta que la de ACh, como se aprecia en las espigas superpuestas de la Figura 15D. Además, la frecuencia de pie de espiga fue un 27.96% mayor, I_{pie} un 19.22% menor, T_{pie} un 89.06% mayor, por lo que se producen más aperturas del poro de fusión que tarda más hasta la expansión completa al estimular CC con muscarina en comparación con ACh (Tabla 4).



6.3 Secreción cuantál de catecolaminas por estimulación con cafeína, histamina y K^+ en CC de C57

La cafeína se ha descrito que actúa mediante liberación de Ca^{2+} a través del canal del RyR del RE en CC bovinas (Lara y col., 1997), de rata (Malgaroli y col., 1990) y de ratón (Rigual y col., 2002). Esta respuesta es rápida pero muy transitoria, posiblemente debido a que el depósito de Ca^{2+} se vacía rápidamente (Alonso y col., 1999), por lo que

vimos de interés estudiar la cinética de los eventos exocitóticos individuales de esta respuesta para ver si diferían de los de ACh.

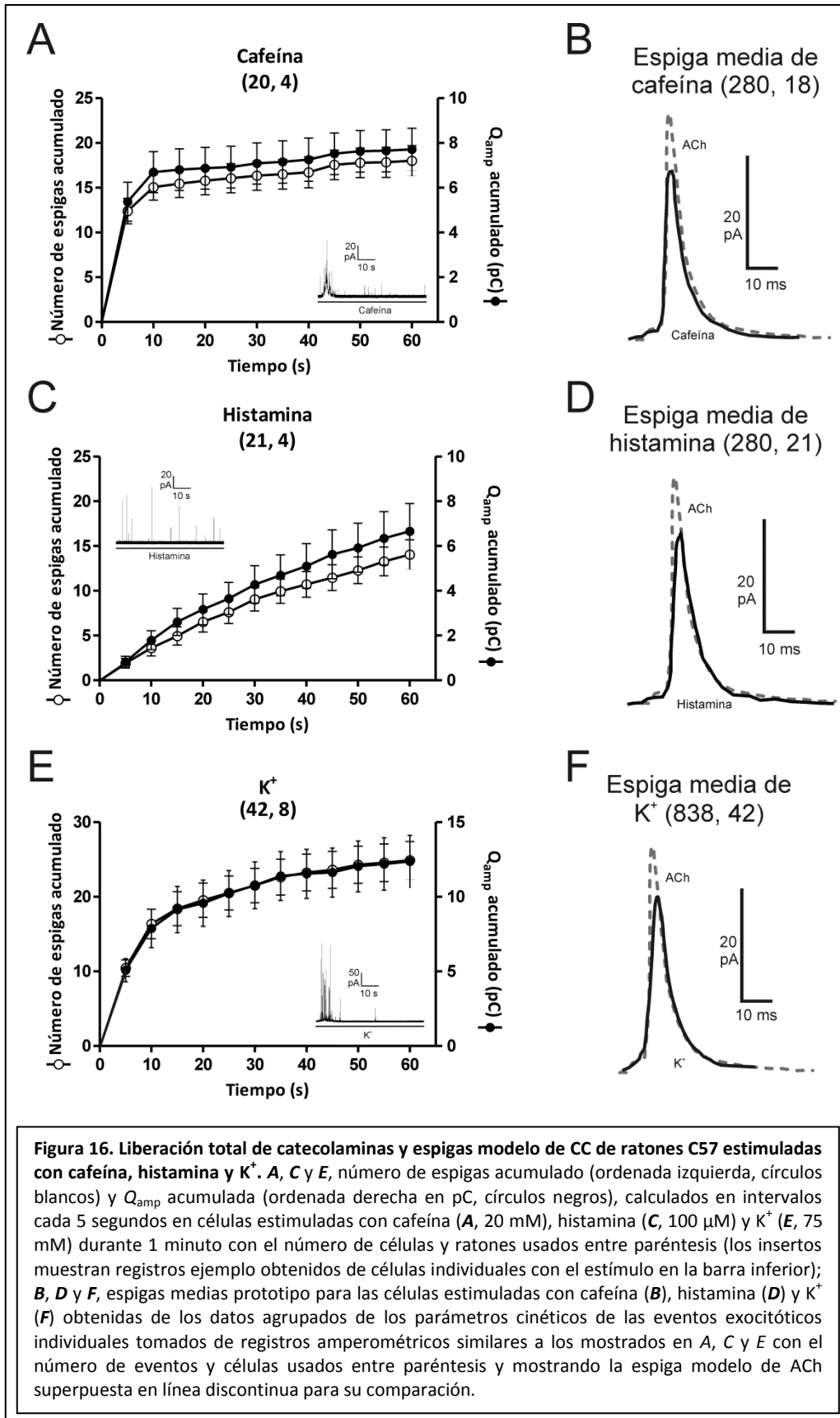
La aplicación de 20 mM de cafeína provocó una respuesta rápida y masiva de espigas superpuestas en una elevación de la línea basal, que duró en torno a 10 segundos y que fue seguida de un periodo de 50 segundos prácticamente silente (inserto de la Figura 16A). La elevación de la línea basal indica la presencia de eventos exocitóticos rápidos y simultáneos de varias vesículas secretoras. De hecho, se ha descrito que los transientes de $[Ca^{2+}]_c$ y la respuesta secretora asociados provocados por cafeína fueron igual de rápidos que los provocados por alto K^+ en CC bovinas, aunque la respuesta a cafeína se inactiva más rápido (Lara y col., 1997). La secreción acumulada (cuantificada tanto como por número de espigas como por Q_{amp}) muestra que en torno al 80% del total de la respuesta tiene lugar en los primeros 5 segundos del periodo de estimulación con cafeína, ya que, de hecho, la respuesta alcanza casi la saturación en 10 segundos y permanece en meseta durante el resto del periodo de estimulación de 60 segundos (Figura 16A).

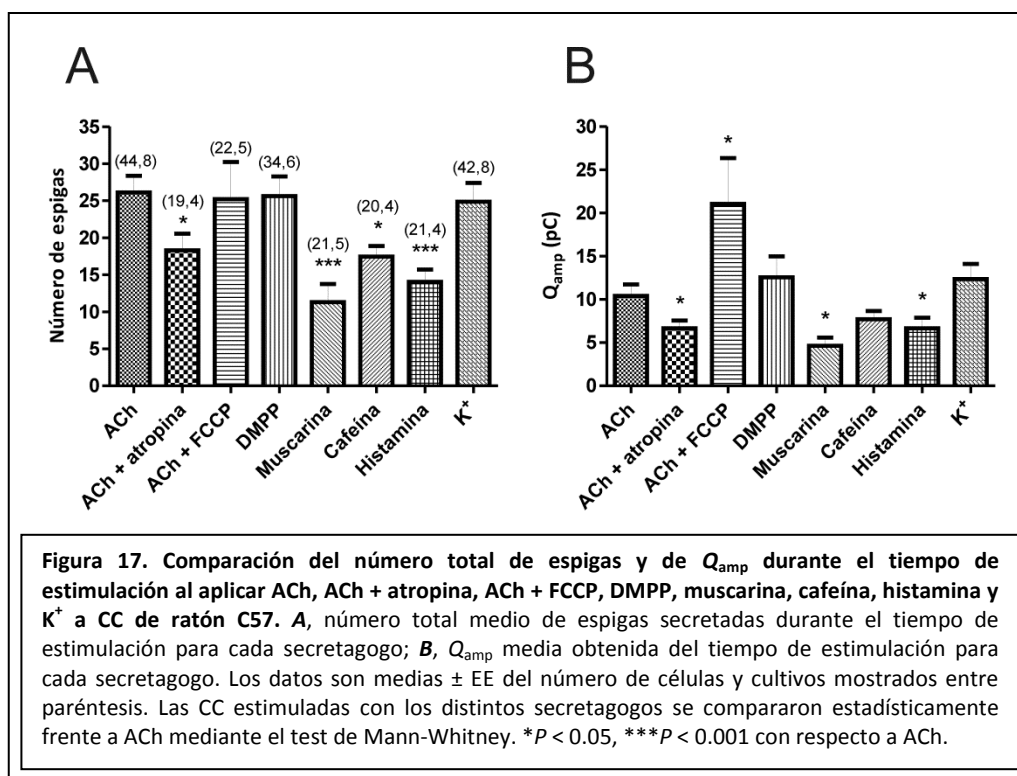
Los parámetros cinéticos de la espiga prototipo modelada de 280 espigas de 20 células a las que se aplica cafeína difirieron sustancialmente de los que se obtuvieron con ACh: 37.29% menor velocidad de crecimiento, 24.29% menor I_{max} , 48.24% menor tiempo de caída, 41.19% mayor $t_{1/2}$ y 18.65% mayor Q (Tabla 3). La presencia de pie fue similar en ambos estímulos (en torno al 50%), pero I_{pie} fue un 50.69% menor, T_{pie} un 17.41% más largo y Q_{pie} un 60.38% menor (Tabla 4). Estos datos nos dicen que la espiga media de cafeína tiene un pie sustancialmente menor, pero un tamaño cuantitativo similar, como se ilustra en las dos espigas superpuestas de la Figura 16B. De esta forma, la espiga modelo de la cafeína tiene características que la asemejan a la que produce muscarina: activación e inactivación lentas y menor amplitud.

Como la muscarina, la histamina también provoca la liberación de Ca^{2+} del RE, pero lo hace a través de los canales de IP_3R , y se ha descrito que aumenta la liberación de catecolaminas de CC bovinas (Livett y Marley, 1986) y de rata (Yoshizaki, 1973). A una concentración de 100 μM , histamina provoca una respuesta secretora que se desarrolla lentamente, mostrando espigas dispersas a lo largo del periodo de registro de 1 minuto, como se observa en el registro ejemplo mostrado en el inserto de la

Figura 16C. El gráfico de secreción acumulada calculada en intervalos de 5 segundos muestra la respuesta secretora que se desarrolla gradualmente y que no alcanza saturación durante el periodo de estimulación de 1 minuto. Las medias de los parámetros cinéticos de 21 CC a las que se aplicó histamina tuvieron los siguientes valores estadísticamente diferentes con respecto a los de ACh: 45.88% mayor $t_{1/2}$, 61.85% mayor tiempo de caída y 34.22% mayor Q . así, la espiga media de histamina es más lenta pero con un tamaño cuantitativo similar a la de ACh, como vemos en las espigas superpuestas de la Figura 16D. Los pies de espiga promedio tenían 27.65% menor I_{pie} , 113.91% mayor T_{pie} y 49.46% menor Q_{pie} , lo que indica una apertura del poro de fusión más larga con una menor liberación de catecolaminas.

Finalmente se usó una solución Tyrode de alto K^+ para despolarizar directamente las células y provocar la entrada de Ca^{2+} por los CCDV y la consiguiente secreción (García y col., 2006). A 75 mM, K^+ provoca despolarización de las CC hasta 0 mV (Orozco y col., 2006) y, por tanto, usamos esta concentración para reclutar todos los CCDV de las CC. En el inserto de la Figura 16E se muestra un registro amperométrico ejemplo obtenido en una CC, donde K^+ provocó una ráfaga inicial rápida de eventos amperométricos que rápidamente desensibilizó tras 10 segundos, aunque en otros registros fue posible ver espigas dispersas en el tiempo restante de estimulación (no mostrado). El gráfico de la secreción media de 42 células indicó una fase inicial de secreción rápida seguida por otra lenta con velocidad de crecimiento mucho menor (Figura 16E). Los datos cinéticos medios de 838 espigas de 42 células mostraron las siguientes diferencias estadísticamente relevantes con respecto a ACh: 31.01% mayor velocidad de crecimiento, 21.19% mayor tiempo de caída, 17.43 mayor $t_{1/2}$ y 30.9% mayor Q . Por tanto, la espiga prototipo de K^+ fue más lenta que la de ACh pero con un contenido cuantitativo mayor, como se puede apreciar en las espigas superpuestas de la Figura 16F. La cinética de los pies de espiga también fue distinta, siendo la presencia de pie un 18.67% mayor, I_{pie} un 20.95% menor y T_{pie} un 18.64% más largo, indicando una apertura de poro de fusión más larga con respecto a ACh.





6.4 Transientes de $[Ca^{2+}]_c$ generados por varios secretagogos en CC de ratones C57

Para tratar de correlacionar la cinética de la excitosis y la cinética de los cambios de $[Ca^{2+}]_c$ que tienen lugar durante la estimulación de CC con los distintos secretagogos usados previamente, hemos estudiado dichos transientes de $[Ca^{2+}]_c$ en CC de C57 cargadas con fura-2. Estas células fueron estimuladas durante 1 minuto con la misma concentración usada en los apartados concernientes a secreción (5.3–5.3) de esta Tesis. La fluorescencia con fura-2 fue registrada previamente (para conseguir un valor basal estable), durante el periodo de estimulación de 1 minuto y durante 2 minutos posteriores a que este finalizara. La Figura 18 resume los cursos temporales de los cambios en $[Ca^{2+}]_c$ (medidos como unidades arbitrarias de fluorescencia del ratio de 340/387 nm de longitud de onda, $UAF_{340/387}$).

El transiente de $[Ca^{2+}]_c$ provocado por ACh presentó un tiempo al pico de 23.34 ± 0.72 s con una velocidad de crecimiento al pico de 0.024 $UAF_{340/387}/s$, alcanzando una meseta tras 10 segundos y decayendo con una τ_i de 66.4 s para alcanzar finalmente la línea basal. La presencia de atropina no modificó en modo perceptible el perfil del

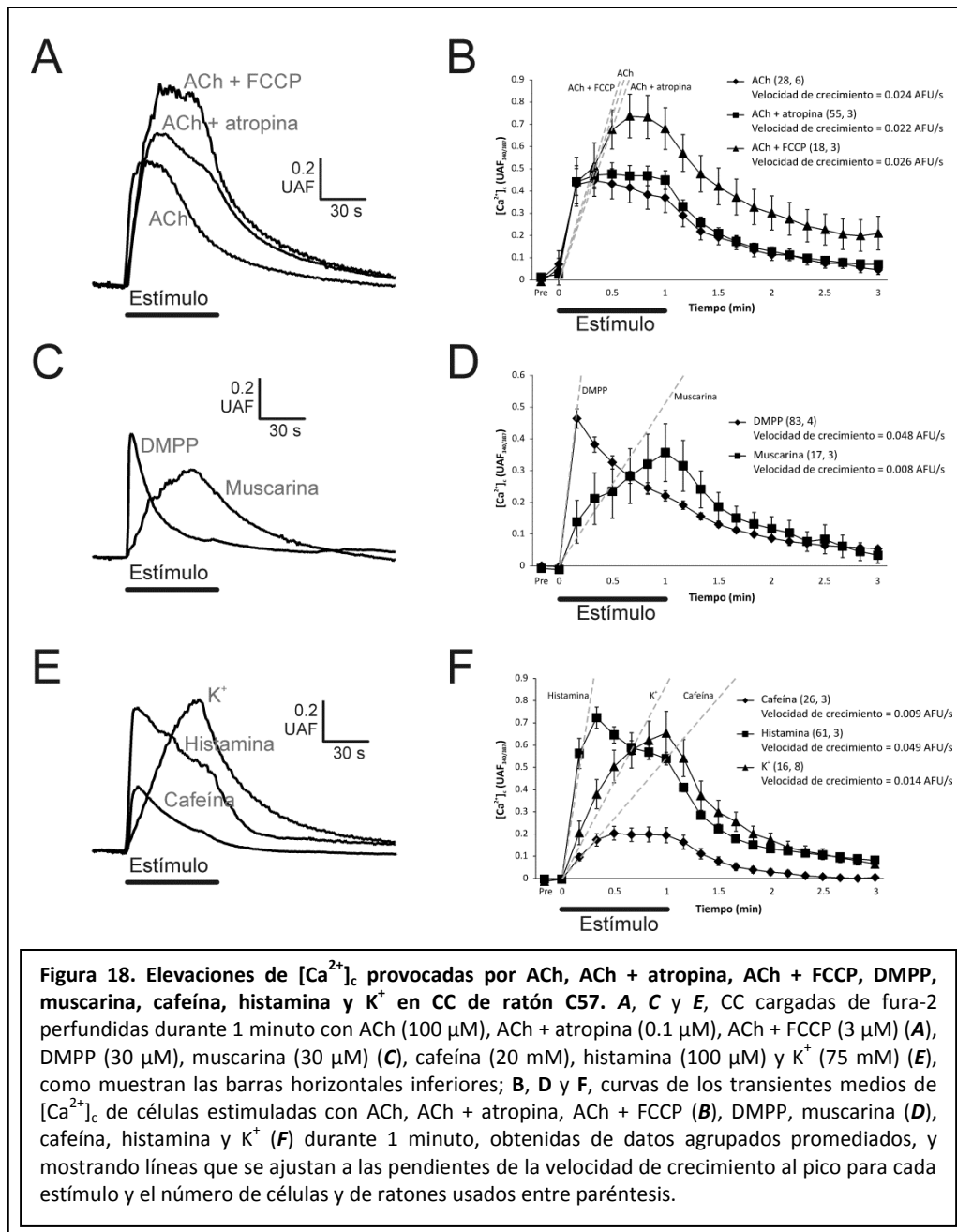
transiente de $[Ca^{2+}]_c$ producido por ACh ni manifestó alteración significativa de los parámetros del mismo (Figura 18B y Tabla 5). Sin embargo, en presencia del protonóforo FCCP, la aplicación conjunta provoca una fase inicial de crecimiento rápido similar a la que produce ACh sola, pero que es seguida por otra fase algo más lenta en lugar de por una meseta, para desembocar en un tiempo al pico de 32.88 ± 1.35 s. El pico de $[Ca^{2+}]_c$ fue un 52.01% significativamente más alto, pero en su caída no alcanza la línea basal, quedando aproximadamente en un 10% del pico. Es reseñable que ABC dobla su tamaño (106.04% mayor) al estimular combinadamente con ACh y FCCP en comparación con ACh sola (Tabla 5).

El crecimiento de $[Ca^{2+}]_c$ más rápido fue conseguido con DMPP (49.91% menor tiempo al pico que la ACh con una velocidad de crecimiento al pico de 0.048 $UAF_{340/387}/s$, Tabla 5 y Figura 18D). Aunque su pico de $[Ca^{2+}]_c$ y τ_i fueron muy similares a ACh (0.56 ± 0.01 $UAF_{340/387}$ y 54.69 ± 0.47 s, respectivamente), el transiente de $[Ca^{2+}]_c$ no alcanzó la línea basal tras el lavado del DMPP (Tabla 5). La muscarina provoca la liberación de Ca^{2+} desde el RE a través de IP_3R , por lo que era esperable que su transiente de $[Ca^{2+}]_c$ se desarrollara de manera lenta (tiempo al pico 109.38% más largo que ACh con una velocidad de crecimiento al pico de 0.008 $UAF_{340/387}/s$), aunque el resto de parámetros fueron bastante similares a la ACh.

Estímulo	Células (cultivos)	ABC ($UAF_{340/387} \cdot s$)	Tiempo al pico (s)	Pico de $[Ca^{2+}]_c$ ($UAF_{340/387}$)	τ_i (s)	Meseta ($UAF_{340/387}$)
ACh	28 (6)	41.14 ± 1.28	23.34 ± 0.72	0.57 ± 0.02	66.38 ± 2.97	-0.058 ± 0.009
ACh + atropina	55 (3)	49.7 ± 0.72 (20.8% higher)	29.68 ± 0.41 (27.16% higher)	0.64 ± 0.01 (12.31% higher)	46.76 ± 0.78 (29.56% lower)	0.029 ± 0.003 * (150.74% higher)
ACh + FCCP	18 (3)	84.77 ± 3.33 *** (106.04% higher)	32.88 ± 1.35 (40.87% higher)	0.86 ± 0.03 * (52.01% higher)	49.31 ± 2.02 (25.72% lower)	0.077 ± 0.014 * (232.65% higher)
DMPP	83 (4)	35.05 ± 0.24 (14.81% lower)	11.69 ± 0.14 *** (49.91% lower)	0.56 ± 0.01 (0.85% lower)	54.69 ± 0.47 (17.62% lower)	0.024 ± 0.001 ** (141.29% higher)
Muscarina	17 (3)	32.1 ± 2.19 (21.97 lower)	48.87 ± 1.02 *** (109.38% higher)	0.41 ± 0.023 (27.91 lower)	66.15 ± 2.91 (0.35% lower)	-0.024 ± 0.008 (58.29% higher)
Cafeína	26 (3)	16.99 ± 0.55 *** (58.69% lower)	31.78 ± 0.74 (36.16% higher)	0.28 ± 0.01 ** (50.54 lower)	37.02 ± 1.06 * (44.24% lower)	-0.026 ± 0.002 (55.85% higher)
Histamina	61 (3)	58.77 ± 0.44 *** (42.84% higher)	18.07 ± 0.21 (22.58% lower)	0.88 ± 0.01 *** (54.55% higher)	31.75 ± 0.25 ** (52.17% lower)	0.049 ± 0.001 *** (184.93% higher)
K ⁺	16 (8)	53.32 ± 1.85 (29.59% higher)	50.72 ± 1.08 *** (117.31% higher)	0.72 ± 0.02 (26.45% higher)	54.09 ± 4.18 (18.51% lower)	-0.011 ± 0.011 (81.71% higher)

Tabla 5. Parámetros cinéticos de las elevaciones de $[Ca^{2+}]_c$ generadas en CC de ratones C57 al ser estimuladas con ACh, ACh + atropina, ACh + FCCP, DMPP, muscarina, cafeína, histamina y K⁺. Los datos se presentan como medias \pm EE con el cambio relativo con respecto a ACh entre paréntesis. Los datos de todas las células fueron analizados y promediados, los datos medios finales son así expresados como medias de todas las células. Las CC estimuladas con los distintos secretagogos (filas) se compararon estadísticamente para cada parámetro de espiga única (columnas) frente a ACh mediante el test de Mann-Whitney. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ con respecto a ACh.

Aunque histamina también provoca movilización del Ca^{2+} de los depósitos del RE, el transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ fue considerablemente distinto al que produjo la muscarina. Sorprendentemente, la velocidad de crecimiento al pico fue muy rápida (0.049 $\text{UAF}_{340/387}/\text{s}$), siendo el tiempo al pico un 22.58% más corto, el pico de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ un 54.55% mayor y τ_i un 52.17% más lenta con respecto a ACh, sin alcanzar llegar a alcanzar la línea basal tras el periodo de lavado (figura 18F, Tabla 5). Inesperadamente, el transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ producido por cafeína también fue muy distinto, con un tiempo al pico largo (36.16% mayor que ACh) y τ_i menor (44.24%). Finalmente, K^+ produjo un transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ mucho más lento que ACh en la fase de crecimiento (117.31% menor tiempo al pico con una velocidad de crecimiento al pico de 0.014 $\text{UAF}_{340/387}/\text{s}$), pero que fue similar en el resto de parámetros (Tabla 5). Resultó interesante también que DMPP fue el único secretagogo con el que el transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ comenzó a aclararse justo después de alcanzar el pico máximo tras un crecimiento rápido, mientras que el resto o bien exhibieron un crecimiento rápido en 2 fases (ACh, ACh + atropina, ACh + FCCP e histamina) o bien un perfil de crecimiento más lento (muscarina, cafeína y K^+) (Figura 18B,D,F).

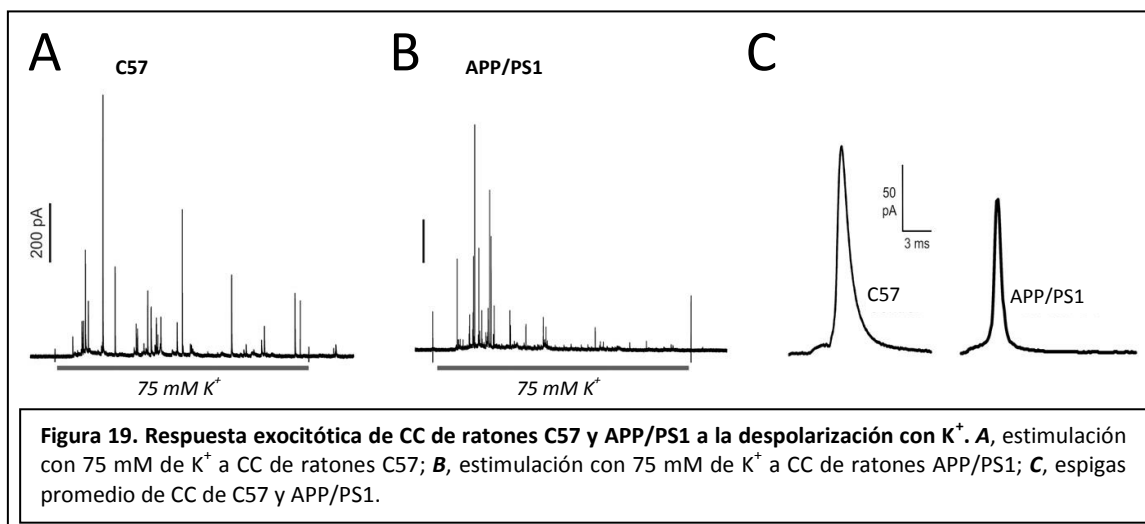


6.5 Secreción cuantil de catecolaminas por estimulación con K^+ comparada en CC de ratones C57 y APP/PS1

Al estimular las CC de ratones C57 y APP/PS1 con 75 mM de K^+ durante 10 segundos, ambas produjeron una salva de espigas excitóticas (Figuras 19A y 19B). Tras el análisis de 278 espigas de 10 células de C57 y 520 espigas de 18 células de APP/PS1, se observó que el número de espigas por célula por estímulo era similar en las CC de C57 (28.4 ± 3) y de APP/PS1 (34.1 ± 4.5).

Al analizar los parámetros cinéticos de las espigas amperométricas (resumidos en la Tabla 6), observamos que la velocidad de crecimiento de las CC de C57 y de APP/PS1 fue similar, en torno a 140 pA/ms (144 ± 36.8 y 135 ± 19.5 pA/ms, respectivamente). Con respecto a I_{\max} , observamos que aunque en CC de APP/PS1 esta fue un 24.82% menor (106 ± 12.4 pA) que en CC de C57 (141 ± 24.3 pA), la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Sí que fueron significativas, sin embargo, las diferencias en $t_{1/2}$, Q y tiempo de caída en CC de APP/PS1 con respecto a C57. Así, $t_{1/2}$ fue un 40.7% más corto en APP/PS1 (3.73 ± 0.43 ms) que en C57 (6.29 ± 0.62 ms). Con respecto a Q , parámetro indicativo del contenido de catecolaminas de la vesícula, observamos que fue un 55% menor en CC de APP/PS1 (0.45 ± 0.05 pC) que de C57 (1 ± 0.09 pC), indicando que el contenido de las vesículas de APP/PS1 liberado es aproximadamente la mitad que el de C57, lo que resulta coherente con los valores de I_{\max} y $t_{1/2}$. Por último, el tiempo de caída fue un 42.45% menor en APP/PS1 (4.04 ± 0.54 s) que en C57 (7.02 ± 0.8 s), en concordancia también con los parámetros anteriormente nombrados. El valor cinético de estos parámetros se encuentra representado en la Figura 19C con las espigas medias representativas de C57 y APP/PS1.



Tipo celular	Número de espigas (células)	Velocidad de crecimiento (pA/ms)	I_{max} (pA)	$t_{1/2}$ (ms)	Q (pC)	Tiempo de caída (ms)
C57	278 (10)	144 ± 36.8	141 ± 24.3	6.29 ± 0.62	1 ± 0.09	7.02 ± 0.8
APP/PS1	520 (18)	135 ± 19.5 (6.25% menor)	106 ± 12.4 (24.82% menor)	3.73 ± 0.43 ** (40.7% menor)	0.45 ± 0.05 *** (55% menor)	4.04 ± 0.54 ** (42.45% menor)

Tabla 6. Parámetros cinéticos de espigas individuales calculados a partir de las respuestas de CC de ratones C57 y APP/PS1 al ser estimuladas con K^+ . Los datos se presentan como medias ± EE con el cambio relativo de APP/PS1 con respecto a C57 entre paréntesis. Los datos de espigas amperométricas fueron analizados y promediados, los datos medios finales son así expresados como medias de todas las células (entre paréntesis). Las CC de C57 y de APP/PS1 se compararon estadísticamente para cada parámetro de espiga única (columnas) mediante el test de Mann-Whitney usando para ello la media de al menos 10 espigas por célula y para cada parámetro. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Con respecto al análisis de los pies de espiga, en la Tabla 7 podemos observar que ambos tipos celulares presentan en torno a un 60% de espigas con pie. I_{pie} y T_{pie} fueron un 27.97% y un 29.72% menores, respectivamente, en las células de APP/PS1 en comparación con las de C57, pero sin alcanzar el nivel de significación estadística. Esta disminución observada tanto en I_{pie} y como en T_{pie} sugiere que sería esperable observar un tamaño cuantil de pie (Q_{pie}) también disminuido, lo cual es corroborado al ver que éste es un 53.23% significativamente menor en células de APP/PS1 frente a las de C57 (27.83 ± 4.35 frente a 59.5 ± 9.16 fC, respectivamente).

Tipo celular	Número de espigas (células)	Espigas con pie (%)	I_{pie} (pA)	T_{pie} (ms)	Q_{pie} (fC)
C57	278 (10)	63 ± 5.22	7.33 ± 1.25	5.82 ± 0.75	59.5 ± 9.16
APP/PS1	520 (18)	62.49 ± 3.8 (0.81% menor)	5.28 ± 0.6 (27.97% menor)	4.09 ± 0.34 (29.72% menor)	27.83 ± 4.35 * (53.23% menor)

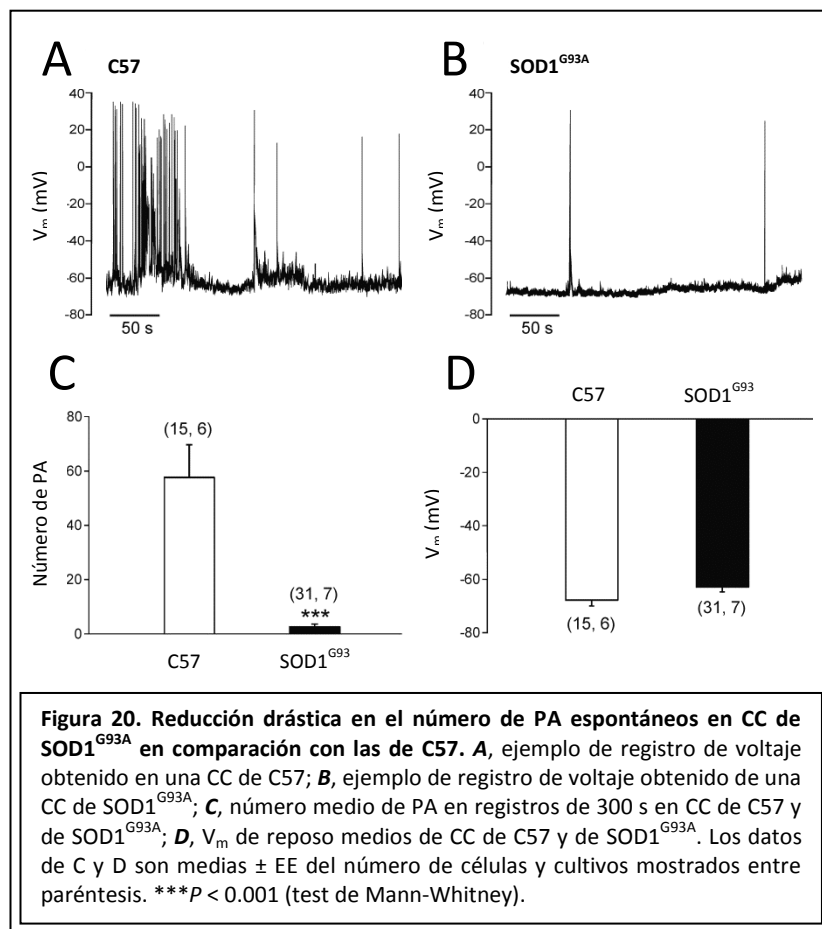
Tabla 7. Parámetros cinéticos de los pies de espiga calculados a partir de las respuestas de CC de ratones C57 y APP/PS1 al ser estimuladas con K^+ . Los datos se presentan como medias ± EE con el cambio relativo de APP/PS1 con respecto a C57 entre paréntesis. Los datos de espigas amperométricas fueron analizados y promediados, los datos medios finales son así expresados como medias de todas las células (entre paréntesis). Las CC de C57 y de APP/PS1 se compararon estadísticamente para cada parámetro de espiga única (columnas) mediante el test de Mann-Whitney usando para ello la media de al menos 10 espigas por célula y para cada parámetro. * $P < 0.05$.

6.6 Excitabilidad de la membrana comparada en CC de ratones C57 y SOD1^{G93A}

Para determinar V_m en reposo, las células se sellaron en el modo de fijación de voltaje y se mantuvieron a un potencial de -80 mV hasta que la resistencia en serie fue <20 M Ω . Después, la configuración del amplificador se cambió al modo de fijación de corriente y se ajustó la inyección de corriente a 0 pA. En 15 células de 6 ratones C57,

V_m fue de -67.8 ± 2.05 mV, mientras que en 31 células de 7 ratones $SOD1^{G93A}$, V_m fue de -62.85 ± 1.9 mV (Figura 20D). Estos valores concuerdan con los encontrados en CC de otras especies animales en las que los valores varían entre -50 y -80 mV (de Diego y col., 2008).

A pesar del hecho de que su V_m es similar, el disparo de PA espontáneos fue considerablemente distinto en CC de ratón C57 y de $SOD1^{G93A}$. En la Figura 20A se puede observar un ejemplo de una CC de C57 cuyo V_m se encuentra en torno a -60 mV y que disparó PA espontáneos a alta frecuencia durante los primeros 70 s, pero que posteriormente permaneció casi silente a excepción de algunos PA dispersos. La Figura 20B muestra una CC ejemplo de $SOD1^{G93A}$ que dispara muy pocos PA aislados dispersos en los 5 minutos registrados. En 15 células de 6 ratones C57 se contaron 57.6 ± 12 PA, mientras que, en el alto contraste, en 31 células de 7 ratones $SOD1^{G93A}$ solo se contaron 2.6 ± 1 PA (Figura 20C)

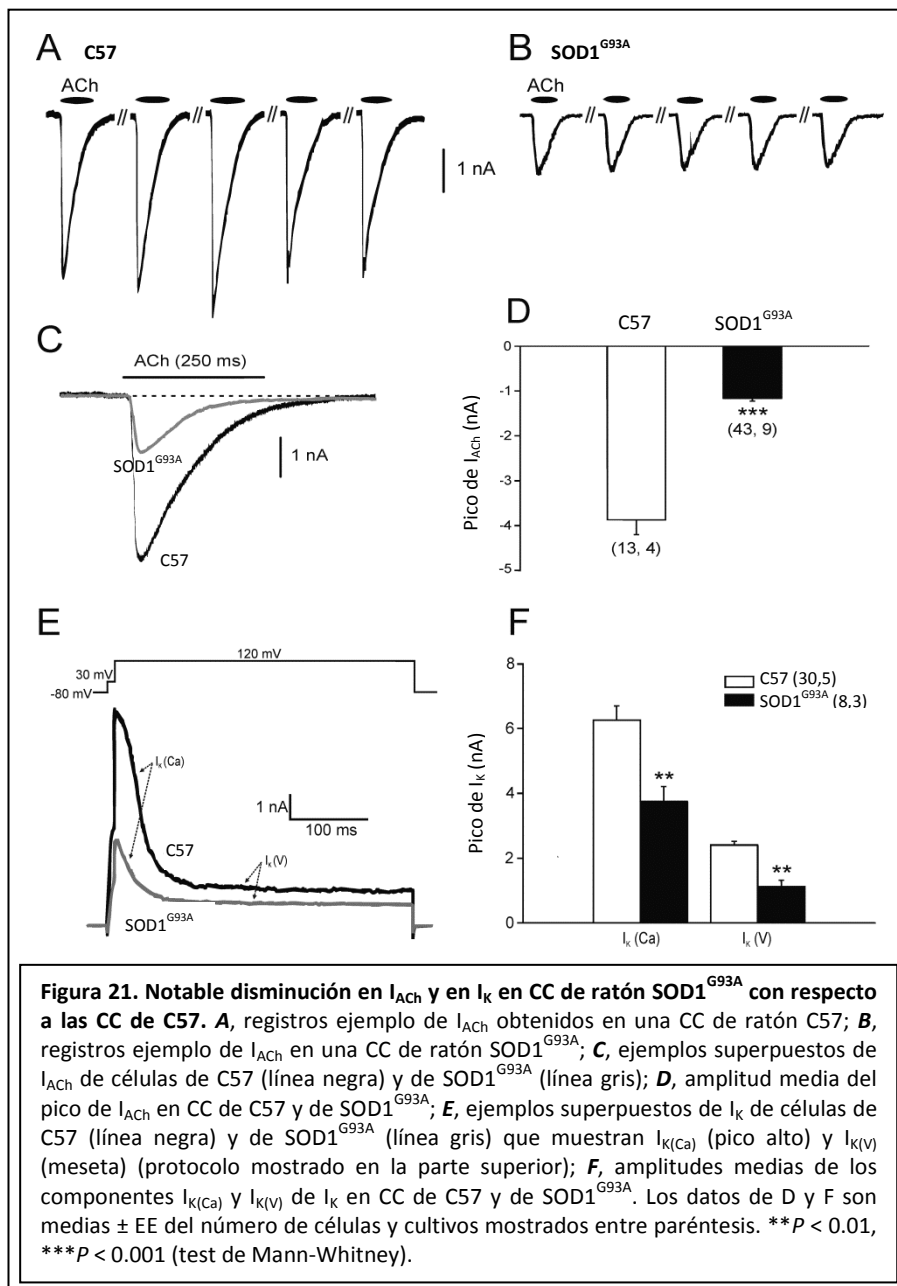


6.7 Corrientes iónicas de célula completa comparadas en CC de C57 y SOD1^{G93A}

Las corrientes iónicas de célula completa fueron registradas en CC de C57 y de SOD1^{G93A} en modo de fijación de voltaje mantenidas a un potencial de -80 mV. I_{ACh} fue producida mediante la aplicación de un pulso de 250 ms de una solución Tyrode para patch-clamp que contenía $100 \mu\text{M}$ de ACh. Los pulsos de ACh se aplicaron a intervalos regulares de 2 minutos. En los paneles A y B de la Figura 21 podemos ver ejemplos de los registros de corriente producidos por la aplicación de 5 pulsos sucesivos de ACh a una CC de C57 y a una CC de SOD1^{G93A}, respectivamente, siendo posible observar una notable disminución en la amplitud de los picos de estas últimas. En la Figura 21C se muestran dos I_{ACh} típicas obtenidas de CC de C57 y de SOD1^{G93A}, siendo posible ver en ambos casos la inactivación usual de la corriente que es probablemente debida a la conocida desensibilización de los receptores nicotínicos tras su exposición a ACh (Katz y Thesleff, 1957; Ochoa y col., 1989). En 13 células de 14 ratones C57 el pico de I_{ACh} fue de 3.87 ± 0.32 nA, mientras que en 43 células de 9 ratones SOD1^{G93A} fue de 1.16 ± 0.06 nA, lo que supone más de un 70% de disminución (Figura 21D).

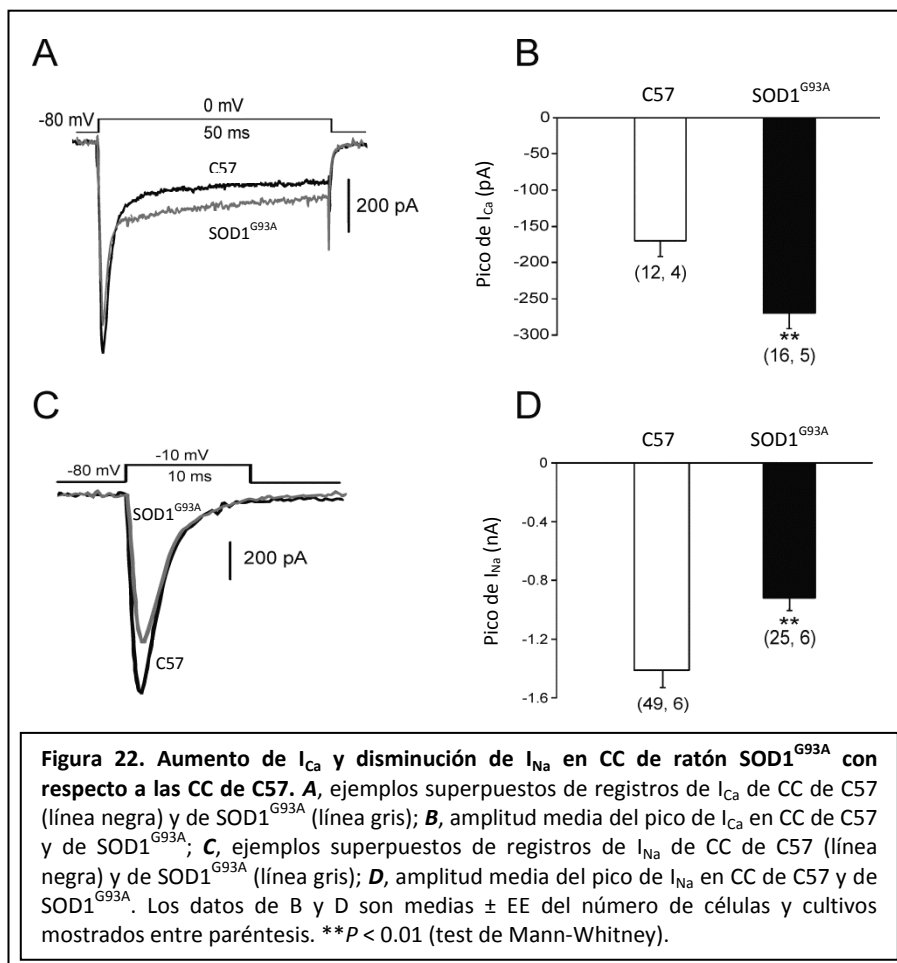
Para estudiar la I_K se usó un protocolo de doble pulso despolarizante. En primer lugar, se aplicó un pulso pre-despolarizante de 10 ms hasta $+30$ mV para permitir la entrada de Ca^{2+} y la activación del componente dependiente de Ca^{2+} de I_K ; después, la aplicación de un pulso despolarizante de 400 ms hasta $+120$ mV permitió reclutar ambos componentes de I_K , el dependiente de Ca^{2+} y el dependiente de voltaje (protocolo en la parte superior de la Figura 21E). Los registros de I_K que se muestran en la Figura 21E fueron tomados de CC de C57 y de SOD1^{G93A} sometidas al protocolo de doble pulso despolarizante antes comentado. Es posible observar una corriente de salida de gran magnitud que se inactiva tras alrededor de 100 ms para desembocar en una meseta; estos dos componentes se deben, respectivamente, a la activación de $I_{K(\text{Ca})}$ y a la activación de $I_{K(\text{V})}$. $I_{K(\text{Ca})}$ se activa gracias al transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ generado por el pre-pulso y se inactiva tras el aclaramiento de este transiente para dar paso a la meseta sostenida, que se debe a su vez a los canales de K^+ dependientes de voltaje, que permanecen abiertos durante los 400 ms del pulso despolarizante (Nistri y Cherubini, 1992). La Figura 21E muestra que los componentes $I_{K(\text{Ca})}$ y $I_{K(\text{V})}$ de I_K están

presentes en las CC de SOD1^{G93A} pero se encuentran, sin embargo, sustancialmente reducidos con relación a los registrados en CC de C57. Estas diferencias se aprecian mejor en el diagrama de barras de la Figura 21F, donde podemos observar que el componente I_{K(Ca)} medio de 30 células de 5 ratones C57 fue 6.25 ± 0.46 nA, en comparación con el de las 8 células de SOD1^{G93A}, que fue 3.75 ± 0.47; esto supone un 40% de disminución. Los valores del componente I_{K(V)} fueron 2.4 ± 0.13 nA y 1.12 ± 0.22 nA para CC de C57 y de SOD1^{G93A}, respectivamente (una reducción del 53.33%).



Para generar I_{Ca} se aplicaron pulsos despolarizantes de 50 ms hasta 0 mV, como es posible observar en el protocolo mostrado en la parte superior de la Figura 22A, en la que además podemos ver dos registros de corriente de células ejemplo de C57 y de $SOD1^{G93A}$, en las que se aprecian dos partes, I_{Na} inicial que se inactiva rápidamente, y I_{Ca} más tardía que es de inactivación lenta. En la Figura 22B se muestra la amplitud media del pico de I_{Ca} para CC de C57 y de $SOD1^{G93A}$, con 170 ± 21.6 y 270 ± 28.1 pA, respectivamente, lo que supone un 37% de incremento. Por otra parte, no se observan diferencias en la cinética de las corrientes entre ambos tipos celulares.

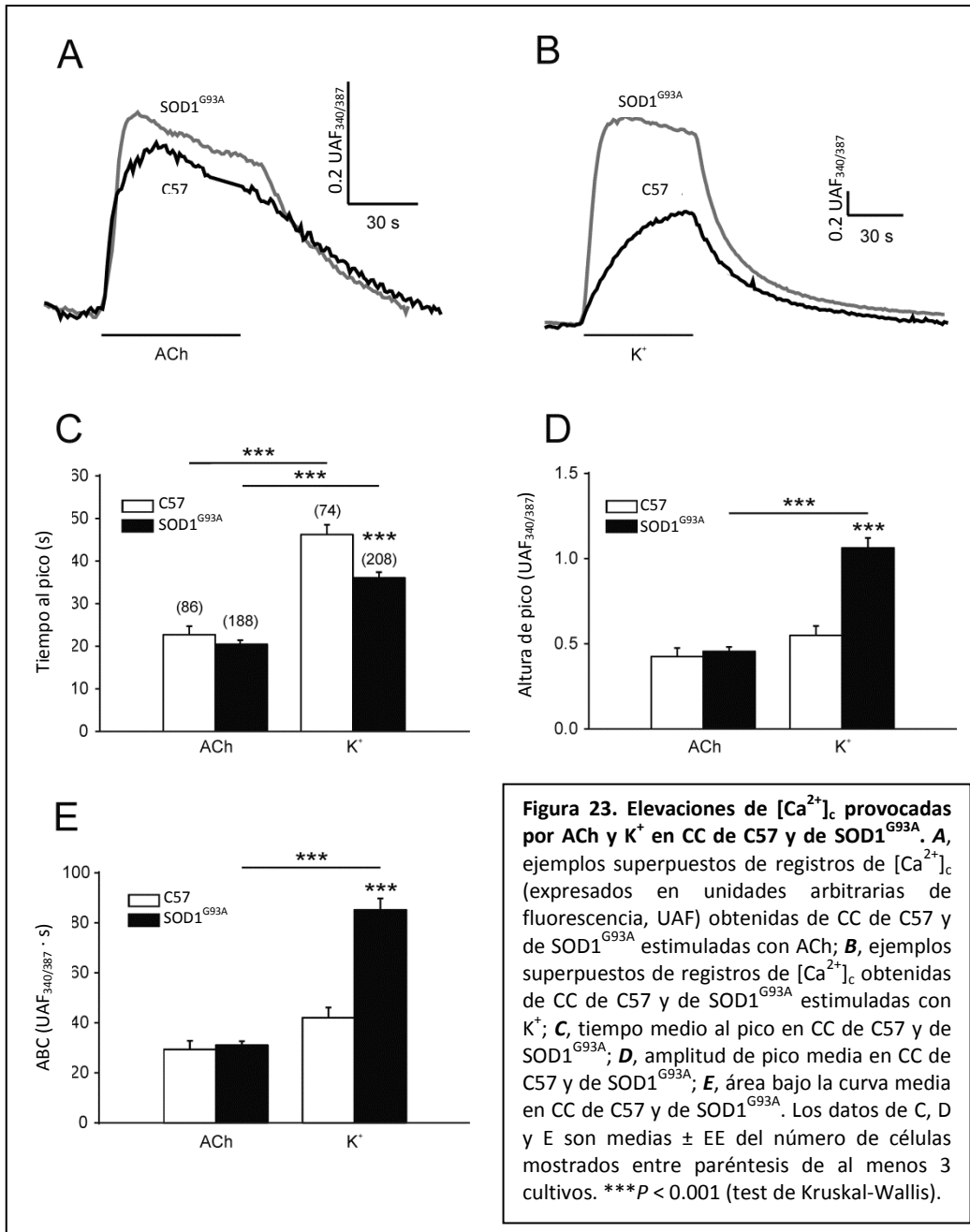
Finalmente, para obtener I_{Na} se aplicaron pulsos despolarizantes de 10 ms hasta -10 mV. Registros ejemplo de I_{Na} de CC de C57 y de $SOD1^{G93A}$ se muestran en la Figura 22C, donde ya es posible apreciar el 35% de disminución en la corriente que arrojan los datos: 1.41 ± 0.12 nA para 49 CC de C57 y 0.92 ± 0.08 nA para CC de $SOD1^{G93A}$ (Figura 22D).



6.8 Transientes de $[Ca^{2+}]_c$ generados por ACh y K^+ comparados en CC de C57 y SOD1^{G93A}

Es bien conocido que ACh y K^+ provocan despolarización celular, entrada de Ca^{2+} por los CCVD, elevación de $[Ca^{2+}]_c$ y activación del mecanismo de liberación de catecolaminas en CC (Douglas y Rubin, 1961; Baker y Knight, 1978; Neher, 1998; de Diego y col., 2008). Desde un punto de vista cuantitativo, ACh y K^+ provocan la liberación de catecolaminas de forma similar; sin embargo, los transientes de $[Ca^{2+}]_c$ generados por estos dos secretagogos son bastante distintos (Cuchillo-Ibanez y col., 2002). Por lo tanto, el siguiente punto a explorar en este estudio fueron los transientes de $[Ca^{2+}]_c$ generados por ACh y K^+ en CC de C57 y de SOD1^{G93A} cargadas con la sonda fluorescente fura-2AM. Tras un periodo inicial de estabilización de 3 minutos para conseguir una línea basal estable, se aplicó a las células solución Tyrode estándar con una concentración supramáxima de ACh (100 μ M) o con alto K^+ (75 mM) durante 1 minuto, para así poder estudiar el proceso de crecimiento y aclaramiento del transiente de $[Ca^{2+}]_c$ al completo.

En la Figura 23A y 23B podemos observar registros ejemplo del curso temporal de las elevaciones de $[Ca^{2+}]_c$ producidas por ACh y K^+ , respectivamente. Aunque los transientes provocados por ACh fueron similares en las células de C57 y de SOD1^{G93A}, los evocados por K^+ fueron notablemente mayores en células de SOD1^{G93A} con respecto a C57. Esto es más fácilmente apreciable en los gráficos de barras de los paneles C a E de la Figura 23, donde podemos apreciar que en las células estimuladas con ACh el tiempo al pico, la amplitud de pico y ABC son similares en ambos tipos celulares. Sin embargo, no ocurrió lo mismo con el K^+ , ya que en las células de SOD1^{G93A} el tiempo al pico resultó ser un 20% menor que en C57, siendo la amplitud de pico y AUC un 88 y un 100% mayores, respectivamente. Así, K^+ provocó un transiente de $[Ca^{2+}]_c$ que tenía una activación más rápida y una carga de Ca^{2+} casi el doble mayor en CC de SOD1^{G93A} con respecto a C57, lo cual está en concordancia con que I_{Ca} se encuentre aumentada en CC de SOD1^{G93A} con respecto a aquellas de C57 (Figura 22B).

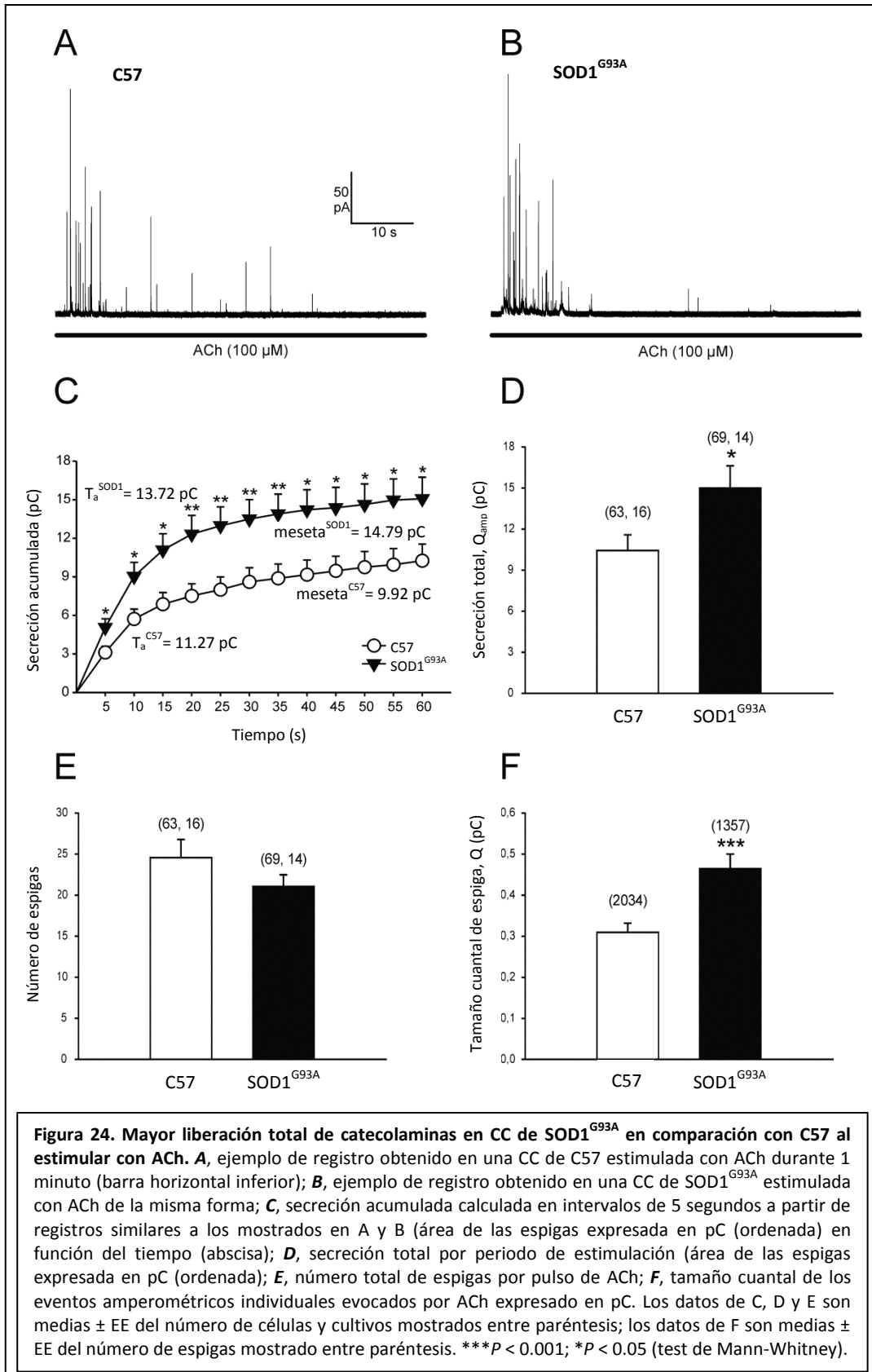


6.9 Secreción cuantil de catecolaminas por estimulación con ACh y K^+ comparada en CC de C57 y SOD1^{G93A}

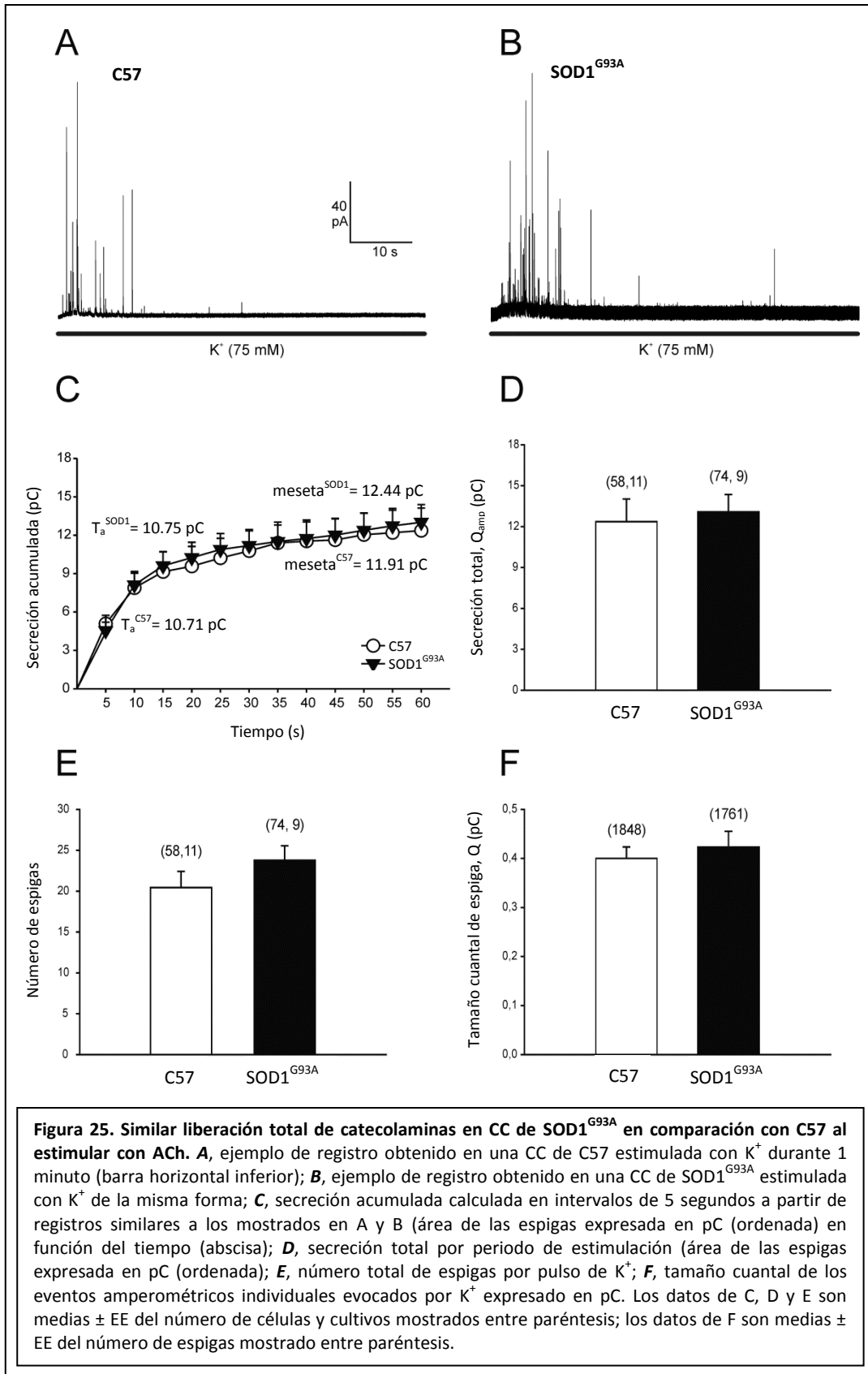
Para estudiar la liberación cuantil de catecolaminas, todos los experimentos comenzaron con un periodo inicial de 5 minutos de perfusión con solución Tyrode estándar para que las células se adapten al medio. No se observó ningún o casi ningún evento amperométrico espontáneo durante este periodo. Para provocar exocitosis, la célula en estudio fue bañada en solución Tyrode estándar que contiene 2 mM de Ca^{2+}

que se cambió rápidamente a otra solución Tyrode estándar que contenía 100 μM de ACh o 75 mM de K^+ durante 1 minuto. Nos decantamos por este periodo largo de estimulación por dos razones: 1) buscábamos obtener el mayor número de espigas amperométricas para maximizar el poder estadístico del análisis de eventos amperométricos únicos; y 2) también deseábamos explorar las diferencias potenciales en el curso temporal de la secreción ligada a la depleción de los contingentes de vesículas y/o a la inactivación de los CCDV (Villarroya y col., 1999; Hernandez-Guijo y col., 2001). Las células individuales fueron estimuladas con ACh o con K^+ una sola vez.

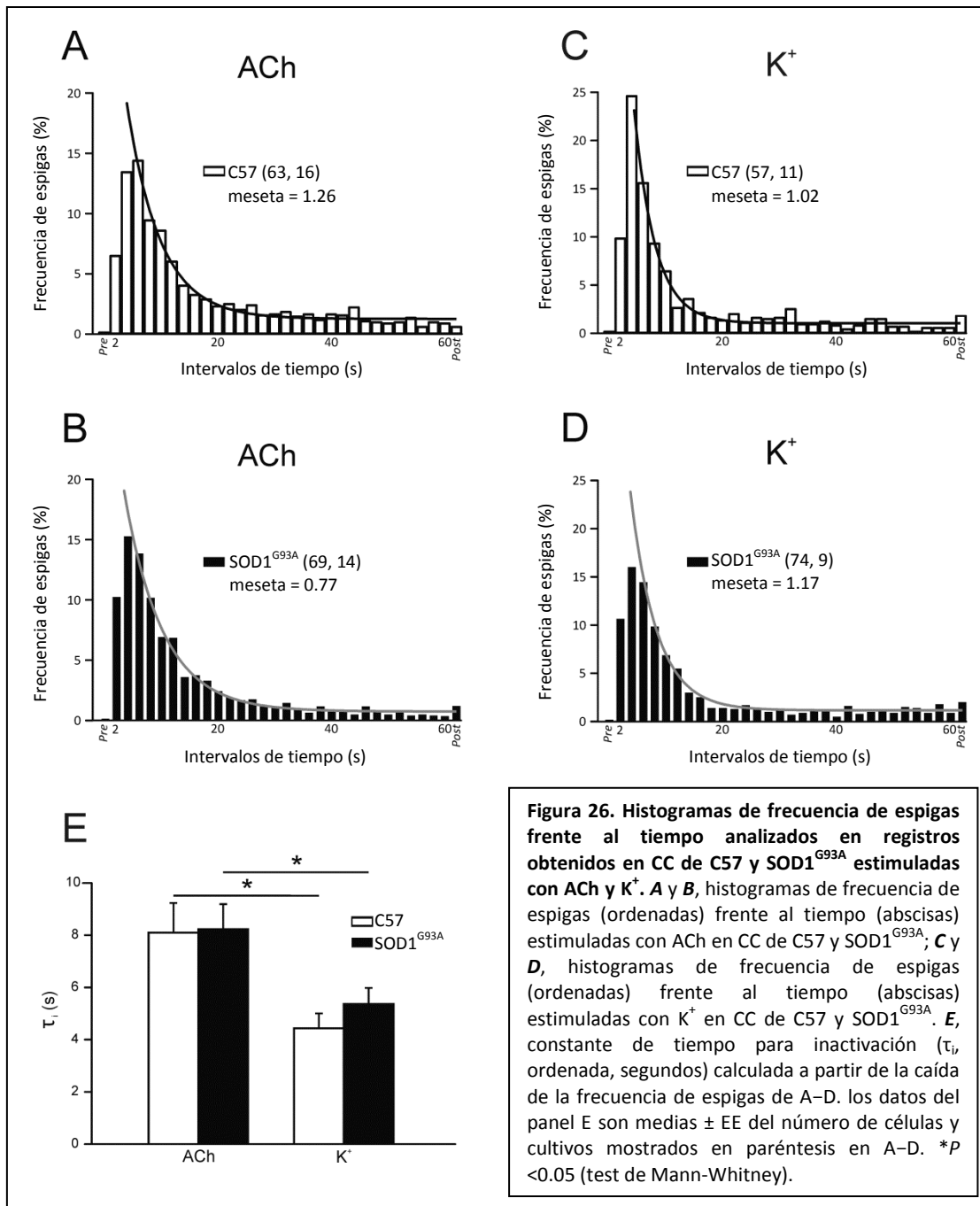
La Figura 24A y 24B muestra ráfagas de espigas amperométricas producidas por ACh en una CC ejemplo de C57 y de $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$, respectivamente. No se observó elevación de la línea basal a pesar de la gran frecuencia de espigas en la ráfaga inicial de secreción en ambos tipos celulares, que fue seguida de un periodo con pocas espigas. Los datos agrupados de secreción acumulada frente al tiempo calculada a intervalos de 5 segundos en experimentos similares a aquellos mostrados en la Figura 24A y 24B se muestran graficados en la Figura 24C. En ambos tipos celulares se observa un ritmo de secreción inicial rápido durante los 10 primeros segundos del pulso de ACh, que fue seguido por tasas de secreción más lentas durante los siguientes 50 segundos del periodo de estimulación. La tasa de secreción inicial fue un 21.7% más lenta en CC de $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ (representada por la constante de tiempo de activación, $\tau_a = 13.72$ s) en comparación a CC de C57 ($\tau_a = 11.27$ s). La secreción total (área en pC de todas las espigas secretadas en cada pulso de ACh, Q_{amp}) se encuentra graficada en la Figura 24D, donde podemos ver que la secreción fue un 46.6% mayor en CC de $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$. Sin embargo, a pesar de esta diferencia, el número de espigas en cada pulso de ACh fue similar, 24.55 ± 2.22 para CC de C57 y 21.06 ± 1.22 para CC de $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ (Figura 24E). El tamaño cuantal (contenido de catecolaminas de cada vesícula individual, Q) fue 1.6 veces mayor en células de $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ (0.47 ± 0.03 pC) con respecto a aquellas de C57 (0.31 ± 0.02 pC) (Figura 24F, Tabla 8). Así, esta secreción total mayor pero con número similar de espigas podría explicarse por este tamaño cuantal mayor en $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ con respecto a C57.



Con respecto a la estimulación con K^+ , los registros ejemplo de CC de C57 y de $SOD1^{G93A}$ mostrados en la Figura 25A y 25B, muestran la presencia de una ráfaga inicial de espigas amperométricas seguido de espigas más infrecuentes, indicando una tasa de secreción reducida en las etapas tardías del periodo de estimulación con K^+ . Es reseñable la presencia de una elevación en la línea basal al inicio del pulso de K^+ , lo que sugiere la presencia de una secreción masiva y de espigas superpuestas debidas a la exocitosis rápida y casi simultánea de vesículas atracadas de RRP e IRP (Neher, 1998; Miranda-Ferreira y col., 2008; Fernandez-Morales y col., 2009). La secreción acumulada frente al tiempo medida en intervalos de 5 segundos se encuentra graficada en la Figura 25C. A diferencia de lo que ocurre con ACh, la secreción inicial fue similar en CC de C57 ($\tau_a = 10.71$ s) y de $SOD1^{G93A}$ ($\tau_a = 10.75$ s), y las dos curvas evolucionan paralelas mostrando un ritmo bajo de incremento en la secreción. La Figura 25D muestra que la secreción total (área en pC de todas las espigas secretadas en el pulso de K^+) fue similar en ambos tipos celulares, sobre 12 – 13 pC. El número total de espigas (20.44 ± 1.98 para C57 y 23.8 ± 1.76 para $SOD1^{G93A}$, Figura 25E) y Q (0.4 ± 0.02 pC para C57 y 0.42 ± 0.03 pC para $SOD1^{G93A}$) fueron también similares (Figura 25F y Tabla 8)



La Figura 26A–26D muestra histogramas de frecuencia de espigas contadas en intervalos de 2 segundos consecutivos durante los 60 segundos del periodo de estimulación con ACh o K^+ . Podemos apreciar que la caída de la frecuencia de espigas se ajusta a una curva exponencial simple en C57 y SOD1^{G93A}. Cuando estimulamos con ACh, τ_i de la frecuencia de espigas fue 8.1 y 8.23 s para C57 y SOD1^{G93A}, respectivamente; mientras que al estimular con K^+ τ_i fue de 4.43 y de 5.36 para C57 y SOD1^{G93A}, respectivamente (Figura 26E), siendo así la tasa de inactivación un 15% para ACh y un 12% para K^+ más lenta en CC de SOD1^{G93A}. Es reseñable que la meseta calculada para la curva de frecuencia de espigas con ACh en SOD1^{G93A} fuera más pequeña (0.77%) que la de C57 (1.26%, Figura 26A y 26B), y que estas diferencias no estuvieran presentes al estimular con K^+ (1.02% frente a 1.17% en C57 y SOD1^{G93A}, respectivamente, Figura 26C y 26D).



6.10 Análisis cinético de eventos excitotóxicos individuales que tienen lugar en las respuestas secretoras evocadas por ACh y K⁺ comparado en CC de C57 y SOD1^{G93A}

Para este estudio se llevaron a cabo cuatro tipos de análisis comparativos de los parámetros cinéticos de espigas amperométricas: 1) CC de C57 (2034 espigas de 63 células) frente a SOD1^{G93A} (1357 espigas de 69 células) estimuladas con ACh; 2) CC de

C57 (1848 espigas de 58 células) frente a SOD1^{G93A} (1761 espigas de 74 células) estimuladas con K⁺; 3) CC de C57 estimuladas con ACh frente a K⁺; y 4) CC de SOD1^{G93A} estimuladas con ACh frente a K⁺.

Todos los parámetros cinéticos estudiados en CC de C57 y SOD1^{G93A} estimuladas con ACh mostraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 8). De esta forma, comparadas con C57, las CC de SOD1^{G93A} mostraron los siguientes cambios: velocidad de crecimiento 35.94% menor, tiempo de caída 60.7% más largo, $t_{1/2}$ 55.3% mayor, I_{max} 16.62% menor y Q 52.24% mayor. Las espigas modelo que se obtienen de estos parámetros cinéticos resultan en una espiga de C57 estrecha pero más rápida, comparada con la espiga de SOD1^{G93A} que es más lenta y de mayor tamaño cuantales. Esto indica una liberación exocitótica de catecolaminas más lenta pero de mayor magnitud por cada vesícula individual en CC de SOD1^{G93A} comparadas con las de C57, como es posible observar en las espigas superpuestas de la Figura 27A.

Tipo celular (estímulo)	Número de espigas (células)	Velocidad de crecimiento (pA/ms)	Tiempo de caída (ms)	$t_{1/2}$ (ms)	I_{max} (pA)	Q (pC)
C57 (ACh)	2034 (63)	23.75 ± 2.49	6.06 ± 0.38	5.71 ± 0.32	39.25 ± 3.17	0.31 ± 0.02
SOD1 ^{G93A} (ACh)	1357 (69)	15.21 ± 1.15 ^B (35.94% menor)	9.73 ± 0.6 ^C (60.7% mayor)	8.86 ± 0.56 ^C (55.3% mayor)	32.72 ± 2.08 ^A (16.62% menor)	0.47 ± 0.03 ^C (52.24% mayor)
C57 (K ⁺)	1848 (58)	17.19 ± 1.38 ^D (27.62% menor)	7.69 ± 0.43 ^E (27.05% mayor)	6.94 ± 0.32 ^E (21.57% mayor)	34.16 ± 1.88 (12.97% menor)	0.4 ± 0.01 ^F (28.77% mayor)
SOD1 ^{G93A} (K ⁺)	1761 (74)	19.81 ± 1.31 ^E (30.24% mayor)	8.11 ± 0.55 ^D (16.43% menor)	7.28 ± 0.5 ^E (17.81% menor)	36.69 ± 2.07 (12.12% mayor)	0.42 ± 0.03 (10.2% menor)

Tabla 8. Parámetros cinéticos de espigas individuales calculados a partir de las respuestas de CC de ratones C57 y SOD1^{G93A} al ser estimuladas con ACh y K⁺. Los datos se presentan como medias ± EE con el cambio relativo de SOD1^{G93A} con respecto a C57 (en la fila SOD1^{G93A}-ACh) o el cambio relativo de K⁺ con respecto a ACh (en las filas de K⁺) entre paréntesis. Los datos de espigas amperométricas fueron analizados y promediados, los datos medios finales son así expresados como medias de todas las células (entre paréntesis). Las CC de C57 y de SOD1^{G93A} se compararon estadísticamente para cada parámetro de espiga única (columnas) mediante el test de Mann-Whitney usando para ello la media de al menos 10 espigas por célula y para cada parámetro. ^AP < 0.05, ^BP < 0.01, ^CP < 0.001 en filas SOD1^{G93A} con respecto a C57 para cada estímulo; ^DP < 0.05, ^EP < 0.01, ^FP < 0.001 en filas K⁺ con respecto a ACh para cada estímulo.

Sorprendentemente, todos los parámetros cinéticos de las espigas registradas de CC de C57 y SOD1^{G93A} despolarizadas directamente con K⁺ mostraban parámetros cinéticos con valores similares (Tabla 8). Esto indicó que la espiga exocitótica media no difería entre ambos tipos celulares cuando se estimulaban con K⁺, como muestran las espigas modelo superpuestas en la Figura 27B.

También es posible observar algunas diferencias cinéticas en las espigas generadas por ACh o K⁺ en las células de C57. De esta forma, comparadas con las

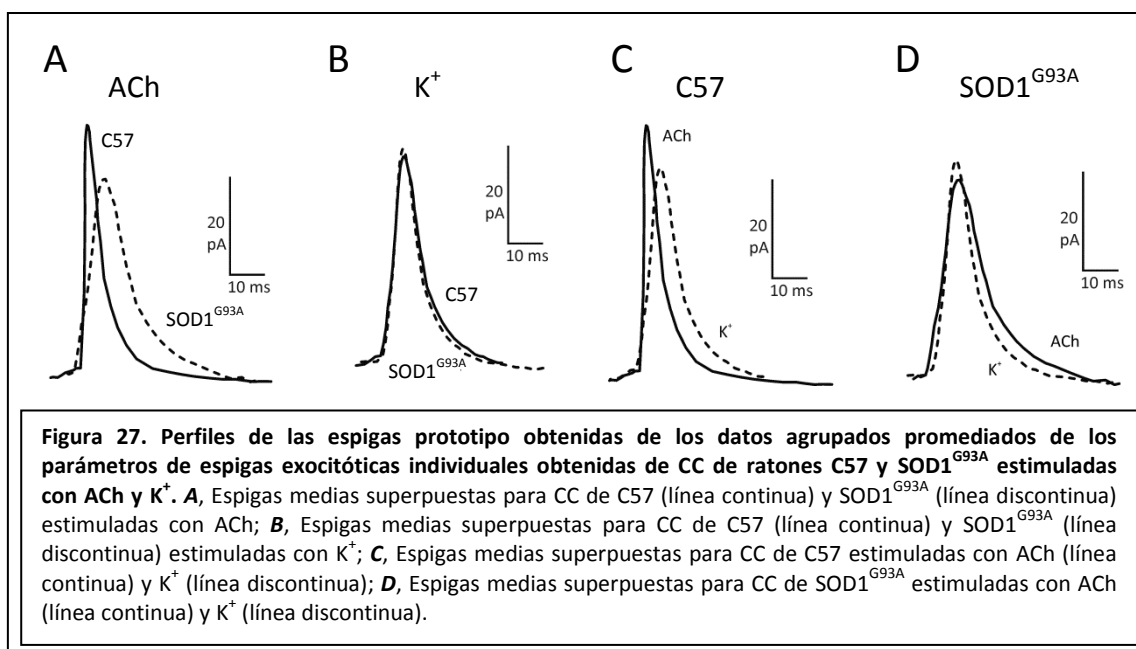
células estimuladas con ACh (despolarización indirecta mediante PA intermitentes), las estimuladas con K⁺ (despolarización directa continua) tenían una velocidad de crecimiento 27.62% menor, 27.05% mayor tiempo de caída, $t_{1/2}$ 21.57% más largo, 12.97% menor I_{max} y Q un 28.77% mayor. Las espigas medias superpuestas en la Figura 27C indican que cuando las CC de C57 son estimuladas con ACh se produce una liberación de catecolaminas más rápida pero menor que cuando son estimuladas con K⁺.

Finalmente, se compararon los parámetros cinéticos de los eventos amperométricos registrados en las células de SOD1^{G93A} estimulados con ACh o K⁺, mostrando solo diferencias menores. Por ejemplo, comparado con la estimulación con ACh, el K⁺ evocó espigas que tenía una velocidad de crecimiento un 30.24% mayor, tiempo de caída 16.43% menor y $t_{1/2}$ 17.81% menor, siendo el resto de parámetros similares (sin diferencia estadística). Las espigas medias superpuestas indicaban que el K⁺ provocaba respuestas secretoras que eran ligeramente más rápidas, pero con Q similar a ACh (Figura 27D).

La presencia de pie fue ligeramente más frecuente (10.33% mayor) en CC de SOD1^{G93A} estimuladas con ACh en comparación con las de C57 (Tabla 9), siendo además la duración del pie un 30.8% mayor y la amplitud un 22.95% menor en células de SOD1^{G93A} comparadas con C57. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en estos parámetros entre ambos tipos celulares al estimular con K⁺ (Tabla 9).

Tipo celular (estímulo)	Número de espigas (células)	Espigas con pie (%)	I_{pie} (pA)	T_{pie} (ms)	Q_{pie} (fC)
C57 (ACh)	2034 (63)	59.56 ± 2.17	3.73 ± 0.22	3.6 ± 0.3	17.08 ± 1.59
SOD1 ^{G93A} (ACh)	1357 (69)	65.71 ± 1.91 ^A (10.33% mayor)	2.87 ± 0.14 ^B (22.95% menor)	4.7 ± 0.26 ^B (30.8% mayor)	16.35 ± 1.13 (4.27% menor)
C57 (K ⁺)	1848 (58)	67.94 ± 2.28 ^D (14.08% mayor)	2.88 ± 0.23 ^E (22.96% menor)	4.14 ± 0.25 ^C (15.23% mayor)	14.94 ± 1.3 (12.52% menor)
SOD1 ^{G93A} (K ⁺)	1761 (74)	73.12 ± 1.72 ^D (11.27% mayor)	3 ± 0.14 (4.25% mayor)	4.19 ± 0.31 ^C (10.97% menor)	15.75 ± 1.49 (3.69% menor)

Tabla 9. Parámetros cinéticos de los pies de espiga calculados a partir de las respuestas de CC de ratones C57 y APP/PS1 al ser estimuladas con ACh y K⁺. Los datos se presentan como medias ± EE con el cambio relativo de SOD1^{G93A} con respecto a C57 (en la fila SOD1^{G93A}-ACh) o el cambio relativo de K⁺ con respecto a ACh (en las filas de K⁺) entre paréntesis. Los datos de espigas amperométricas fueron analizados y promediados, los datos medios finales son así expresados como medias de todas las células (entre paréntesis). Las CC de C57 y de SOD1^{G93A} se compararon estadísticamente para cada parámetro de espiga única (columnas) mediante el test de Mann-Whitney usando para ello la media de al menos 10 espigas por célula y para cada parámetro. ^AP < 0.05, ^BP < 0.001 en filas SOD1^{G93A} con respecto a C57 para cada estímulo; ^CP < 0.05, ^DP < 0.01, ^EP < 0.001 en filas K⁺ con respecto a ACh para cada estímulo.



7 DISCUSIÓN

7.1 Variaciones del poro de fusión exocitótico y de los transientes de $[Ca^{2+}]_c$ en CC de ratón C57 estimuladas con ACh y otros secretagogos

Hemos encontrado en este estudio que ACh, DMPP y K^+ provocan respuestas exocitóticas de mayor carga y más rápidamente que las suscitadas por muscarina o histamina en CC de la cepa C57, y que, aun siendo rápida, la respuesta a cafeína también fue menor (Figura 17). En un estudio previo, la estimulación de CC de este mismo ratón con carbacol, DMPP o K^+ también desencadenó respuestas secretoras mayores y más rápidas con respecto a muscarina (Wu y col., 2010). En la literatura se ha mantenido durante las últimas cuatro décadas una antigua incógnita acerca de la contribución de los receptores nicotínicos y muscarínicos a la respuesta de liberación de catecolaminas que provoca la ACh que libera fisiológicamente la sinapsis entre el nervio esplácnico y la CC (Feldberg y col., 1934). Está descrito y aceptado que el componente nicotínico es un acontecimiento primario en el proceso del acoplamiento estímulo-secreción (Douglas, 1968), pero el papel del componente muscarínico se encuentra todavía en situación incierta en las varias especies animales estudiadas (Olivos y Artalejo, 2008).

La respuesta secretora a ACh mediada por el receptor nicotínico implica despolarización de la membrana, reclutamiento de los CCDV, entrada rápida de Ca^{2+} , formación de microdominios de Ca^{2+} elevado (MDCE) en localizaciones subplasmalemales y la rápida depleción de RRP e IRP; mientras que por otro lado los microdominios de Ca^{2+} reducido (MDCR) que se forman en localizaciones más profundas del citosol, promueven el transporte de vesículas secretoras para reponer los contingentes de vesículas agotados (RRP e IRP) y asegurar así la exocitosis sostenida (Neher, 1998). Se ha descrito que dichos MDCR se producen al usar histamina, cafeína o pulsos despolarizantes pequeños, y que tienen un papel muy reducido por sí mismos en la secreción rápida, aunque se ha visto que aumentan las respuestas a estímulos despolarizantes de niveles supramáximos en CC bovinas en fijación de voltaje (von Ruden y Neher, 1993). Los resultados aquí presentados son compatibles con la hipótesis de que ambos receptores, nicotínico y muscarínico,

cooperan al ser estimulados fisiológicamente para generar MDCE que desencadenan la rápida exocitosis de los RRP e IRP (papel del receptor nicotínico) así como para generar MDCR que estimulan el transporte de vesículas dependiente de Ca^{2+} desde los contingentes de reserva para reponer los ya agotados RRP e IRP (papel del receptor muscarínico). Así, la respuesta secretora total a ACh se compone de una fase secretora rápida mediada por los receptores nicotínicos seguida de una fase lenta mediada por los receptores muscarínicos (Figura 14A). El hecho de que el agonista puro del receptor nicotínico DMPP carezca de esta segunda fase lenta (Figura 15A) y de que la adición de atropina al estímulo de ACh bloquee dicha fase (Figura 14C), concuerda con esta hipótesis de carácter fisiológico. Otro componente que podría contribuir a la respuesta secretora total a ACh es el fenómeno de CICR, desenmascarado por cafeína en CC bovinas (Lara y col., 1997) y de ratón (Figura 16A) y cuya presencia fue directamente demostrada en CC bovinas gracias al uso de ecurinas dirigidas al RE y microscopía confocal. Este mecanismo podría también contribuir a la redistribución de Ca^{2+} hacia regiones más profundas del citosol que facilita el transporte vesicular (Alonso y col., 1999), y aunque un trabajo previo sugiere que este fenómeno no se produce en CC de ratón (Rigual y col., 2002), su presencia se describe posteriormente en CC del ratón C57 (Wu y col., 2010). Nuestros resultados de este estudio de aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Figura 18E) y de secreción (Figura 16A) provocados por cafeína apoyan la presencia de CICR en estas células.

Las elevaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ provocadas por los distintos secretagogos son consistentes con las respuestas secretoras que provocan. Los transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ evocados por ACh y DMPP fueron rápidos (tiempos al pico entre 10 y 20 s), mientras que los provocados por muscarina y cafeína fueron entre 3 y 5 veces más lentos (Tabla 5). De esta forma, estos datos concordarían con la rápida entrada de Ca^{2+} por los CCDV en los casos de ACh y DMPP, y con la lenta liberación de Ca^{2+} provocada por histamina (Stauderman y Pruss, 1990; Bunn y Boyd, 1992) y muscarina (Abad y col., 1992; Uceda y col., 1992; D'Andrea y Thorn, 1996; Ohta y col., 1998). Un hallazgo sorprendente de este estudio fue el rápido incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ provocado por histamina (tiempo al pico de 18 s, Tabla 5), pero que no estuvo acompañado de una secreción rápida (Figura 16C). En cualquier caso, parece ser que el receptor H_1 de histamina del plasmalema se

encuentra más estrechamente unido al IP₃R del RE que el receptor de muscarina, lo que provoca la lentas respuestas de elevación de $[Ca^{2+}]_c$ y secreción en CC de ratón.

La potenciación por parte del FCCP del transiente de $[Ca^{2+}]_c$ (Figura 18A) y de la secreción (Figura 14E) evocados por ACh está en línea con las observaciones originalmente hechas en CC bovinas también estimuladas con ACh (Montero y col., 2000), aunque no se ve apoyado por los hallazgos de un estudio previo de nuestro grupo, en el que encontramos que la inhibición de la captación de Ca^{2+} mitocondrial por un protonóforo disminuyó significativamente el nivel de $[Ca^{2+}]_c$ y la secreción provocados por la despolarización de K^+ en CC de ratón, teniendo además poco efecto en CC bovinas. Sin embargo, se ha descrito que usando la estimulación fisiológica de ACh sí que se observa que la interferencia con la captación mitocondrial de Ca^{2+} provoca el esperado aumento en la respuesta de $[Ca^{2+}]_c$ y de exocitosis en CC bovinas (Montero y col., 2000) y de ratón (este estudio). Esto sugiere que las CC de ratón poseen una población de mitocondrias que controla y modela la respuesta exocitótica provocada por ACh.

Resulta altamente relevante el hecho de que la cinética del poro de fusión exocitótico sea distinta según se use un secretagogo u otro. Es reseñable además, que la espiga media provocada por ACh (Figura 14B, Tabla 3) presente la velocidad de subida más rápida, $t_{1/2}$ más reducido y el tiempo de caída más corto que el resto de secretagogos, y teniendo además I_{pie} más pequeño y T_{pie} más corto. En conjunto, estos datos cinéticos sugieren que el poro de fusión que provoca ACh tiene una apertura seguida de expansión total que se deriva de una forma más eficiente y rápida en comparación con el resto de secretagogos, como cafeína, histamina, muscarina o incluso K^+ .

Resulta complejo, por otro lado, tratar de correlacionar las diferencias halladas en la cinética del poro de fusión con la distinta cinética de las elevaciones de $[Ca^{2+}]_c$ que provocan los distintos secretagogos. Parece que los transientes de $[Ca^{2+}]_c$ rápidos generados por ACh y DMPP pueden también generar eventos amperométricos de secreción de cinética rápida, en comparación con los secretagogos que causan secreción por movilización lenta del Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares. En este contexto, vale la pena señalar que la presencia de FCCP en la estimulación con ACh,

que provoca unas elevaciones de $[Ca^{2+}]_c$ más pronunciadas y sostenidas, afecta a la secreción generando una espiga amperométrica media cuya cinética cambia drásticamente (Figura 14F, Tabla 3): presenta velocidad de crecimiento reducida, $t_{1/2}$ más larga, tiempo de caída más lento, mayor I_{max} y mayor Q , en comparación con ACh sola. Adicionalmente, la frecuencia de pie se redujo a la mitad, bajó I_{pie} , T_{pie} fue más largo y disminuyó Q_{pie} al aplicar FCCP al estímulo de ACh en CC de ratón. De esta forma, los transientes de $[Ca^{2+}]_c$ mayores y más sostenidos transforman el poro de fusión de rápido desarrollo que provoca la ACh en otro que se abre más lentamente y que permanece abierto más tiempo y que, por tanto, provoca que la expansión completa del poro tenga lugar más lentamente para liberar finalmente casi el doble de catecolaminas.

Estos dos conjuntos de diferencias, en la secreción total y en la cinética del poro de fusión excitotóxico así como en los transientes de $[Ca^{2+}]_c$ generados por varios secretagogos, pueden ser enmarcados en un contexto fisiológico. Adicionalmente, estas diferencias tienen interés también en el contexto del gran uso de las CC de los ratones C57 como modelos transgénicos, que son amplia y crecientemente usados y que para estudiar las funciones alteradas de las proteínas de la maquinaria de la exocitosis y la alteración en la cinética del poro de fusión en modelos de enfermedad que presentan disfunciones en la transmisión sináptica. Por ejemplo, estudios en rodajas de médula adrenal han registrado transientes de $[Ca^{2+}]_c$ y la cinética de la exocitosis en CC estimuladas eléctricamente con pulsos despolarizantes por fotoliberación de Ca^{2+} encapsulado, y que han permitido revelar la presencia de etapas paralelas y secuenciales que sugieren que el Ca^{2+} actúa tanto antes como después de la formación del complejo trans-SNARE para regular los contingentes de vesículas, la probabilidad de fusión y la cinética de la fusión (Moser y Neher, 1997; Voets y col., 1999; Voets, 2000). Estas técnicas también han servido para revelar, en rodajas de medula adrenal de ratones mutantes sin Syt1, la función de dicha proteína Syt1 en la regulación del equilibrio entre los estados de liberación lenta y liberación rápida de la maquinaria de la fusión excitotóxica así como para servir de sensor de Ca^{2+} para RRP e IRP (Voets y col., 2001). Adicionalmente, la cinética del poro de fusión ha sido estudiada usando amperometría en CC de ratón para, por ejemplo, examinar la

función de Syt1 en la exocitosis de vesículas de núcleo denso bajo control directo de Ca^{2+} (Sorensen y col., 2003) o para estudiar la regulación del poro de fusión por Syt7 (Segovia y col., 2010).

Las CC de ratón han sido ampliamente usadas también para estudiar las complejidades de la maquinaria de secreción así como la función de los cambios de $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Más recientemente, basándose en las observaciones de que los déficits sinápticos son visibles en las enfermedades neurodegenerativas (Sasaki y Maruyama, 1994; Sze y col., 1997; Sirvio, 1999), se han realizado intentos para tratar de clarificarlas en la CC, que es un modelo neurosecretor más accesible, como por ejemplo, además de las aproximaciones en los modelos descritos en esta Tesis Doctoral (APP/PS1 modelo de EA y SOD1^{G93A} modelo de ELA), el llevado a cabo en un modelo de ratón que carece de una proteína asociada a la enfermedad de Huntington que concluyó que esta proteína juega un papel importante en la exocitosis (Mackenzie y col., 2014).

7.2 Menor tamaño cuantal y cinética acelerada en CC de ratón APP/PS1 con respecto a C57

Es bien sabido que el mecanismo por el que las CC secretan catecolaminas es dependiente de Ca^{2+} , siendo además el Ca^{2+} que entra proveniente de la apertura de los CCDV, que se abren durante la despolarización, el mecanismo principal que acopla el estímulo a la respuesta secretora (Douglas y Rubin, 1961, 1963). En este estudio hemos usado 75 mM de K^+ durante 10 s para estimular la liberación cuantal de catecolaminas de CC de ratones C57 y APP/PS1, una concentración de K^+ suficiente para que el potencial de reposo pase desde -60 a 0 mV (Orozco y col., 2006), provocando un brusco aumento de la entrada de Ca^{2+} y una liberación rápida de catecolaminas.

Como hemos observado, el evento excitotico individual, la espiga amperométrica, resulta ser más pequeña y de menor duración en CC de ratón APP/PS1 en comparación con aquellas de ratones C57, tendencia que se repite en la cinética de los pies de espiga, los cuales son un indicativo de la etapa inicial de la apertura del

poro de fusión, y por ello, de la fusión de la vesícula (Chow y col., 1992). Estas características alteradas podrían estar ligadas a una reducción sustancial en el contenido cuantal de las vesículas de núcleo denso de los ratones mutantes.

La fusión de la vesícula durante la exocitosis es desencadenada por la acción superpuesta de dos proteínas que actúan como sensores de Ca^{2+} , la sinaptotagmina-1 y la sinaptotagmina-7 (Syt7) (Schonn y col., 2008). Se ha descrito que una mutación puntual en el dominio C2B de Syt7 produce una reducción del 50% en $t_{1/2}$ y Q (Segovia y col., 2010), efecto que es bastante similar a la diferencia entre APP/PS1 y C57 que hemos observado aquí. Resulta interesante pensar que esta alteración pueda estar ligada a un déficit funcional o a una modulación fisiopatológica del dominio C2B de Syt7, y que sería merecedora de una investigación más profunda como diana terapéutica para la EA.

Las CC liberan profusamente adrenalina y noradrenalina durante una situación de estrés agudo. A este respecto, la formación de péptido A β se ha relacionado a estrés agudo en un modelo de estrés en rata (Yu y col., 2010), en el cual los agonistas de β_2 incrementaban la carga de A β inducida por estrés mientras que los antagonistas de β_2 ralentizaban la producción del péptido; por ello se propusieron los receptores β_2 como posible diana para restringir la progresión de la EA. Dado que en el presente estudio observamos que en el modelo murino APP/PS1 de EA el contenido cuantal de catecolaminas liberado por vesícula se encuentra disminuido a la mitad, resulta tentador sugerir que el significado fisiológico de esta liberación reducida de catecolaminas es una reacción protectora como intento de disminuir la rápida y tóxica acumulación de A β en el cerebro de los animales transgénicos.

Por otro lado, se ha descrito que no existe presencia del péptido A β en rodajas de médula adrenal del ratón APP/PS1 usando tinciones de tioflavina para agregación peptídica y anticuerpos anti-A β (de Diego y col., 2012), aunque sí que se demostró su existencia en rodajas de hipocampo. Por ello, no resulta posible vincular directamente *in situ* la reducción en el tamaño cuantal y en la duración de los eventos excitotóxicos con la patología típica de A β de este ratón mutante, a saber, deposición de agregados de A β y déficits sinápticos, si bien estos últimos podrían estar representados por la alteración en la exocitosis que observamos, ya que nuestro modelo celular, la CC, es

una neurona simpática periférica modificada, y sería esperable que las alteraciones que encontramos fueran extrapolables a cualquier otra neurona del organismo.

7.3 Disminución de la excitabilidad celular y corrientes iónicas ligada a ralentización del poro de fusión en CC de ratón SOD1^{G93A} con respecto a C57

Este estudio nos ha permitido encontrar profundas alteraciones en la excitabilidad celular y corrientes iónicas, así como en la cinética del poro de fusión exocitótico, en la CC de ratón mutante SOD1^{G93A} en comparación con las de ratón silvestre C57. Una de las más reseñables fue la desaparición casi total de PA espontáneos, una propiedad intrínseca de las CC de ratón (de Diego y col., 2008). El V_m de reposo obtenido en la CC adrenal de ratón usando registros intracelulares *in situ* es de 54.3 mV (Nassar-Gentina y col., 1988), aunque en este trabajo observamos que, usando la técnica de patch-clamp, el V_m de reposo de las CC tanto de C57 como de SOD1^{G93A} se encontraba de alguna forma hiperpolarizado, siendo de 68 y de 63 mV, respectivamente. Considerando que el V_m de reposo se encuentra a un nivel similar en ambos tipos celulares, la enorme diferencia observada en el disparo de PA espontáneos podría encontrar explicación en el hecho de que tanto I_{Na} como $I_{K(Ca)}$ y $I_{K(V)}$ se encuentran reducidas en CC de SOD1^{G93A} con respecto a C57, ya que está descrito que estas corrientes contribuyen a la generación de PA en CC (Biales y col., 1976; Brandt y col., 1976; Kidokoro y Ritchie, 1980; Marty, 1981; Nassar-Gentina y col., 1988)

Nuestros hallazgos en corrientes iónicas deprimidas en SOD1^{G93A} concuerdan con los hallados por Boutahar y colaboradores trabajando con el perfil transcripcional de neuronas corticales de embriones E14 de ratones C57 y SOD1^{G93A} (Boutahar y col., 2011). En neuronas de SOD1^{G93A}, la expresión del canal de Na^+ tipo VII α (SNC7A) se encuentra disminuida 7.2 veces, así como la del canal de K^+ de alta conductancia dependiente de Ca^{2+} (KCNMA1, canal BK), que se encuentra reducida 21 veces, con respecto a las neuronas de C57. También se ha descrito que la inmunorreactividad de los canales Kv1.2 se encuentra marcadamente reducida en la raíz ventral de pacientes de ELA (Shibuya y col., 2011). Se ha reportado además una disminución de I_{Na} en

células SH-SY5Y que expresan SOD1 con la mutación G93A (Zona y col., 1998). Esta expresión génica deprimida en neuronas corticales apoya nuestra conclusión de que la excitabilidad reducida en CC de SOD1^{G93A} se debe posiblemente a una expresión deficiente de los canales de Na⁺ y de K⁺, lo que explicaría la disminución en I_{Na} y en I_K que hemos encontrado en estas células. Se ha considerado la ganancia tóxica de función como causa responsable de la degeneración que sufren las motoneuronas de ratones que sobre-expresan la proteína SOD1 mutada (Gurney y col., 1994), hipótesis que ha recibido apoyo de un estudio en células PC12 transfectadas con SOD1 con la mutación G93A que presentaban una producción incrementada de radicales hidroxilo y una tasa de muerte celular por apoptosis también aumentada (Liu y col., 1999)

La secreción total de catecolaminas, medida como el número total de espigas individuales contadas durante la estimulación de 1 minuto con ACh, fue similar en ambos tipos celulares. Esto concuerda, en principio, con la paridad en los transientes de [Ca²⁺]_c provocados por ACh, a pesar de que I_{Ca} se encontraba medianamente aumentada en las células de SOD1^{G93A}, dato que se encuentra apoyado por un estudio previo que mostraba que los CCDV tipo N se encuentran sobre-expresados en neuronas corticales de embriones de ratones SOD1^{G93A} (Pieri y col., 2013). Sin embargo, si medimos la secreción total como un sumatorio del área de todas las espigas amperométricas, ocurre que las células de SOD1^{G93A} secretaron un 46.6% más catecolaminas que las de C57, aunque esto podría explicarse si tenemos en cuenta que Q de las espigas individuales fue un 52.24% mayor. Que los transientes de [Ca²⁺]_c y la secreción evocados por ACh fueran similares no concuerda con el hecho de que I_{ACh} fuera un 70% menor en CC de SOD1^{G93A} con respecto a C57. Dado que se ha descrito que la subunidad α7 del receptor nicotínico es similar en ambos tipos celulares (Calvo-Gallardo y col., 2015), la reducción del 70% en I_{ACh} de CC de SOD1^{G93A} podría deberse a una alteración en la función del receptor, sin olvidar que una sobre-expresión compensadora de otros subtipos de receptores nicotínicos también podría estar ocurriendo.

Respecto a los parámetros cinéticos del poro de fusión exocitótico, promediados de cálculos hechos en miles de espigas amperométricas individuales, encontramos diferencias muy interesantes. Se trata de las siguientes (CC de SOD1^{G93A} frente a C57):

35.94% menor velocidad de crecimiento, 60.7% mayor tiempo de caída, 55.3% mayor $t_{1/2}$, 16.61% menor I_{\max} y 52.24% mayor Q . Estas diferencias se traducen en que la expansión del poro de fusión es más lenta y la liberación del contenido vesicular tarda más, pero se libera mayor cantidad de dicho contenido vesicular. En otras palabras, considerando la estimulación de 1 minuto con ACh, las 21 vesículas que sufren exocitosis en CC de SOD1^{G93A} liberan un 50% más de catecolaminas que las 24 – 25 vesículas de CC de C57, pero a un ritmo más lento.

Probablemente, el hallazgo más chocante de este estudio está relacionado con el hecho de que las drásticas diferencias que observamos entre los parámetros cinéticos de exocitosis en CC de C57 y de SOD1^{G93A} al estimular con ACh no estén presentes cuando estas células son estimuladas con K^+ . Desde hace muchos años, ACh, alto K^+ , bario (Ba^{2+}) y varios secretagogos más han sido usados para provocar exocitosis e incluso para analizar la cinética del poro de fusión (Schroeder y col., 1996; Machado y col., 2000). Sin embargo, el neurotransmisor fisiológico ACh (Feldberg y col., 1934) ha sido usado en menor medida simplemente porque las CC responden de una forma más reproducible y con una secreción abundante a otros estímulos no fisiológicos como pueden ser K^+ o Ba^{2+} , que como ACh, producen indudablemente despolarización celular (von Ruden y col., 1993; Orozco y col., 2006). No obstante, desde la publicación del pionero trabajo del laboratorio de William Douglas (Douglas y Rubin, 1961, 1963), quedó patente que ACh y K^+ diferían en su capacidad para provocar PA, transientes de $[Ca^{2+}]_c$ y secreción. Por ejemplo, de acuerdo con la ecuación de Nernst, el alto K^+ produce una despolarización sostenida de las CC sin PA superpuestos (Orozco y col., 2006). Por otra parte, ACh produce una despolarización leve que es suficiente para producir PA en CC de varias especies animales incluyendo ratón (Biales y col., 1976; Brandt y col., 1976; Fenwick y col., 1982; Nassar-Gentina y col., 1988; Holman y col., 1994; de Diego y col., 2008; de Diego, 2010). Por otro lado, aunque ACh y K^+ provocan una respuesta secretora total similar, ACh causa elevaciones de $[Ca^{2+}]_c$ más pequeñas y localizadas que K^+ , el cual evoca transientes de $[Ca^{2+}]_c$ mayores que rápidamente se extienden por el citosol, como se ha demostrado por microscopía confocal (Cuchillo-Ibanez y col., 2002).

A la luz de los resultados anteriores, podemos concluir, por tanto, que las CC estimuladas con ACh ven alterada su excitabilidad celular y los consiguientes transientes de $[Ca^{2+}]_c$ y respuestas secretoras de una forma que difiere considerablemente de las respuestas que provoca la despolarización sostenida causada con K^+ . La entrada masiva de Ca^{2+} provocada por K^+ sugiere que se están dando lugar transientes mayores de $[Ca^{2+}]_c$ que no se tamponan o regulan, fenómeno que no ocurre con ACh, ya que se da lugar a transientes de $[Ca^{2+}]_c$ menores y más localizados (Cuchillo-Ibanez y col., 2002). Esto explicaría que K^+ cause mayores transientes de $[Ca^{2+}]_c$ en CC de $SOD1^{G93A}$, mientras que las elevaciones de $[Ca^{2+}]_c$ de ACh son similares a las de C57. Resulta relevante a este estudio que los cambios en la cinética del poro de fusión exocitótico solo se encuentren presentes bajo la despolarización indirecta y fisiológica de las CC a través de la estimulación de sus receptores nicotínicos con ACh, cambios que no están presentes cuando la estimulación no es fisiológica al usar K^+ . Esto indica la evidente presencia de una alteración en la neurotransmisión en la médula adrenal en los ratones $SOD1^{G93A}$.

Resulta intrigante que el transiente de $[Ca^{2+}]_c$ que provoca el K^+ sea significativamente mayor en CC de $SOD1^{G93A}$ en comparación con C57, fenómeno que no estuvo acompañado de una liberación de catecolaminas mayor. Es bien sabido que la mitocondria es responsable del control del estado *redox* y de la bioenergética de la célula mediante la captación de Ca^{2+} procedente del citosol (Duchen, 2000). En este contexto, hemos encontrado que las CC poseen dos sub-poblaciones de mitocondrias encargadas de tamponar los transientes de $[Ca^{2+}]_c$ de formas bastante diferentes: la población M1 capta grandes concentraciones de Ca^{2+} a nivel del sub-plasmalema, mientras que la población M2 se localiza en sitios más profundos del citosol y capta cantidades mucho menores de Ca^{2+} (Montero y col., 2000). La contribución relativa de estas dos poblaciones de mitocondrias y/o la posible alteración del ciclo mitocondrial del Ca^{2+} a través de su uniportador y su intercambiador Na^+/Ca^{2+} (Garcia y col., 2012) podrían explicar la paradoja creada por los transientes de $[Ca^{2+}]_c$ aumentados con secreción normal provocados por K^+ en CC de $SOD1^{G93A}$ con respecto a C57.

Durante las dos últimas décadas, el análisis de los distintos contingentes vesiculares y de los eventos pre-excitóticos y excitóticos en CC de ratones

transgénicos ha sido ampliamente usada para tratar de entender los mecanismos moleculares y celulares implicados en la liberación excitotóxica de neurotransmisores (Pieri y col., 2003; Sorensen, 2004; Sudhof, 2004). Sin embargo, es más recientemente cuando se están llevando a cabo estudios similares en ratones transgénicos modelo de enfermedades neurodegenerativas, como el expuesto anteriormente en esta Tesis en el ratón APP/PS1 modelo de EA, donde vemos lo opuesto a lo observado en el modelo de ELA: se libera menor cantidad de catecolaminas pero con una apertura, expansión y cierre del poro de fusión más rápidos y transitorios, dando lugar a una espiga amperométrica más rápida y de menor Q que la del ratón C57 (Apartado 6.5 de esta Tesis). Esta diferencia drástica en la morfología de las espigas amperométricas de estos dos modelos, ELA (lenta y con liberación de catecolaminas aumentada) por un lado y EA (rápida y con liberación de catecolaminas reducida) por otro, sugiere que estas podrían servir como marcadores de ELA y EA. Un estudio reciente también indica una alteración en las etapas pre-excitotóxica y excitotóxica en CC de un ratón modelo de enfermedad de Huntington, que concluye que la proteína asociada a Huntingtina-1 (HAP1, de sus siglas en inglés) regula la exocitosis por medio de dos mecanismos potencialmente ligados entre sí: el control del anclaje vesicular y el tamaño del contingente vesicular RRP por un lado, y la regulación de la estabilización del poro de fusión (Mackenzie y col., 2014).

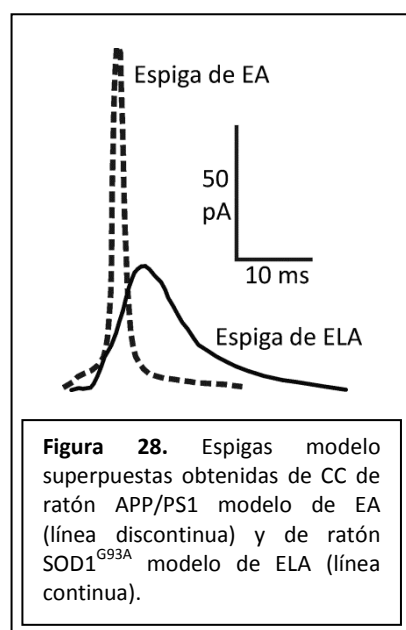
Los cambios observados en este estudio (ralentización de la apertura, expansión y cierre del poro de fusión posiblemente debida a una pronunciada reducción en la excitabilidad celular y corrientes iónicas que producen PA en CC de $SOD1^{G93A}$ en comparación a las de C57 al ser estimuladas con ACh) pueden ser de utilidad para entender mejor la patogénesis de la ELA en humanos y para inspirar nuevas dianas terapéuticas para el futuro desarrollo de un tratamiento para pacientes que sufren ELA, que desgraciadamente se encuentra aún sin tratamiento.

8 CONCLUSIONES

De los resultados presentados en esta Tesis Doctoral podemos extraer las siguientes conclusiones puntuales:

- I. El uso indiscriminado de distintos secretagogos para provocar excitosis en CC es poco aconsejable en contextos en los que el poro de fusión sea un parámetro sensible del estudio, ya que su cinética difiere considerablemente de un secretagogo a otro.
- II. ACh como secretagogo en CC evoca una respuesta excitotónica fisiológica característica en la secreción que no es posible imitar con ningún otro secretagogo usado.
- III. ACh, DMPP y Muscarina correlacionan su ritmo de secreción excitotónica total con sus patrones de elevaciones de $[Ca^{2+}]_c$, pero cafeína, histamina y K^+ presentan ritmos de secreción opuestos a sus patrones de transientes de $[Ca^{2+}]_c$.
- IV. La mutación APP/PS1 en el ratón provoca una aceleración en el poro de fusión excitotónico con una disminución en la cantidad de catecolaminas liberadas al estimular las CC con K^+ , en comparación con el ratón C57.
- V. La mutación SOD1-G93A en el ratón provoca una drástica disminución en el disparo de PA espontáneos, y una disminución en I_{ACh} , I_K y I_{Na} , así como un aumento en I_{Ca} en CC, en comparación con el ratón C57.
- VI. La mutación SOD1-G93A en el ratón provoca un aumento en los transientes de $[Ca^{2+}]_c$ al estimular CC con K^+ , pero no afecta en manera alguna a las elevaciones de $[Ca^{2+}]_c$ al estimular con ACh las mismas células.
- VII. La mutación SOD1-G93A en el ratón provoca una ralentización en el poro de fusión excitotónico con un aumento en la cantidad de catecolaminas liberadas al estimular CC con ACh, en comparación con el ratón C57, pero no afecta en manera alguna al poro de fusión excitotónico al estimular con K^+ las mismas células.
- VIII. La mutación SOD1-G93A en el ratón no afecta a la secreción total al estimular CC con ACh y con K^+ .

Como conclusión global, cabe destacar que los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral pueden ser la base para una nueva teoría basada en el hecho de que cada enfermedad neurodegenerativa (enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, etc.) podría tener una cinética específica del poro de fusión excitotóxico, que supondría un marcador de la alteración sináptica y de la comunicación neuronal en cada enfermedad, como podemos observar al superponer las espigas modelo obtenidas para la EA (con el ratón APP/PS1) y para la ELA (con el ratón $SOD1^{G93A}$) en la Figura 28.



9 BIBLIOGRAFÍA

- Abad F, Garrido B, Lopez MG, Garcia AG (1992) The source of calcium for muscarinic-mediated catecholamine release from cat adrenals. *J Physiol* 445:725-740.
- Ales E, Fuentealba J, Garcia AG, Lopez MG (2005) Depolarization evokes different patterns of calcium signals and exocytosis in bovine and mouse chromaffin cells: the role of mitochondria. *Eur J Neurosci* 21:142-150.
- Ales E, Tabares L, Poyato JM, Valero V, Lindau M, Alvarez de Toledo G (1999) High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nat Cell Biol* 1:40-44.
- Alexianu ME, Ho BK, Mohamed AH, La Bella V, Smith RG, Appel SH (1994) The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 36:846-858.
- Alonso MT, Barrero MJ, Michelena P, Carnicero E, Cuchillo I, Garcia AG, Garcia-Sancho J, Montero M, Alvarez J (1999) Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in chromaffin cells seen from inside the ER with targeted aequorin. *J Cell Biol* 144:241-254.
- Alzheimer A (1907) Uber eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde. *Psychiatr Psych-Gerichtl Med* 64:146-148.
- Andersen PM, Nilsson P, Ala-Hurula V, Keranen ML, Tarvainen I, Haltia T, Nilsson L, Binzer M, Forsgren L, Marklund SL (1995) Amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for an Asp90Ala mutation in CuZn-superoxide dismutase. *Nat Genet* 10:61-66.
- Aoki M, Ogasawara M, Matsubara Y, Narisawa K, Nakamura S, Itoyama Y, Abe K (1993) Mild ALS in Japan associated with novel SOD mutation. *Nat Genet* 5:323-324.
- Baker PF, Knight DE (1978) Calcium-dependent exocytosis in bovine adrenal medullary cells with leaky plasma membranes. *Nature* 276:620-622.
- Banci L, Bertini I, Boca M, Girotto S, Martinelli M, Valentine JS, Vieru M (2008) SOD1 and amyotrophic lateral sclerosis: mutations and oligomerization. *PLoS One* 3:e1677.
- Bergemalm D, Jonsson PA, Graffmo KS, Andersen PM, Brannstrom T, Rehnmark A, Marklund SL (2006) Overloading of stable and exclusion of unstable human superoxide dismutase-1 variants in mitochondria of murine amyotrophic lateral sclerosis models. *J Neurosci* 26:4147-4154.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517-529.

- Biales B, Dichter M, Tischler A (1976) Electrical excitability of cultured adrenal chromaffin cells. *J Physiol* 262:743-753.
- Bierer LM, Hof PR, Purohit DP, Carlin L, Schmeidler J, Davis KL, Perl DP (1995) Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 52:81-88.
- Bittner MA, Holz RW (1992) Kinetic analysis of secretion from permeabilized adrenal chromaffin cells reveals distinct components. *J Biol Chem* 267:16219-16225.
- Blauw HM, Veldink JH, van Es MA, van Vught PW, Saris CG, van der Zwaag B, Franke L, Burbach JP, Wokke JH, Ophoff RA, van den Berg LH (2008) Copy-number variation in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a genome-wide screen. *Lancet Neurol* 7:319-326.
- Boillee S, Vande Velde C, Cleveland DW (2006) ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 52:39-59.
- Boller F, Mizutani T, Roessmann U, Gambetti P (1980) Parkinson disease, dementia, and Alzheimer disease: clinicopathological correlations. *Ann Neurol* 7:329-335.
- Borchelt DR, Ratovitski T, van Lare J, Lee MK, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Sisodia SS (1997) Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* 19:939-945.
- Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH, Wang R, Seeger M, Levey AI, Gandy SE, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL, Younkin SG, Sisodia SS (1996) Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A β 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17:1005-1013.
- Boutahar N, Wierinckx A, Camdessanche JP, Antoine JC, Reynaud E, Lassabliere F, Lachuer J, Borg J (2011) Differential effect of oxidative or excitotoxic stress on the transcriptional profile of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 cultured neurons. *J Neurosci Res* 89:1439-1450.
- Brandt BL, Hagiwara S, Kidokoro Y, Miyazaki S (1976) Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *J Physiol* 263:417-439.
- Broom WJ, Russ C, Sapp PC, McKenna-Yasek D, Hosler BA, Andersen PM, Brown RH, Jr. (2006) Variants in candidate ALS modifier genes linked to Cu/Zn superoxide dismutase do not explain divergent survival phenotypes. *Neurosci Lett* 392:52-57.
- Brown DF, Risser RC, Bigio EH, Tripp P, Stiegler A, Welch E, Eagan KP, Hladik CL, White CL, 3rd (1998) Neocortical synapse density and Braak stage in the Lewy body variant of Alzheimer disease: a comparison with classic Alzheimer disease and normal aging. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:955-960.

- Bruijn LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Rothstein JD, Borchelt DR, Price DL, Cleveland DW (1997) ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18:327-338.
- Bunn SJ, Boyd TL (1992) Characterization of histamine-induced catecholamine secretion from bovine adrenal medullary chromaffin cells. *J Neurochem* 58:1602-1610.
- Burgoyne RD (1995) Fast exocytosis and endocytosis triggered by depolarisation in single adrenal chromaffin cells before rapid Ca²⁺ current run-down. *Pflugers Arch* 430:213-219.
- Calvo-Gallardo E, de Pascual R, Fernandez-Morales JC, Arranz-Tagarro JA, Maroto M, Nanclares C, Gandia L, de Diego AM, Padin JF, Garcia AG (2015) Depressed excitability and ion currents linked to slow exocytotic fusion pore in chromaffin cells of the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 308:C1-19.
- Camu W, Khoris J, Moulard B, Salachas F, Briolotti V, Rouleau GA, Meininger V (1999) Genetics of familial ALS and consequences for diagnosis. French ALS Research Group. *J Neurol Sci* 165 Suppl 1:S21-26.
- Cleveland DW, Rothstein JD (2001) From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2:806-819.
- Cousse E, De Smet P, Bogaert E, Elens I, Van Damme P, Willems P, Koopman W, Van Den Bosch L, Callewaert G (2011) G37R SOD1 mutant alters mitochondrial complex I activity, Ca²⁺ uptake and ATP production. *Cell Calcium* 49:217-225.
- Cuchillo-Ibanez I, Olivares R, Aldea M, Villarroja M, Arroyo G, Fuentealba J, Garcia AG, Albillos A (2002) Acetylcholine and potassium elicit different patterns of exocytosis in chromaffin cells when the intracellular calcium handling is disturbed. *Pflugers Arch* 444:133-142.
- Cudkovicz ME, McKenna-Yasek D, Sapp PE, Chin W, Geller B, Hayden DL, Schoenfeld DA, Hosler BA, Horvitz HR, Brown RH (1997) Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 41:210-221.
- Charcot JM, Joffroy A (1869) Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesions de la substance grise et des faisceaux antero-lateraux de la moelle epiniere. *Arch Physiol Neurol Pathol* 2:744-754.
- Chern YJ, Chueh SH, Lin YJ, Ho CM, Kao LS (1992) Presence of Na⁺/Ca²⁺ exchange activity and its role in regulation of intracellular calcium concentration in bovine adrenal chromaffin cells. *Cell Calcium* 13:99-106.

- Chiu AY, Zhai P, Dal Canto MC, Peters TM, Kwon YW, Prattis SM, Gurney ME (1995) Age-dependent penetrance of disease in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Cell Neurosci* 6:349-362.
- Chow RH, von Ruden L, Neher E (1992) Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature* 356:60-63.
- D'Andrea P, Thorn P (1996) Ca²⁺ signalling in rat chromaffin cells: interplay between Ca²⁺ release from intracellular stores and membrane potential. *Cell Calcium* 19:113-123.
- de Diego AM (2010) Electrophysiological and morphological features underlying neurotransmission efficacy at the splanchnic nerve-chromaffin cell synapse of bovine adrenal medulla. *Am J Physiol Cell Physiol* 298:C397-405.
- de Diego AM, Gandia L, Garcia AG (2008) A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta Physiol (Oxf)* 192:287-301.
- de Diego AM, Lorrio S, Calvo-Gallardo E, Garcia AG (2012) Smaller quantal size and faster kinetics of single exocytotic events in chromaffin cells from the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 428:482-486.
- Deng HX, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung WY, Getzoff ED, Hu P, Herzfeldt B, Roos RP, et al. (1993) Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* 261:1047-1051.
- Deng HX, Shi Y, Furukawa Y, Zhai H, Fu R, Liu E, Gorrie GH, Khan MS, Hung WY, Bigio EH, Lukas T, Dal Canto MC, O'Halloran TV, Siddique T (2006) Conversion to the amyotrophic lateral sclerosis phenotype is associated with intermolecular linked insoluble aggregates of SOD1 in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7142-7147.
- Douglas WW (1968) Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol* 34:451-474.
- Douglas WW, Rubin RP (1961) The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J Physiol* 159:40-57.
- Douglas WW, Rubin RP (1963) The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling. *J Physiol* 167:288-310.
- Douglas WW, Poisner AM (1965) Preferential release of adrenaline from the adrenal medulla by muscarine and pilocarpine. *Nature* 208:1102-1103.
- Duchen MR (2000) Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* 529 Pt 1:57-68.
- Edison P, Rowe CC, Rinne JO, Ng S, Ahmed I, Kempainen N, Villemagne VL, O'Keefe G, Nagren K, Chaudhury KR, Masters CL, Brooks DJ (2008) Amyloid load in Parkinson's disease

- dementia and Lewy body dementia measured with [11C]PIB positron emission tomography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79:1331-1338.
- Enayat ZE, Orrell RW, Claus A, Ludolph A, Bachus R, Brockmuller J, Ray-Chaudhuri K, Radunovic A, Shaw C, Wilkinson J, et al. (1995) Two novel mutations in the gene for copper zinc superoxide dismutase in UK families with amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 4:1239-1240.
- Feldberg W, Minz B, Tsudzimura H (1934) The mechanism of the nervous discharge of adrenaline. *J Physiol* 81:286-304.
- Fenwick EM, Marty A, Neher E (1982) A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J Physiol* 331:577-597.
- Fernandez-Chacon R, Alvarez de Toledo G (1995) Cytosolic calcium facilitates release of secretory products after exocytotic vesicle fusion. *FEBS Lett* 363:221-225.
- Fernandez-Morales JC, Cortes-Gil L, Garcia AG, de Diego AM (2009) Differences in the quantal release of catecholamines in chromaffin cells of rat embryos and their mothers. *Am J Physiol Cell Physiol* 297:C407-418.
- Ferri A, Cozzolino M, Crosio C, Nencini M, Casciati A, Gralla EB, Rotilio G, Valentine JS, Carri MT (2006) Familial ALS-superoxide dismutases associate with mitochondria and shift their redox potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13860-13865.
- Finnegan JM, Borges R, Wightman RM (1996) Comparison of cytosolic Ca²⁺ and exocytosis responses from single rat and bovine chromaffin cells. *Neuroscience* 71:833-843.
- Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK (1999) The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66:137-147.
- Fratiglioni L, Paillard-Borg S, Winblad B (2004) An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia. *Lancet Neurol* 3:343-353.
- Fridovich I (1986) Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 58:61-97.
- Fuchs A, Ringer C, Bilkei-Gorzo A, Weihe E, Roeper J, Schutz B (2010) Downregulation of the potassium chloride cotransporter KCC2 in vulnerable motoneurons in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 69:1057-1070.
- Garcia-Sancho J, de Diego AM, Garcia AG (2012) Mitochondria and chromaffin cell function. *Pflugers Arch* 464:33-41.
- Garcia AG, Garcia-De-Diego AM, Gandia L, Borges R, Garcia-Sancho J (2006) Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev* 86:1093-1131.

- Garcia AG, Padin F, Fernandez-Morales JC, Maroto M, Garcia-Sancho J (2012) Cytosolic organelles shape calcium signals and exo-endocytotic responses of chromaffin cells. *Cell Calcium* 51:309-320.
- Gerber SH, Rah JC, Min SW, Liu X, de Wit H, Dulubova I, Meyer AC, Rizo J, Arancillo M, Hammer RE, Verhage M, Rosenmund C, Sudhof TC (2008) Conformational switch of syntaxin-1 controls synaptic vesicle fusion. *Science* 321:1507-1510.
- Goedert M (1993) Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 16:460-465.
- Goedert M, Klug A, Crowther RA (2006) Tau protein, the paired helical filament and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 9:195-207.
- Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE, Klug A (1988) Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:4051-4055.
- Gomperts SN, Rentz DM, Moran E, Becker JA, Locascio JJ, Klunk WE, Mathis CA, Elmaleh DR, Shoup T, Fischman AJ, Hyman BT, Growdon JH, Johnson KA (2008) Imaging amyloid deposition in Lewy body diseases. *Neurology* 71:903-910.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-3450.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264:1772-1775.
- Haass M, Serf C, Gerber SH, Kruger C, Haunstetter A, Vahl CF, Nobiling R, Kubler W (1997) Dual effect of digitalis glycosides on norepinephrine release from human atrial tissue and bovine adrenal chromaffin cells: differential dependence on [Na⁺]_i and [Ca²⁺]_i. *J Mol Cell Cardiol* 29:1615-1627.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.
- Hanger DP, Anderton BH, Noble W (2009) Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med* 15:112-119.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.
- Hardy J, Chartier-Harlin MC, Mullan M (1992) Alzheimer disease: the new agenda. *Am J Hum Genet* 50:648-651.

- Haverkamp LJ, Appel V, Appel SH (1995) Natural history of amyotrophic lateral sclerosis in a database population. Validation of a scoring system and a model for survival prediction. *Brain* 118 (Pt 3):707-719.
- Hernandez-Guijo JM, Maneu-Flores VE, Ruiz-Nuno A, Villarroya M, Garcia AG, Gandia L (2001) Calcium-dependent inhibition of L, N, and P/Q Ca²⁺ channels in chromaffin cells: role of mitochondria. *J Neurosci* 21:2553-2560.
- Holman ME, Coleman HA, Tonta MA, Parkinson HC (1994) Synaptic transmission from splanchnic nerves to the adrenal medulla of guinea-pigs. *J Physiol* 478 (Pt 1):115-124.
- Holz RW, Bittner MA, Peppers SC, Senter RA, Eberhard DA (1989) MgATP-independent and MgATP-dependent exocytosis. Evidence that MgATP primes adrenal chromaffin cells to undergo exocytosis. *J Biol Chem* 264:5412-5419.
- Horn R, Marty A (1988) Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol* 92:145-159.
- Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, Erickson J, Kulik J, DeVito L, Psaltis G, DeGennaro LJ, Cleveland DW, Rothstein JD (2002) Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1604-1609.
- Jahn R, Scheller RH (2006) SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:631-643.
- Jaiswal MK, Zech WD, Goos M, Leutbecher C, Ferri A, Zippelius A, Carri MT, Nau R, Keller BU (2009) Impairment of mitochondrial calcium handling in a mtSOD1 cell culture model of motoneuron disease. *BMC Neurosci* 10:64.
- Jonsson PA, Ernhill K, Andersen PM, Bergemalm D, Brannstrom T, Gredal O, Nilsson P, Marklund SL (2004) Minute quantities of misfolded mutant superoxide dismutase-1 cause amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 127:73-88.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM (1991) *Principles of Neural Sciences*: Norwalk, Appleton & Lange.
- Kao LS, Cheung NS (1990) Mechanism of calcium transport across the plasma membrane of bovine chromaffin cells. *J Neurochem* 54:1972-1979.
- Katz B, Thesleff S (1957) A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J Physiol* 138:63-80.
- Kawagoe KT, Zimmerman JB, Wightman RM (1993) Principles of voltammetry and microelectrode surface states. *J Neurosci Methods* 48:225-240.
- Kayaalp SO, Mclsaac RJ (1968) In vivo release of catecholamines from the adrenal medulla by selective activation of cholinergic receptors. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 176:168-175.

- Kidokoro Y, Ritchie AK (1980) Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. *J Physiol* 307:199-216.
- Kirpekar SM, Prat JC, Schiavone MT (1982) Effect of muscarine on release of catecholamines from the perfused adrenal gland of the cat. *Br J Pharmacol* 77:455-460.
- Kruman, II, Pedersen WA, Springer JE, Mattson MP (1999) ALS-linked Cu/Zn-SOD mutation increases vulnerability of motor neurons to excitotoxicity by a mechanism involving increased oxidative stress and perturbed calcium homeostasis. *Exp Neurol* 160:28-39.
- Kummel D, Krishnakumar SS, Radoff DT, Li F, Giraudo CG, Pincet F, Rothman JE, Reinisch KM (2011) Complexin cross-links pre-fusion SNAREs into a zigzag array. *Nat Struct Mol Biol* 18:927-933.
- Kurland LT, Mulder DW (1955) Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. 2. Familial aggregations indicative of dominant inheritance. I. *Neurology* 5:182-196.
- Lara B, Lopez MG, Villarroya M, Gandia L, Cleeman L, Morad M, Garcia AG (1997) A caffeine-sensitive Ca²⁺ store modulates K⁺-evoked secretion in chromaffin cells. *Am J Physiol* 272:C1211-1221.
- Lee HG, Zhu X, Castellani RJ, Nunomura A, Perry G, Smith MA (2007) Amyloid-beta in Alzheimer disease: the null versus the alternate hypotheses. *J Pharmacol Exp Ther* 321:823-829.
- Leszczyszyn DJ, Jankowski JA, Viveros OH, Diliberto EJ, Jr., Near JA, Wightman RM (1990) Nicotinic receptor-mediated catecholamine secretion from individual chromaffin cells. Chemical evidence for exocytosis. *J Biol Chem* 265:14736-14737.
- Leszczyszyn DJ, Jankowski JA, Viveros OH, Diliberto EJ, Jr., Near JA, Wightman RM (1991) Secretion of catecholamines from individual adrenal medullary chromaffin cells. *J Neurochem* 56:1855-1863.
- Lindau M, Fernandez JM (1986) IgE-mediated degranulation of mast cells does not require opening of ion channels. *Nature* 319:150-153.
- Liu J, Lillo C, Jonsson PA, Vande Velde C, Ward CM, Miller TM, Subramaniam JR, Rothstein JD, Marklund S, Andersen PM, Brannstrom T, Gredal O, Wong PC, Williams DS, Cleveland DW (2004) Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron* 43:5-17.
- Liu PS, Kao LS (1990) Na⁺-dependent Ca²⁺ influx in bovine adrenal chromaffin cells. *Cell Calcium* 11:573-579.
- Liu R, Narla RK, Kurinov I, Li B, Uckun FM (1999) Increased hydroxyl radical production and apoptosis in PC12 neuron cells expressing the gain-of-function mutant G93A SOD1 gene. *Radiat Res* 151:133-141.

- Livett BG, Marley PD (1986) Effects of opioid peptides and morphine on histamine-induced catecholamine secretion from cultured, bovine adrenal chromaffin cells. *Br J Pharmacol* 89:327-334.
- Lockman PR, Mumper RJ, Khan MA, Allen DD (2002) Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. *Drug Dev Ind Pharm* 28:1-13.
- Ma C, Su L, Seven AB, Xu Y, Rizo J (2013) Reconstitution of the vital functions of Munc18 and Munc13 in neurotransmitter release. *Science* 339:421-425.
- Mackenzie KD, Duffield MD, Peiris H, Phillips L, Zanin MP, Teo EH, Zhou XF, Keating DJ (2014) Huntingtin-associated protein 1 regulates exocytosis, vesicle docking, readily releasable pool size and fusion pore stability in mouse chromaffin cells. *J Physiol* 592:1505-1518.
- Machado DJ, Montesinos MS, Borges R (2008) Good practices in single-cell amperometry. *Methods Mol Biol* 440:297-313.
- Machado JD, Segura F, Brioso MA, Borges R (2000) Nitric oxide modulates a late step of exocytosis. *J Biol Chem* 275:20274-20279.
- Malgaroli A, Fesce R, Meldolesi J (1990) Spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ fluctuations in rat chromaffin cells do not require inositol 1,4,5-trisphosphate elevations but are generated by a caffeine- and ryanodine-sensitive intracellular Ca^{2+} store. *J Biol Chem* 265:3005-3008.
- Marty A (1981) Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature* 291:497-500.
- Miranda-Ferreira R, de Pascual R, de Diego AM, Caricati-Neto A, Gandia L, Jurkiewicz A, Garcia AG (2008) Single-vesicle catecholamine release has greater quantal content and faster kinetics in chromaffin cells from hypertensive, as compared with normotensive, rats. *J Pharmacol Exp Ther* 324:685-693.
- Miranda-Ferreira R, de Pascual R, Smaili SS, Caricati-Neto A, Gandia L, Garcia AG, Jurkiewicz A (2010) Greater cytosolic and mitochondrial calcium transients in adrenal medullary slices of hypertensive, compared with normotensive rats. *Eur J Pharmacol* 636:126-136.
- Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibanez I, Albillos A, Garcia AG, Garcia-Sancho J, Alvarez J (2000) Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol* 2:57-61.
- Moser T, Neher E (1997) Rapid exocytosis in single chromaffin cells recorded from mouse adrenal slices. *J Neurosci* 17:2314-2323.
- Mosharov EV, Sulzer D (2005) Analysis of exocytotic events recorded by amperometry. *Nat Methods* 2:651-658.

- Mudher A, Lovestone S (2002) Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? *Trends Neurosci* 25:22-26.
- Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, Kato M, Pasinelli P, Kasai N, Brown RH, Jr., Itoyama Y (2001) Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *J Neurosci* 21:9246-9254.
- Nassar-Gentina V, Pollard HB, Rojas E (1988) Electrical activity in chromaffin cells of intact mouse adrenal gland. *Am J Physiol* 254:C675-683.
- Neher E (1998) Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* 20:389-399.
- Nistri A, Cherubini E (1992) Inactivation characteristics of a sustained, Ca(2+)-independent K⁺ current of rat hippocampal neurones in vitro. *J Physiol* 457:575-590.
- Octave JN (1995) The amyloid peptide precursor in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Belg* 95:197-209.
- Ochoa EL, Chattopadhyay A, McNamee MG (1989) Desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor: molecular mechanisms and effect of modulators. *Cell Mol Neurobiol* 9:141-178.
- Ohta T, Ito S, Nakazato Y (1998) Ca²⁺-dependent K⁺ currents induced by muscarinic receptor activation in guinea pig adrenal chromaffin cells. *J Neurochem* 70:1280-1288.
- Olivos L, Artalejo AR (2008) Muscarinic excitation-secretion coupling in chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* 192:213-220.
- Orozco C, Garcia-de-Diego AM, Arias E, Hernandez-Guijo JM, Garcia AG, Villarroya M, Lopez MG (2006) Depolarization preconditioning produces cytoprotection against veratridine-induced chromaffin cell death. *Eur J Pharmacol* 553:28-38.
- Orrell R, de Belleruche J, Marklund S, Bowe F, Hallelwell R (1995) A novel SOD mutant and ALS. *Nature* 374:504-505.
- Pieri M, Caioli S, Canu N, Mercuri NB, Guatteo E, Zona C (2013) Over-expression of N-type calcium channels in cortical neurons from a mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Exp Neurol* 247:349-358.
- Pieri M, Albo F, Gaetti C, Spalloni A, Bengtson CP, Longone P, Cavalcanti S, Zona C (2003) Altered excitability of motor neurons in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 351:153-156.
- Quinlan KA, Schuster JE, Fu R, Siddique T, Heckman CJ (2011) Altered postnatal maturation of electrical properties in spinal motoneurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol* 589:2245-2260.

- Rae J, Cooper K, Gates P, Watsky M (1991) Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *J Neurosci Methods* 37:15-26.
- Ratovitski T, Corson LB, Strain J, Wong P, Cleveland DW, Culotta VC, Borchelt DR (1999) Variation in the biochemical/biophysical properties of mutant superoxide dismutase 1 enzymes and the rate of disease progression in familial amyotrophic lateral sclerosis kindreds. *Hum Mol Genet* 8:1451-1460.
- Rigual R, Montero M, Rico AJ, Prieto-Lloret J, Alonso MT, Alvarez J (2002) Modulation of secretion by the endoplasmic reticulum in mouse chromaffin cells. *Eur J Neurosci* 16:1690-1696.
- Ripps ME, Huntley GW, Hof PR, Morrison JH, Gordon JW (1995) Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:689-693.
- Rizzuto R (2001) Intracellular Ca²⁺ pools in neuronal signalling. *Curr Opin Neurobiol* 11:306-311.
- Rose CR, Konnerth A (2001) Stores not just for storage. intracellular calcium release and synaptic plasticity. *Neuron* 31:519-522.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59-62.
- Rubenstein R, Kascsak RJ, Merz PA, Wisniewski HM, Carp RI, Iqbal K (1986) Paired helical filaments associated with Alzheimer disease are readily soluble structures. *Brain Res* 372:80-88.
- Sabo SL, Ikin AF, Buxbaum JD, Greengard P (2001) The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *J Cell Biol* 153:1403-1414.
- Sandow A (1952) Excitation-contraction coupling in muscular response. *Yale J Biol Med* 25:176-201.
- Sasaki S, Maruyama S (1994) Synapse loss in anterior horn neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 88:222-227.
- Scherzinger E, Lurz R, Turmaine M, Mangiarini L, Hollenbach B, Hasenbank R, Bates GP, Davies SW, Lehrach H, Wanker EE (1997) Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* 90:549-558.
- Schonn JS, Maximov A, Lao Y, Sudhof TC, Sorensen JB (2008) Synaptotagmin-1 and -7 are functionally overlapping Ca²⁺ sensors for exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3998-4003.

- Schroeder TJ, Borges R, Finnegan JM, Pihel K, Amatore C, Wightman RM (1996) Temporally resolved, independent stages of individual exocytotic secretion events. *Biophys J* 70:1061-1068.
- Schutz B (2005) Imbalanced excitatory to inhibitory synaptic input precedes motor neuron degeneration in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 20:131-140.
- Segovia M, Ales E, Montes MA, Bonifas I, Jemal I, Lindau M, Maximov A, Sudhof TC, Alvarez de Toledo G (2010) Push-and-pull regulation of the fusion pore by synaptotagmin-7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:19032-19037.
- Shen ZX (2004) Brain cholinesterases: II. The molecular and cellular basis of Alzheimer's disease. *Med Hypotheses* 63:308-321.
- Shibuya K, Misawa S, Arai K, Nakata M, Kanai K, Yoshiyama Y, Ito K, Iose S, Noto Y, Nasu S, Sekiguchi Y, Fujimaki Y, Ohmori S, Kitamura H, Sato Y, Kuwabara S (2011) Markedly reduced axonal potassium channel expression in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis: an immunohistochemical study. *Exp Neurol* 232:149-153.
- Sirvio J (1999) Strategies that support declining cholinergic neurotransmission in Alzheimer's disease patients. *Gerontology* 45 Suppl 1:3-14.
- Sjalander A, Beckman G, Deng HX, Iqbal Z, Tainer JA, Siddique T (1995) The D90A mutation results in a polymorphism of Cu,Zn superoxide dismutase that is prevalent in northern Sweden and Finland. *Hum Mol Genet* 4:1105-1108.
- Small DH, Nurcombe V, Reed G, Clarris H, Moir R, Beyreuther K, Masters CL (1994) A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J Neurosci* 14:2117-2127.
- Sorensen JB (2004) Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflugers Arch* 448:347-362.
- Sorensen JB, Fernandez-Chacon R, Sudhof TC, Neher E (2003) Examining synaptotagmin 1 function in dense core vesicle exocytosis under direct control of Ca²⁺. *J Gen Physiol* 122:265-276.
- Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E, Baralle F, de Belleruche J, Mitchell JD, Leigh PN, Al-Chalabi A, Miller CC, Nicholson G, Shaw CE (2008) TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 319:1668-1672.
- Stauderman KA, Pruss RM (1990) Different patterns of agonist-stimulated increases of 3H-inositol phosphate isomers and cytosolic Ca²⁺ in bovine adrenal chromaffin cells: comparison of the effects of histamine and angiotensin II. *J Neurochem* 54:946-953.

- Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27:509-547.
- Suzuki T, Volle RL (1979) Nicotinic, muscarinic and adrenergic receptors in a parasympathetic ganglion. *J Pharmacol Exp Ther* 211:252-256.
- Sze CI, Troncoso JC, Kawas C, Mouton P, Price DL, Martin LJ (1997) Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:933-944.
- Terry RD, Katzman R (1983) Senile dementia of the Alzheimer type. *Ann Neurol* 14:497-506.
- Uceda G, Artalejo AR, Lopez MG, Abad F, Neher E, Garcia AG (1992) Ca²⁺-activated K⁺ channels modulate muscarinic secretion in cat chromaffin cells. *J Physiol* 454:213-230.
- Valentine JS, Doucette PA, Zittin Potter S (2005) Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Annu Rev Biochem* 74:563-593.
- van Marum RJ (2008) Current and future therapy in Alzheimer's disease. *Fundam Clin Pharmacol* 22:265-274.
- Vanselow BK, Keller BU (2000) Calcium dynamics and buffering in oculomotor neurones from mouse that are particularly resistant during amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-related motoneurone disease. *J Physiol* 525 Pt 2:433-445.
- Verkhatsky A (2002) The endoplasmic reticulum and neuronal calcium signalling. *Cell Calcium* 32:393-404.
- Vijayvergiya C, Beal MF, Buck J, Manfredi G (2005) Mutant superoxide dismutase 1 forms aggregates in the brain mitochondrial matrix of amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neurosci* 25:2463-2470.
- Vila L, Barrett EF, Barrett JN (2003) Stimulation-induced mitochondrial [Ca²⁺] elevations in mouse motor terminals: comparison of wild-type with SOD1-G93A. *J Physiol* 549:719-728.
- Villarroya M, Olivares R, Ruiz A, Cano-Abad MF, de Pascual R, Lomax RB, Lopez MG, Mayorgas I, Gandia L, Garcia AG (1999) Voltage inactivation of Ca²⁺ entry and secretion associated with N- and P/Q-type but not L-type Ca²⁺ channels of bovine chromaffin cells. *J Physiol* 516 (Pt 2):421-432.
- Voets T (2000) Dissection of three Ca²⁺-dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron* 28:537-545.
- Voets T, Neher E, Moser T (1999) Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron* 23:607-615.
- Voets T, Moser T, Lund PE, Chow RH, Geppert M, Sudhof TC, Neher E (2001) Intracellular calcium dependence of large dense-core vesicle exocytosis in the absence of synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11680-11685.

- von Lewinski F, Fuchs J, Vanselow BK, Keller BU (2008) Low Ca²⁺ buffering in hypoglossal motoneurons of mutant SOD1 (G93A) mice. *Neurosci Lett* 445:224-228.
- von Ruden L, Neher E (1993) A Ca-dependent early step in the release of catecholamines from adrenal chromaffin cells. *Science* 262:1061-1065.
- von Ruden L, Garcia AG, Lopez MG (1993) The mechanism of Ba²⁺-induced exocytosis from single chromaffin cells. *FEBS Lett* 336:48-52.
- Wakade AR, Kahn R, Malhotra RK, Wakade CG, Wakade TD (1986) McN-A-343, a specific agonist of M1-muscarinic receptors, exerts antinicotinic and antimuscarinic effects in the rat adrenal medulla. *Life Sci* 39:2073-2080.
- Wang J, Slunt H, Gonzales V, Fromholt D, Coonfield M, Copeland NG, Jenkins NA, Borchelt DR (2003) Copper-binding-site-null SOD1 causes ALS in transgenic mice: aggregates of non-native SOD1 delineate a common feature. *Hum Mol Genet* 12:2753-2764.
- Wang J, Xu G, Slunt HH, Gonzales V, Coonfield M, Fromholt D, Copeland NG, Jenkins NA, Borchelt DR (2005) Coincident thresholds of mutant protein for paralytic disease and protein aggregation caused by restrictively expressed superoxide dismutase cDNA. *Neurobiol Dis* 20:943-952.
- Wenk GL (2003) Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry* 64 Suppl 9:7-10.
- Wightman RM, Jankowski JA, Kennedy RT, Kawagoe KT, Schroeder TJ, Leszczyszyn DJ, Near JA, Diliberto EJ, Jr., Viveros OH (1991) Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10754-10758.
- Winkler H, Smith AD (1968) Mechanism of secretion from the adrenal medulla. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 259:219-220.
- Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL (1995) An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 14:1105-1116.
- Woodbury DJ, Rognlien K (2000) The t-SNARE syntaxin is sufficient for spontaneous fusion of synaptic vesicles to planar membranes. *Cell Biol Int* 24:809-818.
- Wu PC, Fann MJ, Kao LS (2010) Characterization of Ca²⁺ signaling pathways in mouse adrenal medullary chromaffin cells. *J Neurochem* 112:1210-1222.
- Yoshida S, Mulder DW, Kurland LT, Chu CP, Okazaki H (1986) Follow-up study on amyotrophic lateral sclerosis in Rochester, Minn., 1925 through 1984. *Neuroepidemiology* 5:61-70.

- Yoshizaki T (1973) Effect of histamine, bradykinin and morphine on adrenaline release from rat adrenal gland. *Jpn J Pharmacol* 23:695-699.
- Yu NN, Wang XX, Yu JT, Wang ND, Lu RC, Miao D, Tian Y, Tan L (2010) Blocking beta2-adrenergic receptor attenuates acute stress-induced amyloid beta peptides production. *Brain Res* 1317:305-310.
- Zheng H, Koo EH (2006) The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener* 1:5.
- Zhou P, Pang ZP, Yang X, Zhang Y, Rosenmund C, Bacaj T, Sudhof TC (2013) Syntaxin-1 N-peptide and Habc-domain perform distinct essential functions in synaptic vesicle fusion. *EMBO J* 32:159-171.
- Zona C, Ferri A, Gabbianelli R, Mercuri NB, Bernardi G, Rotilio G, Carri MT (1998) Voltage-activated sodium currents in a cell line expressing a Cu,Zn superoxide dismutase typical of familial ALS. *Neuroreport* 9:3515-3518.