Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Mecanismos involucrados en el desarrollo y sostenimiento de la exocitosis altamente acoplada en células cromafines

Moya Díaz, José

2016-10-25

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Moya Díaz, José. (2016-10-25). Mecanismos involucrados en el desarrollo y sostenimiento de la exocitosis altamente acoplada en células cromafines. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Moya Díaz, José. "Mecanismos involucrados en el desarrollo y sostenimiento de la exocitosis altamente acoplada en células cromafines". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-10-25.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Mecanismos involucrados en el desarrollo y sostenimiento de la exocitosis altamente acoplada en células cromafines

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área
CIENCIAS BIOLÓGICAS

JOSÉ MOYA DÍAZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. FERNANDO DIEGO MARENGO

Consejero de Estudios: Dr. Osvaldo Uchitel

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (CONICET), Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, Octubre de 2016

Fecha de defensa: 25/10/2016

RESUMEN

En esta tesis se estudiaron los mecanismos asociados con la exocitosis vesicular altamente acoplada al estímulo, su recuperación, y su mantenimiento frente a la aplicación de potenciales de acción a bajas frecuencias de estimulación, propias del estado basal de estas células. En primer lugar, se evidenció que frente a la aplicación de un estímulo que simula un potencial de acción se libera un grupo de ≅ 8 vesículas, al que denominamos ETAP (por *exocytosis triggered by action potential*). Este *pool* vesicular está incluido en el *pool* inmediatamente liberable (IRP, ≅ 25 vesículas), y su exocitosis depende en un 50% de fuentes de Ca^{2+} extracelulares y en un 50% de un mecanismo independiente del influjo de Ca^{2+}. Mientras que IRP recupera lentamente ($\tau \cong 7$ s) luego de ser deprimido, ETAP presenta una rápida cinética de recuperación ($\tau \cong$ 0.7 s). Esta recuperación depende de dos procesos: (i) transferencia de vesículas desde *pooles* vesiculares río arriba, y (ii) una endocitosis rápida dependiente de dinamina y altamente acoplada a la exocitosis precedente. En la segunda parte de esta tesis se investigó el mecanismo de exocitosis independiente del influjo Ca^{2+} mencionado previamente. Utilizando despolarizaciones cuadradas de 100 ms (máxima respuesta), se determinaron la siguientes características para dicho fenómeno: (i) independencia de fuentes extracelulares e intracelulares de Ca^{2+}; (ii) dependencia de la proteína SNARE sinaptobrevina; (iii) dependencia sigmoidea con el voltaje aplicado; (iv) los resultados sugieren que el sensor de voltaje sería el canal de Ca^{2+} tipo P/Q, y que interaccionaría con la maquinaria exocitótica a través de la secuencia *synprint*. En resumen, los resultados muestran que un potencial de acción induce una exocitosis altamente acoplada y sincrónica al estímulo que es dependiente en parte de un mecanismo activado por Ca^{2+} y en parte de otro activado directamente por voltaje. Finalmente, demostramos que esta exocitosis, gracias a su rápida velocidad de recuperación vesicular, es capaz de mantener la secreción de manera continua a frecuencias basales fisiológicas.

Palabras claves: Exocitosis, Endocitosis, Potencial de Acción, Calcio, Potencial de Membrana, Canales de Calcio.

Mechanisms involved in the development and the maintenance of the exocytosis highly coupled in chromaffin cells

Abstract

In resting conditions, chromaffin cells fire action potentials at frequencies of 0.2-0.5 Hz, while under stress the frequency increases to 10-15 Hz. In this thesis we studied the mechanisms involved in the development and maintenance of exocytosis in response to the application of action potentials, individually and at low frequencies. In first place, we showed that the application of a stimulus that resembles a single action potential induced the release of a group of ≅8 vesicles that we defined as "exocytosis triggered by action potential" (ETAP). Our results show that this *pool* is part of the immediately releasable pool (IRP ≅ 25 vesicles), and its exocytosis depends 50% on extracellular Ca^{2+} sources and 50% on a mechanism that is independent of Ca^{2+} influx. While IRP refilling is slow ($\tau \cong 7\ s$) after depletion, ETAP showed a fast kinetic of recovery ($\tau \cong 0.7\ s$). This recovery depends on two processes: (i) vesicular transference from upstream *pools*, and (ii) a fast dynamin-dependent endocytotic process, which is tightly coupled to the precedent exocytosis. In the second part of this thesis we investigated the Ca^{2+}-independent exocytotic mechanism previously mentioned. Using square depolarizations pulses of 100 ms (maximal response), the following characteristics were determined for this phenomenon: (i) independence on external and internal Ca^{2+} sources; (ii) dependence on the SNARE protein synaptobrevin; (iii) sigmoidal dependence with the voltage applied; (iv) the results suggest that the voltage sensor could be the P/Q type Ca^{2+} channel, which can interact with the exocytotic machinery through its *synprint* sequence. In summary, our results show that an action potential induces an exocytotic response highly coupled, and synchronous with the stimuli, which depends in part on a mechanism activated by Ca^{2+} and in part on other mechanism activated directly by voltage. Finally, we demonstrated that this exocytosis, due to its fast vesicular recovery, is able to maintain the secretion under the application of action potentials at basal physiological frequencies.

Key words: Exocytosis, Endocytosis, Action Potential, Calcium, Membrane Potential, Calcium Channels.

AGRADECIMIENTOS

Al pueblo Argentino, por recibirme tan bien durante estos años.

A Fernando, mi director, por darme la oportunidad de continuar con mi perfeccionamiento académico. Por su dedicación y compromiso con mi formación, pero por sobre todo, por su calidez humana y por darme la confianza desde el minuto que le mandé ese e-mail para venir a trabajar a su laboratorio, por allá por el 2011.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a Verónica, Mauricio y Lucas. A Verónica por su calidad humana, y por su ayuda desinteresada cuando recién comenzaba esta etapa, cuando todo era nuevo y complicado para mí. A Mauricio, mi amigazo, mi compadre, mi hermano postizo en Buenos Aires. Mil gracias por todo lo que me diste en este tiempo. Gracias por tu humildad, amistad, perseverancia y trabajo. Creo que eres una de las personas de las que más aprendí durante este tiempo. A Lucas, por su ayuda, motivación y por sus notables ganas de seguir siempre para adelante. Gracias por tu amistad. Extrañaré las risas y las guarangadas que a veces cortaban el día junto a Mauri y Celeste.

A los miembros actuales y a los que ya pasaron por el laboratorio, en especial a Celeste (la guaranga número 1), Lucía, Noelia, Nicolás, Graciela, Luciana, Willy, Ayelén, Lucas, Joaquín y Carlota. Por la ayuda entregada, amistad y momentos compartidos durante estos años.

A mis amigos del IFIByNE, en especial a José Clemente, Matias Blaustein y Javier Gloazzo. Gracias por los viernes de cerveza y risas que a menudo permitieron terminar bien la semana laboral.

A los miembros de mi CST: Alejandro Schinder y Alejandro Delorenzi. Por las críticas constructivas a este trabajo y por su notable compromiso académico durante esta etapa.

A todos los miembros del IFIByNE que, de alguna u otra manera, contribuyeron al desarrollo de esta tesis.

A los del "fulbito" de los miércoles. Muchas gracias por no juzgar mis dotes de delantero, y permitirme hacer más de 100 goles durante estos años, adjudicándome el premio al goleador histórico del IFIByNE.

A Jorge, mi profesor de inglés, por su amistad y excelente disposición para conmigo. Por su tremenda paciencia, risas y conocimientos entregados durante estos años.

A mis amigos de Chile que hice estando en Buenos Aires, en especial a la familia WALLMAPU, particularmente a Albert, Guille, Gio y Ronny. Gracias por el fútbol, las cervezas, la música y las risas.

A mi familia: Jovina, José, María, Victoria, Jorge, Francisco, Cristóbal, Nicolás, Clorita, Ramoncito y a mi Mamá Coba. Porque sin ellos nada de esto hubiese sido posible. Porque fueron parte importante de mi motivación durante estos años. Muchas gracias por estar siempre ahí, por el apoyo, por el amor, comprensión y por las palabras de aliento en los momentos complicados.

A mis amigos de Chile que siempre estuvieron a pesar de la distancia, en especial a Oliver, Denis, Gabo, Marín y Enzo.

A Mirta, Nilo, Leandro y Giuliana, mi segunda familia en Buenos Aires. Gracias por recibirme y hacerme sentir parte de ustedes siempre.

A mi esposa, amiga, compañera, confidente. A la persona que me acompañó día y noche en este largo camino. A la que estuvo siempre ahí a pesar de las dificultades. Gracias Micaela por ser la piedra angular de este trabajo, y por entregarme tu amor y apoyo en todo momento.

A mis padres…

A Micaela…

ABREVIATURAS

Aga: ω-agatoxina IVA.

Anti-Dyn: Anticuerpo monoclonal anti-dinamina.

BAPTA: 1,2-*Bis(o-AminoPhenoxy)ethane-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid).*

Bont-B:Toxina Botulínica tipo B.

CCDV: Canales de Calcio dependientes de Voltaje.

Cono: ω-conotoxina GVIA.

Cm: Capacitancia de membrana celular.

EGTA: *Ethylene Glycol Tetraacetic Acid.*

ETAP: *Exocytosis triggered by an action potential.*

GST-Dyn: Proteína de fusión acoplada a los aminoácidos 829-842 de la dinamina humana.

HVA: *High voltage activated*.

I_{Ca2+} : Corriente de Ca^{2+}.

IntCa^{2+}: Integral de la corriente de Ca^{2+}.

IP_3R: receptores de IP_3.

IRP: *Immediately Releasable Pool.*

KO: *Knock out.*

LVA: *Low Voltage Activated.*

NCAM: Molécula de adhesión de células neuronales.

Nitre: Nitrendipina.

PA: Potencial de acción.

PAs: Potenciales de acción.

PA_{sim}: Potencial de acción simulado.

PA_{nat}: Potencial de acción nativo.

PKA: Proteína kinasa A.

PKC: Proteína kinasa C.

RE: Retículo endoplasmático.

RP: *Reserve pool.*

RRP: *Ready releasable pool.*

RyR: Receptores de rianodina.

SNAP-25: *Synaptosomal-associated protein of 25 kDa.*

SNARE: *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*.

SRP: *Slowly releasable pool.*

Synprint: *Synaptic protein interaction site.*

TIRFM:*Total internal reflection fluorescente microscopy.*

t-SNARE: *SNARE target.*

UPP*: Unprimed pool.*

VMAT*: vesicular monoamine transporter*

v-SNARE: SNARE vesicular.

WT: *wild type.*

2-APB:*2-aminoethoxydiphenyl borate*.

ΔCm: Cambios sincrónicos de capacitancia de membrana celular.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 6

1.1 MÉDULA ADRENAL Y CÉLULAS CROMAFINES 6
1.1.1 GENERALIDADES 6
1.1.2 POTENCIAL DE ACCIÓN 8
1.1.3 LAS CATECOLAMINAS ESTÁN EMPAQUETADAS EN VESÍCULAS 10
1.1.4 LA MÉDULA ADRENAL Y LA RESPUESTA AL ESTRÉS 12
1.1.5 VENTAJAS COMO MODELO NEUROBIOLÓGICO 15
1.2 SEÑALES DE CALCIO EN CÉLULAS CROMAFINES 19
1.2.1 FUENTES DE CALCIO 19
1.2.1.2 FUENTES INTRACELULARES DE CALCIO 23
1.2.2 SISTEMAS DE REMOCIÓN Y REGULACIÓN DEL CALCIO CITOSÓLICO 25
1.2.3 CARACTERÍSTICAS ESPACIALES Y TEMPORALES DE LAS SEÑALES DE CALCIO 26
1.3 EXOCITOSIS EN CÉLULAS CROMAFINES 29
1.4 LA CINÉTICA DE LA RESPUESTA SECRETORIA Y SU ASOCIACIÓN CON LOS GRUPOSDE VESÍCULAS. 35
1.5 ACOPLE ENTRE LOS CANALES DE CALCIO Y LAS VESÍCULAS SECRETORIAS 38
1.6 MECANISMOS ALTERNATIVOS A LA EXOCITOSIS DEPENDIENTE DE CALCIO. 41
1.7 ENDOCITOSIS 45
1.7.1 ENDOCITOSIS DEPENDIENTE DE CLATRINA 46
1.7.2 ENDOCITOSIS EN EXCESO Y BULK ENDOCITOSIS 47
1.7.3 ENDOCITOSIS ASOCIADA A UN POTENCIAL DE ACCIÓN 48
1.7.4. DINAMINA Y ENDOCITOSIS 50
1.7.5. LA ENDOCITOSIS Y SU DEPENDENCIA CON LA ENTRADA DE CALCIO 54
1.8 - EL IRP Y SU RELEVANCIA EN LA EXOCITOSIS ALTAMENTE ACOPLADA 56
1.8.1 - ESTIMACIÓN DEL IRP 56
1.8.2 - CINÉTICA DE RECUPERACIÓN DEL IRP 57
1.8.3 - CANALES DE Ca^{2+} ASOCIADOS AL IRP 59
1.8.4 - EL ACOPLE DE IRP CON LOS CANALES DE Ca^{2+} TIPO P/Q ES DEPENDIENTE DE *SYNPRINT* 62

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 65

2.1. HIPÓTESIS 65

2.2. OBJETIVOS 67
OBJETIVO GENERAL: 67
OBJETIVOS PARTICULARES: 68

3. MATERIALES Y MÉTODOS 70

3.1 CULTIVO Y TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS CROMAFINES 70
3.1.1 SOLUCIONES DE CULTIVO Y TRANSFECCIÓN 70
3.1.2 PROCEDIMIENTO PARA EL CULTIVO 70
3.1.3 PROCEDIMIENTO PARA LA TRANSFECCIÓN 72
3.2 TÉCNICAS ELECTROFISIOLÓGICAS 73
3.2.1 GENERALIDADES 73
3.2.2 CIRCUITO EQUIVALENTE DE LA CÉLULA Y MEDICIÓN DE CAPACITANCIA CELULAR 75
3.2.3 DISPOSITIVO DE PATCH CLAMP 79
3.2.4 PREPARACIÓN DE MICROPIPETAS 80
3.2.5 SOLUCIONES PARA EXPERIMENTOS ELECTROFISIOLÓGICOS 81
3.2.6 PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN UTILIZADOS PARA EL REGISTRO DE LA EXOCITOSIS 83
3.3 IMAGING DE CALCIO 85
3.3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS INDICADORES DE CALCIO TIPO FLUO 85
3.3.2 DISPOSITIVO EXPERIMENTAL 86
3.4 AMPEROMETRÍA 87
3.4.1 - PREPARACIÓN Y CALIBRACIÓN DE ELECTRODOS DE CARBONO PARA EXPERIMENTOS DE AMPEROMETRÍA 90
3.4 ANÁLISIS DE DATOS Y ESTADÍSTICA 92
3.4.1 PROCESAMIENTO DE LOS EXPERIMENTOS ELECTROFISIOLÓGICOS Y ELECTROQUÍMICOS 92
3.4.2 PROCESAMIENTO DE LOS EXPERIMENTOS DE IMAGING DE CALCIO 93
3.4.3 ESTADÍSTICA 93
3.5 REACTIVOS Y QUÍMICOS 94

4. RESULTADOS I 96

4.1 EXOCITOSIS INDUCIDA POR UN ESTÍMULO QUE SIMULA UN POTENCIAL DE ACCIÓN (PA_{SIM}) 96
4.2 RECUPERACIÓN DEL GRUPO DE VESÍCULAS LIBERADAS POR UN PA_{SIM} 102
4.3 LA RECUPERACIÓN DE ETAP DEPENDE DEL CONTENIDO VESICULAR DEL RRP 104
4.4 LA RECUPERACIÓN DE ETAP DEPENDE DE UN PROCESO ENDOCITÓTICO RÁPIDO. 108
4.5 EXOCITOSIS SINCRÓNICA DURANTE ESTIMULACIÓN REPETITIVA CON PAS_{SIM} 117

4.6 LIBERACIÓN DE CATECOLAMINAS EN RESPUESTA A TRENES DE PA_{SIM} A BAJA FRECUENCIA 121
4.7 LA EXOCITOSIS DE ETAP DEPENDE PARCIALMENTE DE UN MECANISMO INDEPENDIENTE DE I_{CA2+} 122

5. DISCUSIÓN I 126

5.1 ETAP REPRESENTA UNA SUBPOBLACIÓN DE VESÍCULAS DEL IRP. 127
5.2 ETAP Y SU RELEVANCIA EN EL SOSTENIMIENTO DE LA EXOCITOSIS ALTAMENTE ACOPLADA 128
5.3 MECANISMOS ASOCIADOS A LA RÁPIDA RECUPERACIÓN DE ETAP 129
5.4 EL SOSTENIMIENTO DE LA EXOCITOSIS A BAJAS FRECUENCIAS DE ESTIMULACIÓN ESTÁ LIGADO A UN MECANISMO DE ENDOCITOSIS RÁPIDA DEPENDIENTE DE DINAMINA 134

RESULTADOS II 137

6.1 CAMBIOS SINCRÓNICOS DE CAPACITANCIA (□CM) INDEPENDIENTES DE LA ENTRADA DE CA^{2+} 137
6.2 LOS CAMBIOS SINCRÓNICOS DE CAPACITANCIA REGISTRADOS EN CÉLULAS CROMAFINES BAÑADAS EN SOLUCIÓN LIBRE DE CA^{2+} EXTERNO NO ESTÁN ASOCIADOS A LA LIBERACIÓN DE CA^{+2} DESDE RESERVORIOS INTRACELULARES 140
6.3 EL AUMENTO SINCRÓNICO DE CAPACITANCIA INDEPENDIENTE DE CA^{2+} ESTÁ ASOCIADO A UNA EXOCITOSIS QUE DEPENDE DE PROTEÍNAS SNARE FUNCIONALES 143
6.4 VOLTAJE-DEPENDENCIA DE LA EXOCITOSIS INDEPENDIENTE DE CA^{+2} 146
6.5 LA RECUPERACIÓN DEL POOL VESICULAR ASOCIADO A ECIVD ESTÁ LIGADA A UN PROCESO ENDOCÍTICO RÁPIDO DEPENDIENTE DE DINAMINA 148
6.6 ECIVD PREDOMINA A BAJAS FRECUENCIAS DE ESTIMULACIÓN 152
6.7 EN ECIVD PREDOMINARÍAN LAS FUSIONES VESICULARES TRANSITORIAS DE TIPO *KISS AND RUN* 155
6.8 EL ACOPLE VOLTAJE-EXOCITOSIS EN LA ECIVD ESTARÍA ASOCIADO A CANALES DE CA^{2+} DE TIPO P/Q 157

7. DISCUSIÓN II 164

7.1 EXOCITOSIS INDEPENDIENTE DE CA^{2+} Y DEPENDIENTE DE VOLTAJE EN CÉLULAS CROMAFINES 164
7.2 ACOPLE FUNCIONAL ENTRE LA EXOCITOSIS Y LA ENDOCITOSIS INDEPENDIENTE DE CA^{2+}. RECUPERACIÓN DEL *POOL* VESICULAR ASOCIADO A ECIVD 168
7.3 RELEVANCIA DE ECIVD EN CÉLULAS CROMAFINES ESTIMULADAS CON PA_{SIM} 170

7.4 PROBABLES MECANISMOS DE ACOPLE ENTRE EL POTENCIAL DE MEMBRANA Y ECIVD 171

8. CONCLUSIONES GENERALES Y CONSIDERACIONES FINALES 176

9. BIBLIOGRAFÍA..... 180

10. ANEXO 195

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 MÉDULA ADRENAL Y CÉLULAS CROMAFINES

1.1.1 GENERALIDADES

La glándula suprarrenal se ubica anatómicamente en el extremo superior de los riñones y está constituida por dos órganos que coexisten espacialmente, pero con marcadas diferencias funcionales y embriológicas: la médula y la corteza suprarrenal (Figura 1.1). En la médula suprarrenal se encuentran las células cromafines que producen y secretan fundamentalmente catecolaminas, en mayor medida adrenalina y, en menor medida, su precursor noradrenalina. Además, estas células secretan varios péptidos activos como el neuropéptido Y, el activador de plasminógeno, cromograninas, secretograninas y encefalinas. Por otro lado, la corteza de la glándula suprarrenal está compuesta por células fasciculadas, glomerulares y reticuladas que secretan glucocorticoides, mineralocorticoides y una pequeña fracción de hormonas sexuales. Además de los efectos sobre órganos a distancia, estos esteroides también cumplen una función parácrina sobre la médula adrenal (Bornstein *et al.*, 1997). Su acción está involucrada en la función y en la estructura de las células cromafines, ya que favorece la producción de adrenalina a partir de noradrenalina y evita la formación de prolongaciones en estas células. Es sabido que las células cromafines en cultivo, eventualmente generan procesos de características similares a las neuritas (Trifaro *et al.*, 1980; Unsicker *et al.*, 1978), y que el agregado de esteroides al medio de cultivo inhibe este crecimiento (Anderson *et al.*, 1986).

La médula adrenal comparte un origen embriológico con el sistema simpático, ya que ambos provienen del neuroectodermo (Aloe *et al.*, 1979; Tischler, 2002; Weston, 1970). Algunos de los progenitores neuronales provenientes de la cresta neural originan el sistema simpático, mientras que

otros migran e invaden la corteza suprarrenal, dando lugar a la médula de dicha glándula. Más tarde, como consecuencia de la actividad de diversos factores de crecimiento (Dutt *et al.*, 2006) que estimulan la vía del AMP cíclico, las células se diferencian y se induce la síntesis de catecolaminas (Bilodeau *et al.*, 2000; Bilodeau *et al.*, 2005). Por su origen, ubicación y propiedades bioquímicas y fisiológicas, la médula suprarrenal se puede considerar un ganglio simpático modificado (Diaz-Flores *et al.*, 2008), y las células cromafines que la componen son neuronas modificadas que liberan sus productos de secreción directamente al torrente sanguíneo (Figura 1.1 C) (Rattenbury *et al.*, 1980). Al igual que las células cromafines, las neuronas postganglionares del sistema simpático también producen y secretan catecolaminas (noradrenalina). Por otro lado, al igual que en un ganglio simpático, las células cromafines son estimuladas por la acetilcolina liberada desde terminales colinérgicas preganglionares del sistema simpático. Estas terminales se ubican al final de axones que se proyectan a través del nervio esplácnico (Hirano, 1982).

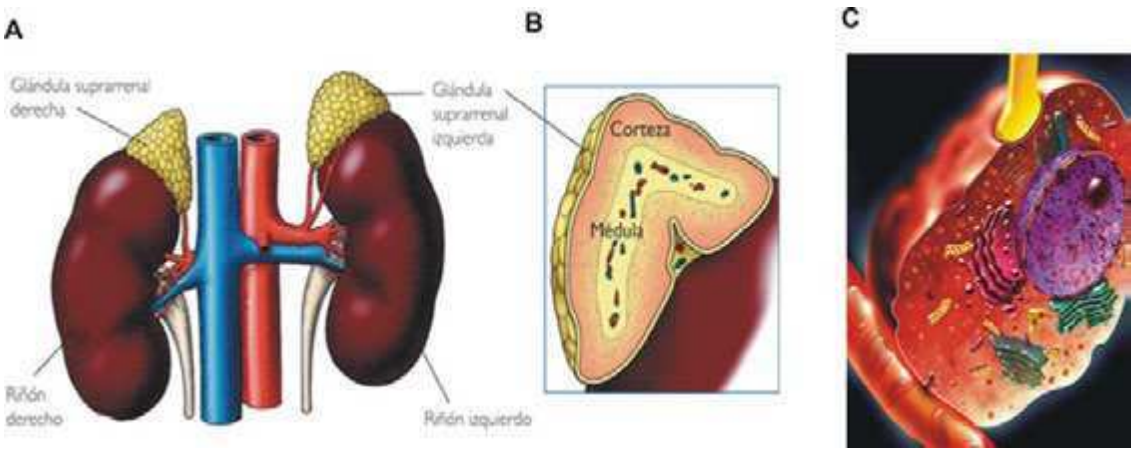

Figura 1.1- (A) La representación muestra la localización de la glándula suprarrenal y sus relaciones anatómicas con el riñón. **(B)** En un corte de la glándula se pueden diferenciar la médula y la corteza**. (C)** Se representa la ultraestructura de una célula cromafin. Nótese el contacto directo de la misma con un terminal nervioso responsable de su estimulación, y con un capilar sanguíneo hacia donde se secretan las catecolaminas mediante exocitosis.

Las células cromafines se encuentran dispuestas en cordones (Diaz-Flores *et al.*, 2008), lo cual favorece la relación con los capilares, a los que liberan sus productos de secreción (Figura 1.1 C). Por otro lado, en aposición a las terminales colinérgicas que las estimulan, las células cromafines poseen

receptores colinérgicos de membrana que se unen con alta afinidad a la acetilcolina. Estos receptores se clasifican en dos grupos principales: muscarínicos y nicotínicos. La secreción en las células cromafines es mayormente estimulada por la activación de receptores nicotínicos, que son receptores del tipo ionotrópicos. Sin embargo en estas células también hay receptores muscarínicos, metabotrópicos acoplados a proteína G, que pueden contribuir a la regulación de la secreción de catecolaminas (Aguilar *et al.*, 1992). Dentro de los receptores muscarínicos hay cinco subtipos (M_1-M_5). En células cromafines vacunas se observó mayor proporción del subtipo M_2, y en menor proporción los subtipos M_1, M_3y M_4 (Aguilar *et al.*, 1992; Fernando *et al.*, 1991). En cuanto a los receptores nicotínicos, el subtipo más importante en las células cromafines es el complejo pentamérico formado por las subunidades α_3 y β_4 que forman el canal que atraviesa la membrana (Sala *et al.*, 2008). Cuando el receptor es activado por la acetilcolina liberada desde los terminales neuronales, este canal aumenta su permeabilidad a cationes, ingresando fundamentalmente Na^+, despolarizando la membrana, y consecuentemente, generando el disparo de potenciales de acción (PAs). A consecuencia de esto se activan canales de Ca^{2+} voltaje dependientes (CCDV) en la membrana plasmática, y se produce la entrada de Ca^{2+} que dispara la exocitosis de las vesículas secretorios que contienen las catecolaminas y otras sustancias activas.

1.1.2 Potencial de acción

En todas las células existe una diferencia de potencial entre el interior y el exterior celular, denominado potencial de membrana (V_m) (por convención, V_{intra}-V_{extra}). Este potencial depende de las concentraciones intracelulares y extracelulares de los diferentes iones y de las conductividades relativas de la membrana a ellos. En las células no excitables este potencial tiene generalmente valores entre -10 y -30 mV, mientras que en las excitables cuando están en reposo se ubica en valores entre -50 y -90 mV. En estudios realizados en los años 60 se estimó un valor para el potencial de reposo en células cromafines de alrededor de -30 mV (Douglas *et al.*, 1967; Matthews,

1967). Las mejoras en las técnicas experimentales introducidas por la técnica de *patch clamp* permitieron estimar este valor entre -50 y -80 mV (Fenwick *et al.*, 1982). En estudios más recientes por registros de *patch* perforado en células cromafines bovinas se midió un valor entre -50 a -60 mV (Orozco *et al.*, 2006; Wallace *et al.*, 2002).

Cuando las células cromafines son excitadas, tanto fisiológicamente por la acetilcolina liberada o por otros métodos, se disparan PAs en la membrana plasmática. La fase de subida del potencial de acción (PA) en algunos casos es dominada sólo por la entrada de iones de Na^+ (Figura 1.2 B) (Biales *et al.*, 1977), mientras que en otros casos se observó que depende tanto de los canales de Na^+ como de Ca^{2+} (Brandt *et al.*, 1976; Kidokoro *et al.*, 1980). La repolarización del PA en las células cromafines depende principalmente de la inactivación de los canales de Na^+ (Solaro *et al.*, 1995). Además de los canales de Na^+, también se observó que la presencia de canales de K^+ dependientes de voltaje (Inoue *et al.*, 1993), y dos variantes de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} tipo BK (Neely *et al.*, 1992), contribuyen a la repolarización del PA, regulando el patrón de disparo de estas células (Gonzalez-Garcia *et al.*, 1993; Lara *et al.*, 1995). La frecuencia de disparo de PAs en las células cromafines *in situ* es controlada por el grado de activación de los receptores nicotínicos. El disparo de PAs espontáneos fue estudiado en cultivos de células cromafines de gerbos, humanos, ratas y vacas (Biales *et al.*, 1976; Kidokoro *et al.*, 1980; Micheletti *et al.*, 2005; Wallace *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 1997). La frecuencia de aparición de PAs espontáneos se estimó en alrededor de 0.2 Hz. Estos PAs tienen amplitud muy variable, con valores entre 52 mV y 78 mV (de Diego *et al.*, 2008). Por otro lado, frente a una activación máxima, típica del estrés, las células cromafines disparan PAs a frecuencias mayores a 10 Hz (Chan *et al.*, 2001; Kidokoro *et al.*, 1980)

Las corrientes de Ca^{2+} que se activan durante un PA son el disparador natural de la exocitosis en las células cromafines, como en otras células neuroendocrinas y en neuronas. La eficiencia de esta corriente de Ca^{2+} para inducir exocitosis varía según el tipo de preparación. Se estimó que la exocitosis generada por un PA individual en rebanadas de la médula adrenal

de ratón es de ~7 vesículas, mientras que en células aisladas en cultivo de ratón se midieron valores inferiores (~2 vesículas) (Moser *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1995). Esta discrepancia se debería a diferencias en el acoplamiento de los canales de Ca^{2+} y las vesículas entre las dos preparaciones (esto punto se discutirá más adelante en esta tesis).

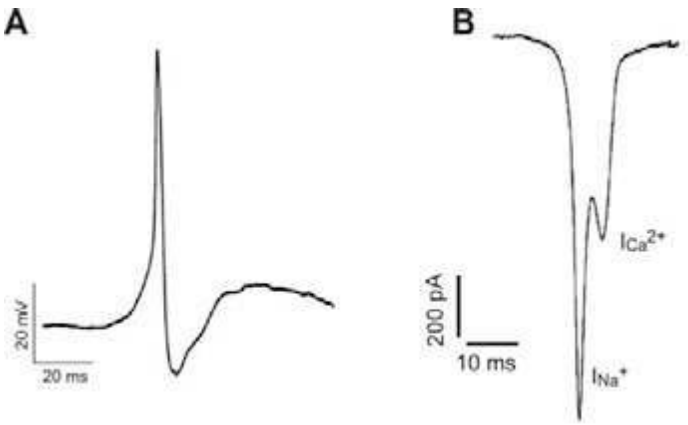

Figura 1.2 - Potencial de acción en células cromafines. (A) Ejemplo de un PA generado por un "*puff*" de 25 ms de acetilcolina en una célula cromafin bovina. **(B)** Las corrientes que subyacen al PA son de Na^+ y de Ca^{2+}, por la rápida inactivación de las corrientes de Na^+ las dos corrientes están separadas temporalmente (Modificados de de Diego, 2009 y de Diego, 2008).

1.1.3 LAS CATECOLAMINAS ESTÁN EMPAQUETADAS EN VESÍCULAS

El producto de secreción más importante de las células cromafines es la adrenalina, la cual pertenece a un grupo de sustancias, las catecolaminas, que incluye también a la dopamina y a la noradrenalina. Estas dos últimas son productos metabólicos intermedios en la síntesis de la adrenalina a partir de un precursor común, el aminoácido tirosina. El primer paso en la síntesis de las catecolaminas es catalizado por la enzima tirosina hidroxilasa que es el paso limitante en la ruta biosintética. El paso de dopamina a noradrenalina lo cataliza la enzima dopamina β-hidroxilasa, a partir de ascorbato y oxígeno, y en el último paso, la transformación de noradrenalina en adrenalina es llevada a cabo por la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa (Nagatsu *et al.*, 1964). Toda la adrenalina circulante procede de la secreción de la médula suprarrenal, la cual genera una concentración en sangre basal de 250 pg/ml (de Diego *et al.*, 2008). En cambio, la noradrenalina es también producida y secretada por neuronas del sistema nervioso autónomo, donde funciona como neurotransmisor. Prácticamente toda la noradrenalina circulante deriva de las

terminaciones nerviosas simpáticas y del encéfalo, debido a la fuga que se produce de las brechas sinápticas. La poca noradrenalina producida por la médula suprarrenal y liberada a la sangre tiene una vida media muy breve, ya que se metaboliza en el hígado poco después de su descarga (Donald *et al.*, 1980).

Las catecolaminas producidas en las células cromafines son acumuladas dentro de vesículas por un mecanismo dependiente de transportadores de monoaminas, que utilizan el gradiente de H^+ generado por una bomba H^+-ATPasa (Dean *et al.*, 1986). Por esta razón el pH de las vesículas es ácido, con un valor aproximado de 5.5. Existen dos tipos de transportadores, llamados VMAT1 y VMAT2 (del inglés *vesicular monoamine transporter*), y las células cromafines expresan ambos (Erickson *et al.*, 1996).

Existen diferentes tipos de vesículas en las células cromafines. Por una parte se encuentran las vesículas secretorias, que son gránulos de ~200 nm de diámetro, electrodensos, que contienen las catecolaminas y otros componentes. Por otro lado, se encuentran las vesículas pequeñas, de baja densidad óptica y de un tamaño promedio de 40 nm, que son similares a las vesículas sinápticas (Annaert *et al.*, 1993; Koval *et al.*, 2001; Tanner *et al.*, 1996). Por medio de microscopia electrónica se estimó que en una célula cromafín el número de vesículas secretorias que contienen adrenalina es ~17000, lo que corresponde al 71% de vesículas secretorias, mientras que las que contienen noradrenalina son ~7000 (Vitale *et al.*, 1995).

Además de las catecolaminas, las vesículas secretorias contienen ATP, neuropéptido Y, encefalinas (Lewis *et al.*, 1979; Viveros *et al.*, 1979), cromograninas y otros péptidos activos (Banks *et al.*, 1965). Las cromograninas son necesarias para la formación de las vesículas secretorias, confiriéndoles sus características electrodensas por el empaquetamiento de estas proteínas con cationes que neutralizan sus cargas negativas (Stettler *et al.*, 2009).

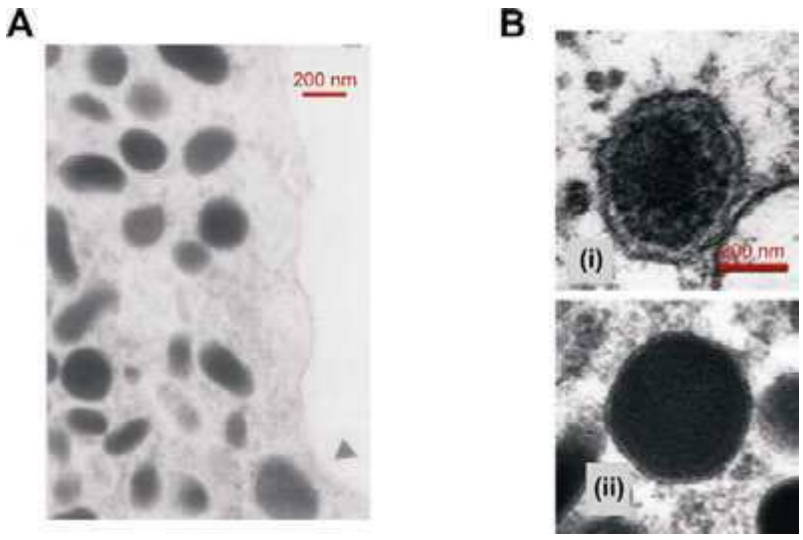

Figura 1.3-Microscopia electrónica de la zona cortical de una célula cromafín bovina. (A) En esta imagen se observa la ubicación de las vesículas secretorias con respecto a la membrana plasmática (imagen extraída de Vitale y col., 2005). **(B)** Se observan las diferencias entre las vesículas cargadas con adrenalina de las cargadas con noradrenalina. **(i)** Las vesículas que contienen adrenalina muestran un halo en su periferia mientras que las que contienen noradrenalina son sólidas **(ii)** (imágenes modificadas de Crivellato *et al* ., 2008).

La cantidad total de vesículas secretorias liberables estimada por medio de técnicas fisiológicas, no coincide con el número total de vesículas reportado por estudios morfológicos (Vitale *et al.*, 1995). Se calculó que las vesículas secretorias liberables oscilarían entre 2000 a 6000 (Phillips *et al.*, 1983). Considerando que el aumento de superficie generado en la membrana plasmática por la fusión de una vesícula secretoria individual en células cromafines de ratón fue estimada en 1.3 fF (Moser *et al.*, 1997), y tomando un valor promedio de capacitancia de membrana de 6 pF, esto representaría entre el 40% y el 30% de la membrana celular.

1.1.4 La médula adrenal y la respuesta al estrés

El sistema nervioso autónomo es un sistema eferente e involuntario, que transmite impulsos desde el sistema nervioso central (desde centros nerviosos situados en la médula espinal, tallo cerebral e hipotálamo) hasta la periferia, estimulando órganos particulares. Estas acciones incluyen el control de la frecuencia y la fuerza de contracción cardíaca, la contracción y dilatación de

vasos sanguíneos, la contracción y relajación del músculo liso en varios órganos, acomodación visual, tamaño pupilar y secreción de glándulas exocrinas y endocrinas, regulando funciones tan importantes como la digestión, circulación sanguínea, respiración y metabolismo (Purves, 2004).

El sistema nervioso autónomo se divide funcionalmente en sistema simpático y en sistema parasimpático. El sistema simpático juega un papel fundamental en la preservación del organismo, ya que genera una respuesta rápida y efectiva ante los estímulos externos y/o internos que puedan amenazar la integridad del individuo, manteniendo la homeostasis del sistema. Por el contrario, la acción del sistema parasimpático es opuesta a la del sistema simpático, y su función está generalmente orientada a la conservación de la energía del organismo (Purves, 2004).

En el sistema nervioso simpático, las fibras preganglionares emergen desde la médula espinal y se conectan con una serie ganglios intermedios. Desde aquí las fibras postganglionares se dirigen al órgano efector. La inervación de la glándula adrenal es una excepción, ya que las fibras preganglionares inervan directamente a la glándula. El neurotransmisor liberado por las presinapsis ganglionares es la acetilcolina. A su vez, el neurotransmisor liberado por las terminales de las fibras postganglionares hacia el órgano efector es la noradrenalina (Purves, 2004).

En condiciones normales, en las cuales el organismo no está sometido a estrés, las neuronas preganglionares simpáticas del nervio esplácnico disparan PAs a frecuencias bajas, manteniendo la frecuencia de PAs en las células cromafines en el orden de aproximadamente 0.2-0.5 Hz. Este estado se conoce como *breed and feed* (Brandt *et al.*, 1976). En estas condiciones las células cromafines liberan pequeñas cantidades de catecolaminas al sistema circulatorio, permitiendo que ciertos parámetros fisiológicos (como por ejemplo el tono vascular y la frecuencia cardíaca) se mantengan en sus niveles de reposo. En condiciones de estrés agudo, el sistema nervioso simpático inicia una respuesta llamada *fight or flight*, en la cual la médula suprarrenal es activada simultáneamente con la rama simpática del sistema nervioso

autónomo. La activación de la médula adrenal produce un aumento en la frecuencia de disparo de PA de las células cromafines hasta un valor 30 veces mayor al de reposo (~15 Hz) (Iijima *et al.*, 1992), lo cual genera una liberación masiva de adrenalina a la circulación general.

La dependencia de los mecanismos de neurosecreción operantes con la frecuencia de estimulación, ha sido parcialmente indagada en células cromafines. Los trabajos más representativos que abordaron esta temática se desarrollaron en el laboratorio de Corey Smith y colaboradores. Por ejemplo, uno de estos trabajos demostró que la liberación del contenido vesicular dependía cuantitativamente y cualitativamente de la frecuencia de estimulación aplicada. Mediante el uso de técnicas electrofisiológicas, imágenes de fluorescencia, inmunocitoquímica y amperometría, observaron que la estimulación con PAs a altas frecuencias promovía la liberación del contenido total de catecolaminas y neuropéptidos de cada vesícula fusionada, sugiriendo que bajo condiciones de estrés predominaban fusiones vesiculares completas. Esto significa que cada vesícula sufre un colapso completo con la membrana plasmática, liberando todos sus contenidos al espacio extracelular. Por el contrario, bajas frecuencias de estimulación generaban la liberación de solamente una fracción de las catecolaminas contenidas en la vesícula, y no se liberaban péptidos (Fulop *et al.*, 2005). Dado que esto coincidía con una selectividad diferencial para distintos tamaños de dextraxos fluorecentes, los autores propusieron que bajo un régimen de frecuencias de PAs basal se producían fusiones vesiculares de tipo *kiss and run*, donde sólo se abre transitoriamente un poro de fusión de baja conductividad que no deja pasar moléculas grandes. Un año mas tarde, este mismo grupo de investigadores demostró que la activación de la vía de la proteína kinasa C (PKC) modulaba la transición desde fusiones transitorias (PKC inactiva) a fusiones completas (PKC activa) (Fulop *et al.*, 2006).

Por otro lado, también se ha demostrado que el modo de fusión vesicular depende de un reordenamiento en las proteínas del citoesqueleto. Por ejemplo, se ha reportado que la aplicación de PAs a bajas frecuencias mantiene a los filamentos de actina cortical en configuración F-actina (filamentosa), lo cual

favorece a las fusiones transitorias de tipo *kiss and run*. Por el contrario, altas frecuencias de estimulación desestabilizan estas redes y favorecen la despolimerización de la F-actina, promoviendo fusiones de tipo completas (Doreian *et al.*, 2008). Otros trabajos sostienen que la miosina II actuaría en conjunto con la actina, y que esta interacción facilitaría la liberación de catecolaminas desde gránulos individuales a través de un mecanismo dependiente de generación de fuerzas mecánicas (Berberian *et al.*, 2009).

1.1.5 VENTAJAS COMO MODELO NEUROBIOLÓGICO

Acordes con su origen embriológico, los mecanismos secretorios de las células cromafines poseen muchas similitudes con los de las neuronas, tanto en aspectos moleculares como biofísicos. Ambos tipos celulares son excitables, y la liberación de neurotransmisores o adrenalina se produce a través del disparo de PAs que activan CCDV ubicados en la membrana, generando un aumento en el Ca^{2+} citosólico y la posterior liberación del contenido vesicular (Neher *et al.*, 1992). Otras características compartidas son la relación entre el Ca^{2+} y la exocitosis, la cual no es lineal sino sigmoidea, ambos modelos presentan el sensor de Ca^{2+} sinaptotagmina, comparten básicamente la misma maquinaria de fusión, incluyendo proteínas SNARE, α-SNAP, NSF, etc (Borisovska *et al.*, 2005; Heinemann *et al.*, 1993; Koo *et al.*, 2011).

Respecto a las diferencias entre las neuronas y las células cromafines, una muy importante es el grado de acople entre estímulo y secreción. Mientras que en las neuronas los canales de Ca^{2+} y las vesículas están altamente acoplados en zonas activas, permitiendo una rápida y eficiente liberación de los neurotransmisores, en las células cromafines no existen zonas activas morfológicamente establecidas. Es importante mencionar que la secreción de hormonas desde las células cromafines se vierte directamente al torrente sanguíneo, lo cual actúa como paso limitante en el proceso de señalización, y por lo tanto un alto grado de acople no implicaría desde este punto de vista ninguna ventaja fisiológica. De hecho, mayoritariamente, la secreción desde

células cromafines ocurre mucho más lentamente que en las terminales nerviosas (Chow *et al.*, 1992; Heinemann *et al.*, 1994). De cualquier modo, estas células poseen varios *pools* vesiculares con diferente grado de maduración (ver más adelante), y consecuentemente distintas cinéticas de liberación, que liberan las catecolaminas en períodos que van desde fracciones de segundos a segundos, por lo que el acople estimulo-secreción en estas células puede considerarse una situación intermedia entre neuronas y otras células endocrinas (Garcia *et al.*, 2006). Incluso, si bien no existen zonas activas morfológicamente organizadas como en neuronas, existe en las células cromafines un limitado número de vesículas altamente acopladas a canales de Ca^{2+}, que se liberan velozmente frente al estímulo. Eso último se tratará más adelante en esta introducción.

Considerando la similitud entre ambos sistemas, las células cromafines poseen características que las hacen muy ventajosas como modelo experimental para el estudio de procesos biológicos tales como la exocitosis, endocitosis, reciclado vesicular, acople estímulo-secreción, formación del poro de fusión vesicular, entre otras. Las células cromafines son fácilmente cultivables, y es posible obtener altas cantidades de células por cultivo (Livett, 1984). Además, el tamaño de estas células es mucho mayor que la mayoría de las terminales nerviosas, y adoptan una geometría esférica en cultivo. Estas características permiten la fácil aplicación de la técnica de *patch clamp* en configuración de célula entera o *whole cell*. Esta técnica, si se utiliza en modo *voltage clamp* permite fijar el potencial de membrana y registrar las corrientes generadas por el flujo de iones a través de los canales. Dado que estas células se comportan eléctricamente como un compartimiento único (debido a su morfología esférica), esto hace más sencillo fijar el potencial de membrana, a diferencia de lo que ocurre con las neuronas que poseen una geometría mucho más compleja. Esta geometría simple, también facilita la aplicación de la técnica de medición de capacitancia, que es un método altamente sensible para evaluar la exocitosis y la endocitosis con una resolución temporal de milisegundos (Neher *et al.*, 1982). Los fundamentos de esta técnica se basan en que las membranas biológicas se comportan eléctricamente como capacitores, y por lo tanto la capacitancia de la membrana celular es

directamente proporcional al área superficial de la célula (Neher, 1995). Por esta razón, la fusión de la membrana vesicular con la membrana plasmática, producto de la exocitosis, se traduce en un aumento de la capacitancia, y la subsecuente recuperación de la membrana producto de la endocitosis posterior se registra como una disminución de capacitancia. Esta técnica será explicada con más detalle luego, ya que se utilizó a lo largo de esta tesis. La técnica de *whole cell* también permite controlar la composición del citoplasma, y la adición al mismo, vía diálisis por la pipeta de registro, de proteínas, buffers de Ca^{2+} y sondas fluorescentes. Justamente utilizando indicadores fluorecentes de Ca^{2+}, las células cromafines han sido muy útiles para estudiar la distribución espacial de las señales de Ca^{2+} luego de la activación de los CCDV (Marengo *et al.*, 2000, 2003; Monck *et al.*, 1994; Neher *et al.*, 1992).

Otra técnica de alta resolución que puede ser utilizada para estudiar la secreción en células cromafines, y que también representa una ventaja metodológica respecto a muchas terminales nerviosas, es la amperometría (Bruns, 2004). Mediante esta técnica, se mide la corriente eléctrica generada por la oxidación de las catecolaminas liberadas sobre la superficie de un microelectrodo de fibra de carbono, el cual se coloca en contacto con la superficie celular. Esta técnica permite detectar las catecolaminas liberadas al medio extracelular por vesículas secretorias individuales (Chow *et al.*, 1992; Wightman *et al.*, 1991), y puede ser aplicada conjuntamente con mediciones electrofisiológicas de corrientes y capacitancia celular (Albillos *et al.*, 1997; Ales *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2001), y/o de señales de Ca^{2+} (Monck *et al.*, 1994). Esta técnica también fue utilizada en el transcurso de esta tesis, por lo que en la sección materiales y métodos profundizaremos sus fundamentos.

Otra técnica aplicada para estudiar exocitosis y endocitosis en células cromafines se basa en la obtención de imágenes de fluorescencia a partir de indicadores de tipo FM (Perez Bay *et al.*, 2007). Es importante mencionar también, que se han logrado significativos avances en el entendimiento de los estados inmediatamente previos a la fusión de las vesículas secretorias gracias a la aplicación de la técnica de microscopia de reflexión total (TIRFM). Por medio de TIRFM, es posible visualizar y seguir la evolución de las vesículas a

~100 nm de la membrana plasmática (Becherer *et al.*, 2007; Steyer *et al.*, 2001), pudiendo identificar y cuantificar temporalmente procesos como la migración de las vesículas, el *docking* y la fusión.

Existen numerosos ejemplos de cómo las células cromafines han servido como modelo neurobiológico. En estas células se logró por primera vez aislar una organela secretoria mediante ultracentrifugación (Blaschko *et al.*, 1953). También se logró establecer que las vesículas secretorias podían almacenar al transmisor en altas concentraciones, mediante la actividad de una bomba ATPasa generadora de un gradiente de protones (Njus *et al.*, 1978). Además, las células cromafines han sido el modelo fundamental para definir la presencia y la dinámica de los *pools* vesiculares (Neher *et al.*, 1993; Rettig *et al.*, 2002; Sorensen, 2004). Por medio de la aplicación de amperometría, amperometría en *patch* y capacitancia en *patch*, estas células también han servido para poder demostrar de manera directa los distintos tipos de fusión de las vesículas (fusión transitoria o colapso completo). Si bien el *kiss and run* fue propuesto por primera vez por Bruno Ceccarelli (1973), a partir de experimentos de microscopía electrónica en placa neuromuscular, los primeros registros directos y en tiempo real de la existencia de este fenómeno fueron obtenidos por mediciones de capacitancia y amperometría en células cromafines (Zhou *et al.*, 1996). De cualquier manera, la confirmación más rotunda de este proceso se realizó también en células cromafines por medio de la técnica de amperometría y capacitancia en *patch* combinadas, donde se demostró que la espiga de liberación de adrenalina coincidía temporalmente con el aumento en capacitancia transitorio, y con el aumento de conductancia del poro de fusión (Albillos *et al.*, 1997; Ales *et al.*, 1999). En cuanto a la maquinaria exocitótica, en las células cromafines se han podido establecer claras correlaciones entre mutaciones en las proteínas que conforman el complejo SNARE y en proteínas accesorias al proceso de secreción (entre ellas munc-18 y α-SNAP), y las distintas etapas de la exocitosis, como el *docking*, diferentes pasos del *priming*, formación del complejo SNARE y la fusión (Sorensen, 2004; Sorensen *et al.*, 2006).

Por los motivos citados arriba, entre otros, las células cromafines han

sido extensamente estudiadas para entender los mecanismos involucrados en la exocitosis, así como también en la endocitosis y en el ciclado de membrana internalizada hacia vesículas liberables.

1.2 SEÑALES DE CALCIO EN CÉLULAS CROMAFINES

La secreción en células neuroendócrinas está mediada, al igual que la transmisión sináptica, por la entrada localizada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de los CCDV localizados en la membrana plasmática (Neher *et al.*, 1992). Además de esta vía, las células cromafines poseen otros mecanismos capaces de aumentar los niveles de Ca^{2+} citosólico, tales como la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático (RE) a través de receptores de rianodina y/o de IP_3, y la reversión del intercambiador Na^+/Ca^{2+} de la membrana plasmática. Por otro lado, también tenemos mecanismos de recaptación de Ca^{2+} que permiten restablecer y/o mantener los niveles basales de este catión, como la Ca^{2+} ATPasa de la membrana plasmática, el intercambiador Na^+/Ca^{2+} actuando en modo directo, la Ca^{2+} ATPasa del retículo endoplásmico y el uniporter mitocondrial (Herrington *et al.*, 1996; Pan *et al.*, 1997; Villalobos *et al.*, 2002). Todos estos sistemas pueden potencialmente influir en la distribución espacio-temporal de la señal de Ca^{2+} de estas células (Marengo *et al.*, 2003).

1.2.1 FUENTES DE CALCIO

1.2.1.1 CANALES DE CALCIO

Los CCDV son proteínas oligoméricas, constituidas por cinco subunidades: α_1, α_2, δ, γ y β. La subunidad α_1 es la que forma el poro y es la que distingue a los diferentes tipos de canales de Ca^{2+} (Catterall, 2000), mientras que las otras subunidades cumplen un papel regulatorio. La subunidad α_1 tiene un tamaño aproximado de 2000 aminoácidos, y posee una estructura terciaria similar a la de los canales de Na^+ dependientes de voltaje. Es decir, está constituida por 4 dominios, que combinados forman el poro del

canal. Cada uno de estos dominios, a su vez está formado por 6 segmentos transmembrana en alfa hélice, y posee funciones particulares (Tsien *et al.*, 1991). El cuarto de estos segmentos, denominado S_4, está altamente cargado y actúa como sensor del voltaje, mientras que los segmentos S_5 y S_6, incluido el *loop* entre ellos, contribuyen a la formación del poro del canal (Hille, 2001). La estructura general descripta de este tipo de canales se esquematiza en la figura 1.4.

Los CCDV, al igual que los canales dependientes de voltaje de Na^+ y K^+, son altamente selectivos. Cuando está abierto, el canal forma un poro que se extiende a través de toda la membrana. Este poro es, en casi toda su longitud, mucho más ancho que el ion, salvo en un pequeño tramo donde se encuentra el filtro que establece la selectividad iónica del canal. Este filtro restringe el paso del ion de acuerdo con el tamaño, carga y energía libre de hidratación del ión (Hille, 2001). La apertura del canal requiere un cambio de conformación de la proteína, la cual se produce frente a un cambio de potencial de membrana (Figura 1.4 C). El canal de Ca^{2+} además experimenta un proceso de inactivación, que es dependiente de voltaje y de Ca^{2+} (Zhang *et al.*, 1994). El canal de Ca^{2+} debe salir del estado de inactivación para poder volver a activarse ante un cambio de potencial.

Cuando un canal está abierto, este contribuye con un valor pequeño (γ) a la conductancia total de la célula. La conductancia macroscópica (*g)*, debida a N canales está dada por la fórmula en la ecuación 1.1.

$$g(V) = \gamma \cdot N \cdot p(V) \qquad (1.1)$$

A nivel celular, la corriente de calcio (I_{Ca2+})*,* depende del tipo y número de canales, del gradiente de concentración de Ca^{2+} entre ambos lados de la membrana, y del voltaje al que está sometida la membrana (Hille, 2001). Las corrientes son dependientes del voltaje por dos razones. Por un lado por la

dependencia de la probabilidad de apertura del canal con esta variable, y por el otro debido a la fuerza impulsora que actúa sobre estos cationes, la cual es equivalente a la diferencia entre el potencial aplicado (*Vm)* y el potencial de equilibrio del Ca^{2+} calculado por la ecuación de Nerst, $E_{Ca}{}^{2+}$ (Ecuación 1.2).

$$I_{Ca^{2+}} = g_{Ca^{2+}} (Vm - E_{Ca^{2+}}) \qquad (1.2)$$

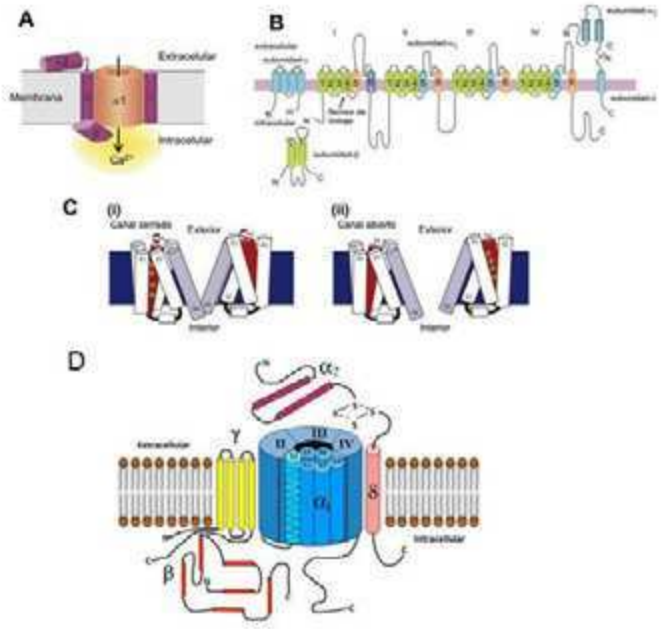

Figura 1.4 - (A) Diagrama de un canal de Ca^{2+} voltaje dependiente. La estructura molecular del canal de calcio consta de cinco subunidades: α_1, α_2, δ, γ y β. La subunidad α_1 es la que distingue a los subtipos de canales y la que contiene al poro. **(B)** Representación de los segmentos transmembranales de la subunidad α_1 y las subunidades regulatorias. La subunidad α_1 a su vez está formada por cuatro dominios. En cada uno de ellos hay un sensor de voltaje, S4. **(C)** En la figura se esquematiza el cambio conformacional del canal de Ca^{2+} representando los estados cerrado (i) y abierto (ii)**. (D)** Estructura de las subunidades de los CCVD. α_1 es la subunidad formadora del poro que contiene la maquinaria sensible a voltaje. La subunidad α_1 contiene 4 dominios homólogos (I-IV), y cada una de ellas contiene 6 hélices transmembranales (S1-S6). Las subunidades α2, δ y ß mejoran la expresión y modulan la dependencia de voltaje y la cinética de *gating* de los CCDV.

Las células cromafines, sometidas a despolarizaciones sucesivas desde el valor de reposo de la membrana hasta potenciales más positivos en forma creciente, muestran primero un aumento en las I_{Ca2+} a partir del umbral de activación, que llega a un máximo aaproximadamente +10 mV, en donde la

mayoría de los canales están abiertos. A medida que V_m aumenta más, las corrientes disminuyen, debido a la reducción de la fuerza impulsora de los iones de Ca^{2+} cuando nos acercamos al potencial de reversión para el calcio, $E_{Ca}{}^{2+}$ (Hille, 2001). Una curva que representa el pico de la corriente en función del voltaje aplicado en la despolarización (curva I/V), obtenida experimentalmente en nuestro laboratorio, se muestra en la figura 1.5.

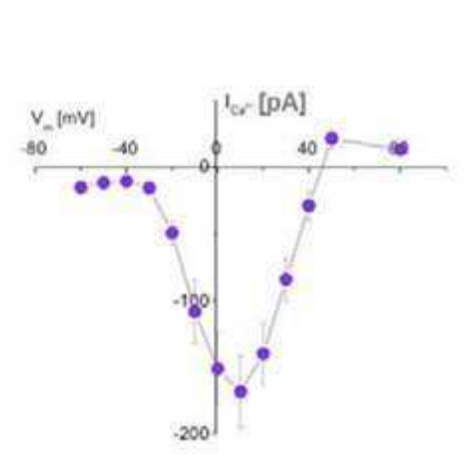

Figura 1.5 - Dependencia de la I_{Ca2+} con el V_m en células cromafines de ratón. En esta figura se muestra una curva de la corriente de Ca^{2+} máxima en función del potencial aplicado durante la despolariza-ción. Esta curva se obtuvo experimental-mente mediante la aplicación de pulsos despolarizantes desde el valor del potencial de mantenimiento de –80 mV hasta los valores de potencial deseados, los cuales están expresados en la abscisa del gráfico.

En base a sus propiedades biofísicas y farmacológicas, se han identificado y clasificado distintos tipos de CCDV. En principio se distinguieron dos grupos: los que necesitan de una despolarización por voltajes altos para ser activados (*HVA*, *high voltage activated*), y un segundo grupo que se activa por voltajes bajos (*LVA*, *low voltage activated*). El hallazgo de toxinas y/o fármacos específicos que bloquean los canales de Ca^{2+} permitió una mejor categorización de los mismos. Dentro de los canales *HVA* se pueden distinguir los subtipos: N, P/Q, R y L. La corriente tipo N es bloqueada irreversiblemente por el péptido llamado ω-conotoxina-GVIA, proveniente de un caracol marino *Conus geographicus* (Kerr *et al.*, 1984; Olivera *et al.*, 1985). Las corrientes tipo P/Q son bloqueadas con alta especificidad por un componente peptídico del veneno de araña *Agenelopsis aperta* conocido como ω-agatoxina IVA (Mintz *et al.*, 1992). El canal de tipo R es bloqueado específicamente por la toxina peptídica SNX-482, aislada del veneno de la tarántula africana *Hysterocrates gigas* (Bourinet *et al.*, 2001; Newcomb *et al.*, 1998). Finalmente, las corrientes denominadas de tipo L son sensibles a las dihidropiridinas (ver Tabla 1.1) (Davies *et al.*, 2008). Por otro lado, los canales LVA son los llamados de tipo T.

Los canales de tipo T no se expresan normalmente en células cromafines en cultivo, pero se demostró que la subunidad α_{1H}, que forma el poro de estos canales, se expresa en respuesta a incubaciones prolongadas en AMP cíclico, a una estimulación β adrenérgica (Novara *et al.*, 2004), o por exposición a hipoxia (Carbone *et al.*, 2006). Farmacológicamente, los canales tipo T son más sensibles al bloqueante inorgánico Ni^{2+} que a Cd^{2+} (Fox *et al.*, 1987).

Tipo de Corriente		Subunidad	Activación	Distribución	Farmacología
L	$Ca_V1.1$	α_{1S}	HVA	Músculo esquelético	Dihidropiridinas
	$Ca_V1.2$	α_{1C}		Células cromafines, SNC, músculo cardíaco, células endócrinas	
	$Ca_V1.3$	α_{1D}		Células cromafines, SNC, páncreas, riñón, cóclea, oído	
	$Ca_V1.4$	α_{1F}		Retina	
P/Q	$Ca_V2.1$	α_{1A}		Células cromafines, dendritas, terminales nerviosas	ω-agatoxina-IVA
N	$Ca_V2.2$	α_{1B}		Células cromafines, dendritas, terminales nerviosas	ω-conotoxina-GIVA
R	$Ca_V2.3$	α_{1E}		Células cromafines, dendritas, terminales nerviosas, cuerpos celulares	SNX-482
T	$Ca_V3.1$	α_{1G}	LVA	SNC	Mibefradil
	$Ca_V3.2$	α_{1H}		Células cromafines*, neuronas, músculo cardíaco	
	$Ca_V3.3$	α_{1I}		SNC	

Tabla 1.1 - Nomenclatura, distribución y farmacología de los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje. Los canales tipo T son activados por voltaje bajos (LVA), mientras que el resto son activados por voltajes altos (HVA). Los subtipos de canales detectados en las células cromafines son los P/Q, L, N y R. (*) Los canales T no se expresan normalmente en células en cultivo, pero son reclutados en condiciones específicas de estimulación. Figura tomada y modificada de Davies y Zamponi, 2008; García *et al.*, 2006.

1.2.1.2 Fuentes intracelulares de calcio

Las células cromafines poseen varios compartimientos intracelulares capaces de acumular Ca^{2+} en su interior. Entre estos, se encuentran las mitocondrias, el retículo endoplásmico (RE) y las vesículas secretorias. Si bien en situaciones patológicas de sobrecarga de Ca^{2+} citosólico las mitocondrias pueden acumular grandes cantidades de Ca^{2+}, en condiciones fisiológicas estas organelas no acumulan Ca^{2+} en forma significativa (Gunter *et al.*, 1994). Incluso, la concentración de Ca^{2+} libre intramitocondrial es sólo levemente más alta que la citosólica, y la mitocondria no participaría activamente en procesos de liberación de Ca^{2+} (Gunter *et al.*, 1994). Por ello, en este capítulo nos

centraremos en el rol del RE y las vesículas secretorias, tanto en lo que se refiere a procesos de liberación como de recaptación del Ca^{2+} citosólico.

El RE posee una alta capacidad de acumular Ca^{2+} por la existencia de una bomba, llamada Ca^{2+}-ATPasa del retículo sarco-endoplásmico o SERCA (Mathiasen *et al.*, 1993), la cual es sensible a la droga tapsigargina (Lytton *et al.*, 1991). Ésta se localiza en la membrana de dicha organela, y transporta el Ca^{2+} desde el citosol a contra–gradiente, y con gasto de la energía de enlace del ATP, acumulándolo en el lumen del RE. La presencia de dicha bomba permite la formación de un importante gradiente de Ca^{2+} entre el lumen del RE y el citosol, ya que la concentración de Ca^{2+} libre basal en ambos compartimentos es del orden de ~500 µM (Montero *et al.*, 1995) y ~100 nM (Meldolesi *et al.*, 1998), respectivamente, lo que habilita a esta organela a ser una potencial fuente de este catión. El RE participa de las señales de Ca^{2+} en innumerables tipos celulares, jugando un rol central en la homeostasis del Ca^{2+} citosólico (Fabiato, 1983; Rigual *et al.*, 2002). El RE posee canales activables por ligando que son regulados por mensajeros intracelulares específicos, que permiten la liberación de Ca^{2+} al citosol (Berridge, 1993; Inoue *et al.*, 2003). Existen dos tipos de canales activados por ligando. Por un lado, tenemos a los canales activables por inositol 1,4,5-trifosfato, o receptores de IP_3 (IP_3R), cuyo principal activador es IP_3, aunque también son regulables por Ca^{2+}. Por otro lado están los receptores de rianoidina (RyR), los cuales son activados por Ca^{2+}, a concentraciones menores que las necesarias para activar al IP_3R. En consecuencia, un aumento del Ca^{2+} citosólico provocado por la activación de CCDV puede activar por sí solo a los RyR, conduciendo a la salida de dicho catión desde el RE, y contribuyendo por lo tanto a un aumento aún mayor del Ca^{2+} citosólico. Es decir, que este proceso actúa como un mecanismo de amplificación de la señal de Ca^{2+}. Este fenómeno, llamado liberación de calcio inducida por calcio, fue observado por primera vez en células musculares esqueléticas, aunque constituye la fuente principal de Ca^{2+} en células cardíacas (Fabiato, 1983). En estos modelos experimentales, el subtipo L de canales de calcio tiene un rol preponderante en la activación de estos receptores debido a un íntimo acople espacial entre las dos proteínas.

Otra posible fuente de Ca^{2+} son las vesículas secretorias. La [Ca^{2+}] total en estos compartimentos se ha estimado en valores tan altos como ~40 mM (Hutton, 1989; Winkler *et al.*, 1980). La mayoría de este Ca^{2+} está asociado a la matriz vesicular (cromograninas), y sólo el 10% está libre dentro de la vesícula. La acumulación del Ca^{2+} se produce a través de una ATPasa sensible a tapsigargina (Santodomingo *et al.*, 2008), y se reportó que es posible inducir la liberación de este catión desde las vesículas tanto frente al agregado de IP_3 como de cafeína (Huh *et al.*, 2005). Respecto a este último punto, es necesario aclarar que la cafeína es un inductor farmacológico de los RyR (Kong *et al.*, 2008). Incluso, algunos autores sostienen la posibilidad de que el Ca^{2+} intravesicular pudiera contribuir a a la exocitosis de la mismas vesículas (Santodomingo *et al.*, 2008). En este sentido, existen evidencias que sugieren que el Ca^{2+} liberado desde dichas vesículas puede inducir la movilización vesicular y su posterior exocitosis (Borges *et al.*, 2012).

1.2.2 Sistemas de remoción y regulación del Calcio citosólico

Como se mencionó en la sección anterior, en condiciones de reposo el Ca^{2+} celular se encuentra acumulado a altas concentraciones en el RE, y se mantiene a baja concentración en el citosol. Por otro lado, en ausencia de estimulación las mitocondrias alcanzan niveles de Ca^{2+} un poco más altos que los citosólicos (Gunter *et al.*, 1990). Frente a un aumento del Ca^{2+} citosólico por la entrada de Ca^{2+} desde las distintas fuentes, la célula debe volver luego a las condiciones basales. Frente a este escenario, las células cromafines poseen diversos mecanismos encargados de remover el Ca^{2+} del citosol.

La remoción de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática se debe a la operación conjunta de una Ca^{2+}-ATPasa (estequiometría 1 Ca^{2+} / ATP) y del intercambiador $3Na^{+}/1Ca^{2+}$ (Herrington *et al.*, 1996; Pan *et al.*, 1997). Estos dos mecanismos funcionando simultáneamente son capaces de disminuir la [Ca^{2+}] citosólico a una velocidad máxima de ~0.2 µM/s en células cromafines de rata a 27°C (Park *et al.*, 1996).

De la tres isoformas de la Ca^{2+} ATPasa del RE que existen, en las

células cromafines se detectaron dos isoformas de pesos moleculares 116 y 100 kDa que corresponden a los subtipos SERCA 2b y SERCA 3, respectivamente (Poulsen *et al.*, 1995). Estas ATPasas poseen una estequiometría de 2 Ca^{2+} removidos por ATP hidrolizado (Villalobos *et al.*, 2002), y presentan una velocidad máxima de remoción de Ca^{2+} ubicada en el rango de entre 1 y 1.5 µM/s.

Finalmente, es importante destacar que las células cromafines poseen *buffers* endógenos de Ca^{2+}, tanto fijos como móviles, que cumplen una función muy importante tanto en la regulación de la intensidad como en la distribución espacial y temporal de las señales de Ca^{2+}(Marengo *et al.*, 2000). Por ejemplo, durante la activación de los CCDV se genera un aumento en la concentración de Ca^{2+} cercano a la membrana plasmática, que puede alcanzar concentraciones entre 10 µM y 100 µM (Neher, 1998; Neher *et al.*, 1992, Marengo, 2000 #107). La presencia de *buffers* citosólicos fijos enlentecen la disipación del gradiente de Ca^{2+}, restringiéndolo en tiempo y en espacio (Marengo *et al.*, 2000; Neher *et al.*, 1992).

1.2.3 Características espaciales y temporales de las señales de calcio

Todos los elementos descriptos (canales, compartimientos intracelulares, *buffers*, sistemas de remoción), intervienen en la generación/modulación de señales transitorias Ca^{2+} citosólico. Sin embargo, como ya habíamos mencionado previamente, la señal relevante de Ca^{2+} para la exocitosis es la que ocurre próxima a la membrana plasmática, que se produce gracias a la activación de los CCDV. Esta señal depende fundamentalmente de la cinética de activación/inactivación de dichos canales, de la difusión del Ca^{2+} en el citosol y de las propiedades de los *buffers* de Ca^{2+} citosólicos (Marengo *et al.*, 2000). Usando sensores fluorescentes de Ca^{2+} iluminados por un láser pulsado en células cromafines bovinas, se reportó que luego de la activación de los CCDV por medio de una despolarización breve (50 ms), los gradientes de Ca^{2+} se manifiestan rápidamente (<5 ms), y se disipan en aproximadamente

300 ms (Marengo *et al.*, 2000; Monck *et al.*, 1994). Resultados similares fueron obtenidos en células bovinas y de ratón usando la técnica de microscopia de escaneo lineal (Ales *et al.*, 2005). La distribución del Ca^{2+} observada pudo ser explicada simplemente por la entrada de Ca^{2+}, el ligado a *buffers,* y la difusión del Ca^{2+} y los *buffers* (Marengo *et al.*, 2000, 2003). De estos resultados, se concluyó que la capacidad buffer del citosol es altísima, ya que comparando la cantidad total de Ca^{2+} que ingresa al citosol, medida por la integral de la corriente de Ca^{2+}, con el aumento citosólico de la [Ca^{2+}] obtenida del promedio espacial de la fluorescencia, se observa que sólo el 0.1% del Ca^{2+} que ingresa a la célula está libre en el citosol, mientras que la mayoría del Ca^{2+} está ligado a los *buffers*. También se observó que los gradientes de Ca^{2+} inducidos no recibían contribución de la liberación de Ca^{2+} desde el RE (ya sea inducida por Ca^{2+} o por IP_3) (Marengo *et al.*, 2003). Más aún, la inhibición farmacológica de los transportadores de Ca^{2+} activos de la mitocondria y RE, o la supresión del intercambiador de Na^+/Ca^{2+}, no generaron efectos en la magnitud ni en la velocidad de decaimiento de los gradientes, sugiriendo que los *buffers* de Ca^{2+} endógenos pasivos son los responsables de la redistribución del Ca^{2+} bajo estas condiciones. Resultados similares se observaron frente a una estimulación con trenes de PA a baja frecuencia, en donde la I_{Ca2+}, la velocidad de difusión del Ca^{2+} y el ligado del catión a los *buffers* citosólicos fueron los mecanismos que determinaron la forma de la señal de Ca^{2+} citosólico (Villalobos *et al.*, 2002).

Después de la disipación del gradiente de Ca^{2+}, la concentración de Ca^{2+} permanece uniformemente elevada y luego retorna lentamente a su valor basal (Marengo *et al.*, 2003). Este proceso se lleva a cabo por sistemas de trasporte en los cuales la mitocondria, la ATPasa del RE y el intercambiador de Na^+/Ca^{2+} tendrían un papel importante en las células cromafines (Figura 1.6) (Ales *et al.*, 2005; Herrington *et al.*, 1996; Marengo, 2005; Marengo *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 1997; Villalobos *et al.*, 2002).

La señal de Ca^{2+} que se genera por la apertura de CCDV en dominios próximos a la membrana plasmática no es uniforme. La entrada de Ca^{2+} por los canales es naturalmente discontinua espacialmente. Como consecuencia, se

generan micro o nanodominios de [Ca^{2+}] altas alrededor de los canales de Ca^{2+}. Se modeló que dichos microdominios alcanzan concentraciones mayores a 10 micromolar de Ca^{2+} (Simon *et al.*, 1985); pero en contraposición, la concentración de Ca^{2+} decae a niveles cercanos al reposo a 300 nm de la boca del canal (Chad *et al.*, 1984). Esto toma particular importancia cuando se considera que las vesículas secretorias también se distribuyen de manera discontinua en la membrana, existiendo grupos de vesículas que se encuentran cerca y grupos que se encuentran lejos de los canales de Ca^{2+}, teniendo en consecuencia diferente probabilidad de liberación. Hay evidencias experimentales que avalan esta hipótesis. Usando la técnica de laser pulsada, Monck y colaboradores (1994) midieron la generación de *hotspots* de Ca^{2+} en la periferia de células cromafines bovinas en respuesta a pulsos despolarizantes (Monck *et al.*, 1994). Además, en experimentos combinando la técnica de imágenes por láser pulsado con amperometría, se logró mapear la coexistencia espacial de dichos *hotspots* de Ca^{2+} con sitios de exocitosis (Monck *et al.*, 1994; Robinson *et al.*, 1995). También en células cromafines bovinas, usando microscopia de campo evanescente para medir la [Ca^{2+}] cercano a la membrana, Becherer y colaboradores, establecieron una correlación entre la fusión vesículas únicas y la aparición de microdominios de Ca^{2+} asociados a la activación de CCDV (Becherer *et al.*, 2003).

La colocalización de canales de Ca^{2+} con los sitios de liberación vesicular es difícil de reconciliar con la función fisiológica de estas células, que liberan hormonas al torrente sanguíneo. Mientras que en las sinapsis las vesículas se fusionan a velocidades < a 1 milisegundo después de un PA (Robitaille *et al.*, 1990), en las células neuroendócrinas la fusión puede llegar a ser hasta 100 veces más lenta (Spruce *et al.*, 1990; Zhou *et al.*, 1995). Sin embargo, como veremos luego, las vesículas que se localizan próximas a los canales de Ca^{2+} son sólo una pequeña proporción de las vesículas liberables totales, y explican un pequeño componente de liberación rápida presente en estas células (Voets *et al.*, 1999).

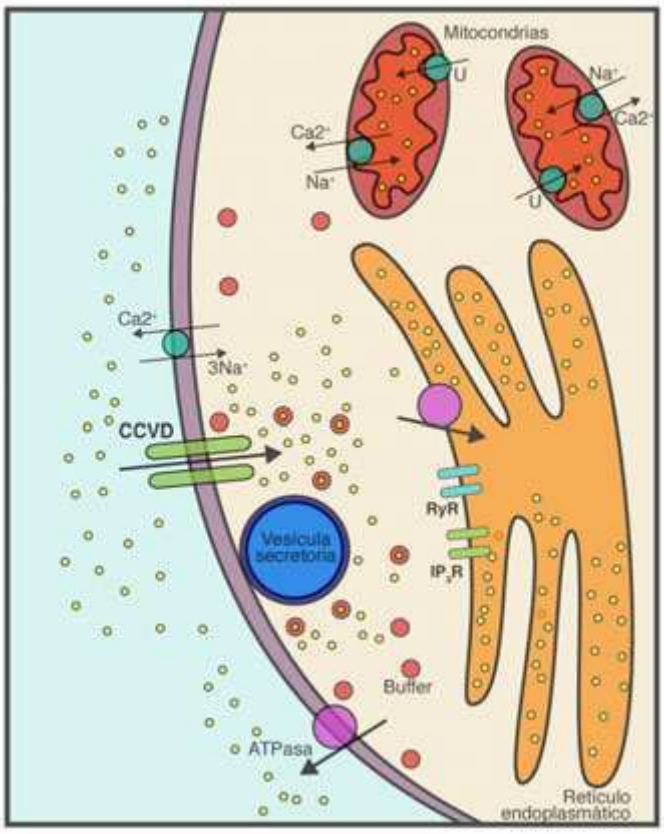

Figura 1.6 - Mecanismos involucrados en la formación y regulación de la señal de Ca^{2+}. En resumen, el Ca^{2+} que ingresa por los CCDV es el responsable fundamental de la exocitosis de las vesículas secretorias. Este mismo Ca^{2+} puede potencialmente inducir la liberación de Ca^{2+} por los RyR del RE. La liberación desde el RE también puede producirse por los IP_3R. Los sistemas de remoción del calcio citosólico son: La mitocondria que capta este catión por el uniporter (U), los mecanismos de extrusión a través de la membrana plasmática, que se deben a la operación conjunta de una Ca^{2+}-ATPasa y del intercambiador de Na^+/Ca^{2+}, y finalmente la Ca^{2+} ATPasa del RE. Finalmente los *buffers* en el citosol regulan la intensidad y la extensión de la señal de Ca^{2+}. Figura adaptada de García *et al*., 2006.

1.3 EXOCITOSIS EN CÉLULAS CROMAFINES

La exocitosis es el proceso de fusión de una vesícula lipídica intracelular a la membrana plasmática, que puede involucrar la secreción al espacio extracelular de diferentes tipos de moléculas contenidas en dichas vesículas. Este proceso está presente en todas las células eucariotas, y se genera a través de mecanismos muy conservados. Todas las células presentan una exocitosis de tipo constitutiva, que forma parte del normal reciclado de lípidos y proteínas entre la membrana plasmática y el interior de la célula. Esta

exocitosis constitutiva es activa a los bajos niveles de Ca^{2+} del citosol en la célula en reposo (Sorensen, 2004). En cambio, la secreción de mensajeros químicos como neurotransmisores u hormonas, que se observa tanto en terminales nerviosas como en células endocrinas y neuroendocrinas, depende de una exocitosis finamente regulada por la concentración del Ca^{2+} citosólico, el cual debe superar ciertos valores críticos para activarla. Por lo tanto, para disparar este mecanismo es necesaria la elevación del Ca^{2+} intracelular, la cual se produce fundamentalmente como consecuencia de la apertura de los CCDV, fisiológicamente activados ante la propagación de PA (Neher *et al.*, 1992). Si bien las exocitosis constitutiva y la regulada por Ca^{2+} cumplen funciones distintas, los pasos que deben cumplir las vesículas antes de fusionarse son similares en ambos casos.

El primer paso que se debe cumplir para que una vesícula pueda fusionarse es el anclado o *docking*, en el cual las vesículas se aproximan a la membrana plasmática estableciendo algún tipo de contacto con ella (Figura 1.7). La definición de este proceso presenta contradicciones en la literatura, ya que algunos autores se basan en definiciones morfológicas y otros en definiciones a nivel molecular. Las primeras se basan en estudios de microscopía electrónica, y se refieren a las vesículas que se encuentran próximas a la membrana plasmática, en general a una distancia inferior a 200 nm (Ashery *et al.*, 2000). Sin embargo, dado que las células cromafines poseen una enorme cantidad de vesículas, parecería que esta definición es muy poco precisa e involucraría una población muy heterogénea de vesículas. Por otro lado, los autores que definen el *docking* a nivel molecular estudian la interacción específica entre proteínas vesiculares y de la membrana plasmática. Pevsner y colaboradores reportaron que la sinaptotagmina, la sintaxina y la neurexina 1 intervienen en el anclado (Pevsner *et al.*, 1994). Otros autores, mediante el uso de ratones transgénicos, evidenciaron que la Munc18 y la sintaxina participaban de este proceso (Borisovska *et al.*, 2005; Sorensen *et al.*, 2003). De hecho, la deleción de Munc18 generó una gran reducción del número de vesículas ancladas a la membrana, y una pérdida total en la secreción en células cromafines (Voets *et al.*, 2001b). Otras proteínas que estarían involucradas en el anclado de las vesículas a la membrana son la Rab3 y la proteína RIM (*Rab3-interacting*

molecule) (Sudhof, 2004). Las proteínas Rabs3 son pequeñas GTPasas, que se ligan a la membrana de las vesículas secretorias mediante grupos hidrofóbicos ubicados en el C-terminal.

Luego del anclaje, las vesículas secretorias deben atravesar un proceso de activación o *priming* (Figura 1.7). Durante este proceso las vesículas ancladas adquieren la capacidad de fusionarse frente a una señal de Ca^{2+} apropiada. El *priming* es un proceso complejo que involucra varios pasos, y que requiere ATP y Ca^{2+} (Holz *et al.*, 1989, Sorensen, 2004 #119). Este proceso lleva finalmente a formación/maduración del complejo *trans*-SNARE (por *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*), que es el complejo proteico involucrado en la fusión. La formación del complejo *trans*-SNARE implica la interacción entre ciertas proteínas de la membrana plasmática (t-SNARE) y de la membrana vesícular (v-SNARE) (Fasshauer, 2003; Jahn *et al.*, 1999; Rizo *et al.*, 2002).

En sinapsis y en células neuroendocrinas, el v-SNARE es la sinaptobrevina o VAMP, la cual forma un complejo estable con las t-SNAREs, SNAP-25 y sintaxina, que se ubican en la membrana plasmática. La cristalización del complejo SNARE reveló la existencia de cuatro α hélices, una de sintaxina, una de sinaptobrevina y dos de SNAP-25 (Sutton *et al.*, 1998). Diversas proteínas accesorias están involucradas en la regulación, reciclado, y/o formación del complejo SNARE, como NSF, αSNAP, Munc13, Munc18 y otras.

La formación del complejo *trans* SNARE precisa del reciclado de los complejos SNARE que han sido ya utilizados. Este es un proceso dependiente de ATP, en el que intervienen las proteínas NSF y αSNAP. La NSF es una chaperona, que utiliza la energía de hidrólisis del ATP y a α-SNAP como cofactor para catalizar el desarmado de los complejos SNARE que quedaron en conformación *cis* (en el mismo lado de la membrana plasmática), luego de un proceso de exocitosis previo. Esto permite la reutilización de las proteínas SNARE en un nuevo proceso de fusión (Kibble *et al.*, 1996; Sollner *et al.*, 1993).

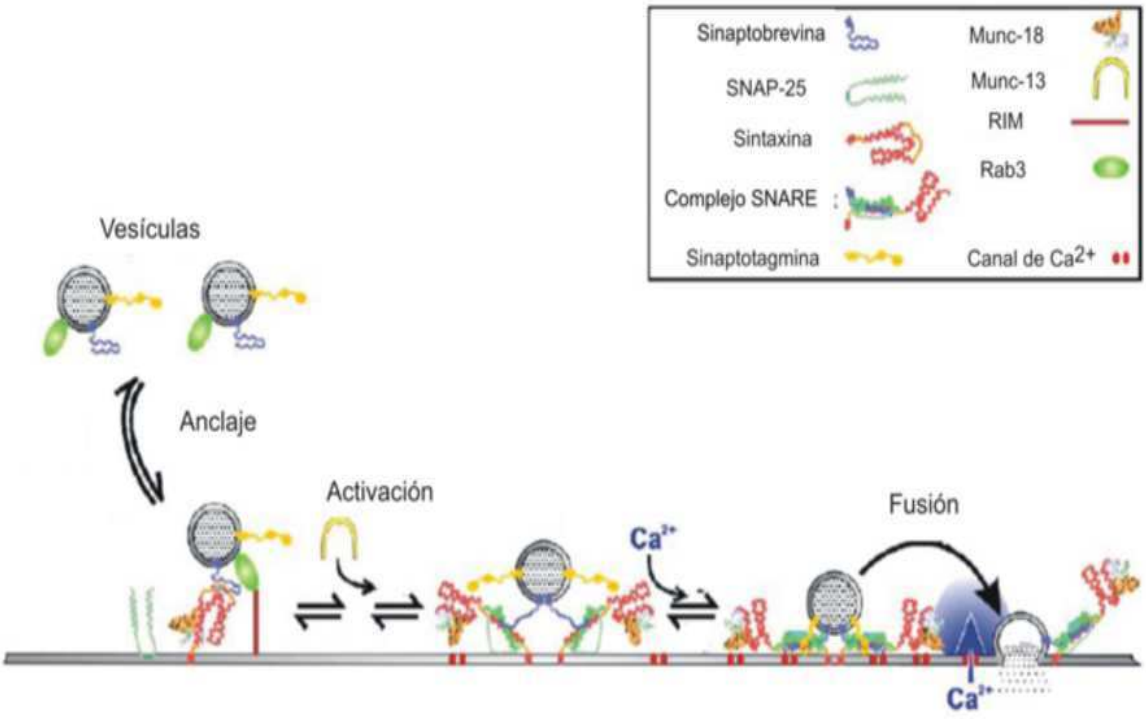

Figura 1.7-Representación de los pasos de la exocitosis, y de las distintas proteínas involucradas en cada paso. En el anclado, la vesícula se posiciona próxima a la membrana debido ciertas interacciones proteicas, entre las cuales estarían involucradas la GTPasa Rab3, RIM, Munc 18 y sintaxina. En la activación, las vesículas experimentan una serie de procesos que las prepara para ser exocitadas frente a una señal de Ca^{2+} apropiada. En esta etapa ocurrirían una serie de reacciones que contribuyen a la activación de las proteínas v-SNARE (sinaptobrevina) y las proteínas t-SNARE (SNAP 25 y sintaxina), y a la consecuente alineación de las mismas. En la exocitosis regulada se produce un cambio conformacional en las proteínas del complejo SNARE en respuesta al incremento de la concentración citosólica de Ca^{2+}. Este incremento se genera por el influjo del ion por los CCDV. Esto lleva a que la interacción entre las proteínas pase de ser débil a fuerte, conduciendo a la aposición y aproximación de las membranas vesicular y plasmática que finalmente generan el poro de fusión. Figura tomada y modificada de Becherer y Rettig, 2006.

Una vez finalizado el *priming*, el complejo *trans* SNARE sufre un proceso exergónico desde el punto de vista energético llamado *zippering*, el cual conduce finalmente a la fusión. El *zippering* consiste en la formación de un estado *coil-coiled* entre las distintas alfa hélice que forman el SNARE, empezando desde el N-terminal y terminando en el C-terminal (Borisovska *et al.*, 2005; Sorensen *et al.*, 2006). Esto lleva a la aproximación de una membrana con la otra (Figura 1.7), reduciendo así la energía de activación necesaria para la fusión (Jahn *et al.*, 2003). La aproximación íntima de las

membranas aumenta la probabilidad de fusión entre ambas, llevando a la formación de un poro de fusión entre los medios extracelular e intracelular (Han *et al.*, 2004). Este proceso se realiza en dos pasos: primero las membranas se aproximan, venciendo las fuerzas electroestáticas, y luego se desestabilizan las porciones hidrofílica e hidrofóbica de la bicapa lipídica**.** Todas estas transiciones están gobernadas por fuerzas que minimizan la exposición de superficies no polares al medio acuoso.

Los eventos de anclaje y activación son etapas necesarias para que las vesículas alcancen el estado de maduración final para fusionarse. Sin embargo, en el caso de la exocitosis regulada por Ca^{2+}, la fusión vesicular ocurrirá solamente con alta probabilidad cuando el aumento citosólico de Ca^{2+} supere cierto valor umbral (1-10 μM) en la región próxima a las vesículas (Sugita, 2008). En estos casos particulares la fusión requiere, además de la presencia de proteínas SNARE, de la existencia de un sensor de Ca^{2+}, representado por las sinaptotagminas (Perin *et al.*, 1990). En general, la sinaptotagmina es una proteína vesicular que posee cinco sitios de unión a iones Ca^{2+}, que al ser ocupados llevan a la activación de la proteína, favoreciendo la unión de esta a la sintaxina y a ciertos lípidos de la cara interna de la membrana plasmática (Bennett *et al.*, 1992) (Figura 1.8). Esto, en conjunto con el *zippering* (Sutton *et al.*, 1998) del complejo SNARE, conlleva a la formación del poro de fusión. La finalización de este proceso conduce a la liberación del contenido vesicular a la brecha sináptica (Sugita, 2008) (en el caso de neuronas), o a la circulación sanguínea (en el caso de las células neuroendócrinas).

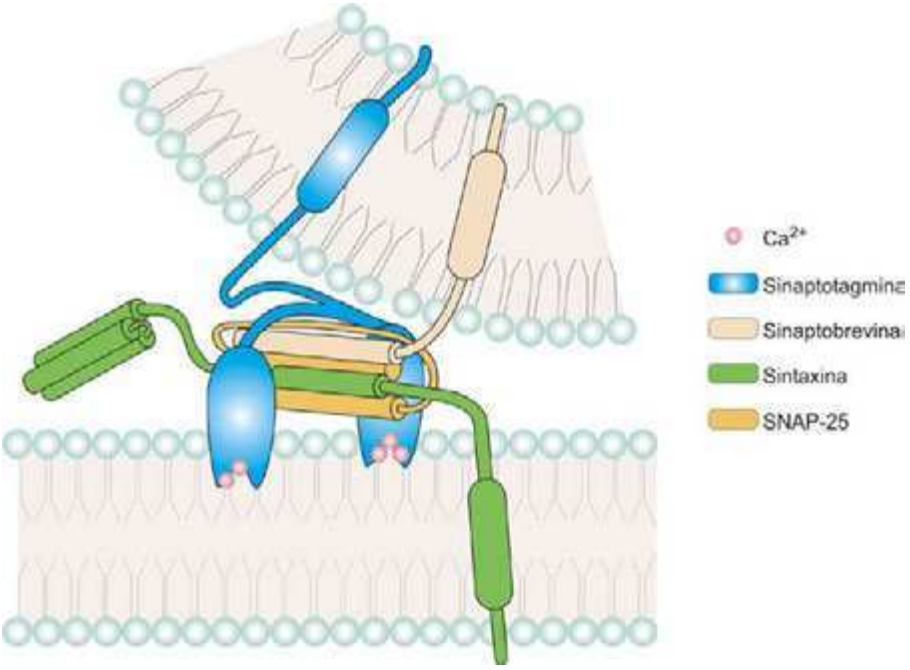

Figura 1.8- Esquema del complejo SNARE y la sinaptotagmina. El complejo SNARE está formado por la proteína vesicular sinaptobrevina (v-SNARE) y dos proteínas localizadas en la membrana plasmática, la sintaxina y SNAP-25 (t-SNARE). La sintaxina y la sinaptobrevina aportan sólo un dominio α-hélice al complejo, mientras que el SNAP-25 aporta dos. La sinaptotagmina es una proteína vesicular que funciona como sensor de Ca^{2+}. Esta proteína se une a fosfolípidos de membrana plasmática y a la sintaxina de forma dependiente de Ca^{2+}, favoreciendo la fusión de las membranas.

Una vez abierto el poro de fusión, la exocitosis puede seguir caminos diferentes. Estos pueden llevar al colapso completo de la vesícula con la membrana plasmática o a un proceso de fusión transitoria (Figura 1.9). En el primer caso, el poro de fusión se expande llevando a una integración total de la membrana vesicular con la membrana plasmática. En cambio, en una fusión transitoria, el poro de fusión permanece abierto durante un cierto tiempo, y luego vuelve a cerrarse, llevando a que la vesícula se recupere en el mismo sitio de fusión sin perder su identidad. A este proceso de exocitosis/endocitosis acopladas se le denomina generalmente *kiss and run*. Sin embargo varios autores han definido diferentes tipos de fusión transitoria de acuerdo al tiempo de apertura, conductividad y grado de selectividad del poro, como es el *fast kiss and run*, el *stand alone foot* y la *cavicapture* (Cardenas *et al.*, 2010, 2016). El *kiss and run* fue propuesto originalmente por Ceccarelli, (1973) utilizando microscopía electrónica en placa neuromuscular. Posteriormente, este modo de fusión vesicular se demostró en células cromafines en forma directa, mediante

una elegante combinación de mediciones de amperometría y capacitancia en *patch* con un grado de resolución de vesículas únicas (Albillos *et al.*, 1997; Ales *et al.*, 1999).

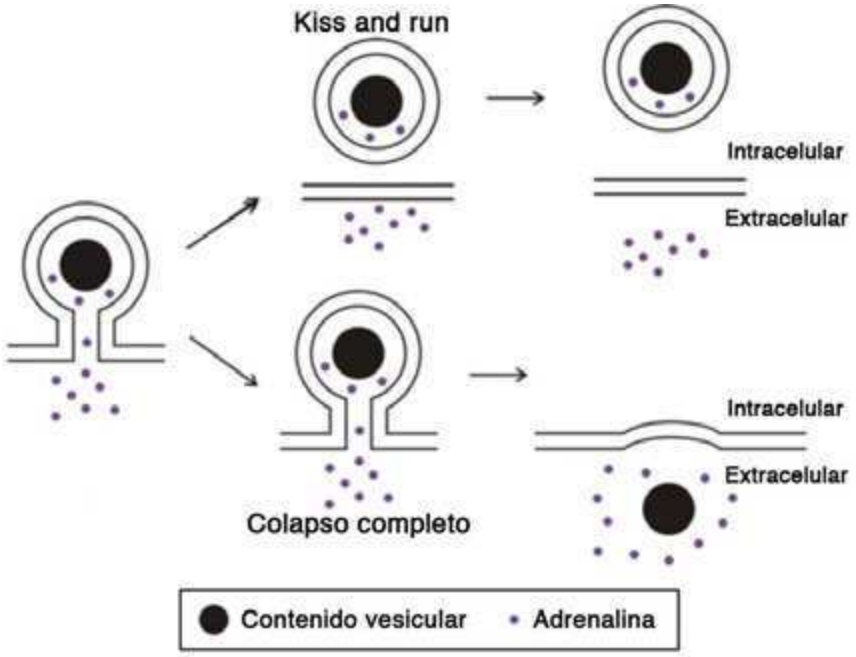

Figura 1.9- Representación de la secuencia de eventos del mecanismo de *kiss and run* y del colapso completo. Luego de la formación del poro, la vesícula puede recuperarse sin haber perdido su identidad (*kiss and run*) o colapsarse completamente en la membrana plasmática. Figura modificada de Chan *et al*., 2010.

1.4 LA CINÉTICA DE LA RESPUESTA SECRETORIA Y SU ASOCIACIÓN CON LOS GRUPOS DE VESÍCULAS

Desde el momento en que es formada hasta que es liberada, una vesícula sináptica debe pasar por muchas etapas. Comenzando con la biogénesis de la vesícula en el Golgi, siguiendo con su transporte por el citoesqueleto, su llenado con sustancias activas a través de transportadores específicos, su posterior disociación del citoesqueleto, el anclado físico a la membrana plasmática, su activación, y finalmente su fusión (Holz *et al.*, 1992; Neher *et al.*, 1993). Esta compleja secuencia de procesos, hace que en la

célula cromafin se establezcan *pools* vesiculares que se encuentran en distintas etapas de maduración. Para evidenciar la existencia de estos *pools* vesiculares es necesario, en primer lugar, disparar la exocitosis celular con una concentración homogénea de Ca^{2+}, de modo que no se generen diferencias de respuesta asociadas a la distribución espacial de las vesículas respecto de la fuente de Ca^{2+}. En segundo lugar, se debe utilizar una técnica de registro de la exocitosis de alta resolución temporal, que permita diferenciar los *pools* maduros de los inmaduros. En ese sentido, la técnica llamada *flash photolysis* de Ca^{2+} enjaulado permite obtener una rapidísima señal de Ca^{2+} que es espacialmente uniforme. Esta técnica consiste en ingresar al citoplasma un *buffer* de Ca^{2+} fotosensible unido a Ca^{2+}. Posteriormente, se aplica un pulso de luz ultravioleta que genera la modificación química del quelante, con una consecuente disminución de su afinidad al Ca^{2+} (Kaplan *et al.*, 1988). Por otro lado, la medición de la capacitancia celular por medio de la técnica de *patch clamp* en configuración *whole cell* tiene la resolución espacial necesaria para este tipo de experimentos (Neher *et al.*, 1982). Experimentos de *flash photolysis* en células cromafines, evidenciaron la presencia de dos componentes diferenciables cinéticamente en el aumento de la capacitancia celular asociado a la exocitosis: uno rápido que se completa en menos de un segundo y al cual se lo denomina *exocytotic burst*, y otro lento y sostenido que evoluciona por muchos segundos (Heinemann *et al.*, 1994). Mientras que el primero fue asociado a vesículas con capacidad para liberarse en forma directa frente al aumento de Ca^{2+}, es decir que han completado el anclado y la activación, el segundo es considerado como la manifestación cinética de un *pool* de reserva (RP, *reserve pool*), compuesto por vesículas inmaduras. El RP representa el *pool* de vesículas secretorias más grande de las células cromafines, con 2000 a 5000 vesículas (Heinemann *et al.*, 1994; Sorensen, 2004). Se ha determinado que el RP se compone en su mayoría de vesículas no ancladas a la membrana, y de una menor fracción de vesículas ya ancladas, a la que se denominó UPP (*unprime pool*), es decir un grupo de vesículas que ya se han anclado pero que aún no se han activado (Ashery *et al.*, 2000).

Mediciones de capacitancia con mayor resolución temporal permitieron identificar dentro del *exocytotic burst* dos componentes exponenciales, que se interpretaron como la existencia de dos grupos de vesículas con distintas cinéticas de liberación. Uno rápido, al cual se llamó *pool* de vesículas preparadas para liberarse (*RRP, ready releasable pool),* y otro más lento al que se denominó *SRP* (*slowly releasable pool*), ambos con 120-150 vesículas aproximadamente (Becherer *et al.*, 2006; Voets *et al.*, 1999). Las diferencias a nivel molecular entre las vesículas que componen a estos dos grupos no han sido totalmente resueltas hasta el momento. Sin embargo, se planteó que podrían responder a sensores de Ca^{2+} diferentes (Voets, 2000; Voets *et al.*, 2001a). Como el llenado del *RRP* se corresponde con un vaciamiento del *SRP* (Voets *et al.*, 1999), se postula que estos dos grupos vesiculares se ubicarían secuencialmente (Heinemann *et al.*, 1994; Sorensen, 2004; Voets *et al.*, 1999). En resumen, se plantea un esquema secuencial para todos los *pools* mencionados, en el sentido RP → UPP → SRP → RRP (Figura 1.11), donde las vesículas se movilizan desde los *pools* río arriba hacia los *pools* rio abajo (Ashery *et al.*, 2000).

Pese a los importantes avances que produjo la aplicación de la técnica de *flash photolysis* de Ca^{2+} enjaulado para la determinación de *pools* vesiculares, esta técnica no permite diferenciar a las vesículas en cuanto a su ubicación espacial, y por lo tanto de acuerdo a su acople con la fuente de Ca^{2+} que dispara la exocitosis. Desde el punto de vista fisiológico, dado que el Ca^{2+} proviene de fuentes puntuales, este aspecto puede ser muy importante en cuanto a la determinación de diferencias en la probabilidad de experimentar exocitosis entre las vesículas ya maduras. Por ejemplo, se ha calculado que las vesículas más cercanas a los canales de Ca^{2+} deben experimentar necesariamente una [Ca^{2+}] mucho más alta que las vesículas distantes cuando dichos canales son activados (Neher, 1998). Por lo tanto, tales vesículas se deberían liberar más rápidamente frente a un estímulo adecuado. Cuando se induce la liberación del RRP por un tren de despolarizaciones cortas, o por despolarizaciones individuales de duración creciente, se logra identificar un componente de exocitosis particularmente rápido, cuya liberación se completa en 25 a 100 ms, dependiendo de la preparación. Esta exocitosis rápida fue

asociada a un *pool* de vesículas altamente acoplado al estímulo, que se ubica dentro del RRP. A este *pool* se lo denominó *pool* inmediatamente liberable (IRP; *immediately releasable pool*) (Horrigan *et al.*, 1994; Voets *et al.*, 1999). Este pequeño grupo, con aproximadamente 10-40 vesículas (hasta ~25% del RRP), tiene en rebanadas de médula adrenal de ratón una tasa de liberación 5 veces mayor que las del RRP (Voets *et al.*, 1999) (Figura 1.10).

Las reacciones descriptas con flechas en la figura 1.10 pueden simbolizar tanto una relocalización espacial de las vesículas como un paso de maduración que no implique un traslado a nivel espacial.

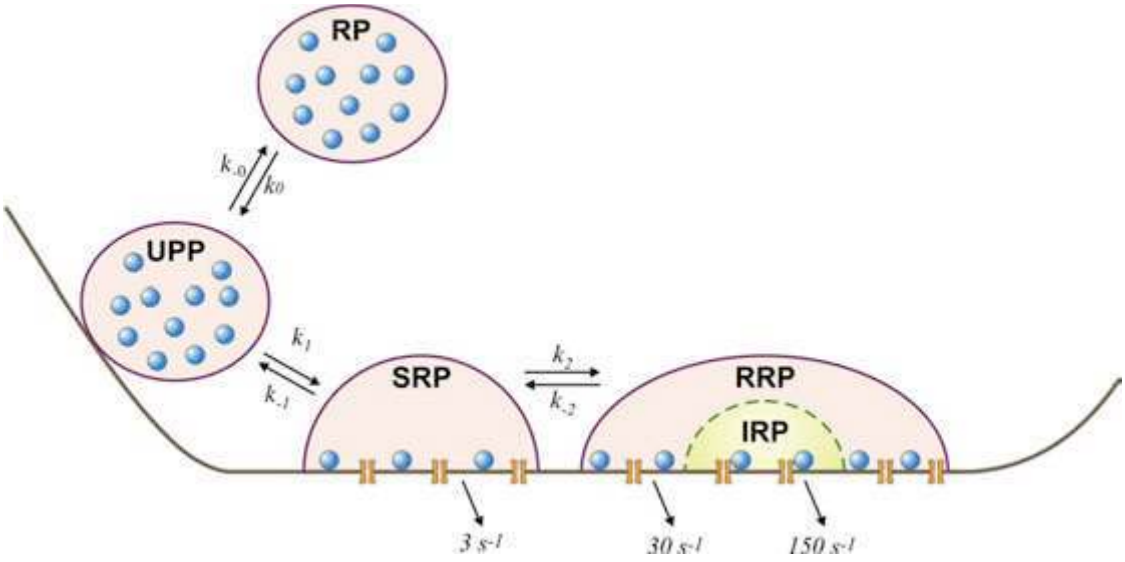

Figura 1.10- Diagrama representativo de los diferentes *pooles* funcionales de vesículas secretorias identificados en células cromafines. Estos *pools* se diferencian en su estado de maduración y/o su distribución espacial (ver texto). Figura adaptada de Ashery *et al*., (2000) y Voets *et al*., (1999).

1.5 ACOPLE ENTRE LOS CANALES DE CALCIO Y LAS VESÍCULAS SECRETORIAS

Todos los subtipos de CCDV mencionados en la sección 1.2.1.1, contribuyen a la exocitosis de vesículas sinápticas en células cromafines frente a la aplicación de un estímulo adecuado. Se demostró que frente a despolarizaciones largas, los distintos subtipos de CCDV participan en la secreción de manera proporcional a su contribución a la corriente total

(Engisch *et al.*, 1996). Este tipo de estimulación relativamente fuerte, no sólo libera las vesículas del IRP sino que también provoca la liberación de las demás vesículas del RRP (Horrigan *et al.*, 1994; Voets *et al.*, 1999), debido a que generan señales de Ca^{2+} que alcanzan regiones alejadas de los CCDV.

En contraposición a lo explicado en el párrafo anterior, la exocitosis inducida por despolarizaciones de corta duración (< 50 ms) está claramente asociada a tipos de canales particulares (Albillos *et al.*, 2000; Alvarez *et al.*, 2008). Por lo tanto, se postuló que del total de vesículas secretorias algunas pueden estar particularmente asociadas a ciertos subtipos de CCDV (Alvarez *et al.*, 2011). Por un lado, existen evidencias que sugieren que el subtipo de canal R está altamente acoplado a la exocitosis en *slices* de médula adrenal en ratón (Albillos *et al.*, 2000). Sin embargo, hay antecedentes más numerosos que asocian al canal P/Q con la exocitosis altamente acoplada al estímulo en células cromafines. Por ejemplo, Lara y colaboradores demostraron que el grado de inhibición que produce el bloqueante del canal P/Q ω-agatoxin IVA es mayor a baja concentración (0.5 mM) que a altas (5 mM) concentraciones de Ca^{2+} externo, donde se esperan señales de Ca^{2+} espacialmente más extendidas (Lara *et al.*, 1998). Desde otra perspectiva experimental, Aldea y colaboradores encontraron en ratones *KO* para el canal P/Q, que si bien la corriente de Ca^{2+} en estas células era completamente compensada por una sobreexpresión de canales tipo L, la eficiencia con que estas corrientes inducían exocitosis era significativamente menor que en las células provenientes de ratones salvajes (Aldea *et al.*, 2002). Por último, se observó en *slices* de la médula adrenal que la exocitosis inducida por un PA era particularmente sensible a la aplicación de ω-agatoxin IVA (Chan *et al.*, 2005b). La participación del canal P/Q en la exocitosis altamente acoplada al estímulo, y en particular en el IRP de células cromafines, fue estudiada en profundidad en nuestro laboratorio, lo cual se discutirá en la sección 1.8 de esta introducción.

La pregunta que surge es ¿cómo podría explicarse desde un punto de vista molecular la interacción entre tipos particulares de canales y vesículas? En terminales nerviosas del sistema nervioso central, se demostró que la

subunidad α_{1A} de los canales de calcio tipo N y P/Q posee una secuencia aminoacídica llamada *synaptic protein interaction site* (*synprin*t), o en castellano, sitio de interacción de proteínas sinápticas, que está ubicada en el *loop* intracelular entre los dominios II y III (Sheng *et al.*, 1998) (Figura 1.11). Se ha comprobado que *synprint* interactúa con proteínas de la maquinaria exocitótica tales como sintaxina, SNAP-25 y sinaptotagmina (Jarvis *et al.*, 2005; Rettig *et al.*, 1996), y también con otras proteínas sinápticas tales como la proteína CSP (*cysteine string protein*) y RIM (Davies *et al.*, 2008).

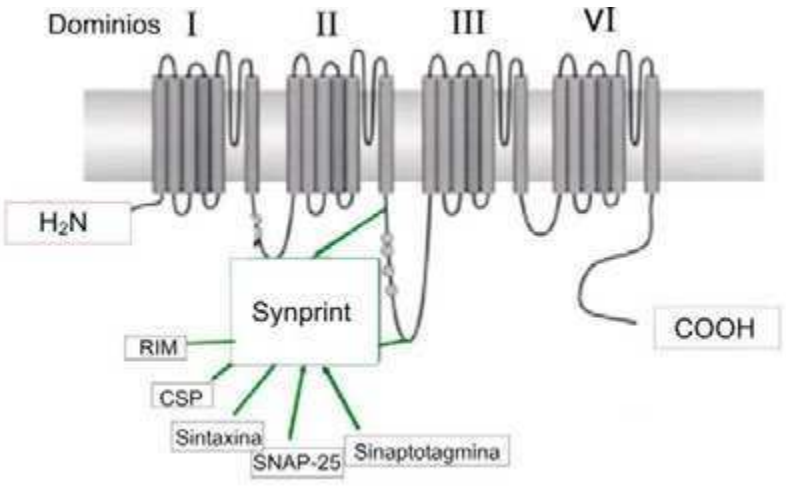

Figura 1.11- La figura representa la ubicación del sitio de interacción de proteínas sinápticas (*synprint*) en la molécula del canal de calcio. Este sitio se ubica en el *loop* intracelular ubicado entre los dominios II – III de la subunidad α_1 del canal de Ca^{2+} de tipo P/Q o N. Este sitio interactúa con varias proteínas sinápticas (conectadas a *synprint*). Figura tomada y modificada de Zamponi *et al*., (2003).

Se postuló que la función de *synprint* es mantener un acople físico entre las vesículas sinápticas y los canales de Ca^{2+}, de modo de aumentar la eficiencia del proceso de acople funcional estímulo-secreción en los terminales sinápticos. Por ejemplo, la inyección de *synprint* libre en el ganglio cervical simpático redujo al 42% la transmisión sináptica (Mochida *et al.*, 1996). Este resultado se interpreta suponiendo una competencia entre el *synprint* introducido con el *synprint endógeno,* que forma parte del canal, por las proteínas secretorias.

Adicionalmente, se postularon otras funciones para *synprint*. Existen datos que indican que la asociación entre el *synprint* y las proteínas de la maquinaria exocitótica regula la actividad de los canales de Ca^{2+}, determina la localización de los canales de calcio de tipo P/Q en la membrana, e interviene en los procesos endocíticos (Jarvis *et al.*, 2005, 2007; Zamponi, 2003). Respecto al modelo experimental utilizado en esta tesis, varios antecedentes indican que el *synprint* tendría importancia en el acople estímulo-secreción en células cromafines. Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron un acople funcional entre el canal de Ca^{2+} tipo P/Q y las vesículas secretorias de IRP, en donde interviene *synprint* (Alvarez *et al.*, 2013; Alvarez *et al.*, 2008), ver capítulo 1.8 de esta Introducción). Además, ensayos de co-inmunoprecipitación establecieron la interacción de la subunidad α_{1A} de este canal con los complejos SNARE (Andres-Mateos *et al.*, 2005). Finalmente, se observó que la subunidad α_{1A} del canal de Ca^{2+} tipo P/Q y la proteína SNAP-25 colocalizan en membranas intactas de células cromafines (Andres-Mateos *et al.*, 2005).

Además de la región *synprint*, la porción C-terminal de los canales tipo P/Q y N ha sido implicada en el direccionamiento de los canales de Ca^{2+} a la zona activa de la sinapsis (Catterall *et al.*, 2005b). En ese sentido, Maximov y colaboradores demostraron por ensayos *in vitro* e *in vivo* una asociación específica entre la porción C - terminal de las subunidades α_{1B} y α_{1A}, que forman el poro en los canales tipo N y P/Q, con proteínas sinápticas adaptadoras tales como Mint 1-1 y CASK (Maximov *et al.*, 1999).

1.6 MECANISMOS ALTERNATIVOS A LA EXOCITOSIS DEPENDIENTE DE CALCIO

En las secciones anteriores se explicó cómo ocurre la exocitosis dependiente de Ca^{2+}. Esta representa el mecanismo clásico de fusión en terminales sinápticas y células neuroendócrinas. Sin embargo, desde la década de los 80 se han recopilado antecedentes que apuntan a la presencia de mecanismos alternativos. Por ejemplo, se demostró que los análogos del nucleótido de GTP (particularmente GTP-γ-S y GMppNp) estimulaban la

secreción de enzimas lisosomales (en neutrófilos) e insulina (en líneas celulares) en ausencia de fuentes de Ca^{2+} (Pozzan *et al.*, 1984; Wollheim *et al.*, 1987). En base a estas observaciones se postuló que una proteína G estaría asociada a un mecanismo de neurotransmisión alternativo a la convencionalmente descripta hasta ese entonces (Knight *et al.*, 1989).

Las investigaciones publicadas por Parnas y colaboradores también postularon la presencia de mecanismos alternativos a la neurotransmisión mediada por Ca^{2+} (Hochner *et al.*, 1989). Desde estos trabajos surgió la hipótesis denominada "Ca^{2+}-voltaje", que sostiene que la neurotransmisión depende de dos factores: la entrada de Ca^{2+} y la despolarización de la membrana. Las bases de este postulado sostienen que el primer factor está asociado a la cantidad de neurotransmisor liberado, mientras que la despolarización de la membrana se relaciona con el transcurso temporal del proceso. Estos autores postularon que el sensor de voltaje implicado sería el receptor muscarínico de tipo 2 (M2R), que es un receptor asociado a proteína G (Parnas *et al.*, 2010).

La descripción mecanística de la hipótesis Ca^{2+}-voltaje se representa en la figura 1.12. En condiciones de reposo, el M2R se encuentra en su estado de máxima afinidad por los neurotransmisores presentes en el espacio sináptico, que en ese momento se encuentran a baja concentración. Este complejo se une con la maquinaria exocitótica, manteniéndola en un estado de inhibición tónica. En esta etapa la exocitosis prácticamente no ocurre, debido a que cerca de los sitios de liberación la concentración de Ca^{2+} es baja, y además, la maquinaria exocitótica está bloqueada. Luego de la despolarización de la membrana, cuando el potencial de acción llega a la terminal sináptica, dos procesos ocurren de manera paralela e independiente. El primero de ellos corresponde a la rápida apertura de los CCDV, con la consiguiente entrada de Ca^{2+}. Sin embargo, la ocurrencia de sólo este proceso no dispararía la exocitosis, debido a que la maquinaria de liberación todavía se encuentra bloqueada. El segundo proceso, que es independiente de la entrada de Ca^{2+}, involucra el cambio de afinidad del M2R, pasando de un estado de alta a uno de baja afinidad por el neurotransmisor. En ese momento el neurotransmisor, que se encuentra en una concentración muy baja en el espacio sináptico, se

desacopla del receptor en una fracción de milisegundos. Esto conlleva al desacople del M2R de la maquinaria exocitótica, liberándola de su estado de inhibición. A pesar de que este evento es rápido y ocurre en una fracción de milisegundos, sigue siendo aún más lento que la entrada de Ca^{2+}. Por lo tanto, este sería el factor limitante del inicio de la liberación y no la entrada de Ca^{2+}. Una vez que el Ca^{2+} ya entró por los CCDV es capaz de unirse a la maquinaria exocitótica (que se encuentra libre), iniciando así la liberación evocada de los neurotransmisores. Luego, cuando la membrana se repolariza, el receptor retorna a su estado de alta afinidad, en un proceso mucho más rápido que la remoción de Ca^{2+}. De esta manera, los receptores se vuelven a unir a los neurotransmisores, restaurando la inhibición tónica.

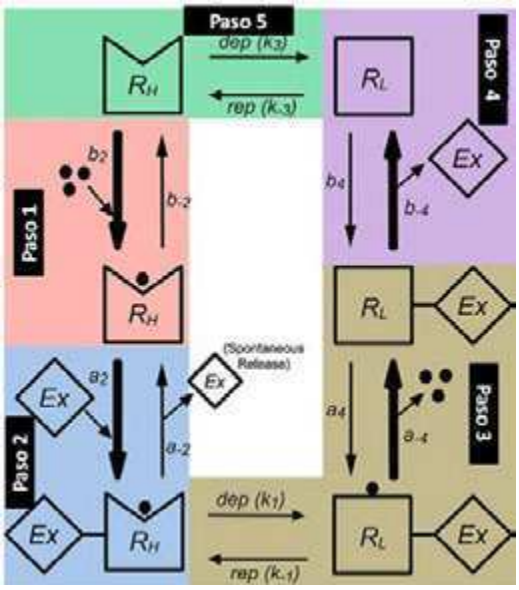

Figura 1.12- Esquema cinético que representa a nivel molecular la hipótesis Ca^{2+} - voltaje. A potencial de membrana en reposo (verde), el receptor está en su mayor estado de afinidad, R_H. **Paso 1** (rosa): En este estado, el receptor está unido al neurotransmisor (puntos negros), que se encuentra a muy baja concentración en el espacio sináptico para formar el complejo R_H -neurotransmisor. **Paso 2** (azul claro) El receptor unido al neurotransmisor se une a la maquinaria exocítica. Esto mantiene la maquinaria de liberación bajo un bloqueo tónico. Sin embargo, hay una pequeña fracción de maquinaria exocítica libre (EX) permitiendo la liberación espontánea. **Paso 3** (marrón). Luego de la despolarización, el receptor cambia a un estado de baja afinidad, el neurotransmisor se disocia del receptor (flecha gruesa). **Paso 4** (violeta): El receptor se desacopla de la maquinaria de liberación (EX), y el bloqueo tónico es removido. La maquinaria exocítica libre interactúa con el Ca^{2+} que ya ha entrado para comenzar con el proceso de liberación. **Paso 5** (verde): Luego de la repolarización, el receptor vuelve a su estado de alta afinidad y el bloqueo tónico es restablecido. (Figura tomada y modificada de Parnas y Parnas, 2010).

Estudios posteriores, confirmaron que la afinidad de estos receptores (M2R) por la maquinaria exocitótica dependía del potencial de membrana, siendo mayor a potenciales de reposo y menor a potenciales despolarizantes (Ilouz *et al.*, 1999; Linial *et al.*, 1997; Parnas *et al.*, 1987). Años más tarde, se demostró que el movimiento de cargas (o *gating currents*) de dicho receptor controlaba la neurotransmisión (Ben-Chaim *et al.*, 2006).

En otra línea, ciertos autores propusieron que, independientemente de su capacidad de transportar Ca^{2+}, los CCDV son capaces de participar en el disparo de la exocitosis gracias a su interacción con proteínas de la maquinaria de fusión. Esta hipótesis toma como punto de partida el concepto de *"excitosome"*, el cual se definió como un complejo proteico hipotético que participa en las etapas finales de la secreción (Atlas *et al.*, 2001). Distintas evidencias sostienen la existencia de tales complejos. Por ejemplo, se demostró que los canales de Ca^{2+} interactúan con proteínas que forman parte de la maquinaria exocítica, tales como sintaxina 1, SNAP 25 y sinaptotagmina. Ensayos *in vitro* de co-inmunoprecipitación, demostraron la interacción entre el dominio citosólico II-III de la subunidad α_{1B} del canal de Ca^{2+} tipo N (región *synprint*) con las proteínas sintaxina 1a y SNAP-25. Años más tarde, investigaciones *in vivo* revelaron que la interacción entre el canal de Ca^{2+} tipo N y la sintaxina 1a era importante en la liberación de neurotransmisores en sinapsis neuromusculares (Keith *et al.*, 2007). Partiendo de la existencia de tales complejos, otros autores propusieron que los canales de Ca^{2+} podían disparar la exocitosis en forma independiente a que se genere una corriente a través de ellos. En esta línea, trabajos del grupo de William Catterall sugieren que el canal de Ca^{2+} tipo N, al responder a la despolarización de la membrana, actúa directamente sobre el complejo SNARE, via *synprint,* favoreciendo el *docking* y disparando un tipo de neurotransmisión independientemente del influjo de Ca^{2+} (Mochida *et al.*, 1998). El resultado final del *cross talk* entre los componentes de estos complejos sería una respuesta secretoria rápida, y altamente acoplada a la despolarización de la membrana plasmática (Atlas *et al.*, 2001).

Años más tarde, se reportaron evidencias en células cromafines y en la línea celular HEK 293 que indicaban que la unión de Ca^{2+} al poro del canal de Ca^{2+} tipo L (sin la necesidad que lo permeen), era condición suficiente para desencadenar la exocitosis (Lerner *et al.*, 2006). Estudios posteriores demostraron que la administración de los moduladores alostéricos de este canal, tales como BayK8644 y FPL 64176, modificaban la cinética de secreción de catecolaminas independientemente del influjo de Ca^{2+} (Marom *et al.*, 2010). Tales hallazgos, sugirieron que los canales de Ca^{2+} actuarían como un sensor molecular en el proceso excitación-secreción en células neuroendocrinas en forma independiente al influjo de Ca^{2+} a la célula.

Finalmente, en neuronas sensoriales, Zhuan Zhou y colaboradores demostraron un estrecho acople entre el potencial de membrana y una exocitosis independiente de cambios citosólicos de Ca^{2+} (Zhang *et al.*, 2002). Sin embargo, estos autores no definieron cual sería el mecanismo operante en este proceso.

1.7 ENDOCITOSIS

La endocitosis es un proceso por el cual la membrana plasmática es invaginada, y mediante la fisión de dichas invaginaciones, conduce a la consecuente formación de vesículas, o alternativamente cisternas o vacuolas (Royle *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2014a). Por medio de este proceso, una fracción de membrana equivalente a la agregada por la fusión de las vesículas durante la exocitosis se reinternaliza, retornando además la superficie de membrana plasmática a sus niveles originales. La internalización de la membrana contribuye a recuperar los niveles estacionarios de los *pools* de vesículas deprimidos por la exocitosis, y también a restaurar la distribución de componentes proteicos de las fracciones de membrana plasmática e intracelular. La endocitosis se ha clasificado de acuerdo a criterios mecanísticos, como también de acuerdo a un criterio cinético en endocitosis lenta y rápida (Cardenas *et al.*, 2016).

1.7.1 ENDOCITOSIS DEPENDIENTE DE CLATRINA

Inmediatamente después del colapso completo de la vesículas sinápticas o secretorias con la membrana plasmática, éstas se recuperan en otra región de la membrana por invaginación de vesículas recubiertas de clatrina (Smith *et al.*, 2008). En el comienzo de este proceso intervienen distintas proteínas adaptadoras, entre ellas AP2, AP180 y epsin (Ferguson *et al.*, 2012). El reclutamiento de estas proteínas en sitios de la membrana plasmática ricos en fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato ($PI(4,5)P_2$) favorece la curvatura de la membrana (Ferguson *et al.*, 2012). Posteriormente, los monómeros de clatrina son reclutados, uniéndose a estas proteínas adaptadoras, y son luego ensamblados formando una cubierta fibrosa, promoviendo aún más la curvatura de membrana y su invaginación (Slepnev *et al.*, 2000). Luego de ello, la dinamina se une a la cubierta de clatrina a través de sus dominios SH3. Finalmente, el autoensamblamiento de muchos dímeros de dinamina, formando un collar o espiral alrededor del cuello de la vesícula en formación, termina por mediar la fisión (Takei *et al.*, 2005). Las características estructurales y funcionales de la dinamina se detallarán más en profundidad en la sección 1.7.4.

Trabajos iniciales en células cromafines reportaron que este tipo de endocitosis se desarrolla muy lentamente, completándose en un tiempo de aproximadamente ~15-30 minutos (Artalejo *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2003b). Sin embargo, trabajos más recientes en células β del páncreas (He *et al.*, 2008) y en neuronas (Royle *et al.*, 2010) determinaron para la endocitosis dependiente de clatrina constantes temporales menores a 10 segundos. En nuestro laboratorio, tenemos resultados aún no publicados que avalan estas últimas estimaciones para células cromafines.

En general, se define a la endocitosis mediada por clatrina como un mecanismo *compensatorio*, es decir, que internaliza una cantidad de membrana equivalente a la previamente liberada. La endocitosis compensatoria fue definida en células cromafines por Smith y Neher (1997) y por Engisch y Nowycky (1998). Por medio de registros de capacitancia, estos

autores demostraron que este proceso evolucionaba monoexponencialmente con una constante temporal que dependía de la [Ca^{2+}] citosólica, la cual era de unos 20 segundos aproximadamente frente a estímulos débiles, hasta unos 5 segundos si la estimulación es fuerte (Engisch *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1997). En nuestro laboratorio tenemos resultados no publicados que muestran que este proceso es fuertemente dependiente de clatrina (tesis doctoral de Ana Verónica Belingheri). Hay datos que sugieren que la endocitosis compensatoriaes activada preferentemente por una entrada de Ca^{2+} desde los canales de tipo L (Rosa *et al.*, 2011).

El colapso completo de las vesículas implica la integración total, y pérdida de identidad de la membrana vesicular en la plasmática. Por lo tanto la recuperación endocítica posterior debe realizarse por un mecanismo endocítico que genere vesículas nuevas, no preformadas, el cual puede ser la endocitosis mediada por clatrina o la endocitosis de tipo *bulk* (que se tratará posteriormente en este capítulo). Es importante tener en cuenta que durante el colapso completo se secreta el núcleo proteico electrodenso de las vesículas secretorias, formado por cromogranina y otras proteínas, el cual no puede ser recuperado por la endocitosis posterior. Por lo tanto, en general se considera que la endocitosis mediada por clatrina implica una recuperación muy lenta de las vesículas secretorias, ya que dicho proceso debe necesariamente involucrar al sistema de Golgi, donde las proteínas del núcleo denso vesicular se sintetizan *de novo* (Maxfield *et al.*, 2004).

1.7.2 Endocitosis en Exceso y Bulk Endocitosis

Luego de una estimulación muy fuerte (entrada de Ca^{2+}> 70 pC), que genera exocitosis masiva, se dispara un proceso denominado *endocitosis en exceso*, que recupera una cantidad de membrana mayor a la adicionada por exocitosis (Artalejo *et al.*, 1995; Engisch *et al.*, 1998; Neher *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1997). Este proceso, a diferencia de la endocitosis compensatoria, no sigue una relación continua con la entrada de Ca^{2+}, y por el contrario ocurre de una manera “todo o nada” luego de superar el umbral mencionado arriba. Desde el punto de vista cinético, este modo de endocitosis evoluciona de

manera rápida, con un componente inicial mucho más rápido que el observado para la endocitosis compensatoria, y un segundo componente que es cinéticamente similar a la compensatoria (t_1 = 600 mseg.; t_2 = 6 seg.).

Respecto al reciclado de membrana postendocítico, en nuestro laboratorio determinamos que la exocitosis en exceso es un fenómeno complejo, compuesto por un componente que recicla a vesículas secretorias en un tiempo < 2 minutos y otro componente que no recicla a vesículas, se localiza en al menos parcialmente en lisosomas, y está asociado a un mecanismo endocítico llamado endocitosis tipo *bulk* (Perez Bay *et al.*, 2012; Perez Bay *et al.*, 2007). La endocitosis de tipo *bulk* es un fenómeno por el cual se invaginan grandes porciones de membrana que forman vacuolas o cisternas, y que se dispara frente a procesos exocíticos masivos que pueden poner en riesgo la viabilidad celular (Betz *et al.*, 1992). El mecanismo molecular operante en la endocitosis tipo *bulk* es desconocido, pero hay datos recientes que sugieren que es dependiente de actina y de dinamina (Gormal *et al.*, 2015).

1.7.3 Endocitosis asociada a un potencial de acción

Estudios en neuronas del sistema nervioso central, que contemplaron el uso de técnicas electrofisiológicas y fluoróforos de la familia FM, demostraron que un gran porcentaje de vesículas que se liberan en respuesta a PAs se reciclan sin la necesidad de pasar por compartimentos endosomales, posibilitando así su rápida reutilización (Sara *et al.*, 2002; Stevens *et al.*, 2000). Es estos trabajos se mostró que en terminales nerviosas opera una endocitosis rápida, con tiempos característicos del proceso del orden de los cientos de milisegundos hasta los pocos segundos. Estos resultados y otros posteriores son consistentes con la idea de que aquellas vesículas que se liberan en respuesta a un PA pueden reutilizarse en reiteradas ocasiones, sin que ello implique la pérdida de su identidad estructural (Aravanis *et al.*, 2003; Richards *et al.*, 2005).

En células cromafines se ha demostrado que, a fin de compensar la exocitosis inducida por PAs, se pueden activar dos mecanismos de endocitosis

independientes, y que la manifestación de uno u otros de ellos depende de la frecuencia de PAs aplicados. En ese sentido, se reportó que la estimulación con PAs aislados o a frecuencias próximas a la actividad basal (entre 0.2 y 0.5 Hz) induce una rápida y robusta internalización de la membrana plasmática, con tiempos característicos menores a 1 segundo (Chan *et al.*, 2001, 2003b; Moya-Diaz *et al.*, 2016). En términos cuantitativos, la cantidad de membrana internalizada equivale al número de vesículas fusionadas, es decir que el mecanismo es totalmente compensatorio de la exocitosis previa. Además, una característica particular de esta endocitosis rápida es que se inhibe con el aumento del Ca^{2+} citosólico, con una K_{inh} de 605 nM, lo cual provoca una total inhibición de la misma cuando la frecuencia de PAs supera los 2 Hz. Pero a medida que aumenta la frecuencia de PAs aparece otro mecanismo de endocitosis, clatrina dependiente, que se activa por la acumulación de Ca^{2+} residual (K_{act} = 1.46 μM), y está asociado a la acción de la fosfatasa calcineurina (Chan *et al.*, 2001, 2003b).

En la tabla 1.3 se resumen las características cinéticas de las distintas endocitosis.

Tipo de Endocitosis	Tiempos característicos	Técnica/referencia
En exceso	$\tau 1 \approx 0.6$ seg y $\tau 2 \approx 6$ seg	patch perforado/Engisch y Nowycky (1998)
Compensatoria	$\tau \approx$ 5-20 seg	patch perforado/Engisch y Nowycky (1998)
Compensatoria después de AP	$\tau \approx 560$ mseg	patch perforado-patch clamp/Chan y Smith (2001)

Tabla 1.3 Características cinéticas de la endocitosis lenta (clásica) y rápida en células cromafines. Figura tomada y modificada de Cárdenas y Marengo (2010).

Los trabajos publicados por Elhamdani y colaboradores (2006) complementaron estas observaciones. Utilizando la técnica de doble *patch-clamp* (configuración *whole cell/cell attached*) estos autores describieron que bajas frecuencias de estimulación desencadenaban eventos endocitóticos rápidos, íntimamente asociados al desarrollo de fusiones vesiculares tipo *kiss*

and run, mientras que estimulaciones sostenidas promovían el desarrollo de endocitosis lentas asociadas a fusiones vesiculares completas (Elhamdani *et al.*, 2006b). Otros trabajos realizados en células cromafines también apuntaron en esa dirección. En ese sentido, se propuso que las vesículas que se liberan por fusiones tipo *kiss and run* presentan un mecanismo local de reciclado vesicular, que es dependiente de dinamina e independiente de clatrina (Fulop *et al.*, 2005). La participación de la dinamina en el desarrollo de la endocitosis rápida será descrita en mayor detalle en la próxima sección.

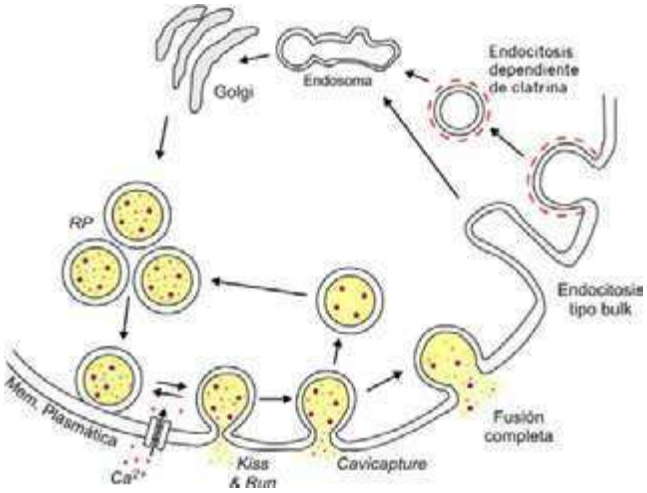

Figura 1.13 - Tipos de endocitosis y ciclado vesicular. Las vesículas del *pool* de reserva (RP) son translocadas a la membrana. Una vez activadas, la entrada de Ca^{2+} dispara la fusión, que puede ser transitoria, de tipo *kiss and run* o *cavicapture*, o una fusión completa. En este último caso la membrana se recupera por la vía clásica dependiente de clatrina, o en respuesta a exocitosis muy masivas a través de una endocitosis de tipo *bulk*. Las vesículas endocitadas por la vía clásica pierden rápidamente sus cubiertas de clatrina (línea punteada roja) y son movilizadas hacia endosomas y luego al Golgi. Figura tomada y modificada de Cárdenas y Marengo, 2010.

1.7.4. DINAMINA Y ENDOCITOSIS

Está ya sólidamente establecido que el desprendimiento de las vesículas recubiertas de clatrina requiere de la GTPasa dinamina. El análisis del mutante de *Drosophila shibire,* que codifica un alelo de dinamina sensible a la temperatura, proporcionó la primera evidencia de la importancia central de la dinamina en la endocitosis. A temperaturas de 20ºC las moscas mutantes son

normales, pero a Tº de 30ºC se paralizan (*shibire*, paralizado en japonés), debido a que se bloquea el desprendimiento de las invaginaciones cubiertas de clatrina, y se interrumpe el reciclado vesicular (van der Bliek *et al.*, 1991). Estudios subsecuentes, revelaron la formación de invaginaciones estables en las terminales presinápticas de la membrana luego de la exposición de las células a GTPγS, un análogo de GTP que se hidroliza muy lentamente (Takei *et al.*, 1995). Investigaciones posteriores en células no-neuronales mostraron que la dinamina es un componente normal de las invaginaciones que se encuentran revestidas por clatrina, y que su actividad GTPasa es importante para la endocitosis: experimentos en donde se expresaron mutantes de dinamina con un sitio de unión a GTP alterado (comunmente conocido como el mutante K44A) presentaron efectos negativos sobre la endocitosis (McMahon *et al.*, 2011). Actualmente, se sabe que la dinamina interviene cortando el cuello que se forma entre la membrana y la vesícula en formación durante la endocitosis clatrino dependiente. La dinamina se polimeriza alrededor del cuello vesicular, y provee la energía mecánica necesaria para completar la fisión. Además hay fuertes indicios de que la dinamina, también polimerizada alrededor del cuello, estabiliza el poro de fusión durante el *kiss and run*, y completa luego la fisión en este mecanismo exo-endocítico (Gonzalez-Jamett *et al.*, 2010). Finalmente, la información respecto a la participación de dinamina en la endocitosis tipo *bulk* es contradictoria, mientras algunos autores han encontrado evidencias sobre su participación (Gormal *et al.*, 2015), otros han propuesto lo contrario (Hayashi *et al.*, 2008).

En mamíferos se han identificado tres isoformas de dinamina. La dinamina 1, que se localiza específicamente en el tejido neuronal (Scaife *et al.*, 1990), dinamina 2, que se expresa ubicuamente (Cook *et al.*, 1994) y la dinamina 3 que se expresa en el tejido testicular (Cao *et al.*, 1998).

En células cromafines se expresan las isoformas 1 y 2, y se asoció a cada una de ellas con la regulación de diferentes tipos de endocitosis. Artalejo y colaboradores reportaron que la endocitosis rápida era dependiente del influjo de Ca^{2+}, hidrólisis de GTP y dinamina (Artalejo *et al.*, 1995). Años más tarde estos mismos autores profundizaron sus observaciones, y propusieron que la

isoforma 1 de la dinamina se asociaba a la endocitosis rápida, mientras que la isoforma 2, así como la clatrina, se asociaban endocitosis con cinéticas lentas (Artalejo *et al.*, 2002).

La dinamina es una proteína compuesta por 5 dominios: un dominio GTPasa N-terminal, un dominio intermedio, un dominio homólogo a pleckstrina (PH), un dominio efector de la GTPasa (GED) y un dominio C-terminal (PRD) rico en prolinas y argininas (Ferguson *et al.*, 2012; Ramachandran *et al.*, 2007); Figura 1.14). A continuación se expondrán las principales características y/o funciones asociadas a cada uno de estos dominios.

Dominio GTPasa N-terminal: en relación a las proteínas pequeñas que unen GTP, la dinamina es una de las que presenta mayor actividad GTPasa (Warnock *et al.*, 1996). Respecto a ello, la isoforma 2 es aquella que tiene la mayor actividad intrínseca, siendo de 3 a 10 veces mayor que la dinamina 1 (Warnock *et al.*, 1997).

Dominio Intermedio: basándose en experimentos de digestión proteolítica, se propuso que el dominio intermedio de la dinamina se divide en las porciones C-terminal y N-terminal (Warnock *et al.*, 1996). La región N-terminal de este dominio fue asociada al ensamblaje de monómeros de dinamina (Smirnova *et al.*, 1999), identificándose inclusive aquellos aminoácidos necesarios para la nucleación a gran escala en membranas biológicas (Ramachandran *et al.*, 2007). En particular, el proceso de polimerización alrededor del cuello de la vesículas en formación es fundamental en la etapa final de la fisión, catalizada por la dinamina (Ferguson *et al.*, 2012).

Dominio homólogo a pleckstrina (PH): este dominio favorece la unión de la dinamina a fosfatidil inositoles, específicamente a $PI(4,5)P_2$, permitiendo la inserción de la dinamina en la membrana de la vesícula en formación, la activación de la actividad GTPasa, y la finalización de la endocitosis (Ferguson *et al.*, 2012).

Dominio efector de la GTPasa (GED): el GED intaractúa con el dominio GTPasa. Esta interacción es necesaria para que el dominio GTPasa sea activo (Muhlberg *et al.*, 1997; Smirnova *et al.*, 1999). En ese contexto, experimentos

demostraron que el agregado aislado de GED a monómeros de dinamina no ensamblados estimularon la actividad GTPasa casi 50 veces por sobre su tasa basal (Sever *et al.*, 1999).

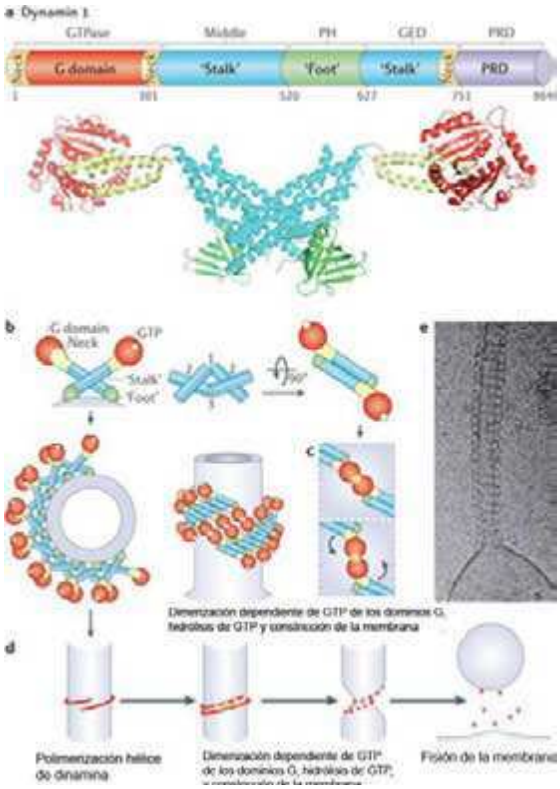

Figura 1.14- Estructura molecular de la dinamina y mecanismo de fisión de membrana. (A) Arriba: Representación lineal de la organización de los dominios de dinamina (los números indican la posición de los aminoácidos dentro de la secuencia primaria de la dinamina1). Las regiones que pertenecen a la misma región plegada se representan en el mismo color. Abajo: estructura cristalina de un dímero de dinamina (los colores coinciden con la representación lineal). **(B)** Representación esquemática de dímeros y polímeros de dinamina helicoidales alrededor de un templado tubular en dos orientaciones distintas (90º de rotación). El código de color de los dominios coincide con los colores del panel (A). La localización aproximada del sitio de unión a nucleótidos está remarcado en amarillo. La polimerización de la dinamina ocurre como resultado de la interacción entre los "tallos" de monómeros de dinamina (interface 2) y entre los dímeros (interfase 1 y 3). La dimerización dependiente de GTP de los dominios G entre los peldaños adyacentes de la hélice de dinamina (remarcado en amarillo, vista longitudinal de la hélice) promueve el ensamblaje dependiente de la actividad GTPasa, resultando en la constricción de la membrana y por último en la fisión. **(C)** Modelo propuesto para la hidrólisis dependiente de GTP que genera un movimiento tipo palanca en el cuello de la dinamina respecto al dominio G. **(D)** Visión esquemática de los pasos principales que llevan a la fisión de membrana dependiente de dinamina. **(E)** Imágenes de microscopia electrónica que muestran un polímero helicoidal de dinamina purificada que ha conducido a la formación de un túbulo desde un liposoma. Figura tomada y modificada de Ferguson y De Camilli., 2012.

Dominio rico en prolina (PRD): el dominio C-terminal de la dinamina es rico en prolina y residuos básicos, y se caracteriza por su capacidad de unión a proteínas que contienen el dominio SH3, entre ellas la anfifisina (Hinshaw, 2000). Esta interacción es necesaria para ocurra la endocitosis mediada por clatrina, ya que es a través de ella que la dinamina se recluta a la vesícula en formación. En ese sentido, un estudio en donde se microinyectó el dominio SH3 de anfifisina, o péptidos de dinamina que contenían el dominio de unión a SH3, mostraron el bloqueo de la endocitosis e incrementaron la densidad de revestimientos de clatrina en las terminales sinápticas (David *et al.*, 1996). Por otra parte, estudios desarrollados en células cromafines demostraron que la unión del dominio PRD de dinamina a los dominios SH3 de las proteínas anfifisina, encefalina, intersectina y α-adaptina estaban asociados a procesos endocíticos lentos dependientes de dinamina 2 y clatrina (Elhamdani *et al.*, 2006b).

1.7.5. LA ENDOCITOSIS Y SU DEPENDENCIA CON LA ENTRADA DE CALCIO

Con la finalidad de garantizar la homeostasis de la membrana plasmática, el reciclado vesicular y la liberación confiable de neurotransmisores, las células recuperan la membrana vesicular fusionada durante la exocitosis a través de diversos mecanismos de endocitosis. Uno de los factores que regula dicho proceso es el Ca^{2+}, aunque su rol ha sido muy controvertido y discutido en la literatura.

En general, podríamos decir que la mayor parte de la literatura sostiene que el Ca^{2+} citosólico acelera la endocitosis y el reciclado vesicular. Estudios desarrollados en células cromafines demostraron que la endocitosis rápida en exceso se modulaba positivamente por Ca^{2+}, GTP y dinamina (Artalejo *et al.*, 1995). Del mismo modo, Engisch y Nowycky (1998) demostraron que la endocitosis compensatoria se acelera con la entrada de Ca^{2+} por canales (Engisch *et al.*, 1998). Incluso Rosa y colaboradores (2011) describieron un efecto relativo mayor de los canales de tipo L respecto a otros canales de Ca^{2+} en acelerar la endocitosis (Rosa *et al.*, 2011). Un efecto positivo del Ca^{2+} sobre la endocitosis también se manifestó en terminales nerviosas hipocampales, en

donde se demostró que la estimulación a altas frecuencias de potenciales de acción (un escenario en donde hay acumulación de Ca^{2+} residual) aceleraba dicho proceso (Balaji *et al.*, 2008). Esta incidencia del Ca^{2+} también se reportó en otros modelos neurobiológicos, tales como terminales nerviosas retinales, cálix de Held y células ciliadas del oído (Wu *et al.*, 2014a).

Sin embargo, como se mencionó previamente, también existen evidencias que contradecirían lo enunciado arriba, y que sugieren que la presencia de Ca^{2+} puede retardar la endocitosis y/o el reciclado. Por ejemplo, en neuronas hipocampales se demostró que el reciclado vesicular se retardaba cuando estas células se exponían a altas concentraciones de Ca^{2+} extracelular (Leitz *et al.*, 2011). En acuerdo con estas evidencias, se reportó que la diálisis intracelular de Ca^{2+}, en el orden de 0.5–1 μM, inhibía el desarrollo de la endocitosis rápida en terminales nerviosas retinales del *goldfish* (von Gersdorff *et al.*, 1994).

El grupo de Ling Gang Wu, tratando de poner orden estas observaciones aparentemente contradictorias, describió que bajo ciertas circunstancias el Ca^{2+} puede resultar excitatorio, y bajo otras, inhibitorio para la endocitosis. En base a esto, propuso la hipótesis del *yin y yang* para el control de la endocitosis por el Ca^{2+}. Concretamente, este postulado sostiene que el retardo o aceleración de este proceso depende netamente de la dinámica intracelular del Ca^{2+}: mientras que el incremento global y sostenido de la concentración de Ca^{2+} inhibe el desarrollo de la endocitosis, el aumento transitorio de la concentración de Ca^{2+} en micro/nanodominios facilita su desarrollo (Wu *et al.*, 2014b)

Como ya se explicó previamente, en células cromafines se describió un comportamiento bifásico de la endocitosis con la intensidad del estímulo. En concreto, se observó que la frecuencia de PAs aplicados determinaba el mecanismo de endocitosis operante (Cardenas *et al.*, 2016). PAs aislados o a frecuencias basales (un escenario en donde no hay acumulación de Ca^{2+} residual) promovieron una endocitosis muy rápida, independiente de clatrina y calcineurina, pero dependiente de dinamina (Cardenas *et al.*, 2016; Chan *et al.*, 2001, 2003b). Esta endocitosis rápida tendía a desaparecer cuando la frecuencia del estímulo aumentaba, mientras se activaba una

endocitosis dependiente de clatrina y calcineurina (Cardenas *et al.*, 2016; Chan *et al.*, 2001, 2003b). En línea con estos resultados, un trabajo publicado por Elhamandi y colaboradores demostró que el aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} (de 10 a 210 µM) retardaba la cinética de la endocitosis rápida frente a la aplicación de potenciales de acción a baja frecuencia (Elhamdani *et al.*, 2006a).

Finalmente, un estudio publicado por Zhang y colaboradores demostró la presencia de una endocitosis rápida en neuronas del ganglio de la raíz dorsal que se desarrollaba de manera independiente a la presencia de Ca^{2+}, que se activaba en respuesta a altas frecuencias de estimulación, y que era dependiente de la activación de la vía de la proteína kinasa A (PKA) (Zhang *et al.*, 2004).

1.8 - EL IRP Y SU RELEVANCIA EN LA EXOCITOSIS ALTAMENTE ACOPLADA

El marco conceptual y experimental de esta tesis doctoral se fundamenta en parte en los antecedentes bibliográficos presentados, y por otro lado en trabajos previos de nuestro laboratorio. En dichos trabajos se estudió la magnitud, las cinéticas temporales de liberación y recuperación, y las razones estructurales y funcionales de la formación de IRP, que como ya dijimos es un *pool* vesicular altamente acoplado al estímulo. Es importante destacar que tales evidencias (que se presentarán resumidamente en esta sección) fueron muy importantes para el planteo de objetivos, diseño de experimentos y discusión final de los resultados de este trabajo de tesis.

1.8.1 - ESTIMACIÓN DEL IRP

La exocitosis del IRP fue clásicamente estudiada midiendo los cambios de capacitancia celular en respuesta a despolarizaciones breves (Horrigan *et al.*, 1994; Voets *et al.*, 1999). En nuestro laboratorio, trabajando en células cromafines de ratón, demostramos que frente a la aplicación de

despolarizaciones cuadradas de duración variable la exocitosis de IRP seguía un comportamiento exponencial de primer orden, prácticamente saturándose con pulsos de 50 ms. Este comportamiento se interpreta como el resultado del agotamiento del IRP, por lo que el valor de saturación se utilizó como una estimación del tamaño de este *pool*, y el tiempo característico τ como una medida de su cinética de liberación (Horrigan *et al.*, 1994; Marengo, 2005; Voets *et al.*, 1999). Bajo nuestras condiciones experimentales, el tamaño del IRP resultó ser de 33 ± 1 fF. Considerando que la capacitancia promedio de una vesícula secretoria en células cromafines de ratón es de aproximadamente 1.3 fF (Moser *et al.*, 1997), se puede calcular que IRP estaría conformado por 25 vesículas secretorias (Alvarez *et al.*, 2013). Esto coincide con la estimación de IRP que se obtuvo también en nuestro laboratorio a partir de un protocolo de pulsos pareados de 10 ms separados por 300 ms (Voets *et al.*, 1999), que proveyó una cota mínima para IRP de 32±2 fF y una máxima de 41±3 fF (Alvarez *et al.*, 2008). Por otro lado, la constante τ resultó ser de 15.7±0.8 ms (Alvarez *et al.*, 2013), un valor que se ubica entre los reportados por Horrigan y Bookman (1994) en cromafines de rata y por Voets y colaboradores (1999) en rodajas de adrenales de ratón (Horrigan *et al.*, 1994; Voets *et al.*, 1999). Es importante destacar que la exocitosis de IRP es aproximadamente sincrónica al estímulo. Operativamente, de acuerdo a nuestra metodología de análisis, esta definición significa que la exocitosis se completa durante el período abarcado por el estímulo en sí mismo (50 ms), más los 60 ms posteriores, que no se consideran en la medición debido a la presencia de un artefacto capacitivo (ver métodos).

1.8.2 - Cinética de recuperación del IRP

La cinética de recuperación del IRP luego de su depresión se estudió a través de la aplicación de un protocolo de pulsos pareados separados por tiempos variables. En primer lugar, se deprimió el IRP mediante la aplicación de un pulso cuadrado despolarizante de 50 ms, y luego de un tiempo variable (entre 2 y 40 segundos), se aplicó un segundo pulso de las mismas características para medir la recuperación de este *pool* (Figura 1.15 Ai). Las

figuras 1.15 Aii y Aiii ilustran registros típicos de la I_{Ca2}^{+} y los ΔCm obtenidos por la aplicación de este protocolo a intervalos de 5 y 20 segundos, respectivamente. Luego de 5 segundos, solo una pequeña parte de la fracción de la ΔCm asociada al IRP fue recuperada, mientras que 20 segundos fueron suficientes para recuperar casi completamente la exocitosis de este *pool* de vesículas.

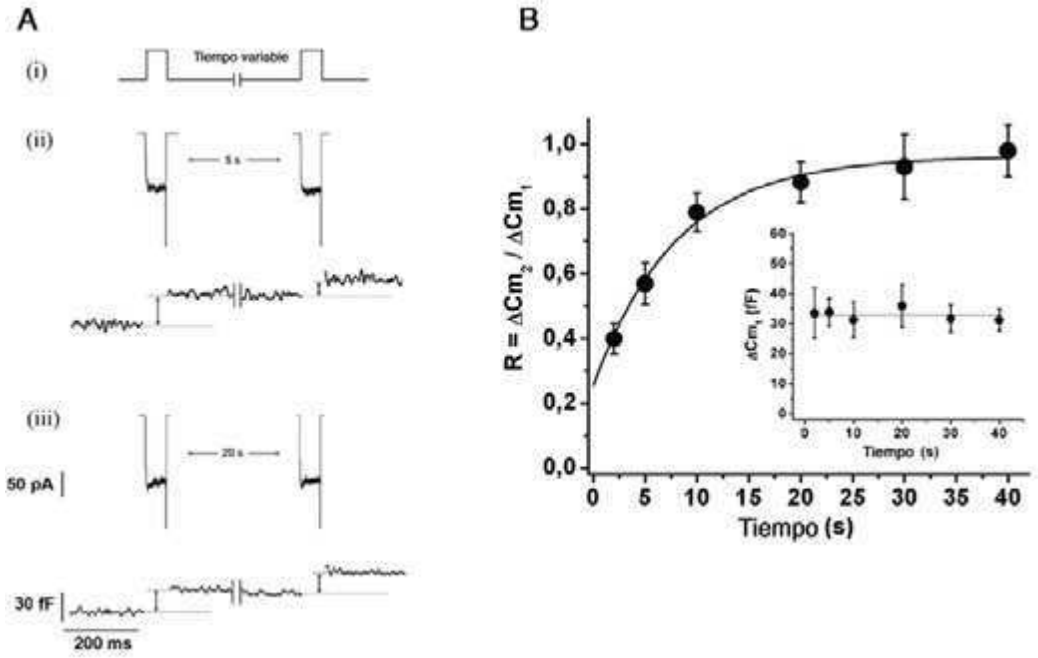

Figura 1.15.- Recuperación del IRP luego de su depresión. (A) (i) Esquema del protocolo de estimulación. Con el objetivo de determinar la cinética de recuperación del IRP, se aplicó un protocolo de pulsos pareados de despolarizaciones de 50 ms (-80 mV a 10 mV) con intervalos de tiempo variable entre ellos. **(ii y iii)** I_{Ca2+} (arriba) y cambios de capacitancia celular (abajo) obtenidos en experimentos típicos a intervalos de tiempo de 5 y 20 segundos, respectivamente. **(B)** La recuperación relativa del IRP luego de su depresión (expresada como $\Delta Cm_2/\Delta Cm_1$) donde ΔCm_1 y ΔCm_2 representan los cambios de capacitancia inducidos por el primer y el segundo pulso despolarizante, respectivamente. Los puntos experimentales se ajustaron a una función de la forma $R = Ro + A (1\text{-}e^{-t/\tau})$. El gráfico en el recuadro representa el promedio de los cambios de capacitancia inducidos por la primera despolarización del protocolo de pulsos pareados descritos arriba (Figura tomada y modificada de Moya-Díaz *et al*., 2016).

La figura 1.15 B muestra los resultados promedios de estos experimentos, donde se grafica la recuperación relativa (R) del IRP, calculado como el cambio de capacitancia inducida por el segundo pulso (ΔCm_2) sobre el cambio de capacitancia inducido por el primer pulso (ΔCm_1). Los puntos experimentales de la figura 1.15 B se ajustaron a una función de crecimiento

monoexponencial, obteniendo un tiempo característico τ de 7.5 ± 1.1 segundos y un intercepto a tiempo 0 de 0.22 ± 0.05. Este τ de recuperación fue similar al observado por Moser y Neher (1997) y por Smith y colaboradores (1998) en la recuperación del RRP (Moser *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1998). El valor asintótico de la curva no fue estadísticamente diferente de 1, lo que sugiere que el IRP se recupera en su totalidad luego de ser liberado.

Si consideramos que la frecuencia basal de potenciales de acción en la célula cromafin es de aproximadamente 0.5 Hz, el tiempo de recuperación estimado sería muy lento como para esperar una significativa participación de IRP en la exocitosis de vesículas secretorias durante una estimulación sostenida. Según la constante de tiempo estimada, la recuperación completa de IRP llevaría más de 20 segundos, un período 10 veces mayoral tiempo entre estímulos a una frecuencia de 0.5 Hz.

1.8.3 - CANALES DE Ca^{2+} ASOCIADOS AL IRP

Para explicar la alta eficiencia con la que la corriente de Ca^{2+} dispara la exocitosis de IRP en comparación al resto de RRP, clásicamente se propuso que existía una colocalización de las vesículas secretorias que conforman este *pool* con los canales de Ca^{2+} (Voets *et al.*, 1999). Inicialmente la tendencia era suponer que las vesículas de RRP se distribuían azarosamente alrededor de los canales, y que el IRP era la consecuencia de que una pequeña fracción de vesículas se encontraba por azar cerca de los canales. Sin embargo las discontinuidades observadas en la exocitosis de RRP frente a estímulos de creciente intensidad sugerían que dicha distribución no era al azar (Segura *et al.*, 2000). La hipótesis alternativa asume una interacción específica entre canales y vesículas, lo cual abría la posibilidad de que un tipo de canal de Ca^{2+} en particular se acoplara específicamente al IRP. En ese sentido, un trabajo publicado por nuestro laboratorio estableció una relación de acople funcional entre el canal de Ca^{2+} tipo P/Q y el IRP (Alvarez *et al.*, 2008). El grado acople de los diferentes subtipos de CCDV con el IRP se estudió en primer lugar mediante la aplicación de bloqueantes específicos de esos canales. Los

bloqueantes para canales de Ca^{2+} tipo P/Q, ω-agatoxina IVA (Aga); para canales tipo L, Nitrendipina (Nitre); y para canales tipo R, Snx - 482 (Snx), redujeron significativamente la densidad de las I_{Ca2+} inducidas por un pulso de 50 ms en comparación con el control ($p<0,05$), lo que no se observó con el bloqueante del canal tipo N, ω-conotoxina GVIA (Cono) (Figura 1.16 i). En cambio, los resultados de medición de capacitancia mostraron que la exocitosis no estaba correlacionada con la modificación observada en las corrientes. Por ejemplo, mientras que el bloqueo de los canales tipo L no produjo cambios significativos en el tamaño del IRP, aun cuando la corriente transportada por esos canales disminuyó a un 50% respecto del control, el bloqueo de los canales tipo P/Q provocó una inhibición muy marcada de la liberación de este *pool*, alcanzando casi el 80% ($p<0.001$).

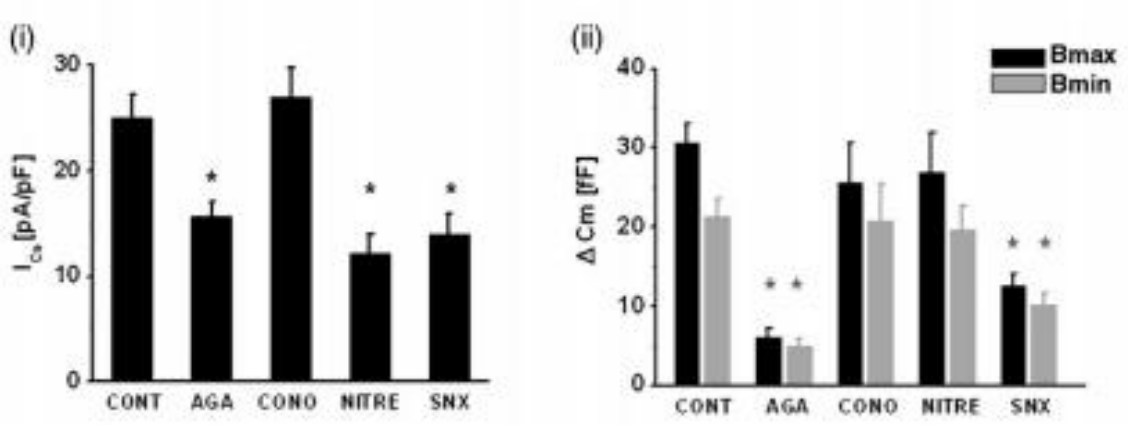

Figura 1.16- Contribución de los distintos tipos de canales de Ca^{2+} a la liberación del IRP. En esta figura se muestran los valores medios (+/- error estándar) obtenidos a partir de los experimentos realizados en presencia de las distintos bloqueantes de los canales de Ca^{2+} (L, P/Q, R y N) en comparación a los controles. En **(i)** las barras representan las densidades de corriente de Ca^{2+} en condiciones control y en presencia de los bloqueantes específicos de los canales L (10 μM de Nitrendipina, Nitre), N (2 μM ω-conotoxina GVIIA, Cono), R (1 μM de SNX-486, Snx) y P/Q (200 nM de ω-agatoxina-VIA, Aga). El bloqueo de los canales tipo L, R y P/Q generó una disminución significativa de la densidad de corriente ($p<0.05$), mientras que el bloqueante del canal N no modificó las corrientes. En **(ii)** se muestra el efecto de los bloqueantes sobre el tamaño del IRP estimado por el protocolo de pulsos pareados (2 despolarizaciones cuadradas de 10 ms separadas por 300 ms). Este protocolo permite establecer una cota mínima (B_{min}) y una máxima (B_{max}) para el tamaño de IRP (para detalles de cómo se realiza esta estimación consultar Voets y col., (1999) y Álvarez y col., (2008)). Mientras que en presencia de Nitre no se observaron cambios, y con Snx la liberación del IRP se inhibió moderadamente, en presencia de Aga el tamaño del IRP disminuyó muy marcadamente respecto del control ($p<0.002$). Tomado y modificado de Álvarez *et al*., (2008).

La aplicación de SNX también inhibió el tamaño de este *pool* significativamente, pero en menor proporción a la provocada por Aga (Figura 1.16 ii). Además, en dicho trabajo se mostró que la aplicación de SNX en una célula previamente tratada con Aga no era capaz modificar significativamente la corriente de Ca^{2+}, lo cual sugiere que al menos parte del efecto de SNX se debe a una acción cruzada con los canales P/Q. Esta acción cruzada ya se había descrito previamente (Arroyo *et al.*, 2003). En resumen, estos resultados mostraron que la liberación de las vesículas que conforman el IRP están principalmente acopladas con la entrada de Ca^{2+} por los canales de Ca^{2+} tipo P/Q (Alvarez *et al.*, 2008).

Para corroborar la participación de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q en la exocitosis del IRP, se utilizaron animales *KO* de la subunidad α_{1A} (subunidad funcional del canal de Ca^{2+} tipo P/Q). En los diagramas de barras de la figura 1.17 se grafican los valores promedios (± error estándar) de las densidades de corriente, y de las cotas mínimas y máximas (B_{min} y B_{max}, respectivamente) del tamaño del IRP, en el animal *KO* y en ratones *WT*.

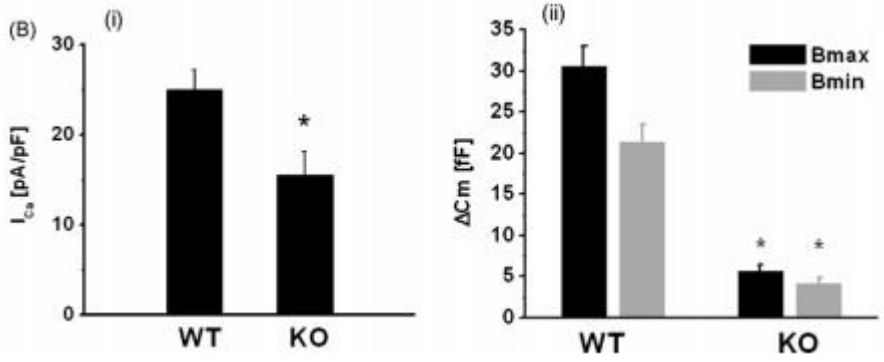

Figura 1.17- En esta figura se muestran los promedios (+/- error estándar) obtenidos a partir de experimentos realizados con ratones *KO* para la subunidad α_{1A} y ratones WT.(A) Las barras representan las densidades de corriente. La densidad de la I_{Ca2+} fue levemente inferior en el modelo *KO* respecto al control ($p<0.05$). **(B)** Las barras representan el tamaño del IRP estimado por el protocolo de pulsos pareados. La exocitosis del IRP resultó marcadamente inferior en los *KO* ($p<0.001$). Tomado y modificado de Álvarez *et al*., (2008).

Aunque las densidades de corriente en el ratón *KO* fueron levemente inferiores a las medidas en *WT* ($p<0.05$), esta diferencia no se condice con la abrupta disminución de la exocitosis del IRP en el animal *KO*. Estos datos

están en línea con los resultados de la figura 1.16, y demuestran que la liberación del IRP sufre una notable disminución ante la ausencia del canal P/Q.

Otro dato llamativo que surgió de ese estudio, fue que pese a que una aplicación simultánea de Aga y Nitre inhibía completamente I_{Ca2+}, una exocitosis residual de aproximadamente 5 fF aún persistía en esas condiciones. Estos resultados sugieren que una pequeña fracción de IRP podría deberse a un mecanismo independiente de la entrada de Ca^{2+} por canales. Este es uno de los puntos que se estudiarán en la presente tesis.

1.8.4 - EL ACOPLE DE IRP CON LOS CANALES DE CA^{2+} TIPO P/Q ES DEPENDIENTE DE *SYNPRINT*

Ha sido demostrado en neuronas que la secuencia aminoacídica intracelular *synprint,* presente en las subunidades α_1 de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q y N, es fundamental para la interacción molecular entre estos canales con las proteínas de la maquinaria exocitótica (Catterall, 1999). Un trabajo previo de nuestro laboratorio (Alvarez *et al.*, 2013) demostró, en células cromafines de ratón, que las vesículas del IRP se acoplan funcionalmente con los canales de Ca^{2+} tipo P/Q en forma *synprint* dependiente. En la figura 1.18 A se muestran ejemplos representativos de mediciones de capacitancia y I_{Ca2+} obtenidas en respuesta a un protocolo de pulsos pareados para estimar cotas mínimas y máximas de IRP (Voets *et al.*, 1999), tanto en células controles no transfectadas (Syn^-) como en células transfectadas con el péptido *synprint* (Syn^+). En estos ejemplos se observa una clara inhibición de la exocitosis del IRP en Syn^+ en comparación con el Syn^-. En la figura 1.18 B se muestra un resumen de estos experimentos, donde también se muestra que un control, obtenido por la transfección de la proteína *enhaced green fluorescence protein* (eGFP) no mostró efectos respecto a Syn^-. Estos datos sugieren que el acople funcional entre los canales de Ca^{2+} tipo P/Q y las vesículas del IRP es interferido por la expresión del péptido *synprint* libre exógeno, lo que en consecuencia inhibe la liberación del IRP. En coherencia con esta

interpretación, el uso del bloqueante especifico del canal de Ca^{2+} de tipo P/Q Aga en las células Syn^+ (Syn^+ + Aga) no modificó la exocitosis residual del IRP medida en las células Syn^+ (Figura 1.18 B). Estos resultados indican que la interacción canal-vesícula vía *synprint* es esencial para el establecimiento del acople del IRP con el canal de Ca^{2+} tipo P/Q.

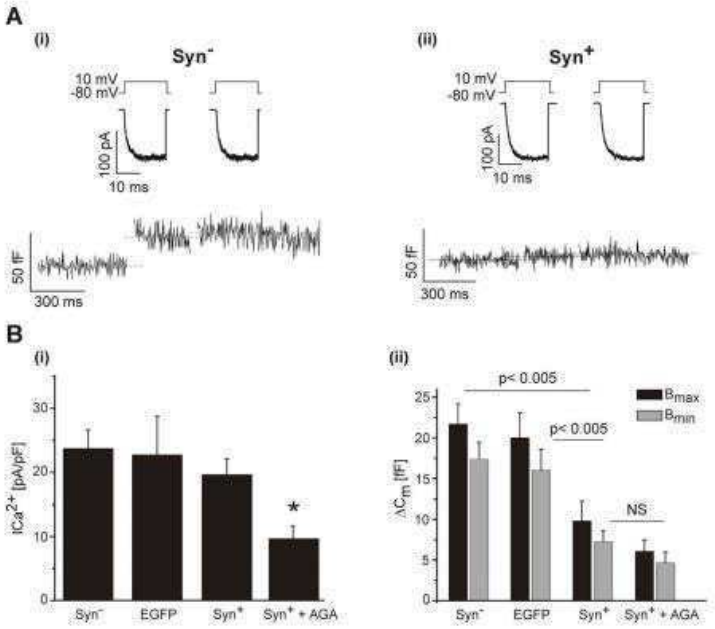

Figura 1.18- Efecto de péptido *synprint* exógeno sobre la liberación del IRP. (A) Ejemplos de trazados de capacitancia y I_{Ca2+} frente al protocolo de doble pulso de 10 ms (300 ms de intervalo) en (i) Syn^- y (ii) Syn^+. **(B)** (i) Densidades de I_{Ca2+} obtenidas en tratamientos Syn-, EGFP, Syn+ y en células Syn+ tratadas con 200 nm de ω-agatoxina IVA. (ii) Estimaciones promedios de las cotas B_{min} y B_{max} para el IRP, obtenidas en respuesta a la aplicación de un doble pulso de 10 ms bajo las mismas condiciones que las mencionadas en (i). En estos experimentos se observó que mientras Syn-, EGFP y Syn+ tuvieron I_{Ca2+} similares, la exocitosis del IRP en Syn+ disminuyó drásticamente respecto a los otros dos grupos experimentales. Tomado y modificado de Álvarez *et al*., 2013.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En el contexto del estudio de la exocitosis altamente acoplada al estímulo, partimos de las siguientes hipótesis, y nos proponemos los siguientes objetivos.

2.1. HIPÓTESIS

Pregunta 1. ¿Es el IRP responsable del mantenimiento de la exocitosis durante la estimulación con PAs aplicados a frecuencias fisiológicas?

Hipótesis 1: Cuando se aplican PAs aislados o a bajas frecuencias, se espera que los gradientes de Ca^{2+} sean restringidos, y la acumulación de Ca^{2+} residual despreciable. Por lo tanto se espera que se secreten únicamente vesículas próximas a los CCDV, lo que respondería a las características de IRP. Por otro lado, durante la estimulación repetitiva con PAs, dichas vesículas deberían reciclarse a una velocidad acorde a la frecuencia aplicada, de modo de mantener la exocitosis. Sin embargo, la recuperación de IRP es muy lenta, por lo que suponemos que debería existir un proceso rápido de recuperación que opere ante estímulos de las características de los PAs. Contábamos con resultados preliminares que indicaban que un estímulo en forma de PA libera un pequeño grupo de vesículas, que es recuperable a una velocidad mayor que IRP total. Por lo tanto, proponemos la existencia de un mecanismo de reciclado vesicular rápido que pueda resultar eficiente para mantener la exocitosis a bajas frecuencias de PAs.

Pregunta 2. ¿Qué mecanismo/s opera/n durante la recuperación de la exocitosis luego de un PA?

Hipótesis 2:

La recuperación de la exocitosis inducida por PA podría ser dependiente de la movilización de vesículas desde *pools* río arriba. Este tipo de mecanismo se ha planteado clásicamente para explicar la recuperación de otros *pools* vesiculares, como el RRP (Voets *et al.*, 1999). Sin embargo debemos considerar que estos mecanismos son en general dependientes de una concentración de Ca^{2+} citosólico moderadamente elevada, y que se sostiene en el tiempo luego del estímulo (Heinemann *et al.*, 1993; Voets *et al.*, 1999).

Un mecanismo alternativo, pero no excluyente respecto del anterior, y que podría explicar la recuperación rápida de la exocitosis asociada a PA, es un reciclado local, como el que ocurre durante el *kiss and run*. Esta hipótesis se basa en parte en resultados del grupo de Corey Smith (Fulop *et al.*, 2005), quienes a partir de experimentos de amperometría propusieron que frente a PAs aplicados a 0.5 Hz el modo de fusión preponderante sería el *kiss and run*. Esto implicaría que una endocitosis rápida, acoplada a la exocitosis previa, estuviese directamente implicada en el proceso de recuperación vesicular.

Pregunta 3. En experimentos preliminares de nuestro laboratorio, se observó que aproximadamente el 25% de IRP y el 50% de la exocitosis disparada por un estímulo en forma de potencial de acción eran independientes de la I_{Ca2+}. Esta sorprendente observación sugería que otra fuente de Ca^{2+}, tal vez intracelular, u otro mecanismo alternativo, pudiese ser el responsable de esta fracción exocítica. Es probable que ante estímulos moderadamente fuertes esta fracción sea despreciable. Pero es importante remarcar que al representar prácticamente la mitad de la exocitosis asociada a un PA, es probable que tome relevancia frente al disparo de PAs a frecuencias fisiológicas basales. Partiendo de estos conocimientos previos, consideramos dos hipótesis alternativas:

Hipótesis 3a

La exocitosis independiente de I_{Ca2+} depende de la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares. Se ha propuesto la presencia de cisternas del retículo endoplásmico que se localizan cerca de la membrana plasmática, y podrían ser relevantes en la exocitosis de vesículas secretorias (Garcia-Sancho, 2014). Por otro lado, sabemos que las mismas vesículas secretorias acumulan grandes cantidades de Ca^{2+} en su lumen, y que dicho Ca^{2+} puede liberarse por mecanismos similares a los del retículo endoplásmico (Borges *et al.*, 2012).

Hipótesis 3b

La exocitosis independiente de I_{Ca2+} depende de un mecanismo alternativo a la neurosecreción Ca^{2+}-dependiente. Se han propuesto en otros sistemas, mecanismos de secreción y neurotransmisión dependientes de potencial, e independientes de la corriente de Ca^{2+} (Hochner *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 2002). Este tipo de mecanismos, alternativos al clásico dependiente de calcio, han sido poco estudiados, y no gozan de una aceptación generalizada. Sin embargo, nos plateamos el desafío de investigar esta posibilidad, y nos preguntamos si un mecanismo de exocitosis voltaje dependiente podría operar en células cromafines.

2.2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Estudiar los mecanismos asociados a la exocitosis vesicular altamente acoplada al estímulo, su recuperación, y su mantenimiento en respuesta a la estimulación con potenciales de acción a bajas frecuencias.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Completar la caracterización de la cinética de recuperación de la exocitosis en respuesta a un estímulo que simula un potencial de acción individual (PA_{sim}).

- Estudiar el mantenimiento de la exocitosis frente a la aplicación de trenes de PA_{sim} en el rango de frecuencias fisiológicas. Analizar si la cinética de recuperación obtenida en el punto anterior se corresponde con lo observado experimentalmente en esta etapa del estudio.

- Identificar los mecanismos involucrados en la recuperación de la exocitosis en respuesta a la estimulación con potenciales de acción, y su implicancia en el mantenimiento de la exocitosis en el rango de frecuencias fisiológicas. De acuerdo a las hipótesis planteadas previamente, nos propusimos analizar la dependencia de la recuperación con (a) los *pooles* vesiculares ubicados río arriba de IRP, y (b) la endocitosis.

- Caracterizar los mecanismos subyacentes a la neurosecreción independiente de Ca^{2+}. Este punto incluye se analizar tanto la posibilidad de que esta exocitosis dependa de fuentes intracelulares de Ca^{2+}, como de un mecanismo Ca^{2+} independiente.

- Como mecanismo independiente de Ca^{2+}, analizaremos particularmente la posibilidad de que las células cromafines presenten un mecanismo de exocitosis dependiente de voltaje, del tipo previamente propuesto para células del ganglio de la raíz dorsal (Zhang *et al.*, 2002).

- Investigar qué tipo de sensores moleculares podrían estar asociados a la exocitosis independiente de Ca^{2+}. Si se tratara de un mecanismo dependiente de voltaje, evaluar la posibilidad de que los mismos canales de Ca^{2+} actúen como sensores de voltaje.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CULTIVO Y TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS CROMAFINES

Para la preparación de cada cultivo primario de células cromafines se extrajeron las glándulas adrenales de 1-2 ratones de cepa sv129 de edades entre 13 y 20 días. En este preparado, la principal dificultad se relaciona con la pequeña cantidad de tejido disponible en la médula adrenal. Por esta razón, es importante minimizar la pérdida de tejido durante el procedimiento de forma de incrementar el rendimiento de los cultivos y la eficiencia de la transfección.

3.1.1 SOLUCIONES DE CULTIVO Y TRANSFECCIÓN

Hanks (en mg/ml): 0,4 KCl, 0,06 KH_2PO_4, 8 NaCl, 0,35 Na_2CO_3, 0,09 Na_2HPO_4, suplementada con 3 µl/ml de penicilina /estreptomicina y 1 mg/ml de glucosa.

Medio de cultivo DMEM suplementado: medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) baja glucosa suplementado con 5% de suero fetal bovino, 5 µl/ml de penicilina/estreptomicina, 1.3 µl/ml de gentamicina, 1mg/ml de seroalbúmina bovina, 10 µM de citosina-1-β-D-arabinofuranósido.

Medio de cultivo OPTIMEM: Medio de cultivo reducido en suero modificado de medio Eagle, con HEPES y bicarbonato de sodio y suplementado con 2.4 g/l L-glutamina y factores de crecimiento.

3.1.2 PROCEDIMIENTO PARA EL CULTIVO

Los animales fueron anestesiados con una sobredosis de avertina (0.5ml) administrada en forma intraabdominal. Una vez que se accedió a las cavidades peritoneal y torácica utilizando material quirúrgico adecuado, se realizó un corte en la vena cava inferior y se perfundió al animal lentamente desde el ventrículo izquierdo con 10 ml de solución de Hanks previamente

oxigenada. Luego, se extrajeron las glándulas adrenales, ya limpias de sangre, y se las colocaron en una caja de petri estéril sobre una lupa para su disección. Primero se removió la grasa circundante, y luego la corteza adrenal, para finalmente quedarnos con la médula adrenal en la que se encuentran las células cromafines. La disección es un paso crítico en el resultado del cultivo, ya que si la remoción de la corteza no es total se observa una disminución en la proporción de células cromafines en relación a otros tipos celulares como fibroblastos. Una vez disecadas, las cuatro médulas fueron colocadas en un tubo de 1,5 ml. y digeridas en una solución de Hanks conteniendo 0,5-1 mg/ml de papaína durante 25 minutos a 37ºC.

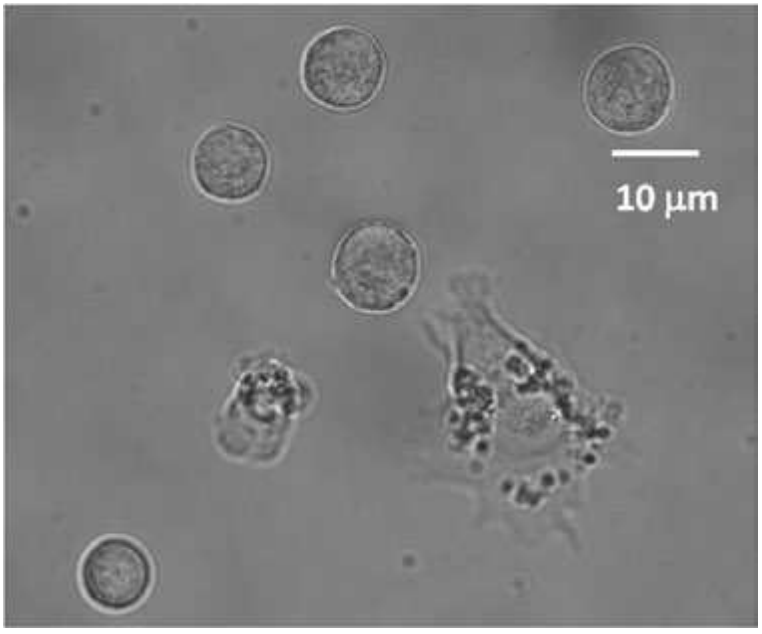

Figura 3.1- Imagen DIC de células cromafines en cultivo tomadas con un objetivo 40X. Las células cromafines pueden distinguirse fácilmente de los fibroblastos, eventualmente presentes en el cultivo, debido a su forma esférica, a su tamaño, a la presencia de un núcleo que ocupa un volumen importante de la célula, y a su apariencia granulada característica. El diámetro promedio aproximado de estas células es de 10 μm.

Los pasos siguientes del cultivo fueron realizados en un flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad. Luego de remover la enzima con tres lavados con 200 μl de medio de cultivo DMEM suplementado, las médulas fueron disgregadas con una micropipeta de volumen 200 μl, y se las suspendió en un volumen final de 600 μl de DMEM suplementado. Esta suspensión fue filtrada secuencialmente a través de mallas con poros de 200 y 50 μm para

remover agregados celulares y remanentes de tejido no disgregado. Finalmente, las células fueron plaqueadas sobre cubreobjetos cortados en cuartos previamente polilisinados (aproximadamente 40 µl de suspensión celular por cubreobjeto) y colocados de a pares en cajas de petri de 35 mm. Luego de incubar por 45 minutos en estufa a 37 ºC con una atmósfera de 95% O_2 - 5% CO_2, se agregaron 2 ml de medio de cultivo DMEM por cada caja de petri, las cuales se mantuvieron en la estufa por las siguientes 24 horas. Estas células fueron utilizadas para las mediciones hasta 48 horas después. En la figura 3.1 se observan fotos tomadas de un cultivo típico de células cromafines de ratón realizado en nuestro laboratorio.

3.1.3 PROCEDIMIENTO PARA LA TRANSFECCIÓN

Para la transfección del plásmido *synprint*-pIRES2-EGFP o del pIRES2-eGFP (Clontech Laboratories, Takara Bio, USA) se utilizó lipofectamina 2000. El procedimiento de transfección comenzó tres horas después de terminado el cultivo. Para realizar la transfección es necesaria la formación del complejo lipofectamina – plásmido, que permite que el plásmido ingrese a la célula. Para generar este complejo se preparó una suspensión que consta de 10 µl de lipofectamina y 250 µl de OPTIMEM, y se la dejó incubar durante 7 minutos. Mientras tanto se preparó otra suspensión con 1 µg de plásmido y 250 µl de OPTIMEM. Cumplidos los 7 minutos se mezclaron ambas. Esta nueva suspensión necesitó de aproximadamente 20 minutos de incubación para que sea posible la formación del complejo. Pasado este tiempo, se procedió a reemplazar el medio DMEM que baña las células por 1.5 ml de medio OPTIMEM en cada placa. Luego, se agregó el complejo lipofectamina – plásmido gota a gota sobre cada cubreobjeto, y se volvió a colocar en la estufa a 37ºC (O_2 95% - CO_2 5%) durante tres horas. Al terminar este tiempo se retiró el medio con el complejo y se repuso el medio DMEM, finalizando la transfección. Los tiempos de incubación para la formación del complejo y de la transfección fueron fijados de forma tal de maximizar el número de células transfectadas. En la figura 3.2 se muestran ejemplos representativos de células transfectadas con *eGFP-synprint*.

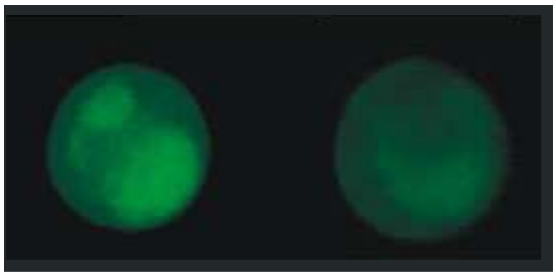

Figura 3.2- Imágenesde células cromafines transfectadas con EGFP-synprint en cultivo. Imágenes tomadas con el microscopio confocal FLUOVIEW-300 con un objetivo de 40X.

3.2 TÉCNICAS ELECTROFISIOLÓGICAS

3.2.1 GENERALIDADES

El método de *voltage clamp* nos permite controlar el potencial de membrana y medir las corrientes que pasan por los canales iónicos (Hodgkin y Huxley, 1952). La aplicación de esta técnica, implica la introducción de al menos un microelectrodo que esté en contacto con el medio intracelular y un electrodo de referencia en el medio extracelular. Si bien se han desarrollado diferentes alternativas para introducir un electrodo en contacto con el citosol, la técnica desarrollada en los años 70 por Neher y Sakmann (Neher *et al.*, 1976), y conocida como *patch clamp* en configuración *whole cell* es hoy en día la técnica más elegida para trabajar con la mayoría de los tipos celulares (especialmente células pequeñas). Si bien existen distintas configuraciones de la técnica de *patch clamp*, el punto común a todas es la formación de un sello entre una pipeta de vidrio de alrededor de 1 µm de diámetro en su punta, y la membrana celular. La resistencia del sello es de crítica importancia, ya que influye marcadamente en las fugas de corriente y el ruido eléctrico presente en la medición. El microelectrodo queda conformado por el conjunto de la micropipeta, que se llena con una solución electrolítica, y un alambre de plata clorurado.

Para formar el sello, el primer paso es apoyar la pipeta sobre la superficie de la célula, y luego aplicar pulsos de presión negativa hasta

alcanzar una resistencia mayor a 1 gΩ, a lo que se le denomina gigasello. A la configuración obtenida una vez formado el gigasello entre la pipeta y la membrana, se la denominada *cell attached* (Figura 3.3 A). Pero la configuración que se aplicó principalmente en este trabajo de tesis es la llamada *whole cell.* Esta configuración puede utilizarse para medir, a un nivel celular global, las corrientes y los cambios de capacitancia de la membrana celular, o los cambios de potencial de membrana. Para llegar a esta configuración, una vez obtenida la configuración *cell attached* se lleva a la membrana al potencial de *holding*, en nuestro caso de -80 mV, y se succiona hasta romper la sección de membrana dentro de la pipeta (Figura 3.3B). Cuando dicha sección de membrana se rompe, el electrodo forma un circuito continuo con el interior de la célula (Figura 3.4A). En la configuración *whole cell* la solución incluida en la pipeta (solución interna) ingresa al interior de la célula, reemplazando la solución citosólica. Debido a ello, esta solución se prepara intentando simular las condiciones intracelulares, pero introduciendo las modificaciones que sean convenientes a cada serie experimental. Por medio del microelectrodo se controla el potencial del lado interior de la membrana, mientras que el lado exterior estará expuesto al potencial del baño en el que se encuentra la célula, que se conecta a tierra.

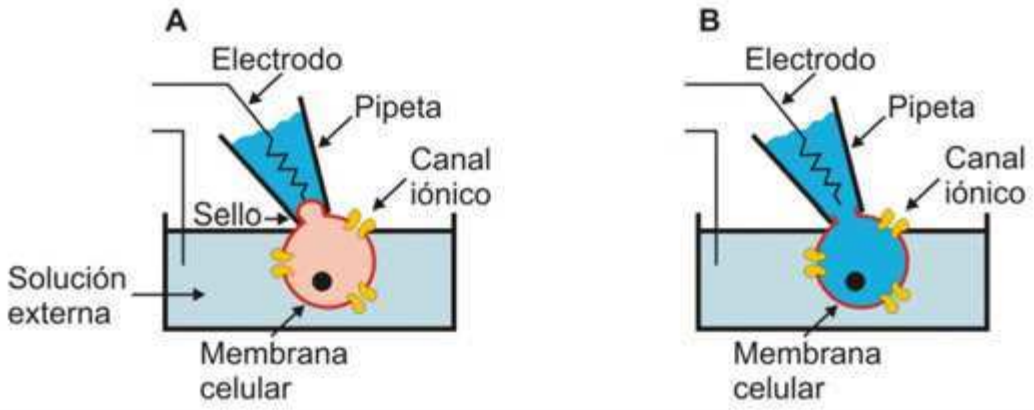

Figura 3.3- Esquema de la formación del gigasello y del establecimiento del modo *whole cell.* (A) La pipeta se apoya sobre la superficie de la membrana y con presión negativa se forma el gigasello (configuración *cell attached*). **(B)** Una vez que se rompe la pequeña sección de la membrana contenida dentro de la punta de la pipeta, se consigue llegar a la configuración *whole cell*.

Si se fija una diferencia de potencial suficientemente negativa (en este trabajo, –80 mV) entre los medios extracelulares e intracelulares (V_{intra}-V_{extra}), la membrana estará en condiciones similares al reposo, no habiendo flujo neto de iones. Pero si se imponen potenciales más positivos, que superen ciertos valores umbrales, se activarán canales dependientes del voltaje.

3.2.2 CIRCUITO EQUIVALENTE DE LA CÉLULA Y MEDICIÓN DE CAPACITANCIA CELULAR

Utilizando la técnica de *patch clamp* en modo *voltage clamp*, además de las corrientes iónicas que atraviesan la membrana pueden medirse otros parámetros eléctricos, como la capacitancia. Los cambios de capacitancia de membrana celular están directamente relacionados con las actividades exocíticas y endocíticas de la célula. La resolución que tiene esta técnica puede llegar al orden del femtofaradio (10^{-15} F) en condiciones experimentales óptimas, permitiendo detectar la fusión de vesículas aisladas. Además, posee una resolución temporal del orden de milisegundos. La desventaja de esta técnica es que mide el cambio total de superficie celular, el que puede resultar de un proceso de exocitosis, de endocitosis o de ambos combinados si ocurriesen simultáneamente. En este último caso se estaría midiendo la diferencia entre estos dos procesos, sin poder definir el valor de uno u otro. Sin embargo la endocitosis suele ser mucho más lenta (> 1 s) que la exocitosis (pocos milisegundos), con lo cual para estímulos breves la exocitosis y la endocitosis pueden ser separadas cinéticamente (Bert Sakmann, 1995).

La validez de las técnicas para estimar la capacitancia de membrana depende de que el circuito equivalente eléctrico asumido se aproxime al real de la célula en la configuración *whole cell*. Un modelo muy simple se aplica para células pequeñas y de forma aproximadamente esférica, como lo son las células cromafines. Este modelo, consta de una resistencia de acceso R_a en serie con un modelo celular en el que la célula se comporta eléctricamente como una resistencia R_m en paralelo con una capacitancia C_m. En este modelo, se supone que la capacidad de la pipeta ha sido completamente

compensada (Figura 3.4 B). La R_m está asociada con las resistencias que ofrecen los canales iónicos, y su valor está determinado por el estado de actividad de los mismos, siendo su valor en reposo del orden de 1GΩ. La capacitancia de la membrana plasmática, C_m, es aproximadamente 1μF/cm² suponiendo un espesor uniforme de 5 nm para la membrana, y una constante dieléctrica relativa entre 2 y 3. En las células cromafines la capacitancia total suele estar entre 4-10 pF (valores experimentales). La resistencia de acceso R_a es la resultante de la resistencia de la punta de la pipeta más contribuciones de la membrana adherida a consecuencia de la ruptura del sello. El valor de esta resistencia de acceso es típicamente de alrededor de 10 MΩ. Bajo este modelo, la corriente de membrana (I_m) tiene una parte iónica ($I_{ión}$) y una capacitiva (Ecuación 3.1).

$$I_m = I_{ion} + C_m \frac{dV}{dt} \qquad (3.1)$$

Donde "I_m"es la corriente que circula por la membrana., "*V*" es el potencial aplicado, "*Cm*" es la capacitancia de la membrana e "$I_{ión}$" es la corriente iónica.

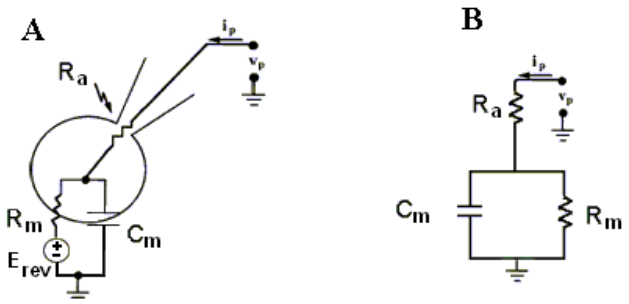

Figura 3.4- (A) Circuito equivalente para una célula de forma esférica bajo configuración *whole cell*. Este modelo tiene en cuenta la capacitancia celular de la membrana C_m, la resistencia de los canales iónicos R_m, y la resistencia de acceso R_a. Vp es el voltaje entre la pipeta y el baño (conectado a tierra) e I_p es la corriente que circula por el electrodo. **(B)** Esquema del modelo simplificado que se utiliza para calcular la capacitancia.

En condiciones de *voltage clamp,* si el potencial de membrana se mantiene constante, como ocurre durante el *holding*, el segundo término de la la ecuación 3.1 se anula, y por lo tanto la corriente medida es solamente iónica. En cambio si se modifica el potencial, el término correspondiente a la corriente capacitiva se vuelve diferente de 0. Como un ejemplo sencillo, la aplicación de un escalón de potencial generará un transitorio de corriente capacitiva de muy corta duración.

A consecuencia de todo esto, para medir la capacitancia de forma continua es necesario modificar el voltaje durante el *holding*, pero evitando la activación de los canales voltaje dependientes. Una solución muy utilizada es aplicar una función sinusoidal de voltaje centrada en el potencial de *holding* utilizado. Estos cambios sinusoidales en el potencial eléctrico aplicado, generan corrientes capacitivas continuas ($I = C_m \frac{dV}{dt}$) que son función de la capacitancia de la membrana, la cual es a su vez proporcional a la superficie de la membrana celular. Por medio de un amplificador de tipo *lock in* o un *software* que cumple esa función, se pueden separar los componentes capacitivos de los iónicos en la admitancia de la membrana, a partir de lo cual puede calcularse la capacitancia. La aplicación de este voltaje sinusoidal es suspendida durante el estímulo aplicado. Así, es posible registrar el valor de la capacitancia de membrana antes y después de un determinado estímulo.

Por lo explicado arriba, la configuración *whole cell* permite cuantificar la exocitosis que se produce en cualquier punto de la membrana celular a través de la medición de la capacitancia de membrana. A medida que se estimula a la célula con pulsos despolarizantes que provocan la activación de corrientes de Ca^{2+}, se pueden observar aumentos en la capacitancia de la membrana celular como consecuencia de la fusión de vesículas con la membrana plasmática (Figura 3.5) (Neher *et al.*, 1982). Conociendo el valor promedio de capacitancia de una vesícula única (Moser *et al.*, 1997), se puede calcular aproximadamente el número de vesículas fusionadas.

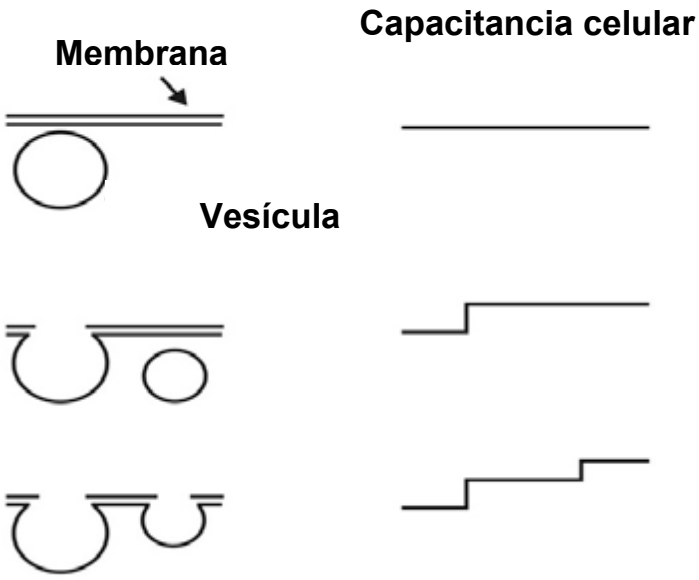

Figura 3.5- Un modo de cuantificar la exocitosis es a través de la medición de la capacitancia celular. A medida que se estimula a la célula con pulsos despolarizantes se observa un aumento en la capacitancia celular como consecuencia de la fusión de las vesículas con la membrana plasmática. En las células cromafines se estimó que el tamaño de una vesícula es de 1,3 fF (Moser *et al.*, 1997).

Suponiendo la validez del circuito equivalentede la célula que se muestra en la figura 3.4 B, se pueden estimar los valores de la capacitancia y la resistencia de la membrana. Para ello se desarrollaron métodos que aseguran una buena resolución en la medición de la capacitancia celular que es la que nos permite estudiar el proceso de exocitosis. El método más utilizado, emplea una onda sinusoidal de frecuencia ω_c sumada al potencial de *holding*. A partir de la corriente sinusoidal resultante, y utilizando un detector de fase (*lockin amplifier*, que puede ser en *hardware* o *software*), es posible aislar el componente imaginario de la admitancia, el cual está 90º fuera de fase respecto del estímulo y es una medida de la capacitancia. Actualmente se utilizan mucho más los algoritmos en forma de *software* incorporados en programas de adquisición de datos. En nuestro programa *patchmaster*, el método que utilizamos en el laboratorios es el Seno+DC, desarrollado por Manfred Lindau y Erwin Neher (Bert Sakmann, 1995)

Es importante remarcar que la estimación de la capacitancia se indetermina frente a la activación de corrientes no lineales significativas. Por lo tanto, este análisis no es válido durante una despolarización que activa a los canales iónicos dependientes de voltaje. Esto implica que se obtienen registros de capacitancia previamente y posteriormente, pero no durante la despolarización. Es importante, por lo tanto, trabajar a un potencial de *holding* suficientemente polarizado como para que, una vez sumada la sinusoide, no se alcance el umbral de activación de dichos canales. En nuestro caso particular, los canales de Na^+ están bloqueados con TTX y los de K^+ por reemplazo con Cs^+, así que lo relevante es no alcanzar el umbral de los CCDV.

3.2.3 DISPOSITIVO DE PATCH CLAMP

El dispositivo experimental utilizado, está formado por un microscopio OLYMPUS IX71, que es el sistema óptico que permite la visualización del preparado; un sistema de micromanipuladores motorizados en tres dimensiones, Sutter Instruments, modelo MP-225, que es mecanicamente estable y permite manipular la posición del microelectrodo respecto de la célula; un sistema de micromanipuladores mecánicos manuales en tres ejes, Narishige, Scientific instruments, modelo MX-4L, para los experimentos de amperometría; un amplificador y sistema conversor A/D-D/A de *patch clamp* EPC10 *double-patch* (Heka Elektronik), que permite controlar el voltaje aplicado, medir y adquirir las corrientes, y los cambios de capacitancia durante los experimentos, como también adquirir y digitalizar señales amperométricas; una jaula de Faraday; y una mesa antivibratoria casera. El *software* utilizado, *patchmaster* (Heka Elektronik), controla al amplificador, y además permite seleccionar el método para calcular la capacitancia, diseñar protocolos de pulsos para la estimulación, seleccionar la frecuencia de adquisición, y visualizar y realizar un primer análisis tanto de las corrientes generadas como de los cambios de capacitancia que se producen.

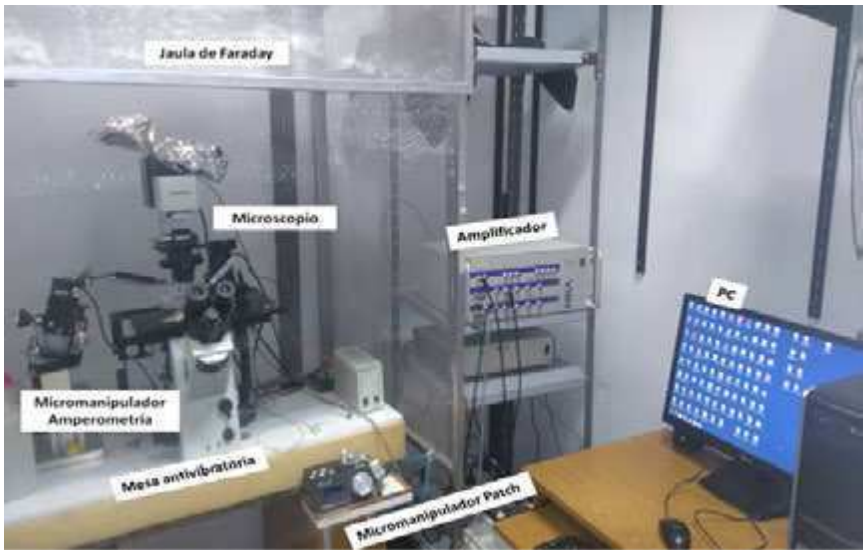

Figura 3.6- Dispositivo experimental de patch clamp utilizado para realizar registros de capacitancia y amperometría.

3.2.4 PREPARACIÓN DE MICROPIPETAS

Para construir los microelectrodos de *patch clamp se* utilizaron capilares de borosilicato de paredes anchas (1,5 mm diámetro externo x 0,86 mm diámetro interno; Sutter Instrument). Las pipetas construidas con este tipo de capilares generan poco ruido y tienen valores bajos de capacitancia parásita. Estas pipetas se construyeron con un *puller* horizontal (SUTTER P-97), mediante un protocolo de cinco pulsos de calor y estiramiento sucesivos hasta conseguir la forma y la resistencia adecuada. Los valores de resistencia que se utilizaron fueron entre 3 y 5 MΩ. Luego se les pulió la punta en una microforja, sometiéndolas al calor de una resistencia durante unos segundos (modelo FM-900, NARISHIGE). Esta acción permitió la obtención de sellos de muy buena calidad, con valores entre que estuvieron en el rango de 2 a 10 GΩ.

Una fuente de ruido en este tipo de experimentos se genera a partir de corrientes capacitivas parásitas variables, asociadas a la interacción entre las paredes del electrodo con la solución externa, la cual trepa por capilaridad. Este efecto, puede ser reducido aumentando el ancho de la pared de la pipeta, y sobre todo si se usa para esto un material hidrofóbico que redece la adsorción agua-vidrio. Para ello cubrimos la punta de las micropipetas con cera

odontológica dura, desde unos 10-20 μm del extremo por una longitud aproximada de 0.5 cm.

3.2.5 SOLUCIONES PARA EXPERIMENTOS ELECTROFISIOLÓGICOS

Una vez establecida la configuración *whole cell,* la solución introducida en la micropipeta (llamada normalmente solución interna) difundirá al citosol. Por lo tanto, se intenta que esta solución tenga aproximadamente una composición iónica similar a la citosólica, pero considerando algunas modificaciones necesarias para medir las corrientes deseadas (ver Tabla 3.1). Además, se debe mantener aproximadamente el pH y, la osmolaridad del citosol, y la célula necesita ser provista de ATP. Los aniones citosólicos solubles no permeables en la membrana (por ejemplo proteínas solubles) son reemplazados por un anión también no soluble, en nuestro caso D-Glutamato. La capacidad buffer de pH del citosol es provista por Hepes, y la de Ca^{2+} por EGTA.

La solución externa también debe contener aproximadamente las concentraciones fisiológicas del líquido extracelular (Tabla 3.1).

Solución interna	*Concentración*	*Solución externa*	*Concentración*
Hepes, pH 7.2	23 Mm	Hepes, pH 7.2	20 mM
Cs-Glut	95 mM	Glucosa	30 mM
CsCl	30 mM	CaCl	5 mM
NaCl	8 mM	NaCl	120 mM
$MgCl_2$	1 mM	MgCl2	4 mM
Cs-EGTA	0,5 mM	TTX	1 μM
Mg-ATP	2 mM		
GTP-Li	0,3 mM		

Tabla 3.1: Soluciones utilizadas para losexperimentos electrofisiológicos en modo *voltage clamp*, donde se midieron corrientes de Ca^{2+} y cambios de capacitancia. En las dos primeras columnas se detallan los componentes y las concentraciones de la solución interna. Esta solución se introduce en la micropipeta, y una vez que se llega a la configuración *whole cell* la misma difunde al citosol. Por esta razón, sus componentes deben simular los componentes fisiológicos celulares. En las dos últimas columnas se presentan los componentes y la concentración final de la solución en la que se bañan las células.

Dado que para los objetivos de esta tesis fue necesario medir la corrientes de Ca^{2+}, para todos los experimentos realizados en modo *voltage clamp* se debió bloquear las corrientes voltaje dependientes de K^+ y Na^+. Para eliminar las corrientes de K^+ se reemplazó el K^+ por Cs^+, manteniendo la osmolaridad y la fuerza iónica. Como los canales son selectivos para el ión K^+, no habrá corrientes asociadas a estos canales. Para bloquear las corrientes de Na^+ se usó tetrodotoxina (TTX) en la solución extracelular.

Los componentes presentados en la tabla 3.1, se utilizaron en la mayoría de los experimentos presentados en la primera mitad de esta tesis, salvo pequeñas modificaciones que se mencionarán oportunamente, por lo que llamaremos a estas soluciones como soluciones estándar. Vale la pena mencionar que se realizaron algunas series experimentales reduciendo la concentración de Ca^{2+} extracelular a 1.8 mM y la concentración intracelular de EGTA a 0.07 mM. En la segunda mitad de la tesis (experimentos en solución libre de Ca^{2+}) se agregó 1mM de EGTA de modo de reducir el Ca^{2+} libre a valores cercanos a cero.

También se realizaron algunos experimentos en configuración *current clamp,* con el objetivo de obtener potenciales de acción nativos en las células cromafines. Para estos ensayos las soluciones que se utilizaron fueron las siguientes:

Solución interna	*Concentración*	*Solución externa*	*Concentración*
Hepes , pH 7.2	20 mM	Hepes , pH 7.2	10 mM
NaCl	8 mM	NaCl	137 mM
KCl	135 mM	KCl	2.5 mM
EGTA	5 mM	$CaCl_2$	2 mM
$MgCl_2$	2 mM	$MgCl_2$	1 mM
Mg-ATP	2 mM	Glucosa	10 mM
GTP-Li	0,3 mM		

Tabla 3.2: Soluciones utilizadas para losexperimentos electrofisiológicos en modo *current clamp.*

3.2.6 PROTOCOLOS DE ESTIMULACIÓN UTILIZADOS PARA EL REGISTRO DE LA EXOCITOSIS

Luego de alcanzar la configuración de *whole cell,* se aplicó a las células un potencial de *holding* de -80 mV, el cual es suficiente para evitar la activación de los CCDV por la sinusoide (ver más adelante). Las mediciones se iniciaron aproximadamente 30 segundos después de haber alcanzado esta configuración. Los protocolos para medir la capacitancia celular (Cm) se basan entonces en la aplicación del potencial de *holding*, sumado a una sinusoidal de frecuencia 800 Hz y amplitud ± 30 mV. Se llegó a esta combinación luego de analizar diferentes combinatorias, de modo de reducir el ruido de la medición. La frecuencia mencionada permite, dado que por cada de ciclo de la sinusoide si obtiene una estimación de la capacitancia, una resolución de un punto cada 1.25 milisegundos en el registro de capacitancia. Sobre este patrón, se agrega una cierta secuencia de despolarizaciones para activar a los canales de Ca^{2+}, y en consecuencia disparar la exocitosis. En esta tesis se aplicaron tanto pulsos cuadrados como despolarizaciones que simulan potenciales de acción, tanto individuales como en tren.

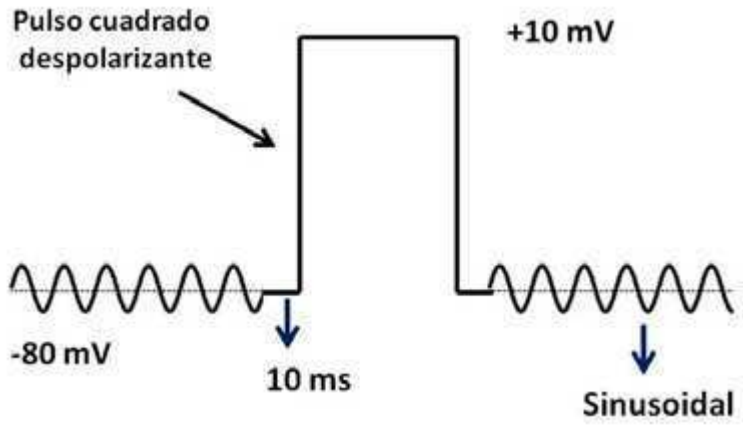

Figura 3.7 - En la figura se esquematiza el patrón de voltaje aplicado para el registro de las corrientes de Ca^{2+} y de la exocitosis durante un pulso despolarizante cuadrado. La exocitosis se midió como la diferencia entre los valores de capacitancia posteriores y previos al pulso. La onda sinusoidal permite la medición de la capacitancia celular, y el pulso despolarizante genera la apertura de los canales de Ca^{2+}, que en consecuencia permiten la entrada de Ca^{2+} que induce la exocitosis. A lo largo de esta tesis, se aplicaron pulsos cuadrados de diferentes duraciones, las cuales serán especificadas en las secciones correspondientes de resultados.

En todos los protocolos, la sinusoide se suspendió durante el pulso, y además 10 ms antes y 10 ms después de la aplicación de las despolarizaciones, para facilitar la definición de la línea de base de las corrientes iónicas. Los pulsos cuadrados se aplicaron desde el potencial de *holding* de -80 mV hasta +10 mV, donde las corrientes entrantes de calcio son máximas (ver figura 1.5 introducción). En la figura 3.7 se muestra un esquema del patrón de voltaje que se aplica para medir las corrientes de Ca^{2+} y la capacitancia en respuesta a un pulso cuadrado.

El estímulo que simula un potencial de acción (PA_{sim}) está formado por una rampa que parte del potencial de *holding* de -80 mV, y llega hasta un potencial de +50 mV en 2.5 milisegundos, y luego vuelve al potencial de *holding* en el mismo tiempo (Figura 3.8).

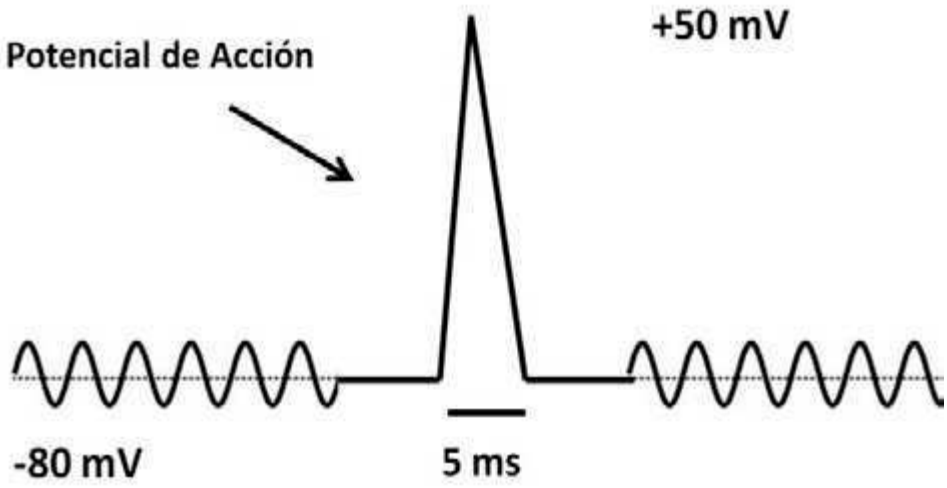

Figura 3.8 -Despolarización que simula un potencial de acción. En la figura se esquematiza el patrón de voltaje aplicado para el registro de las corrientes de Ca^{2+} y de la exocitosis durante un pulso que simula un potencial de acción (PA_{sim}). La exocitosis se midió como la diferencia entre los valores de capacitancia posteriores y previos al pulso. A lo largo de esta tesis, se aplicaron PA_{sim} de manera aislada y en trenes a distinta frecuencia, las cuales serán especificadas en las secciones correspondientes de resultados.

Los PA_{sim} y los pulsos cuadrados fueron utilizados en forma aislada, como pulsos pareados, y en trenes de estimulación a distintas frecuencias. En todos los casos se estimó la exocitosis sincrónica a cada estímulo, definida como la diferencia entre el valor de capacitancia posterior al estímulo menos el

valor de capacitancia previo al estímulo.

Es importante mencionar que en algunas células, inmediatamente después del pulso despolarizante, notamos la presencia de un pequeño cambio de capacitancia transitorio, probablemente asociado a la activación de las corrientes de *gating* de los canales de Na^+ (Horrigan *et al.*, 1994). Este transitorio se extingue completamente durante los 50 ms posteriores a la despolarización. Un artefacto capacitivo con características similares fue reportado también en células cromafines bovinas y embrionarias (Chow *et al.*, 1996; Gong *et al.*, 2005). Por lo tanto, para evitar cualquier influencia de este transitorio capacitivo en nuestras mediciones, decidimos cuantificar los saltos de capacitancia causados por cada estímulo como la diferencia entre el promedio de la capacitancia medida en una ventana de 100 ms, partiendo desde los 60 ms después de la despolarización, menos el promedio de la capacitancia pre-estímulo (medida también en una ventana temporal de 100 ms). Así definimos los cambios sincrónicos de capacitancia (ΔCm), que cuantificanla exocitosis inducida por el estímulo aplicado.

3.3 IMAGING DE CALCIO

3.3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS INDICADORES DE CALCIO TIPO FLUO

El calcio es un segundo mensajero clave en la regulación de numerosos procesos celulares. En ese sentido, la caracterización de estos procesos se ha visto favorecida por la utilización de moléculas fluorescentes que cambian sus propiedades de fluorescencia cuando se unen a Ca^{2+}. Estos indicadores se han clasificado en radiométricos (o también llamados *dual wavelength*) y no radiométricos (*single wavelength*). Los indicadores radiométricos se utilizan para realizar mediciones cuantitativas de las concentraciones de Ca^{2+}, mientras que los no radiométricos sólo permiten registros semicuantitativos, que se expresan como los cambios relativos de la emisión de la fluorescencia del

indicador respecto a su fluorescencia basal ($\Delta F/F$) (Grynkiewicz *et al.*, 1985; Minta *et al.*, 1989). Sin embargo, a favor de los indicadores no radiométricos podemos citar que son excitados en luz visible, poseen en varios casos mayor velocidad para reportar los cambios de Ca^{2+} que los radiométricos, y que según el indicador utilizado pueden ser más luminosos. En esta tesis utilizamos un indicador no radiométrico tipo Fluo en su forma ácida (salina), el que fue dializado a la célula a través de la solución interna del microlectrodo. Esto otorga importantes ventajas experimentales en comparación a las forma AM de los indicadores, particularmente que no se compartimentalice, y que podamos fijar y conocer de manera precisa su concentración intracelular.

Las distintas versiones de los indicadores tipo Fluo han sido mejoradas con el transcurso de los años (Paredes *et al.*, 2008). En ese sentido, la última versión de estos indicadores, Fluo-8, que se utilizó en esta tesis, exhibe propiedades muy ventajosas para monitorear los cambios relativos de fluorescencia. Respecto a sus versiones anteriores (Fluo-3 y Fluo-4), este indicador es menos citotóxico, más fotoestable y tiene una mayor afinidad por el Ca^{2+}, alcanzando una K_d de 395 nM. Otra característica relevante de este indicador es que su fluorescencia se puede incrementar hasta 100 veces por sobre el valor de su fluorescencia basal cuando se une a Ca^{2+}, mientras que Fluo-3 y Fluo-4 aumentan su fluorescencia en el orden de 30 a 40 veces.

3.3.2 DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

Para el desarrollo de los experimentos de Ca^{2+} imaging utilizamos un microscopio vertical modelo BX51WI, con un lente objetivo de inmersión en agua 60X, apertura numérica 0.85 (OLYMPUS) y una cámara EMCCD (Andor iXon, Oxford Instruments), en conjunto con el software "cell-M System Coordinator/ cell- Real Time controller". Las células fueron cargadas con el indicador Fluo-8 en su forma salina a través de la pipeta de *patch* por aproximadamente 2 minutos, a una concentración final de 100 nM. Las muestras se iluminaron con una lámpara de Xenon. La luz emitida pasó por una

red de difracción, y luego por un espejo dicroico, dirigiendo de esta manera los haces de la luz de longitud de onda seleccionada a una ranura y conducida por fibra óptica hacia la muestra. En estos experimentos se utilizó un filtro de excitación de fluorescencia (460-490 nm), un espejo dicroico (505 nm), y un filtro de emisión que permite el paso de longitudes de onda que se encuentran en el rango de la luz verde (515-550 nm; cubo U-MWIBBP, Olympus). La solución interna utilizada en estos experimentos tuvo la siguiente composición final (en mM): 95 mM Cs-Glutamato, 23 mM HEPES, 30 mM CsCl, 8 mM NaCl, 0.1 mM Fluo-8, 0.4 mM Cs-EGTA, 2 mM Mg-ATP, 0.3 mM Li-GTP. Se utilizaron soluciones externas con Ca^{2+} y libre de Ca^{2+} externo con la siguiente composición final (mM): NaCl 120 mM, $MgCl_2$ 4 mM, Hepes 20 mM, Glucosa 30 mM, $CaCl_2$ 5 mM, TTX 0.001 mM. En el caso de la solución libre de Ca^{2+} se agregó 1 mM de EGTA en lugar de $CaCl_2$ a la solución externa. Respecto a la adquisición de imágenes, es importante mencionar que el tiempo de exposición no fue igual entre los experimentos. En los ensayos control (5 mM Ca^{2+} extracelular) el tiempo de exposición promedio fue de 150 ± 29 ms, mientras que en la condición libre de Ca^{2+} el valor fue de 226 ± 41 ms. En cada experimento se seleccionó el tiempo de excitación en función de optimizar la adquisición de la señal fluorecente. Las diferencias en el tiempo de exposición entre ambas condiciones experimentales se debieron a que la fluorescencia basal en la condición libre de Ca^{2+} fue menor respecto a la condición control (5 mM Ca^{2+} extracelular), y por lo tanto, la muestra debió ser expuesta a la fuente de luz por un mayor tiempo.

3.4 AMPEROMETRÍA

La amperometría es una técnica electroquímica de gran sensibilidad y resolución temporal, que permite visualizar en tiempo real el proceso de liberación de moléculas de eventos exocíticos individuales. La posibilidad de realizar dichos registros se limita a situaciones en que los compuestos liberados sean oxidables o reducibles. Dado que la adrenalina (y también la noradrenalina) es susceptible de ser oxidada (figura 3.9 A), esta técnica es

aplicada normalmente a células cromafines. Debido a que la adrenalina posee un potencial redox de aproximadamente 570 mV (pH 7.2, temperatura ambiente), para lograr su oxidación es necesario aplicar potenciales mayores a este valor.

Para aplicar estos potenciales, se suele utilizar un electrodo de fibra de carbono (en la figura 3.9 B se muestra una fotografía obtenida por microscopía electrónica de la punta de este tipo de electrodo) conectado al cabezal del amplificador, que es apoyado sobre la superficie celular (figura 3.9 C). En nuestros experimentos utilizamos fibras de carbono de 12 μM de diámetro, a las que le aplicamos un potencial de 800 mV. La aplicación de este potencial fue adecuado para lograr la detección de la oxidación de las catecolaminas liberadas en nuestras condiciones experimentales. Para movilizar a estos electrodos (ver explicación más abajo) hacia la célula se utilizó un micromanipulador mecánico manual (Figura 3.6, micromanipulador amperometría).

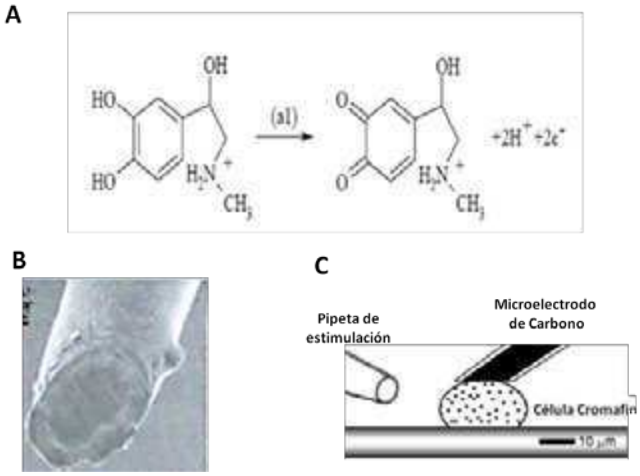

Figura 3.9- Fundamentos básicos de la técnica de amperometría. (A) Esquema representativo que ilustra la reacción química que ocurre durante la oxidación de la adrenalina. **(B)** Detalle del extremo de una fibra de carbono cortada a 45º vista mediante microscopía electrónica. **(C)** Representación esquemática de la técnica amperometría. Un microelectrodo de carbono se posiciona justo por sobre la célula. En este caso particular, la aplicación de una solución de estimulación (por ejemplo, un "*puff*" de 50 mM de KCl) induce la liberación de vesículas secretoras.

La actividad exocítica es registrada como espigas amperométricas (figura 3.10) que aparecen a una determinada frecuencia. Cada una de estas espigas representa la liberación de catecolaminas desde una vesícula individual, lo cual

genera una corriente que se produce por la transferencia de electrones hacia el electrodo (figura 3.10 A), debido a la oxidación de los transmisores liberados (Mosharov *et al.*, 2005). De las espigas amperométricas se puede extraer una serie de parámetros que entregan información sobre las características de los diferentes estadios de la exocitosis (Figura 3.10 B).

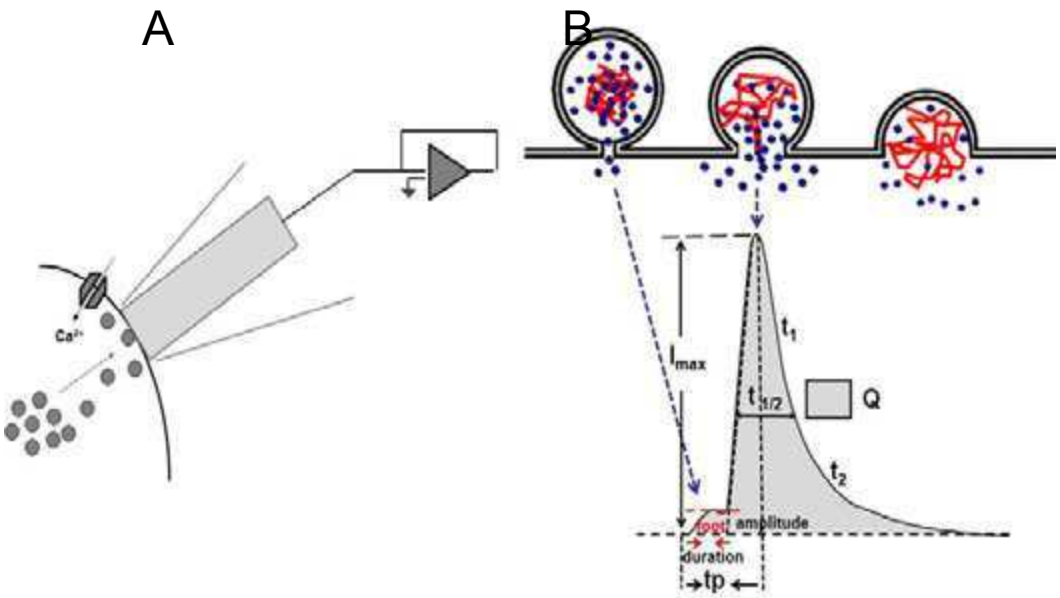

Figura 3.10- Registro de la exocitosis por amperometría: (A) Representación esquemática de la configuración experimental que se utiliza para obtener registros amperométricos. Un electrodo de carbono se pone sobre la superficie de las células cromafines, y se lleva a un potencial que esté por arriba del potencial redox necesario para oxidar las moléculas transmisoras liberadas. **(B)** Cada evento exocítico individual es representado por una espiga amperométrica, de la cual se pueden extraer parámetros asociados a diferentes etapas de la exocitosis. La pequeña corriente que precede la espiga amperométrica llamada "pie" otorga información sobre la conductividad y estabilidad del poro de fusión inicial, $t_{½}$ es una medida dela duración del evento exocítico, I_{max} refleja la corriente causada por la liberación de transmisores durante la expansión del poro de fusión, tp es el tiempo requerido para alcanzar la I_{max}, y Q refleja el contenido cuántico o cantidad de transmisor liberado por evento. Finalmente τ_1 y τ_2 representan las constantes cinéticas durante la depresión del contenido de la vesícula.

El área bajo la espiga es una medida del contenido cuántico (Q) o cantidad de transmisor liberado por evento. La amplitud máxima de la espiga (I Max) corresponde a la corriente causada por la liberación de transmisores durante la expansión del poro de fusión. El $t_{1/2}$ es la anchura de la espiga al 50% de su altura medido en ms, y nos da idea de la cinética del evento. Otros parámetros amperométricos asociados con la cinética de los eventos exocíticos

son el tiempo al pico (tp), que corresponde al tiempo en el que ocurre la expansión del poro, y las constantes cinéticas durante la fase de decaimiento de la espiga (τ_1 y τ_2), que se asocian con la depresión del contenido de la vesícula (Mosharov *et al.*, 2005). La corriente pequeña que precede a la espiga amperométrica, llamada "pie" (por *"foot"*), brinda información sobre la estabilidad (duración del "pie") y conductancia (amplitud del "pie") del poro de fusión (Lindau *et al.*, 2003). Finalmente, la evaluación de la frecuencia de espigas nos da una medida de la frecuencia de evento exocíticos.

La amperometría es una técnica no invasiva con una elevada sensibilidad y gran resolución temporal. Sin embargo, 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 exocítico. Además, solo se pueden detectar aquellas sustancias (productos de secreción) susceptibles de sufrir oxidación en el electrodo de carbono. Esto limita su uso solamente a ciertos tipos celulares, auque es posible lograr introducir compuestos oxidables/reducibles en vesículas de células que naturalmente no los secretan. Finalmente, debemos considerar que la amperometría sólo registra los compuestos liberados en un área limitada de la superficie de la membrana. Esto implica que esta técnica permite la detección de un pequeño porcentaje de las catecolaminas liberadas, a diferencia de las mediciones de capacitancia, que registran el 100% de la exocitosis inducida por estímulos despolarizantes. De acuerdo a las estimaciones realizadas bajo nuestras condiciones experimentales, la fibra de carbono utilizada en esta tesis abarcó aproximadamente el 25% de la superficie celular.

3.4.1 - PREPARACIÓN Y CALIBRACIÓN DE ELECTRODOS DE CARBONO PARA EXPERIMENTOS DE AMPEROMETRÍA

Para la construcción de electrodos de amperometría se aislaron fibras únicas de carbono de 12 μm de diámetro a partir de un haz de fibras (el cual

fue generosamente obsequiado a nuestro laboratorio por el Dr. Guillermo Álvarez de Toledo, Universidad de Sevilla, España). Cada fibra aislada se introdujo posteriormente en capilares de borosilicato (World Precision Instruments). Luego de ello, los electrodos se llevaron a un *puller* horizontal (SUTTER P-97), en donde se aplicó un protocolo de cinco pulsos de calor y estiramientos sucesivos. El producto final en la mayoría de los casos fue la obtención de dos electrodos de carbono. Posteriormente, se sumergió cuidadosamente la punta de los microelectrodos en una resina aislante por aproximadamente dos segundos, la cual se encontraba a una temperatura de aproximadamente 80ºC. Finalmente, los electrodos se llevaron a un horno a 180ºC por 4 horas, y se dejaron secar por 24 horas a temperatura ambiente.

Antes de ser utilizados, se midió la respuesta de los electrodos con el objetivo de evaluar su funcionalidad. En primer lugar, eliminamos la resina aislante de la punta de la fibra cortándola cuidadosamente con una hoja de bisturí. Luego agregamos una solución conductora de KCl (a una concentración de 3M) al capilar, y lo conectamos a un preamplificador o *headstage*, que estaba fijado a un micromanipulador y conectado con el amplificador principal. Posteriormente, los electrodos se sumergieron en una solución de NaCl (145 mM), se llevaron a un potencial de +800 mV, y se agregó al medio una solución que contenía adrenalina a una concentración de 10 μm. Si los electrodos eran funcionales, se obtenía el disparo abrupto de la señal de corriente amperométrica inmediatamente después del agregado de adrenalina, tal como se representa en la figura 3.11. Con el transcurso del tiempo, esta señal se estabilizaba, y se mantenía hasta que el electrodo era retirado de dicha solución. Aquellos electrodos que no respondían al agregado de adrenalina, o que presentaban ruidos basales superiores a 10 pA se descartaron.

En los experimentos de la primera sección de esta tesis cuantificamos la frecuencia de espigas amperométricas que fueron sincrónicas a la aplicación de PA_{sim} en trenes, normalizadas por el número total de células que respondieron mínimamente al estímulo. En los experimentos de la segunda sección de esta tesis (experimentos con Ca^{+2} 0) evaluamos el número de espigas, y tres parámetros experimentales: el tiempo total de la duración del

evento exocítico (Berberian *et al.*, 2009), la I_{max} , que refleja la corriente causada por la liberación de transmisores durante la expansión del poro de fusión, y la integral de la carga liberada (Q), que refleja el contenido cuántico.

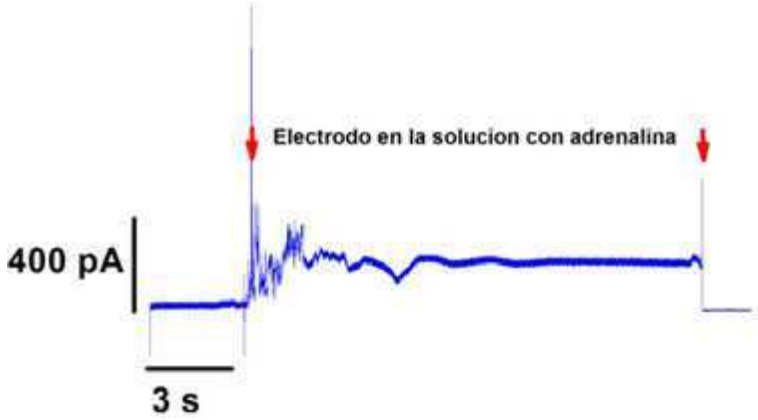

Figura 3.11- Trazado representativo de la respuesta de los electrodos de amperometría al agregado de adrenalina. En el trazado se muestra que inmediatamente después del agregado de una solución con adrenalina (10 μM) (primera flecha roja), hay un claro aumento de la señal de la corriente amperométrica.

3.4 ANÁLISIS DE DATOS Y ESTADÍSTICA

3.4.1 PROCESAMIENTO DE LOS EXPERIMENTOS ELECTROFISIOLÓGICOS Y ELECTROQUÍMICOS

Una primera visualización y análisis de los experimentos fue realizada con el programa patchmaster (Heka electronics). Posteriormente, los resultados electrofisiológicos y electroquímicos fueron analizados con Microsoft Office Excel 2007 y Origin 7.5 (Microcal Software, Northhampton, MA).

De todas las mediciones electrofisiológicas realizadas se descartaron aquellas en las cuales las corrientes de fuga superaban los 30 pA. Esta corriente se debe al flujo de iones que se produce cuando el sello no es bueno, o cuando las células están deterioradas. Los valores de las resistencias en serie variaron en general entre 7 y 10 MΩ. Aquellos experimentos que

presentaron resistencias en serie superiores a 12 MΩ fueron descartados de los análisis.

Por otra parte, aquellos electrodos amperométricos que exhibieron un ruido basal superior a 10 pA fueron desechados.

3.4.2 Procesamiento de los experimentos de Imaging de Calcio

Para analizar las imágenes se utilizó el programa *Image J*, y particularmente una de sus herramientas que permite seleccionar una región de interés con una forma determinada, que puede adaptarse perfectamente a de la célula cromafin, que es redondeada o elíptica. De esta manera se pudo cuantificar la fluorescencia promedio de la célula completa en unidades arbitrarias, a la que se le sustrajo el valor de fluorescencia basal o *background* para cada cuadro o foto. Para obtener el *background* se utilizó el promedio, para cada cuadro, de tres zonas oscuras cercanas a la célula.

Los resultados fueron expresados como los cambios relativos de fluorescencia en relación a la fluorescencia basal ($\Delta F/F_0$), en donde F_0 representa la fluorescencia promedio obtenida antes de estimular a las células y ΔF representa los cambios de fluorescencia durante el transcurso del experimento.

3.4.3 Estadística

Los resultados experimentales fueron expresados como medias muestrales ± su error estándar. Para hacer comparaciones entre dos grupos experimentales, se utilizó el test de Student para dos muestras independientes. Las comparaciones de más de dos muestras independientes se realizaron mediante pruebas de análisis de varianza (ANOVA) y contrastes a posteriori de Bonferroni. Estos test se realizaron mediante el software Origin 7.5 (Microcal Software, Northhampton, MA) y SigmaPlot 11.0.

3.5 REACTIVOS Y QUÍMICOS

La poli-L-lisina, citosina-1-β-arabinofuranósido, papaína, la albúmina sérica bovina, el ATP, el BAPTA, la 2-APB, el Dynasore , la thapsigargina y el GTP se compraron a Sigma (St Louis, MO, EEUU); el medio de cultivo Dulbecco (DMEM), el OPTIMEM, el suero fetal bovino, la gentamicina, penicilina/estreptomicina, son de GIBCO (Carlsbad, CA, EEUU). El fluoróforo Fluo-8 fue adquirido en Teflabs (Capital View, MO, EEUU). La lipofectamnina 2000 es de Invitrogen (St Louis, MO, EEUU). La nitrendipina fue adquirida a Tocris Bioscience (park Ellsville, MO, EEUU) y la ω-Conotoxina GVIA, ω-Agatoxina VIA y TTX a Alomone Laboratories (Har Hotzvim Hi-Tech Park, Jerusalem, Israel). SNX-482 de PEPTIDES international (EEUU). El anticuerpo monoclonal contra dinamina se adquirió BD Biosciences (San Jose, CA, EEUU). La Rianodina fue provista generosamente por el Dr. Ariel Escobar (UCMerced, EEUU). La adrenalina es de Laboratorio Duncan (Argentina).

Las fibras de carbono de 12 μm fueron provistas generosamente por el Dr. Guillermo Álvarez de Toledo (Universidad de Sevilla, Facultad de Medicina, España). Los plásmidos *synprint* fueron provistos generosamente por el laboratorio del Dr. Gerald Zamponi (University of Calgary. School of Medicine. Calgary, Canadá). La proteína de fusión GST-$Dyn_{829-842}$ que contiene los aminoácidos 829-842 de la dinamina humana (PPQVPSRPNRAPPG), y su control negativo, fueron provistos generosamente por la Dra. Ana María Cárdenas (Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso, Chile) y la cadena liviana de la toxina botulínica B fue provista generosamente por la Dra. Claudia Tomes (Universidad Nacional de Cuyo, Instituto de Histología y Embriología, Argentina).

4. RESULTADOS I

4. RESULTADOS I

4.1 EXOCITOSIS INDUCIDA POR UN ESTÍMULO QUE SIMULA UN POTENCIAL DE ACCIÓN (PA_{SIM})

La recuperación de IRP, tal como se representa en la figura 1.15, es demasiado lenta para sostener la exocitosis durante estimulaciones repetitivas, incluso a bajas frecuencias fisiológicas. Pero se debe considerar que, en condiciones fisiológicas, las células cromafines liberan su contenido vesicular en respuesta a potenciales de acción. Un PA de una célula cromafin es mucho más corto que un pulso cuadrado despolarizante de 50 ms, y por lo tanto es esperable que frente a este estímulo el número de vesículas liberadas sea menor que IRP. Por lo tanto, nos plateamos analizar la exocitosis asociada a un PA, y evaluar su cinética de recuperación para ver si es compatible con el rango de frecuencias de disparo de las células cromafines.

Es importante mencionar, que en nuestro modelo experimental hemos definido las características generales de IRP trabajando a una concentración de Ca^{2+} extracelular de 5 mM (Alvarez *et al.*, 2008), y una concentración intracelular de EGTA de 0.5 mM (5 mM $[Ca^{2+}]e$/0.5 mM [EGTA]i). Esta elección se debió a que tales condiciones maximizan la medición de la exocitosis altamente acoplada a CCDV, como lo es este *pool*. Por tales razones, en esta tesis utilizamos estas concentraciones de Ca^{2+} y EGTA como condición inicial estándar de nuestros experimentos. Como se verá posteriormente, varios experimentos fueron repetidos utilizando una concentración extracelular de Ca^{2+} y una concentración interna de EGTA (1.8 mM $[Ca^{2+}]e$/70 µM [EGTA]i) que representan mejor las condiciones fisiológicas (Neher *et al.*, 1992).

Para aproximar la amplitud, forma y duración de un potencial de acción, en esta tesis aplicamos un pulso de voltaje compuesto por una rampa ascendente y una rampa descendente, al que llamamos PA_{sim} (ver métodos, y figura 4.1 (i)). En estos experimentos la aplicación de un PA_{sim} generó una I_{Ca2+}

promedio de 488±34 pA y un salto de capacitancia de 11±1 fF (n=35). En la figura 4.1 (ii) y (iii) se representan ejemplos representativos de trazados individuales de estos experimentos.

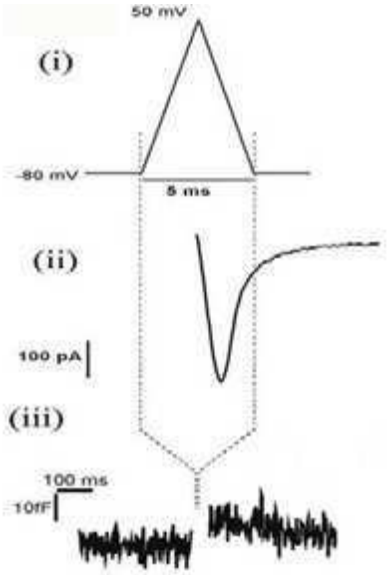

Figura 4.1- I_{Ca2+} y exocitosis sincrónica en respuesta a la aplicación de un PA_{sim}. (i) El PA_{sim} estuvo compuesto de una rampa ascendente despolarizante de 2.5 ms de duración desde el potencial de *holding* (-80 mV) hasta +50 mV, y una rampa descendente de igual duración que retornó al potencial de *holding*. **(ii) y (iii)** son ejemplos representativos de las I_{Ca2+} y los saltos de capacitancia inducidos por este tipo de estímulo. El registro de la medición de capacitancia está en una escala temporal distinta.

En esta tesis decidimos estimular a las células con PA_{sim}, debido a que la utilización de este estímulo nos permitió diseñar una gran variedad de protocolos de estimulación en nuestro software (*Patchmaster*, HEKA Elektronik), y fijar precisamente la frecuencia de estimulación. Además con la utilización de PA_{sim} logramos mantener constante la amplitud del estímulo durante los experimentos de pulsos pareados y trenes. Sin embargo, se ha reportado que la forma del potencial de acción podría afectar las corrientes de Ca^{2+} (Duan *et al.*, 2003). Por este motivo, decidimos comparar las I_{Ca2+}, su integral (Int-I_{Ca2+}) y los ΔCm inducidos por la aplicación de un PA_{sim} con las respuestas obtenidas de la estimulación con un potencial de acción nativo (PA_{nat}). Estos experimentos se realizaron en las dos condiciones de Ca^{2+} externo/EGTA interno mencionadas previamente. Para la obtención de tales PA_{nat}, las células se mantuvieron en la configuración *whole cell* en modo *current clamp*, y se le inyectaron pulsos cuadrados de corriente de 120 pA por 2 ms. El potencial de acción resultante (figuras 4.2 A (ii) y 4.2 B (ii), para 5 mM [Ca^{2+}]e/0.5 mM [EGTA]i y 1.8 mM [Ca^{2+}]e /70 µM [EGTA]i, respectivamente) fue utilizado como templado de estimulación en experimentos de *voltage clamp* (Chan *et al.*, 2001). La Int-I_{Ca2+} y los ΔCm inducidos por ambos tipos de estímulos fueron similares en las dos condiciones Ca^{2+} externo/EGTA interno

evaluadas (Figuras 4.2 A y 4.2 B, ítems (iv) y (v)). Sin embargo, la amplitud de la I_{Ca2+} para PA_{nat} a 5 mM $[Ca^{2+}]e$ /0.5 mM [EGTA]i mostró una reducción moderada, aunque significativa, en comparación a un PA_{sim}. (figura 4.2 A (iii)).

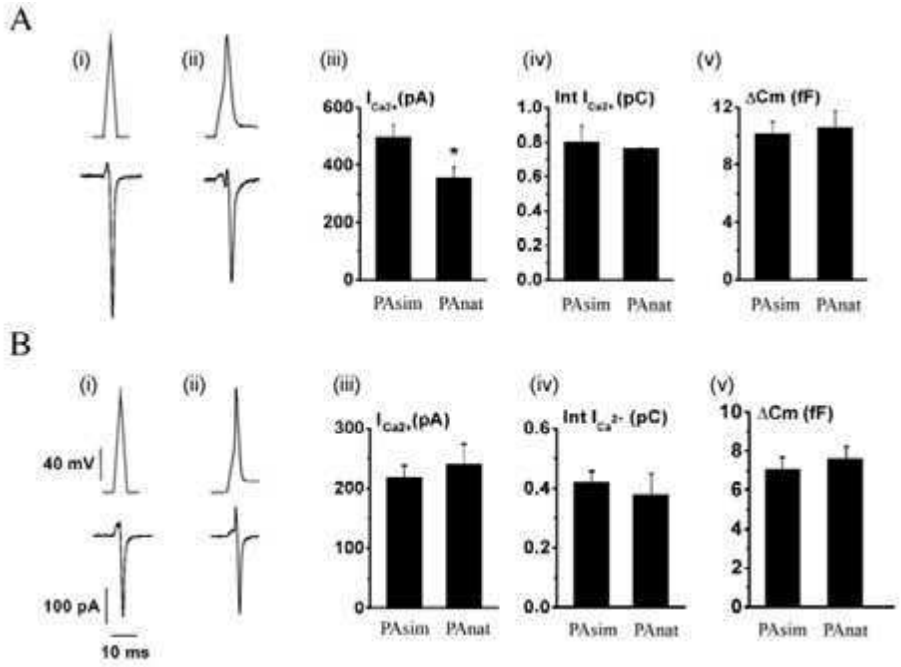

Figura 4.2- La aplicación de un potencial de acción simulado (PA_{sim}) induce una entrada de Ca^{2+} y una exocitosis similar a la de un potencial de acción nativo (PA_{nat}). Se midió la corriente de Ca^{2+} y la exocitosis inducidas por un potencial de acción nativo (PA_{nat}), y los resultados comparados con mediciones independientes obtenidas en células estimuladas con PA_{sim} en condiciones de 5 mM $[Ca^{2+}]e$/0.5 mM [EGTA]i (A), y de 1.8 mM $[Ca^{2+}]e$ /70 µM [EGTA]i (B) (n=10). A (i) y B (i) representan al PA_{sim}, mientras que A(ii) y B(ii) representan los PA_{nat} obtenidos a partir de experimentos de *current clamp, y* que fueron utilizados para estimular a las células. Los ejemplos de los registros de las I_{Ca2+} para todas las condiciones se representan debajo de cada PA. Los gráficos de barras en (iii), (iv) y (v) resumen los valores de las I_{Ca2+}, integral de la I_{Ca2+} (Int-I_{Ca2+}) y los ΔCm, respectivamente. * $p < 0.05$. Los datos están expresados como valores promedios ± error estándar.

En otro grupo de experimentos, evaluamos la posibilidad de que el potencial de *holding* al cual manteníamos las células (-80 mV) pueda provocar un aumento de la I_{Ca2+}, y consecuentemente de la exocitosis, respecto a condiciones más fisiológicas. El potencial de reposo natural de las células cromafines se encuentra en aproximadamente -60 mV (Orozco *et al.*, 2006; Wallace *et al.*, 2002). En nuestros experimentos utilizamos normalmente un *holding* más hiperpolarizado para evitar que la sinusoidal de voltaje aplicado pueda activar a los CCDV. Sin embargo, se debe considerar que también un *holding* menor al potencial de reposo fisiológico puede aumentar la población

de CCDV no inactivados, y por lo tanto disponibles, y entonces permitir el reclutamiento de un mayor número de CCDV cuando llegue la despolarización. Para ello realizamos mediciones pareadas de I_{Ca2+} y ΔCm en respuesta a la aplicación de PA_{sim} en células que se mantuvieron alternadamente a potenciales de *holding* de -80 mV (con sinusoidal de ±30 mV) y de -65 mV (con sinusoidal de ±15 mV). Tanto los trazado representativos en la figura 4.3 (A) (arriba), como los promedios representados en la figura 4.3 (B y C), muestran que no hubo diferencias significativas entre las I_{Ca2+} inducidas en ambos potenciales de *holding*, tanto para 5 mM $[Ca^{2+}]$e/0.5 mM [EGTA]i (B), como para 1.8 mM $[Ca^{2+}]$e / 70 µM [EGTA]i (C). Además, observamos que los trazados de capacitancia obtenidos a -65 mV de *holding* fueron muy ruidosos (ver figura 4.3 A (i), abajo), probablemente debido a la baja amplitud de la sinusoidal de voltaje. Por el contrario, las mediciones obtenidas con potenciales de *holding* de -80 mV y amplitud de sinusoidal ± 30 mV exhibieron una relación señal/ruido mucho mejor para estimar los cambios de capacitancia (figura 4.2 A (ii), abajo). Esta relación entre la relación señal/ruido y la amplitud de la sinusoidal ya fue observada previamente en nuestro laboratorio (Tesis Doctoral de Yanina D. Álvarez, 2011). En esta serie experimental, los cambios de capacitancia obtenidos a ambos potenciales de *holding* fueron iguales estadísticamente, pero esta comparación no se muestra en la tesis debido a que la cuantificación realizada sobre los registros a -65 mV no era del todo confiable, debido a la mala relación señal/ruido mencionada.

También corroboramos que no había diferencias entre las I_{Ca2+}, registradas a ambos potenciales de *holding* cuando se estimularon las células con PA_{nat}. Más precisamente, observamos que en condiciones de 5 mM $[Ca^{2+}]$e/0.5 mM [EGTA]i las I_{Ca2+} fueron de 313 ± 23 pA y 279 ± 31 pA para potenciales de *holding* de -80 mV y -65 mV, respectivamente (n=5 por cada condición), mientras que en la condición 1.8 mM $[Ca^{2+}]$e /70 µM [EGTA]i los valores fueron de 207 ± 25 pA y 189 ± 17 pA para potenciales de *holding* de -80 mV y -65 mV, respectivamente (n=5 por cada condición).

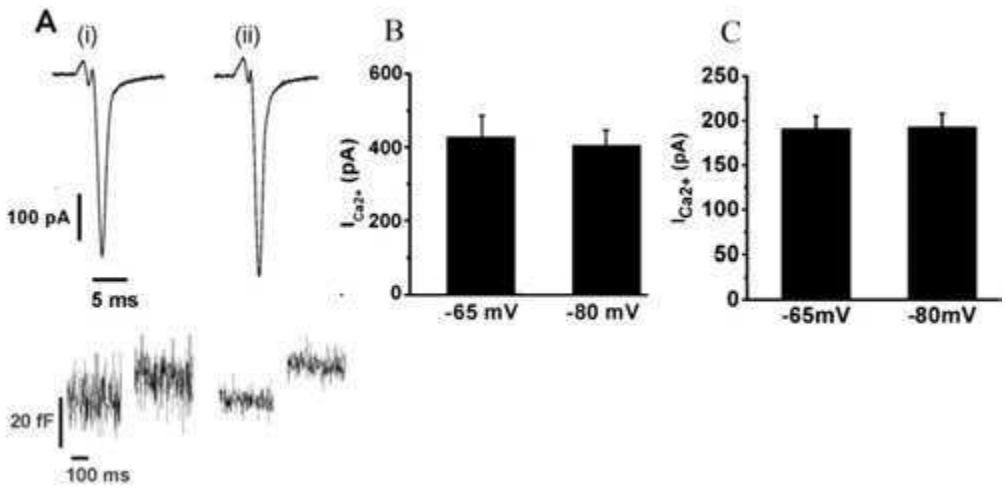

Figura 4.3- La aplicación de un PA_{sim} induce I_{Ca2+} similares a potenciales de *holding* de -65 mV y -80 mV. La I_{Ca2+} y los ΔCm inducidos por un PA_{sim} a potenciales de *holding* de -65 mV y -80 mV fueron medidos en experimentos pareados. **A** (i) y (ii) representan registros típicos de I_{Ca2+} (arriba) y ΔCm (abajo) obtenidos a potenciales de *holding* de -65 mV y -80 mV, respectivamente, a 5 mM $[Ca^{2+}]$e/0.5 mM [EGTA]i. Los gráficos de barras en **B y C** resumen las mediciones de I_{Ca2+} obtenidas a 5 mM $[Ca^{2+}]$e/0.5 mM [EGTA]iy 1.8 mM $[Ca^{2+}]$e /70 µM [EGTA]i, respectivamente (n=10 para ambas condiciones). Los datos están expresados como valores promedios ± error estándar.

Debido a que la aplicación de PA_{sim} a potenciales de *holding* de -80 mV no modificaron sustancialmente las I_{Ca2+} y los ΔCm respecto a PA_{nat}, ni tampoco respecto a un potencial de *holding* cercano al fisiológico, para el resto del trabajo adoptamos las dos primeras condiciones. El PA_{sim}, como ya dijimos, nos permite una construcción más controlada y variada de nuestros protocolos de estimulación. Y por otro lado, el *holding* de -80 mV nos permite utilizar una sinusoidal de mayor amplitud sin riesgo de que se activen los CCDV, y permitiendo la obtención de una mejor relación señal/ruido en nuestros registros de C_m.

También observamos que la disminución de la concentración de Ca^{2+} extracelular desde 5 mM a 1.8 mM redujo significativamente los tamaños de las I_{Ca2+} y los valores de las exocitosis ($p < 0.05$ todas las condiciones analizadas, figuras 4.2 y 4.3). Esto resulta totalmente esperable, dada la fuerte dependencia de la exocitosis con el Ca^{2+}. Como se mencionó previamente, en esta tesis utilizamos como soluciones extracelular e intracelular estándar las que contienen 5 mM $[Ca^{2+}]$e/0.5 mM [EGTA]i respectivamente, dado que

maximizan la respuesta de la exocitosis altamente acoplada a CCDV, que es a la que nos abocamos. Luego, y con el objetivo de corroborar las conclusiones obtenidas, algunos ensayos se replicaron utilizando 1.8 mM $[Ca^{2+}]e$ /70 µM [EGTA]i.

Por definición el IRP es un *pool* vesicular altamente acoplado al estímulo que se libera frente a despolarizaciones de corta duración. Trabajos de nuestro y otros laboratorios indican que se compone de vesículas altamente acopladas a CCDV. Por lo tanto, dado que PA_{sim} es un estímulo muy breve que induce una exocitosis claramente sincrónica, sería esperable que liberase vesículas pertenecientes a IRP.

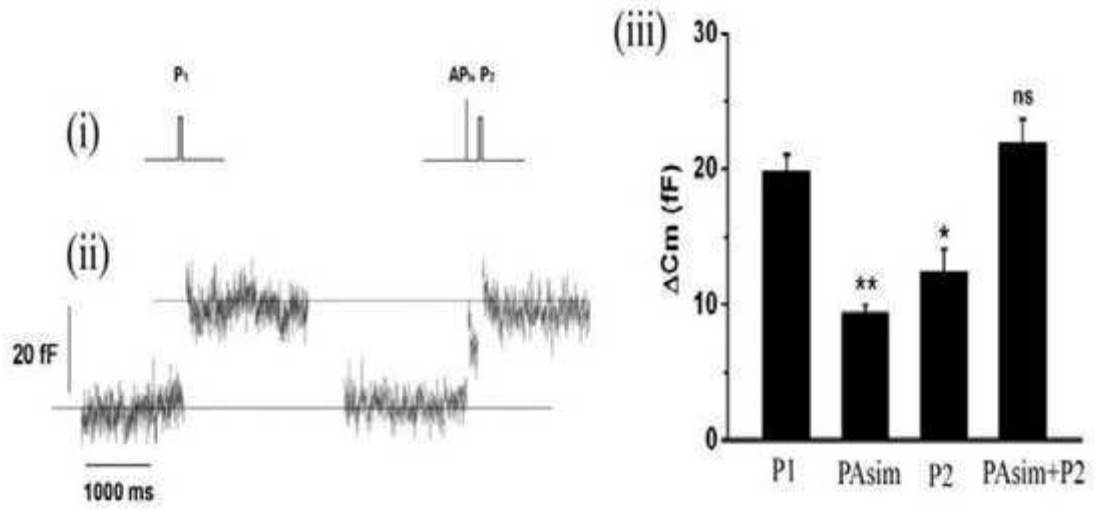

Figura 4.4- La aplicación de un PA_{sim} libera un subgrupo de vesículas del IRP. (i) El protocolo de estimulación consistió en la aplicación secuencial de pulsos cuadrados despolarizantes de 50 ms (P1) para evaluar el tamaño del IRP en condiciones control, luego de 20 segundos se aplicó un PA_{sim}, y casi inmediatamente (200 ms) la célula fue estimulada con otro pulso de 50 ms para evaluar el efecto de la aplicación previa de un PA_{sim} sobre el tamaño del IRP. **(ii)** Registro representativo y **(iii)** diagrama de barras de los resultados promedios obtenidos en este tipo de experimentos (n = 9). PA_{sim}+P2 representa la suma de los cambios de capacitancia inducidos por un PA_{sim} y P2 , obtenido en cada experimento. Las cuatro condiciones representadas en el diagrama de barras fueron comparadas por un test ANOVA ($p<0.001$), y los PA_{sim}, P2 y PA_{sim}+P2 se compararon con P1 (*$p<0.003$ y **$p<0.001$) por un test de Bonferroni. Los datos están expresados como valores promedios ± error estándar.

Para evaluar esta predicción se aplicaron, de manera secuencial, un pulso cuadrado despolarizante de 50 ms (P1) para obtener una estimación control de IRP, 20 segundos después se aplicó un PA_{sim}, y finalmente, 200 ms después, un segundo pulso de 50 ms (P2) (figura 4.4(i)). Como era esperable, los resultados indican que la aplicación de un PA_{sim} genera una respuesta exocítica significativamente menor que P1. Más importante aún, el segundo pulso cuadrado de 50 ms (P2) también generó una respuesta significativamente menor que la estimación del IRP control (P1) ($p<0.003$), y la suma de las exocitosis inducidas por los pulsos PA_{sim}+P_2 resultó en un valor idéntico al del IRP control evaluado por P1 (figura 4.4 (ii) y (iii)). Estos resultados indican que el grupo de vesículas liberadas por un PA_{sim} aislado, al que nosotros denominamos ETAP (del inglés *exocytosis triggered by action potential*) corresponde a una fracción de lo que definimos como IRP.

4.2 RECUPERACIÓN DEL GRUPO DE VESÍCULAS LIBERADAS POR UN PA_{SIM}

Para el estudio de la recuperación vesicular de ETAP, se aplicó el protocolo representado en la figura 4.5 A (i). Básicamente, este consistió en un par de PA_{sim} separados por intervalos de tiempo variable, entre 0.2 y 10 s. La figura 4.5 A (ii) y (iii) ilustran ejemplos representativos de las mediciones obtenidas frente a este protocolo para intervalos de 0.2 y 2 s, respectivamente. La figura 4.5 B resume los resultados obtenidos en este tipo de experimentos.

La recuperación relativa R fue definida por la relación entre la exocitosis inducida por el segundo PA_{sim} sobre la exocitosis inducida por el primer PA_{sim}. Los puntos experimentales fueron ajustados a una función monoexponencial creciente, obteniendo un tiempo característico de recuperación τ de 0.73 ± 0.1 segundos. Notablemente, este valor fue diez veces más rápido en comparación al τ de recuperación del IRP (figura 1.15; $p<0.01$).

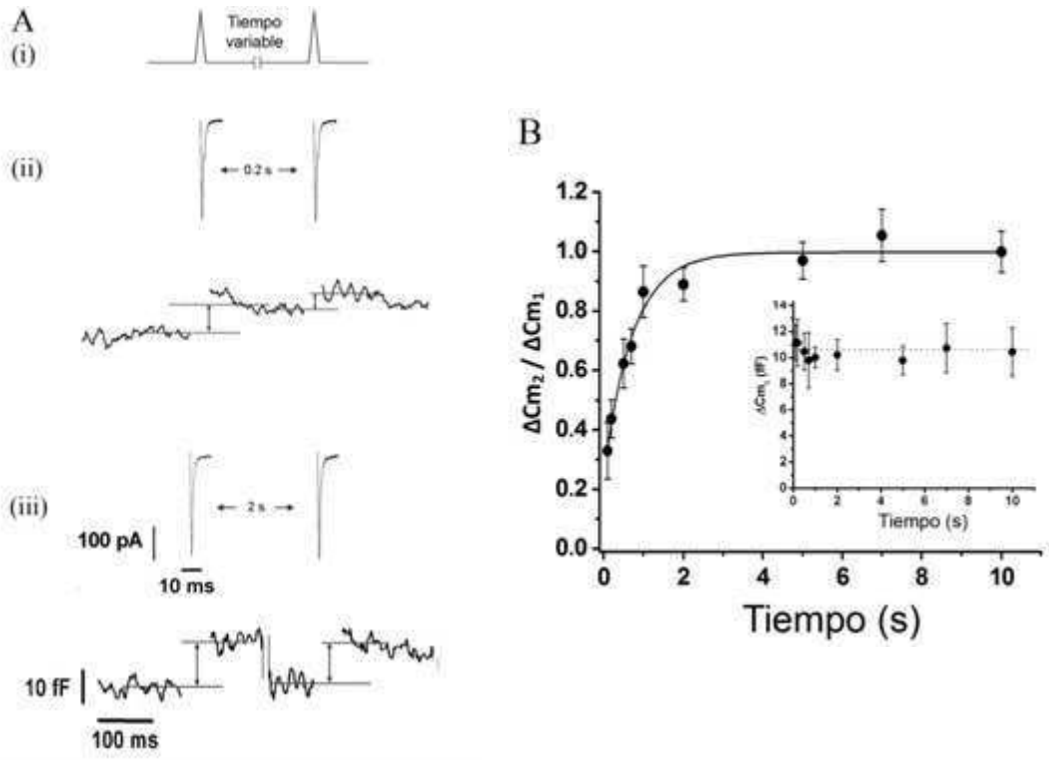

Figura 4.5- Recuperación de ETAP luego de su depresión. (A), (i) Esquema del protocolo de estimulación. Para evaluar la recuperación de ETAP se aplicaron dos PA_{sim} separados por intervalos de tiempo variable. En (ii) y (iii) se muestran las I_{Ca2+} (arriba) y los trazados de capacitancia (abajo) obtenidos durante experimentos típicos, con intervalos de tiempo de 0.2 y 2 s respectivamente. Los registros de capacitancia se muestran en diferentes escalas temporales que las corrientes. **(B)** La recuperación relativa de ETAP (expresada como $\Delta Cm_2/\Delta Cm1$; donde ΔCm_1 y ΔCm_2 representan los cambios de capacitancia inducidos por el primer y segundo PA_{sim}, respectivamente) fueron graficados en relación al intervalo de tiempo entre los PAs_{sim}. Cada punto representa el promedio de las mediciones obtenidas en al menos 11 células independientes. Los valores promedios fueron ajustados a una función de crecimiento monoexponencial de la forma $R = Ro + A.\left(1 - e^{\frac{-t}{\tau}}\right)$, obteniendo un valor Ro a tiempo cero de 0.24±0.05, una asíntota A de 0.75±0.05, una constante temporal τ of 0.73 ± 0.11 segundos, y un coeficiente de correlación R > 0.9886. El gráfico en el recuadro representa los cambios de capacitancia promedio inducidos por el primer PA_{sim} durante el protocolo de pulsos pareados, y la línea continua representa el promedio general de estas mediciones. Los datos están expresados como valores promedios ± error estándar.

4.3 LA RECUPERACIÓN DE ETAP DEPENDE DEL CONTENIDO VESICULAR DEL RRP

Trabajos clásicos en células cromafines, así como en otros modelos neurobiológicos, establecieron que el rellenado de los *pools* vesiculares liberables puede deberse a la transferencia de vesículas desde otros *pools* vesiculares que se encuentran ubicados río arriba (Smith *et al.*, 1998; Voets *et al.*, 1999; von Gersdorff *et al.*, 1997). Por otra parte, en células cromafines se ha propuesto que la aplicación de un potencial de acción único, o la estimulación con trenes de PAs a bajas frecuencias, promueve una fusión transitoria de las vesículas sinápticas, probablemente a través de un mecanismo de tipo *kiss and run* (Fulop *et al.*, 2005). Si tomáramos esta segunda posibilidad como válida, podemos deducir a partir de ella una hipótesis derivada, que consistiría en que a bajas frecuencias de PAs operaría un reciclado local de vesículas, que implicaría una endocitosis rápida asociada a una recuperación también rápida de ETAP.

Con el objetivo de determinar cuál de estos mecanismos opera bajo la rápida recuperación de ETAP, desarrollamos diversas estrategias experimentales.

En primer lugar, deprimimos *pooles* vesiculares que se encuentran alojados río arriba de ETAP. Debido a que ETAP es un subgrupo de vesículas incluido en el IRP (figura 4.4), es posible que las vesículas que forman parte de este último *pool* alimenten a ETAP por transferencia de vesículas. Para poner a prueba esta hipótesis decidimos deprimir al IRP, y posteriormente evaluar la recuperación de ETAP. La figura 4.6 A (i) muestra el protocolo utilizado para este tipo de experimentos. Primero, aplicamos un PA_{sim} único para estimar el valor control de ETAP para cada experimento individual. Posteriormente, luego de un período de 15 s (suficiente para permitir una recuperación total de ETAP) se deprimió completamente a IRP con un pulso de 50 ms ($\Delta Cm = 24 \pm 5$ fF, n = 6). Y finalmente evaluamos la recuperación de ETAP a través de la aplicación de un segundo PA_{sim} a intervalos de tiempo variables.

La recuperación de ETAP bajo esta condición experimental se representa en la figura 4.6 B por medio de círculos negros llenos. Para poder visualizar el efecto de los tratamientos, se graficaron la recuperación control de ETAP (tomada de la figura 4.5 B, líneas punteadas) y la primera parte de la recuperación de IRP (tomada de la figura 1.15 A (ii), líneas discontinuas). Los resultados muestran que la depresión del IRP no afectó la cinética de recuperación de ETAP, sugiriendo que estas vesículas se recuperan por un mecanismo independiente de la transferencia vesicular desde IRP.

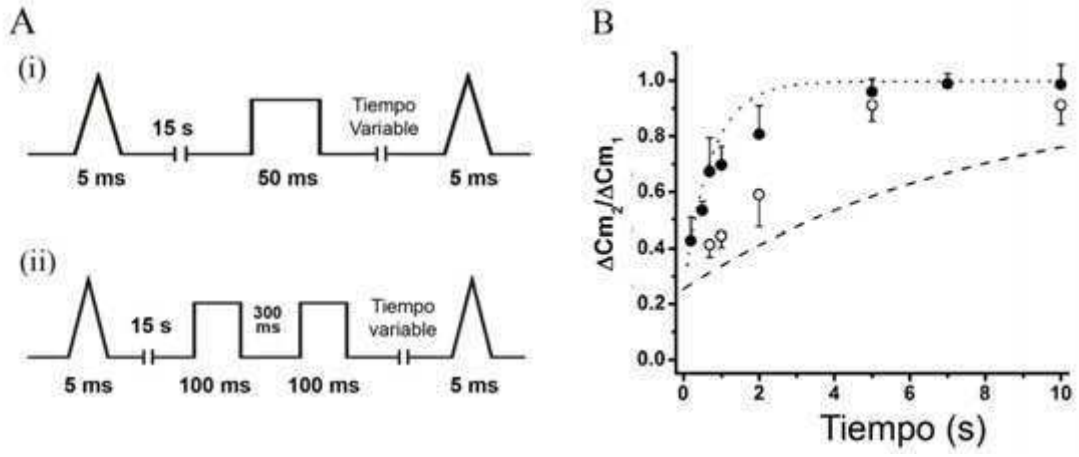

Figura 4.6- La recuperación de ETAP depende del contenido vesicular del RRP.(A) Esquema de los protocolos de estimulación. Primero, un PA_{sim} fue aplicado para estimar el tamaño de ETAP en condiciones control, luego de 15 s un pulso cuadrado despolarizante de 50 ms fue aplicado para deprimir el IRP (i), o un par de pulsos de 100 ms separados por 300 ms para deprimir el RRP (ii); y finalmente un segundo PA_{sim} se aplicó a intervalos de tiempos variables para evaluar la recuperación de ETAP. **(B)** Resumen de los resultados obtenidos luego de la aplicación de los dos protocolos experimentales. La recuperación de ETAP luego de la depresión del IRP es representada por los círculos negros llenos (cada punto representa el promedio de al menos 6 células independientes), mientras que los círculos abiertos representan la recuperación de ETAP luego de la depresión del RRP (cada punto representa el promedio de al menos 5 células independientes). Para poder visualizar el efecto de los tratamientos, se graficaron la recuperación control de ETAP tomada de la figura 4.5 B (líneas punteadas) y la recuperación del IRP tomada desde la figura 1.15 A (ii) (líneas discontinuas). La estadística de estos experimentos está representada en la tabla 4.1. Los datos están expresados como valores promedios ± error estándar.

Alternativamente, consideramos la posibilidad de que ETAP se recupere directamente desde el RRP. Para evaluar esta posibilidad, se deprimió a RRP utilizando el protocolo representado en la figura 4.6 A (ii) (Voets *et al.*, 1999), y luego analizamos cómo este protocolo afectó la recuperación de ETAP. El doble pulso de 100 ms provocó saltos sincrónicos de capacitancia de 42 ± 5 y 21 ± 3 fF (n = 5), respectivamente. Bajo estas condiciones experimentales, la recuperación de ETAP se representa por círculos blancos en la figura 4.6 B. En estos experimentos observamos una considerable inactivación de las I_{Ca2+} durante los primeros 500 ms luego de la aplicación del segundo PA_{sim}, por lo tanto los intervalos de 0.2 y 0.5 s se descartaron de los análisis. En esta condición, los valores relativos de recuperación a 0.7, 1 y 2 s fueron significativamente inferiores en comparación a la recuperación control de ETAP (líneas punteadas, ver tabla 4.1 para los análisis estadísticos). Estos resultados sugieren que la recuperación de ETAP depende, al menos parcialmente, de la movilización de vesículas desde el RRP.

Recuperación de ETAP bajo distintas condiciones experimentales

Tiempo (s)	Control (5 mM Ca^{2+})	RRPdplt	Nitre	Dynasore	RnDn	Anti-Dyn	RRPdplt +Anti-Dyn	GST-Dyn
0.2	0,44±0,07 (11)	-	0,41±0,06 (6)	0,51±0,05 (12)	0,39±0,03 (14)	0,41±0,07 (10)	-	0.45±0.06 (12)
0.5	0,62±0,08 (13)	-	0,55±0,05 (12)	0,66±0,05 (13)	0,52±0,03 (12)	0,61±0,07 (15)	-	0.52±0.05 (15)
0.7	0,68±0,06 (13)	0,41±0,04 (7) *	0,57±0,04 (11)	0,58±0,04 (13)	0,52±0,04 (10)	0,60±0,07 (13)	0,37±0,05 (10) #	
1	0,86±0,08 (13)	0,44±0,04 (5) ***	0,62±0,06 (11) *	0,63±0,06 (13) *	0,61±0,03 (11) *	0,64±0,07 (14) *	0,47±0,04 (7) ***	0.62±0.04 (16) **
2	0,89±0,05 (14)	0,59±0,11 (7) **	0,84±0,05 (12)	0,83±0,05 (14)	0,72±0,03 (15)	0,59±0,07 (15) ***	0,45±0,09 (7) #	0.67±0.05 (13) *
5	0,97±0,06 (15)	0,91±0,07 (5)	0,98±0,05 (11)	0,99±0,06 (14)	1,03±0,06 (15)	0,72±0,06 (15) **	0,44±0,07 (7) #	0.73±0.05 (14) *
10	1,0±0,07 (10)	0,91±0,07 (7)	0,92±0,07 (10)	1,1±0,09 (10)	0,98±0,06 (9)	0,82±0,09 (15)	0,83±0,06 (8)	0.86±0.05 (15)

Tabla 4.1: Recuperación relativa de ETAP (expresada como $\Delta C_{m2}/\Delta C_{m1}$; donde ΔC_{m1} y ΔC_{m2} representan los cambios de capacitancia inducidos por el primer y por el segundo PA_{sim}, respectivamente) en las distintas condiciones estudiadas en este trabajo. Las comparaciones entre los distintos tratamientos a cada tiempo particular fueron desarrolladas por un test ANOVA de una vía, y si las diferencias estadísticas fueron significativas ($p<0.05$), las comparaciones entre las condiciones control y los tratamientos individuales fueron hechas por Bonferonni (*$p<0.05$; **$p<0.02$; ***$p<0.005$; #$p<0.001$). Los valores están representados por medias ± error estándar. El número de experimentos en cada caso está representado entre paréntesis. RRPdplt: Depleción del RRP; RnDn: rundown de endocitosis; Anti-Dyn: Anticuerpo monoclonal anti-dynamina; GST Dyn: Péptido GST-$Dyn_{829-842}$.

4.4 LA RECUPERACIÓN DE ETAP DEPENDE DE UN PROCESO ENDOCITÓTICO RÁPIDO

La exocitosis inducida por un PA_{sim} fue seguida regularmente por una rápida caída de la capacitancia (figura 4.7 A (i)). La amplitud de esta caída fue casi idéntica a la exocitosis precedente (figura 4.7 A (ii)). Un proceso similar fue descrito previamente por Chan y Smith, el cual fue asociado a una endocitosis compensatoria rápida (Chan *et al.*, 2001, 2003b). El promedio del decaimiento de la Cm obtenida en nuestros experimentos se ajustó a una función de decaimiento monoexponencial, con una constante temporal (τ) de 0.53 ± 0.01 s ($R > 0.9446$, línea blanca en figura 4.7 (i)).

Considerando que el transcurso temporal de esta endocitosis fue similar (incluso un poco más rápido) a la tasa de recuperación de ETAP, evaluamos la posibilidad de que ambos procesos pudieran estar acoplados funcionalmente. Dicho de otra manera, la endocitosis rápida descrita podría ser el primer paso de una secuencia de eventos que lleva finalmente a la recuperación. Si esta hipótesis fuese cierta, la cinética de recuperación de ETAP debería estar limitada por la velocidad de la endocitosis. Para evaluar esta hipótesis desarrollamos cinco aproximaciones experimentales. En todas ellas buscamos inhibir o al menos enlentecer el desarrollo de esta endocitosis rápida, y posteriormente evaluar la recuperación de ETAP.

Se ha descrito que las corrientes de Ca^{2+} de tipo L activan procesos endocíticos rápidos, y consecuentemente influencian los mecanismos de reciclado vesicular subyacentes (Perissinotti *et al.*, 2008; Rosa *et al.*, 2007). En base a estos antecedentes, buscamos inhibir el desarrollo de esta endocitosis incubando las células con nitrendipina (Nitre), un bloqueante de los CCDV tipo L (Bean, 1984). El primer efecto observado fue la disminución de las I_{Ca2+} activadas por un PA_{sim} (268 ± 23 pA, $p<0.05$). Esto estuvo asociado a un enlentecimiento de la endocitosis, evidenciado por el aumento de la constante temporal de decaimiento a 3.57 ± 0.14 s (ver figura 4.7 B (i)). Finalmente, este tratamiento también generó un retardo moderado de la recuperación de ETAP en relación a la condición control (ver tabla 4.1 para los análisis estadísticos)

(figura 4.7 B (ii)). Vale la pena mencionar que el inhibidor específico de canales P/Q ω-agatoxina IVA no alteró a la endocitosis rápida, obteniéndose una constante temporal de decaimiento de 0.83 ± 0.13 s (n=5).

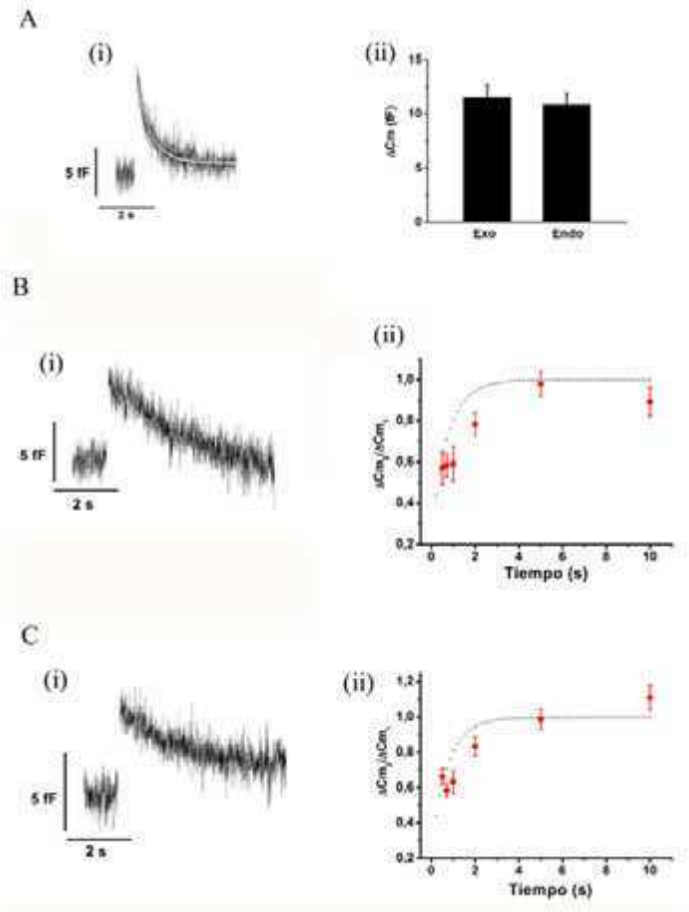

Figura 4.7- La recuperación de ETAP depende de un proceso endocítico rápido: ensayos farmacológicos. (A) (i) Luego de ETAP, la superficie de membrana es recuperada por una endocitosis rápida. La figura representa el promedio de los registros obtenidos en 35 células independientes. El decaimiento de la capacitancia de membrana fue ajustada a una ecuación monoexponencial de caída (τ = 0.53±0.01 s; R > 0.9446). (ii) El diagrama de barras representa el promedio las amplitudes de las exocitosis (Exo) y las endocitosis subsecuentes (Endo), estimadas en cada experimento individual (n=35). Los valores del ΔCm asociados a estos procesos no fueron estadísticamente diferentes. **(B)** (i) Esta figura representa el promedio de los registros de endocitosis medidos en 11 células individuales en presencia de nitrendipina (Nitre) (10 μM), un bloqueante del CCDV tipo L. Las mediciones comenzaron 3 minutos después de la incubación con la droga. El decaimiento de la capacitancia se ajustó a una ecuación de decaimiento monoexponencial (τ = 3.57 ± 0.142 s, R > 0.9235). (ii) Recuperación de ETAP en presencia de Nitre (puntos rojos). Bajo estas condiciones experimentales se observó un retardo parcial de la recuperación de ETAP (τ: 1.64 ± 0.77s, R >0.9612). (Leyenda sigue en la página 110)

(C) (i) Esta figura representa el promedio de los registros de endocitosis medidos en 8 células individuales en presencia de dynasore (80 μM), un inhibidor no competitivo de la proteína dinamina. Las mediciones comenzaron 20 minutos después de la incubación con la droga. El decaimiento de la capacitancia se ajustó a una ecuación de decaimiento monoexponencial (τ = 1.74 ± 0.06 s, R > 0.8236) (ii) Recuperación de ETAP en presencia de dynasore (puntos rojos). Bajo estas condiciones experimentales se observó el retardo parcial de la recuperación de ETAP (τ:3.19 ± 3.01 s, R>0.9554). Para corroborar el efecto de los tratamientos descritos sobre la endocitosis, evaluamos la endocitosis relativa (calculada como el cociente entre la endocitosis medida entre los 1000 y los 1100 milisegundos posteriores al PA_{sim} y la exocitosis sincrónica previa) para cada experimento individual. Para este análisis se tomaron solamente los experimentos controles y los tratamientos que fueron obtenidos en los mismos cultivos celulares. Según este análisis, los dos tratamientos, nitrendipina y dynasore, provocaron una inihibición significativa de la endocitosis respecto a los controles, obteniendo valores de 0.26 ± 0.04 (n=7; p<0.0001), 0.45 ± 0.03 (n=8; p<0.0001), y 0.80 ± 0.04 (n=8), respectivamente. Las líneas punteadas representan el ajuste de las curvas obtenidas en condiciones control. La estadística para evaluar la recuperación de ETAP para todas las condiciones representadas en esta figura se incluyen en la tabla 4.1. Los datos están expresados como valores promedios ± error estándar.

En otro grupo de experimentos se aplicó el fármaco dynasore, que actúa como un inhibidor no competitivo de la dinamina (Tsai *et al.*, 2009). Recordemos que la dinamina es una GTPasa que interviene en las últimas etapas de varios procesos endocíticos. Esta proteína se polimeriza y se ensambla como un collar alrededor del cuello de los *budding pits*. Cuando la dinamina es desfosforilizada cambia la configuración de este collar a un estado más apretado, cerrando el poro fisión y ayudando a completar la endocitosis. El dynasore mantiene a la dinamina en su configuración relajada, y por lo tanto esta droga es un potente inhibidor de la endocitosis (Danino *et al.*, 2004). Al igual que la nitrendipina, la administración de este compuesto a una concentración de 80 μM produjo la disminución de las I_{Ca2+} (225 ± 47 pA, n=12) (Tsai *et al.*, 2009), y una exocitosis levemente inferior en relación al valor control de ETAP (8.4 ±1.2 fF). Por otro lado, la administración de esta droga enlenteció la endocitosis generada por un PA_{sim}, llevando el valor de la constante temporal de decaimiento a 1.74 ± 0.06 s (figura 4.7 C (i)); y de manera coherente la recuperación de ETAP se enlenteció moderadamente (figura 4.7 C (ii), ver tabla 4.1 para los análisis estadísticos).

Se ha descrito una caída significativa (o *rundown*) de la endocitosis compensatoria rápida luego de 4 minutos de mantener células cromafines bovinas bajo la configuración *whole cell*, supuestamente debido al pérdida de factores solubles (Smith *et al.*, 1997). En base a estos antecedentes, decidimos tomar esta ventaja experimental y evaluar si este proceso de *rundown* de la endocitosis rápida afectaba a la cinética de recuperación de ETAP. Para ello, aplicamos el protocolo de la figura 4.5 A (i) después de 5 minutos de establecer la configuración *whole cell*. Dicho tiempo no afectó la respuesta exocítica de ETAP (11±1 fF), pero enlenteció moderadamente a la endocitosis respecto al control. La figura 4.8 A (i) representa el promedio de las endocitosis obtenidas en 13 células, que se ajustaron a una función de decaimiento monoexponencial con una constante temporal τ de 1.65 ± 0.02 s. Además, es importante destacar que en estos experimentos la recuperación de ETAP se retardó también moderadamente en relación a la condición control (círculos negros en figura 4.8 A (iii), y para la estadística ver RnDn (por *rundown* de la endocitosis) en la tabla 4.1).

Los resultados descriptos arriba, mostraron que en los tres casos mencionados hubo un moderado enlentecimiento de la endocitosis que se correlacionó con un también moderado retardo en la recuperación de ETAP. Si bien dichos resultados son coherentes entre sí, y también con la hipótesis que se evalúa, no nos resultaron del todo convincentes debido a la levedad de los cambios observados. Con los objetivos de confirmar la existencia de una potencial asociación entre la endocitosis rápida y la recuperación de ETAP, y de tener una primera aproximación sobre el mecanismo operante, se dializó a través de la pipeta de *patch* un anticuerpo monoclonal contra dinamina (anti-Dyn). Ha sido descripto que dicho anticuerpo inhibe la acción de la dinamina durante al endocitosis (Gonzalez-Jamett *et al.*, 2010). Este tratamiento experimental se realizó bajo la hipótesis de que la endocitosis rápida que se activa luego de la exocitosis de ETAP responde a un mecanismo dependiente de dinamina, lo cual se cumple tanto para la endocitosis clatrino dependiente como para el *kiss and run* (Royle *et al.*, 2003). Anti-Dyn (7 nM) se dializó por un tiempo mínimo de 5 minutos, lo cual, si se considera un peso molecular para el anticuerpo de 150 kD y una resistencia en serie de 10 MΩ (en nuestros

experimentos tuvimos un promedio de 9.7 MΩ), asegura que se alcance más del 63% de la concentración de la proteína en estado estacionario (Pusch *et al.*, 1988). En esta condición, la endocitosis rápida generada frente a un PA_{sim} fue completamente inhibida (figura 4.8 A (ii), trazado rojo). Dicho efecto se suprimió cuando el anticuerpo fue inactivado previamente a 95° C durante 5 minutos (figura 4.8 A (ii), trazado gris). Además, la aplicación de anti-Dyn provocó un retardo significativo de la recuperación de ETAP (figura 4.8 A (iii), círculos rojos, ver Tabla 4.1 para la estadística). Este retardo fue claramente más marcado que en los experimentos farmacológicos previos. Es importante mencionar que el incremento de la concentración del anticuerpo (14 nM), no provocó un efecto adicional sobre el retardo descrito (datos no mostrados).

Finalmente, como estrategia adicional para confirmar la contribución de la endocitosis rápida dependiente de dinamina sobre la recuperación de ETAP, dializamos el oligopéptido de 14 aminoácidos GST-$Dyn_{829-842}$ (ver Materiales y Métodos, sección 3.5), que contiene la región de reconocimiento para proteínas SH3 del dominio PRD de la dinamina. Previamente se demostró que la administración de este péptido inhibe el reclutamiento de la dinamina en los sitios activos de liberación (Shupliakov *et al.*, 1997), así como la endocitosis generada en respuesta a la aplicación de PA aislados o a bajas frecuencias de estimulación en células cromafines (Fulop *et al.*, 2008). Al igual que anti-Dyn, GST-$Dyn_{829-842}$ se dializó por un tiempo mínimo de 5 minutos antes de iniciar las mediciones. Considerando una resistencia en serie de 10 MΩ y el peso molecular de GST-$Dyn_{829-842}$ (27.7 kD), se estima que éste péptido alcanzó aproximadamente el 82% de su concentración final durante dicho período (Pusch *et al.*, 1988). La diálisis de 30 μM de GST-$Dyn_{829-842}$ inhibió completamente la endocitosis rápida (figura 4.8 B (i), trazado rojo), y además retardó significativamente la recuperación de ETAP (figura 4.8 B (ii) puntos rojos, ver Tabla 4.1 para comparaciones estadísticas).

Los experimentos presentados en esta sección apoyan la hipótesis que sostiene que la recuperación de ETAP depende de un mecanismo endocítico rápido, y además muestran que dicha endocitosis sería dependiente de dinamina. Sin embargo, de acuerdo a la sección anterior (figura 4.6), la recuperación de ETAP también sería dependiente del contenido vesicular del

RRP. En resumen, la recuperación de ETAP estaría asociada a dos mecanismos: un proceso endocítico rápido dependiente de dinamina, y a la transferencia de vesículas desde el RRP. Por lo tanto, se realizó una serie experimental para analizar el efecto de la inhibición conjunta de ambos mecanismos sobre la recuperación de ETAP. Para ello, aplicamos el protocolo representado en la figura 4.6 A (ii) luego de la diálisis de anti-Dyn por 5 minutos. Este tratamiento provocó una drástica inhibición de la recuperación de ETAP (figura 4.8 A (iii), diamantes verdes).

Es pertinente aclarar que decidimos comparar los valores de recuperación a tiempos individuales por ANOVA, en vez comparar los ajustes individuales de recuperación de ETAP, ya que algunos tratamientos (ver diamantes verdes y círculos rojos abiertos en figura 4.8 A (iii)), no siguieron un comportamiento de recuperación monoexponencial, a diferencia de los controles.

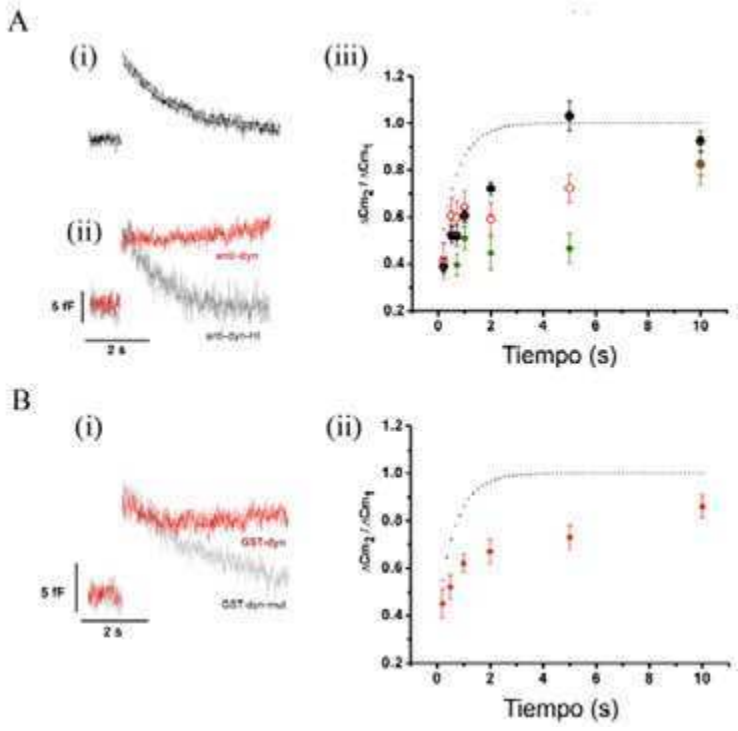

Figura 4.8- La recuperación de ETAP depende de un proceso endocítico rápido: ensayos de interferencia molecular. (A) (i) Promedio de endocitosis registradas en 13 células individuales, las cuales fueron medidas 5 minutos después del establecimiento de la configuración *whole cell*. El decaimiento de la capacitancia de membrana fue ajustada a una ecuación de decaimiento monoexponencial (τ= 1.65±0.02, R = 0.9883). (Leyenda sigue en la próxima página)

(ii) Promedio (en rojo) de 11 registros de endocitosis obtenidas en el mismo número de células, que fueron expuestas a un anticuerpo monoclonal contra dinamina (anti-Dyn, concentración 7 nm) dializado a través de la pipeta de *patch* por 5 minutos. El trazado en gris claro representa el promedio de 5 células tratadas con el mismo anticuerpo previamente inactivado por calor (anti-Dyn HI). (iii) Representación de la recuperación de ETAP en tres condiciones experimentales: cuando las mediciones fueron desarrolladas 5 minutos después del establecimiento de la configuración *whole cell* (círculos negros), cuando el anti-Dyn se agregó a la solución interna (círculos rojos abiertos), y cuando el anti-Dyn se agregó a la solución interna y el RRP se deprimió por el protocolo representado en la figura 4.6 A (ii) (diamantes verdes). Para una comparación visual, el ajuste de la curva obtenida en la condición control (tomada desde la figura 4.5 B) se muestra en líneas punteadas. **(B)** (i) Esta figura representa el promedio (en rojo) de los registros endocíticos medidos en 11 células individuales, en las que el péptido GST-Dyn$_{829\text{-}842}$ (concentración 30 μM) se dializó por 5 minutos previos al comienzo de las mediciones. El trazado gris representa el promedio de 6 células dializadas con un péptido mutado al que llamamos GST-Dyn-mut, el cual no es capaz de interaccionar con proteínas SH y por lo tanto no puede desplazar a dinamina. (ii) Recuperación de ETAP en presencia de GST-Dyn$_{829\text{-}842}$ (círculos rojos). La línea punteada representa el ajuste de la curva obtenida en condiciones control. La estadística para evaluar la recuperación de ETAP para todas las condiciones representadas en esta figura se incluyen en la tabla 4.1. Para corroborar el efecto de los tratamientos descritos sobre la endocitosis, evaluamos la endocitosis relativa (calculada como el cociente entre la endocitosis medida entre los 1000 y los 1100 milisegundos posteriores al PA_{sim} y la exocitosis sincrónica previa) para cada experimento individual. Para este análisis se tomaron solamente los experimentos controles y los tratamientos que fueron obtenidos en los mismos cultivos celulares. Según este análisis, los dos tratamientos, GST-Dyn y Anti-Dyn, provocaron una inihibición significativa de la endocitosis respecto a los controles, obteniendo valores de 0.11 ± 0.04 (n=8; p<0.0001), 0.06 ± 0.05 (n=7; p<0.0001), y 0.81 ± 0.04 (n=6), respectivamente. Los datos están expresados como valores promedios ± error estándar.

Posteriormente, estudiamos la recuperación de ETAP a 1.8 mM $[Ca^{2+}]e$ /70 μM [EGTA]i. Dicha concentración de Ca^{2+} es aproximadamente la fisiológica, y esta menor concentración de EGTA aproxima mejor el rango de capacidades buffer calculado en células cromafines (Neher *et al.*, 1992; Marengo y Monck, 2000). Tal como se indicó, en estas condiciones experimentales (figura 4.2 A (ii) y B (ii)), las I_{Ca2+} y los ΔCm fueron menores (247±21 pA; 8±1 fF; n=14) que los obtenidos en nuestras condiciones estándar. Sin embargo, frente a la aplicación de un PA_{sim} observamos nuevamente la presencia de un proceso endocítico rápido, con cinética similar a la observada en condiciones estándar, y que compensó completamente a la exocitosis precedente (figura 4.9 A (i) y (ii)). Finalmente, observamos que la recuperación de ETAP fue también rápida (figura 4.9 B (iii), círculos negros), con un una

cinética comparable a la ya descripta en condiciones estándar.

Previamente habíamos descrito que la aplicación de anti-Dyn o GST-Dyn reduce las I_{Ca2+} en aproximadamente un 30%. Reanalizamos el efecto de estos dos tratamientos en presencia de una solución interna con 70 μM de EGTA, pero modificando el Ca^{2+} externo de modo de conservar I_{Ca2+} similares en los tres grupos experimentales (control, anti-Dyn y GST-Dyn). Bajo este objetivo, en un primer grupo de experimentos se midieron las I_{Ca2+} en células dializadas con anti-Dyn e incubadas en presencia de 1.8, 3 y 5 mM de $[Ca^{2+}]e$. En dichas condiciones, se obtuvieron I_{Ca2+} de 143,2±17.3 (n=5), 206.6±43.2 (n=5) y 269±43 pA (n=5) respectivamente. Se puede ver que la aplicación de anti-Dyn en 5 mM $[Ca^{2+}]e$/70 μM de EGTA permitió obtener I_{Ca2+} similares a las del control respectivo (a 1.8 mM de $[Ca^{2+}]e$). La I_{Ca2+} para GST-Dyn en 5 mM $[Ca^{2+}]e$/70 μM de EGTA resultó ser de 248±24 pA (n=4), también muy similar al control. Por lo tanto, se evaluó el efecto de anti-Dyn y de GST-Dyn sobre la endocitosis y la recuperación de ETAP en células expuestas a 5 mM $[Ca^{2+}]e$/70 μM de EGTA. Como se muestra en la figura 4.8 B, la aplicación de ambas proteínas a 5 mM Ca^{2+} extracelular/70 μM EGTA interno inhibió la endocitosis rápida y retardó significativamente la recuperación de ETAP (figura 4.9 B (iii), círculos rojos para anti-Dyn y verdes para GST-dyn), al igual que lo descrito previamente (figura 4.8).

Los distintos experimentos presentados en esta sección permiten concluir que las células cromafines exhiben un mecanismo endocítico rápido dependiente de dinamina, y que este mecanismo está asociado a la recuperación de las vesículas que se liberan frente a un potencial de acción.

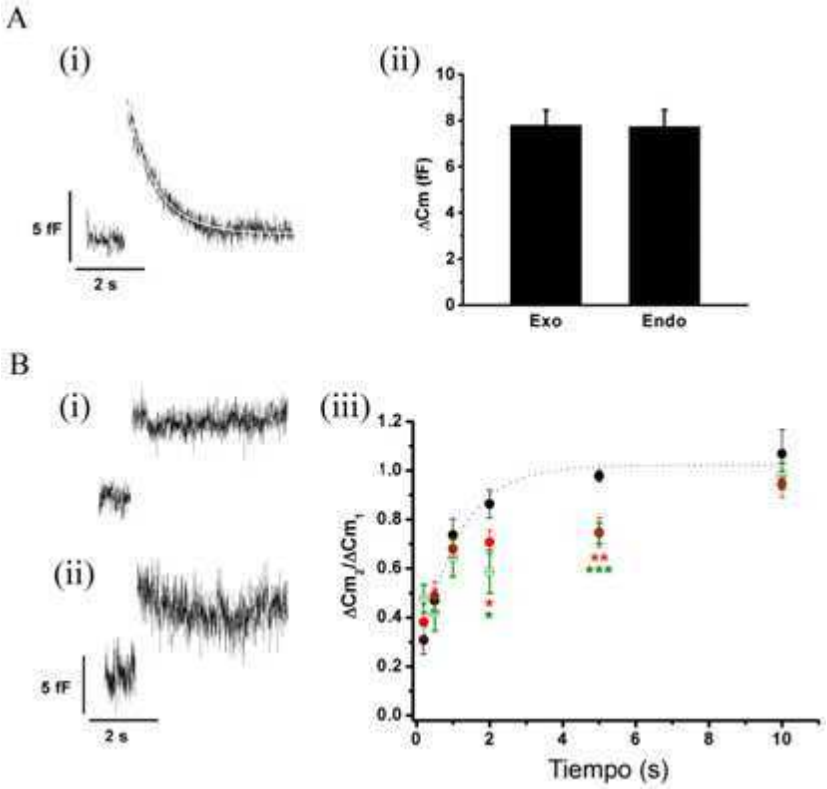

Figura 4.9- Recuperación de ETAP en una [Ca2+]e y una capacidad buffer de [EGTA]i que se aproximan a las fisiológicas. (A) Los experimentos de la figura 4.8 se repitieron usando 1.8 mM [Ca^{2+}]e / 70 µM [EGTA]i. (i) La figura representa el promedio de registros de capacitancia de 14 células independientes. El decaimiento en la señal de capacitancia, asociado a la endocitosis, se ajustó a una ecuación de decaimiento monoexponencial (τ = 0.77±0.06 s; R > 0.9783). (ii) El diagrama de barras representa las amplitudes de la exocitosis (Exo) y la endocitosis subsecuente (Endo), estimadas en estos experimentos, las que no fueron estadísticamente diferentes. **(B)** (i) y (ii) Promedio de registros endocíticos obtenidos luego de la diálisis con anti-Dyn (n=7) o GST-Dyn829-842 (n=5). (iii) Recuperación de ETAP a 1.8 mM [Ca^{2+}]e / 70 µM [EGTA]i (círculos negros), y en presencia de anti-Dyn (círculos rojos) y de GST-$Dyn_{829-842}$ (círculos verdes) en 5 mM [Ca^{2+}]e / 70 µM [EGTA]i. El promedio de los experimentos control se ajustó (línea punteada) a una función de crecimiento monoexponencial de la forma $R = R_o + A\left(1 - e^{\frac{-t}{\tau}}\right)$, obteniendo un valor Ro a tiempo cero de 0.15 ± 0.07, una asíntota A de 0.87±0.07, una constante temporal τ de 1.04±0.20 s, y un coeficiente de correlación R > 0.9867. Cada punto experimental representa el promedio de al menos 6 mediciones independientes para cada tratamiento. Los valores de recuperación relativos a cada tiempo se compararon por ANOVA y contrastes de Bonferroni (*p < 0.05; **p<0.001; ***p<0.0002). Para corroborar el efecto de los tratamientos descritos sobre la endocitosis, evaluamos la endocitosis relativa (calculada como el cociente entre la endocitosis medida entre los 1000 y los 1100 milisegundos posteriores al PA_{sim} y la exocitosis sincrónica previa) para cada experimento individual. Para este análisis se tomaron solamente los experimentos controles y los tratamientos que fueron obtenidos en los mismos cultivos celulares. Según este análisis, los dos tratamientos, GST-Dyn y anti-Dyn, provocaron una inihibición significativa de la endocitosis respecto a los controles, obteniendo valores de 0.17 ± 0.09 (n=8; p<0.0001), 0.08 ± 0.03 (n=7; p<0.0001), y 0.74 ± 0.05 (n=5), respectivamente. Los datos están expresados como valores promedios ± error estándar.

4.5 EXOCITOSIS SINCRÓNICA DURANTE ESTIMULACIÓN REPETITIVA CON PAS_{SIM}

La velocidad de recuperación de los *pools* vesiculares es crítica para la mantención de la exocitosis durante estimulaciones repetitivas (Voets *et al.*, 1999). Los experimentos de las secciones anteriores indican que ETAP se recupera en un período de tiempo muy corto en comparación a reportes previos para otros *pools* vesiculares (Moser *et al.*, 1997; Voets *et al.*, 1999). En base a la constante temporal estimada (τ = 0.73 s), se puede predecir que la exocitosis inducida por un potencial de acción se mantendrá aproximadamente constante a lo largo del tren si las células se estimulan a frecuencias inferiores a 0,5 Hz (intervalo entre estímulos > 3 τ). Para evaluar esta predicción, se aplicaron trenes de 7 PA_{sim} a 0.2, 0.5, 2 y 5 Hz, y se analizó la exocitosis sincrónica (definida en Métodos, página 85) en respuesta a cada estímulo. De acuerdo a los estimado, los resultados representados en la figura 4.10 indican que esta exocitosis se mantiene estable durante la aplicación de trenes de PA_{sim} a una frecuencia de 0,2 Hz (figura 4.10 A (i), y círculos negros en figura 4.10 B). A 0,5 Hz se evidenció una leve caída de este parámetro (aproximadamente 20%, $p<0.05$) en el segundo PA_{sim}, y luego se mantuvo constante a lo largo del tren (ANOVA entre el 2do, 3er, 4to, 5to, 6to y 7mo estímulo no fue significativa, $p > 0.85$; círculos negros en figura 4.10 C). Sin embargo, la aplicación de trenes a 2 Hz provocó más del 50% de disminución en la exocitosis sincrónica (círculos negros, figura 4.10 D), y la aplicación de 5 Hz redujo la exocitosis hasta casi el 10 % del valor inicial (círculos negros, figura 4.10 E). Estos resultados, en su conjunto, están de acuerdo con la cinética de recuperación determinada para ETAP (figura 4.5 B), sugiriendo que este proceso de recuperación sería suficiente para mantener la exocitosis sincrónica a bajas frecuencias de estimulación, pero no podría mantenerla a frecuencias mayores.

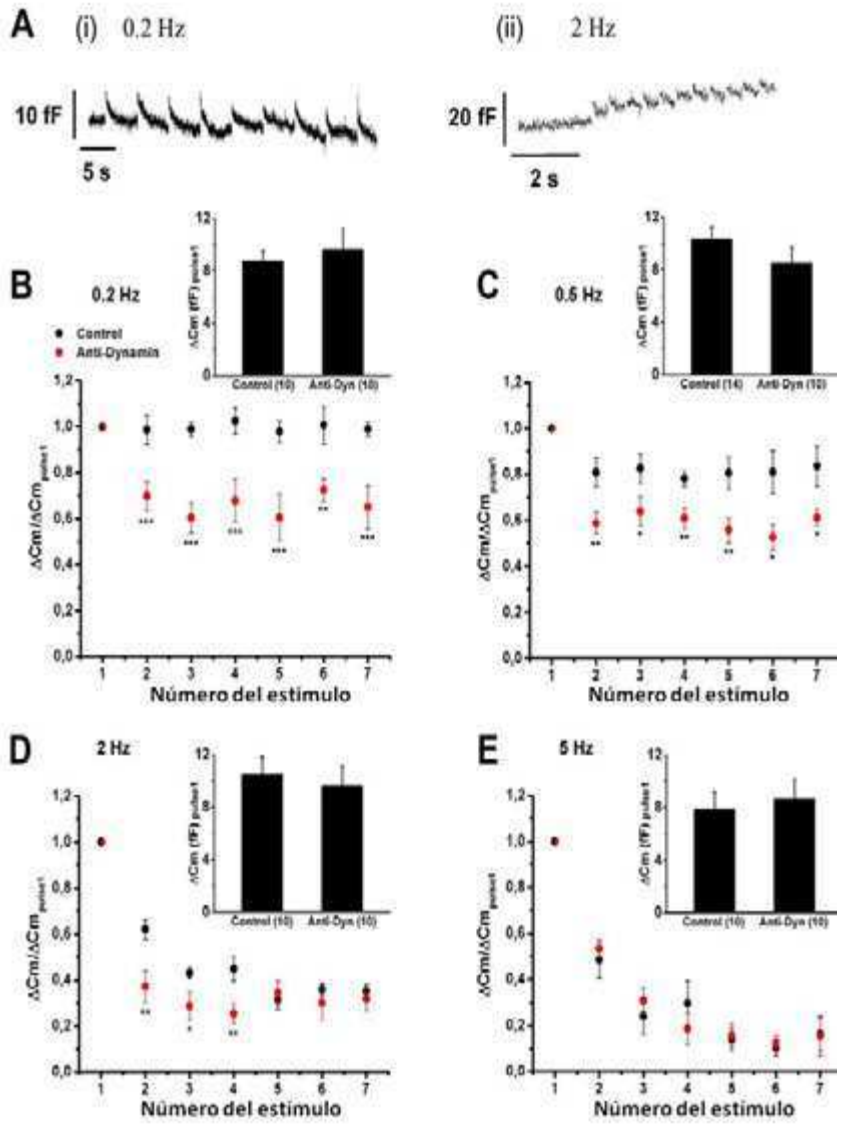

Figura 4.10- Efecto de la frecuencia de estimulación y de la inhibición de la dinamina sobre la exocitosis sincrónica durante trenes cortos de PA_{sim}. (A) Registros representativos de cambios de capacitancia durante trenes cortos de PA_{sim} a 0.2 (i) y 2 Hz (ii). **B,C D y E**: Cambios sincrónicos de capacitancia obtenidos entre el 1er y el 7mo PA_{sim} en trenes aplicados en condiciones control (círculos negros) y en presencia de anti-Dyn (círculos rojos) para 0.2, 0.5, 2 y 5 Hz, respectivamente. (*p<0.05; **p<0.02; y ***p<0.005 representan la significancia estadística entre el control y los tratamientos con anti-dyn para cada estímulo aplicado). Las mediciones obtenidas en cada experimento individual fueron normalizadas respecto a la exocitosis inducida por el 1er PA_{sim} del tren. Los diagramas de barra representan los valores absolutos de las exocitosis sincrónicas inducidas por el 1er PA_{sim}, en condiciones control y en presencia del anticuerpo. Estos valores fueron estadísticamente similares. El número de experimentos en cada condición está representado entre paréntesis en la base del diagrama de barras. Los datos están expresados como valores promedios ± error estándar.

Con el objetivo de investigar el efecto del bloqueo de la endocitosis rápida sobre la mantención de la exocitosis sincrónica frente a trenes de PA_{sim}, agregamos el anti-Dyn a la solución interna, y después de 5 minutos aplicamos los trenes de PA_{sim} a las frecuencias descritas. Es importante mencionar que la administración del anticuerpo no afectó los valores absolutos de las exocitosis registradas durante los primeros PA_{sim} respecto a la condición control (diagrama de barras en figuras 4.10 B, C, D y E). Los círculos rojos en las figuras 4.10 B, C, D y E representan las exocitosis sincrónicas asociadas a estos experimentos. Los resultados muestran que la administración del anticuerpo provocó una marcada y sostenida disminución de la exocitosis sincrónica a 0,2 y 0,5 Hz, la cual se hace significativa respecto a los experimentos control desde el segundo PA_{sim} en adelante (figuras. 4.10 B y C). Por otro lado, a 2 Hz, la aplicación de anti-Dyn aceleró significativamente la caída de la exocitosis sincrónica durante el tren, pero los valores finales fueron similares al control, mientras que a 5 Hz el anticuerpo no provocó diferencias significativas respecto del control en ninguno de los puntos (figuras. 4.10 D y E, ver las leyendas de las figuras para los análisis estadísticos). Estos resultados indican que la endocitosis dependiente de dinamina es importante para el mantenimiento de las exocitosis sincrónica a frecuencias bajas, próximas a las basales que operan en células cromafines.

Finalmente, analizamos la respuesta exocítica sincrónica frente a la estimulación con trenes de PA_{sim} en presencia de 5 mM $[Ca^{2+}]e$ / 70 µM [EGTA]i. En estos experimentos, la exocitosis sincrónica se mantuvo estable durante la aplicación de trenes a 0.2 Hz, y disminuyó moderadamente a 0.5 Hz. Por el contrario, a 2 Hz observamos un decrecimiento notorio de la exocitosis sincrónica que alcanzó aproximadamente el 35% del valor inicial. Por otra parte, y al igual que los experimentos del apartado anterior, la aplicación del anti-Dyn afectó significativamente la mantención de la exocitosis sincrónica a bajas frecuencias de estimulación (0.2 y 0.5 Hz, figura 4.11 A y B), mientras que a 2 Hz no se observaron diferencias significativas.

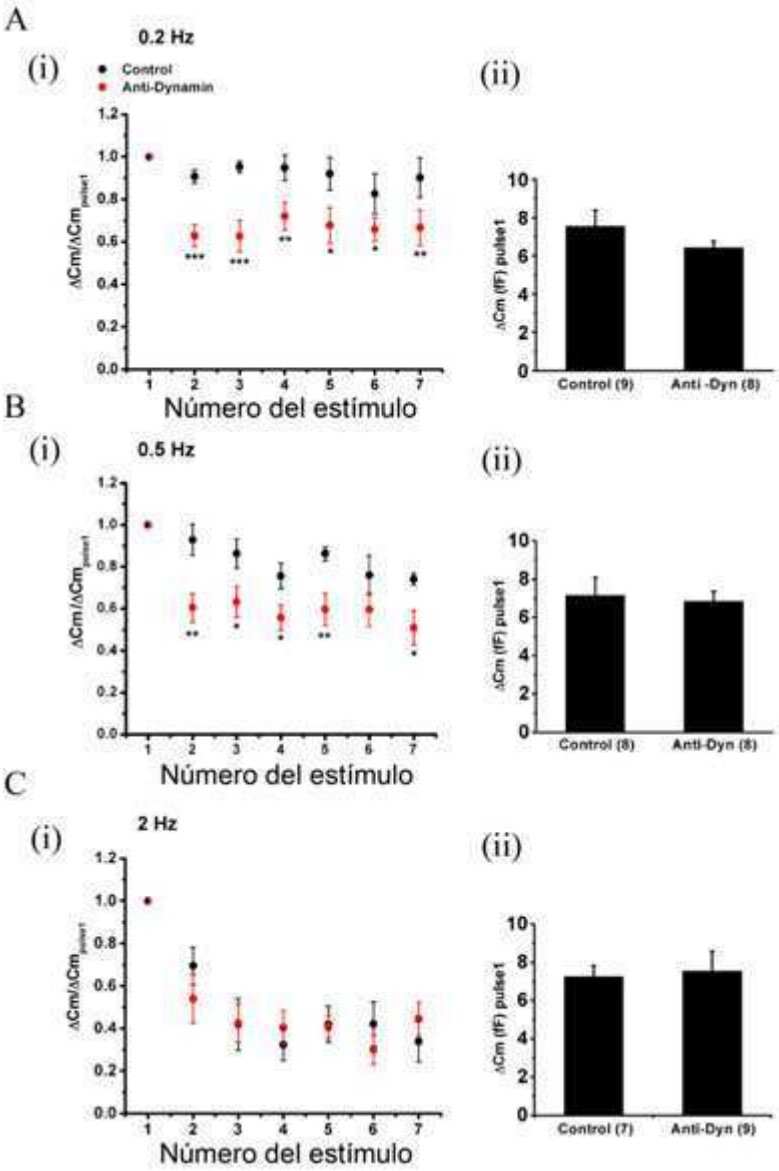

Figura 4.11 - Efecto de la frecuencia de estimulación y de la inhibición de la dinamina sobre la exocitosis sincrónica durante trenes cortos de PA_{sim} en células expuestas a una [Ca2+]e y una capacidad buffer de $[EGTA]_i$ que se aproximan a las fisiológicas. (A,B y C)(i) Cambios sincrónicos de capacitancia obtenidos entre el 1er y el 7mo PA_{sim} en condiciones control (1.8 mM $[Ca^{2+}]$e / 70 µM [EGTA]i) (círculos negros) para 0.2, 0.5 y 2 Hz, respectivamente. En presencia del anticuerpo anti-Dyn (círculos rojos) se utilizó la condición 5 mM $[Ca^{2+}]$e / 70 µM [EGTA]i. *p<0.05; **p<0.01; and ***p<0.001 representa la significancia estadística entre los controles y anti-Dyn para cada estímulo aplicado. Las mediciones obtenidas en cada experimento individual fueron normalizadas respecto a la exocitosis inducidas por el 1er PA_{sim} del tren. **(ii)** Los diagramas de barras representan los valores absolutos de la exocitosis sincrónica inducida por el 1er PA_{sim} del tren, en condiciones control y en presencia del anticuerpo. Estos valores fueron estadísticamente similares. El número de experimentos en cada condición está representado entre paréntesis en la base del diagrama de barras. Los datos están expresados como valores promedios ± error estándar.

4.6 LIBERACIÓN DE CATECOLAMINAS EN RESPUESTA A TRENES DE PA_{SIM} A BAJA FRECUENCIA

Con el objetivo de demostrar que los cambios sincrónicos de capacitancia obtenidos frente a PA_{sim} (ya sea de manera aislada o en trenes) estaban asociados a la liberación de catecolaminas, se llevaron a cabo experimentos de amperometría. Gracias a su alta sensibilidad, esta técnica es capaz de registrar la liberación extracelular de catecolaminas de vesículas individuales (métodos, sección 3.4). Estos experimentos fueron realizados en células cuyo potencial de membrana se controló a través de un microelectrodo de *patch clamp*, mientras un segundo electrodo, de fibra de carbono, registraba los corrientes amperométricas. Las células fueron estimuladas con trenes de 12 PA_{sim} a una frecuencia de 0.2 Hz, en presencia de 1.8 mM $[Ca^{2+}]e$ / 70 µM [EGTA]i, de modo de aproximar condiciones más fisiológicas. La figura 4.12 A ilustra trazados representativos de espigas amperométricas obtenidas bajo estas condiciones experimentales. Es importante remarcar que solamente se registraron las espigas que ocurrían durante el estímulo o los 50 ms posteriores al mismo, lo cual entra en nuestra definición de exocitosis sincrónica (métodos, página 85). La figura 4.12 B representa un histograma de la frecuencia de eventos amperométricos registrados por célula respecto del estímulo aplicado a los largo del tren. Solamente se consideraron las células que respondieron al menos mínimamente a los estímulos aplicados. La frecuencia de eventos osciló entre 0.2 y 0.45 por PA_{sim}. Tales valores se encuentran en el rango de las estimaciones reportadas por Neher y colaboradores (Haller *et al.*, 1998). Estos experimentos confirman, por medio de una técnica alternativa, que la exocitosis sincrónica en respuesta a PA_{sim} se mantiene a bajas frecuencias de estimulación. Por otro lado, también demuestra que la exocitosis sincrónica registrada está asociada a vesículas que contienen catecolaminas.

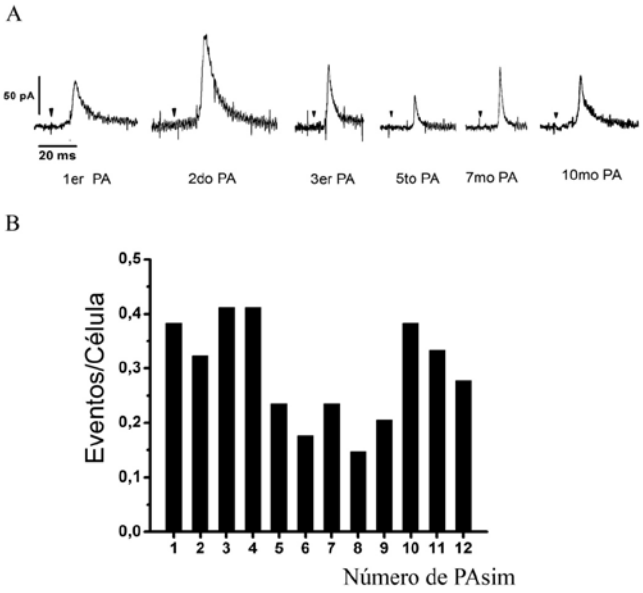

Figura 4.12- Detección de espigas amperométricas sincrónicas en respuesta a la estimulación con PA_{sim}. Las células fueron estimuladas con trenes de 12 PA_{sim} a una frecuencia de 0.2 Hz, en presencia de 1.8 mM $[Ca^{2+}]e$ / 70 µM [EGTA]i. **(A)** Ejemplos representativos de espigas amperométricas obtenidas a diferentes PA_{sim} a lo largo de los trenes. Las cabezas de flecha indican donde se aplicó el estímulo. **(B)** Histograma de frecuencia de espigas amperométricas a lo largo del tren. Estos datos fueron obtenidos de un total de 34 células. Los datos están expresados como el número total de eventos amperométricos detectados en un determinado PA_{sim}, sobre el número de células en donde se registró al menos una espiga amperométrica.

4.7 LA EXOCITOSIS DE ETAP DEPENDE PARCIALMENTE DE UN MECANISMO INDEPENDIENTE DE I_{CA2+}

Los resultados presentados en la figura 4.4 indican que las vesículas de ETAP forman parte del IRP. Por otro lado, trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que las vesículas del IRP están acopladas principalmente a la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q, ya que el bloqueo farmacológico de estos canales o su ablación molecular inhibían el 75% de la exocitosis asociada a dicho *pool* (Alvarez *et al.*, 2008). Sin embargo, también es necesario mencionar que del 25% restante, sólo una pequeña porción era dependiente de otras corrientes de Ca^{2+}, y que frente al bloqueo total de la I_{Ca2+} aún persistía una exocitosis residual de aproximadamente 4 fF (Alvarez *et al.*, 2008). En la misma dirección, el

agregado de ω-agatoxina IVA inhibió más del 60% de la exocitosis disparada frente a la aplicación de un PA_{sim}, pero nuevamente dejando un remanente de aproximadamente 4 fF (Tesis Doctoral de Yanina D. Álvarez, 2011). Partiendo de dichos resultados, en esta sección nos propusimos reanalizar la dependencia de la exocitosis asociada a PA_{sim} con la I_{Ca2+} total, de modo de confirmar o no la presencia de una supuesta exocitosis independiente de dicha corriente, y a la vez evaluar que porcentaje del total representa.

Como primera estrategia, se agregaron toxinas y drogas que bloquean específicamente los canales de Ca^{2+} presentes en nuestro preparado. El agregado aditivo de ω-agatoxina IVA (200 nm), Nitrendipina (10 μM), y SNX-482 (1 μM), para bloquear selectivamente los canales de tipo P/Q, R y L generó la inhibición total de las I_{Ca2+}, persistiendo sin embargo un remanente de exocitosis similar al descrito previamente (figura 4.13 A (i) y B).

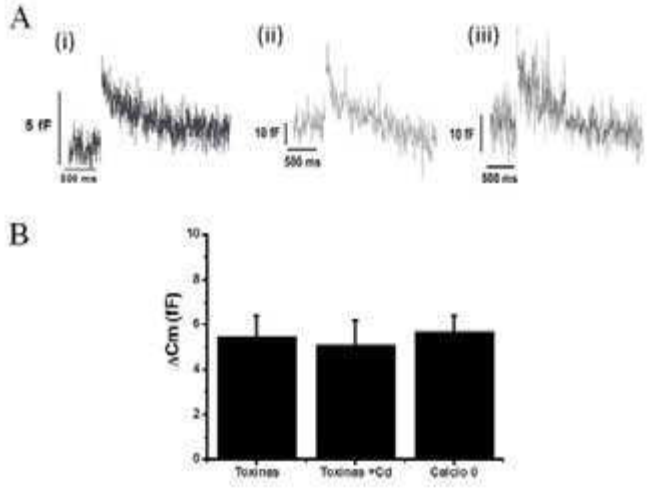

Figura 4.13- Exocitosis sincrónica disparada por PA_{sim} individuales en ausencia de fuentes extracelulares de Ca^{2+}. **(A)** Registros representativos de los cambios de capacitancia que se producen frente a la aplicación de un PA_{sim} en presencia de un cóctel de toxinas compuesto por ω-agatoxina IVA (200 nm), Nitrendipina (10 μM), y SNX-482 (1 μM), las cuales son bloqueantes específicos de los canales de Ca^{2+} de tipo P/Q, L y R respectivamente (i); del mismo cóctel más 100 μM de ClCd (ii); y en una solución de cero Ca^{2+} extracelular nominal (iii). **(B)** El gráfico de barras representa los promedios de las exocitosis obtenidas en las tres condiciones experimentales mencionadas arriba. Los datos están expresados como valores promedios ± error estándar (n = 8 para cada tratamiento experimental).

Luego, durante los mismos experimentos, y con el propósito de eliminar cualquier I_{Ca2+} residual que estuviese por debajo de la resolución de nuestros registros, se agregó ClCd (100 μM), observándose la persistencia de una fracción de ΔCm de aproximadamente 5 fF (figura 4.13 A (ii) y B). Finalmente, como tercera estrategia, se eliminó el Ca^{2+} de la solución extracelular. En esta condición también se registraron cambios significativos de capacitancia (figura 4.13, A (iii) y B) similares a los obtenidos en las otras dos condiciones.

Estos experimentos sugieren que una fracción importante de ETAP se asocia a un mecanismo de acople estimulación-secreción que no depende de la I_{Ca2+}.

5. DISCUSIÓN I

5. DISCUSIÓN I

Esta tesis se enmarca en el estudio de los mecanismos que contribuyen al desarrollo y sostenimiento de la exocitosis altamente acoplada en células cromafines. Más particularmente, se analizaron mecanismos asociados al disparo y mantenimiento de la exocitosis en respuesta a potenciales de acción aplicados de manera aislada o a baja frecuencia. Dada la poca entrada de Ca^{2+} que se induce durante un PA único, sería esperable que la exocitosis en estas condiciones dependa de vesículas altamente acopladas al estímulo (Olivos Ore *et al.*, 2004), y que la recuperación de las mismas sea suficientemente rápida como para satisfacer las frecuencias fisiológicas (Fulop *et al.*, 2005).

En esta primera sección, se analizaron los mecanismos de recuperación de la exocitosis altamente acoplada al estímulo, y la importancia de los mismos en el mantenimiento de la secreción a bajas frecuencias. La motivación principal para abordar este tema de estudio surge del poco conocimiento que se tiene hasta ahora, y de la importancia de descifrar los mecanismos que intervienen en la recuperación de las vesículas secretoras cuando el organismo está en un tono simpático basal.

Los resultados de esta sección indican que el sostenimiento de la exocitosis altamente acoplada depende de dos mecanismos. El primero de ellos, sostiene que la recuperación de las vesículas que se liberan frente a un potencial de acción (ETAP) depende de la transferencia vesicular desde un *pool* que está ubicado río arriba. Mientras que el segundo, plantea que la recuperación depende de un proceso endocitótico rápido, dependiente de dinamina. Los resultados de esta tesis no permiten discernir si este segundo mecanismo es independiente del primero, y si en ese caso está asociado a un ciclado vesicular corto *in situ* al estilo *kiss and run*, o si ambos mecanismos forman parte de un solo proceso de recuperación. Éste y otros aspectos serán discutidos en esta sección.

5.1 ETAP REPRESENTA UNA SUBPOBLACIÓN DE VESÍCULAS DEL IRP

El IRP es un pool de vesículas altamente acoplado a los CCDV, que se libera rápidamente en respuesta a la aplicación de pulsos despolarizantes breves (Alvarez *et al.*, 2013; Horrigan *et al.*, 1994; Voets *et al.*, 1999). IRP consta de una población vesicular pequeña, de 20-30 vesículas (Alvarez *et al.*, 2008; Alvarez *et al.*, 2011; Fulop *et al.*, 2005), mientras que el total de vesículas liberables de las células cromafines ronda en 2000 vesículas (Voets *et al.*, 1999). Por tal razón, la contribución relativa de IRP a la exocitosis inducida por altas frecuencias de estimulación o despolarizaciones prolongadas, que promueven indiferenciadamente la exocitosis de vesículas altamente o pobremente acopladas a los CCDV, es practicamente despreciable (Chow *et al.*, 1992; Voets *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 1995). Por el contrario, la exocitosis inducida por potenciales de acción aislados puede ser explicada enteramente por vesículas que forman parte de IRP (figura 4.4). Considerando el valor de ETAP promedio que obtuvimos en nuestros experimentos, aproximadamente 11 fF, y dado que la capacitancia estimada para una vesícula secretoria de células cromafines de ratón es 1.3 fF (Moser *et al.*, 1997), ETAP equivaldría a aproximadamente 8 vesículas, lo que corresponde a aproximadamente el 40% del total del IRP. Sin embargo, cuando analizamos la recuperación de ETAP (figura 4.5), nuestros resultados indicaron que este grupo de vesículas no se comporta como el IRP total. ETAP se recuperó con una cinética muy rápida (τ= 0.73 s, figura 4.5), aproximadamente un orden de magnitud mas rápido que la recuperación del IRP. En resumen, ETAP representaría un pequeño y rápido componente de liberación, que se recupera rápidamente, tal como se ha propuesto en otras terminales sinápticas (Cho *et al.*, 2011). Potencialmente entonces, sería un *pool* vesicular capaz de responder consistentemente a potenciales de acción aplicados a bajas frecuencias.

5.2 ETAP Y SU RELEVANCIA EN EL SOSTENIMIENTO DE LA EXOCITOSIS ALTAMENTE ACOPLADA

En un trabajo reciente, se estimó un tiempo característico de recuperación para IRP de 7.5 segundos (Moya-Diaz *et al.*, 2016). Este último dato es consistente con reportes previos de cinéticas de recuperación para el IRP y el RRP en células cromafines y en terminales sinápticas (Moser *et al.*, 1997; Voets *et al.*, 1999; von Gersdorff *et al.*, 1994). Esta constante temporal indica que la recuperación del IRP no se completa en menos de 20 segundos y, por lo tanto, frecuencias de disparo mayores a 0.05 Hz provocarían la depresión de este *pool*. Estas estimaciones sugieren que la cinética de recuperación del IRP no es compatible con las frecuencias fisiológicas a las que operan las células cromafines, cuyo rango oscila entre 0.2 y 20 Hz (Chan *et al.*, 2001; Kidokoro *et al.*, 1980).

Por otro lado, la cinética de recuperación de ETAP resultó ser aproximadamente 10 veces más rápida que la del IRP (τ= 0.73 s, figura 4.5). Esto implica que la recuperación de ETAP debería prácticamente completarse en 2 segundos, lo que sería suficiente para sostener la liberación sincrónica de este *pool* de vesículas en respuesta a trenes de potenciales de acción aplicados a frecuencias inferiores a 0,5 Hz. Esta predicción se ajusta a los resultados obtenidos en las figuras 4.10 y 4.11, donde la aplicación de trenes de PA_{sim} a frecuencias inferiores a 0.5 Hz permite el sostenimiento de la exocitosis sincrónica, mientras que la aplicación de trenes a 2 Hz genera la caída de esta exocitosis, alcanzando casi el 40% de su valor inicial. Finalmente, la aplicación de PA_{sim} a una frecuencia de 5 Hz deprimió completamente el sostenimiento de a exocitosis sincrónica. Estos resultados, indican que la recuperación de ETAP por sí misma sería suficiente para sostener la exocitosis sincrónica a bajas frecuencias de PA nativos en condiciones fisiológicas basales (Chan *et al.*, 2001; Kidokoro *et al.*, 1980).

Sin embargo, es importante considerar que en condiciones fisiológicas algunos factores podrían aún acelerar más la cinética de recuperación de ETAP y de IRP, tales como la concentración de Ca^{2+}citosólico (Smith *et al.*,

1998), la actividad PKC (Gillis *et al.*, 1996), Doc2b (Pinheiro *et al.*, 2013), CAPS (Liu *et al.*, 2008), NCAM (Chan *et al.*, 2005a) y la temperatura (Dinkelacker *et al.*, 2000). Respecto a este último factor, debemos considerar que los experimentos de esta tesis se desarrollaron a temperatura ambiente (22-25°C). En ese sentido, en células cromafines se observó que temperaturas de 37ºC aceleraban la velocidad de recuperación del RRP casi 3 veces respecto a una temperatura de 25ºC (Dinkelacker *et al.*, 2000). Tomando este valor como referencia y considerando nuestros resultados, podría especularse que el tiempo característico de la recuperación de ETAP se aceleraría marcadamente a temperaturas fisiológicas. Esto permitiría a las células responder de manera sostenida a frecuencias mayores a las reportadas en este trabajo. Los posibles mecanismos de regulación que pueden intervenir en la recuperación de ETAP deberán ser investigados en futuros trabajos.

5.3 MECANISMOS ASOCIADOS A LA RÁPIDA RECUPERACIÓN DE ETAP

La presencia de un mecanismo eficiente de recuperación vesicular es necesaria para sostener la liberación de catecolaminas durante la aplicación repetitiva de potenciales de acción. Esto se debe cumplir incluso a bajas frecuencias de estimulación, cuando el organismo se encuentra en un tono simpático basal.

En esta tesis consideramos tres hipótesis alternativas que podrían explicar la rápida recuperación de ETAP. La primera de ellas postula que ETAP se rellena directamente desde vesículas que forman parte del IRP. La segunda sostiene que ETAP se recupera directamente desde la transferencia de vesículas del RRP. Finalmente, una tercera posibilidad considera que el proceso endocitótico subsecuente a ETAP sería la primera etapa de la rápida recuperación de este *pool* de vesículas, probablemente a través de un ciclado corto *in situ*.

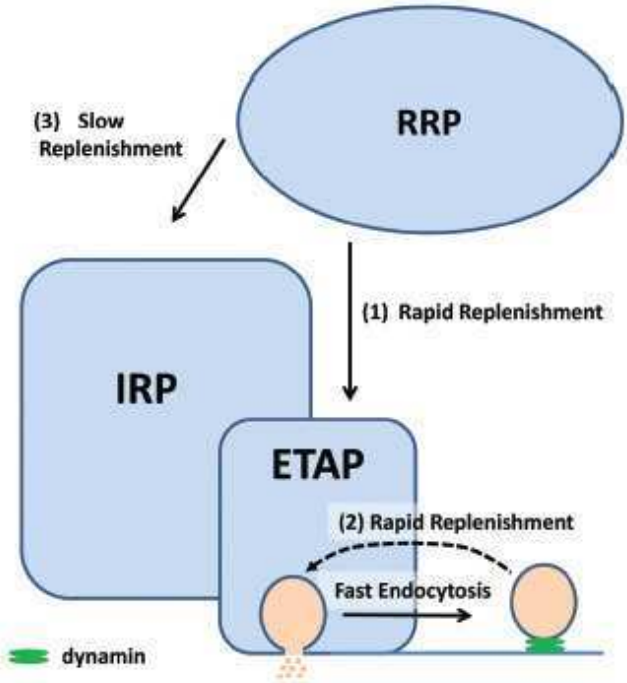

Figura 5.1- En esta tesis proponemos que en células cromafines, la exocitosis de una subpoblación de vesículas del IRP es liberada en respuesta a un potencial de acción (ETAP). Este grupo de vesículas es recuperado rápidamente a través de dos mecanismos: (1) A través de la transferencia de vesículas desde el RRP y por un proceso endocítico rápido que depende de dinamina (*fast endocytosis*). Esta endocitosis rápida podría permitir la recuperación de las vesículas a través de un mecanismo asociado al *kiss and run* (2) (Fulop *et al.*, 2005). Alternativamente, dicha endocitosis rápida podría contribuir a la reestructuración de los sitios de liberación luego de la exocitosis, y a su vez rellenar un *pool* vesicular mayor río arriba, desde donde ETAP finalemente se recuperaría (Hosoi *et al.*, 2009). Estos mecanismos podrían explicar la exocitosis sostenida a frecuencias de potenciales de acción basales en el contexto fisiológico. El RRP podría también suministrar vesículas, con una cinética lenta (3), al resto del IRP.

La primera hipótesis fue descartada debido a que ETAP mantuvo una cinética muy rápida de recuperación cuando se deprimió el IRP, que no difirió de la condición control (figura 4.6, círculos negros). Por el contrario, la depresión del RRP retardó significativamente la recuperación de ETAP (Figura 4.6 (círculos blancos), Tabla 4.1), sugiriendo que la recuperación de este *pool* vesicular se explicaría, al menos en parte, por la transferencia de vesículas directamente desde el RRP (flecha (1), en figura 5.1). En concordancia con estos resultados, trabajos en rodajas de médula adrenal demostraron que las vesículas que forman parte del IRP se pueden recuperar desde el RRP (Chan *et al.*, 2005b). Sin embargo, los resultados de la figura 4.6 muestran que, incluso luego de deprimir el RRP, la recuperación de ETAP sigue siendo más

rápida que la recuperación del IRP total. Esta observación sugirió que, además de la transferencia de vesículas desde el RRP, otro mecanismo estaría involucrado en la rápida recuperación de ETAP.

La exocitosis inducida por un PA_{sim} fue seguida por una rápida caída de la señal de capacitancia (figura 4.7). Dicho proceso presentó en promedio un tiempo característico de 530 ms, resultando en la completa compensación de la exocitosis previa (figura 4.7 A y 4.10). Este fenómeno es muy similar a la endocitosis rápida descrita previamente por el grupo de Corey Smith (Chan *et al.*, 2003a; Chan *et al.*, 2001). Dichos autores establecieron que la estimulación con potenciales de acción únicos, o a bajas frecuencias, generaban una robusta internalización de la membrana plasmática que evolucionaba con una constante de 560 ms, y que en términos cuantitativos, recuperaba la misma cantidad de vesículas a las previamente fusionadas (Chan *et al.*, 2001). Además, estos autores reportaron que esta endocitosis rápida es inhibida por las altas frecuencias, o por Ca^{2+} con una K_{inh} igual a 605 nM. Según los mismos autores, esta inhibición se hacía máxima a una frecuencia de 2 Hz, lo cual provoca que la endocitosis no pudiese compensar la exocitosis previa. Sin embargo, a frecuencias mayores se evidenciaba una recuperación de la endocitosis, gracias a la activación de un mecanismo diferente de internalización de membrana, que era dependiente de la acumulación de Ca^{2+} residual y estaba asociado a la vía de señalización de la calcineurina (Chan *et al.*, 2003a; Chan *et al.*, 2001).

La similitud entre el tiempo característico de recuperación de ETAP y el tiempo característico de la endocitosis rápida, nos llevó a pensar que este último proceso podría representar un primer paso en la rápida recuperación de las vesículas liberadas frente a un PA_{sim}. Para poner a prueba esta hipótesis decidimos inhibir esta endocitosis de diferentes maneras, y evaluar la cinética de recuperación de ETAP para ver si ambos procesos se correlacionaban.

En primer lugar se realizaron dos tratamientos farmacológicos, los cuales están representados en la figura 4.7. Ambos tratamientos provocaron un moderado enlentecimiento de la endocitosis asociada a ETAP, y un modesto retardo de la recuperación de este *pool* de vesículas. En estos experimentos

utilizamos el bloqueante específico de los canales de Ca^{2+} tipo L, Nitrendipina, ya que se ha descrito que este canal de Ca^{2+} está asociado al desarrollo de endocitosis rápida en células cromafines bovinas (Rosa *et al.*, 2011); datos no publicados de nuestro laboratorio que forman parte de la tesis de Verónica Belingheri). En otro grupo de experimentos utilizamos dynasore: un inhibidor del dominio con actividad GTPasa de la dinamina (Tsai *et al.*, 2009). Sin embargo, durante los últimos años se demostró que el efecto del dynasore sobre la dinamina no es del todo específico, y que su administración tiene efectos secundarios sobre otras funciones celulares. Por ejemplo, se sabe que inhibe la I_{Ca2+} (Tsai *et al.*, 2009); esta Tesis), lo cual *per se* puede afectar la endocitosis. Por otro lado, algunos autores sostienen que el dynasore reduce la labilidad del colesterol en las membranas plasmáticas, desestabiliza la formación de redes de actina y afecta la organización de los *rafts* lipídicos (Preta *et al.*, 2015; Yamada *et al.*, 2009). Por lo tanto, es posible que los efectos observados en este grupo de experimentos estén contaminados con alguno/s de estos efectos secundarios. Resumiendo, mas allá de la falta de especificidad o no de los tratamientos utilizados, podemos concluir que un cierto enlentecimiento de la endocitosis se asoció con un moderado retardo de la recuperación. Estos resultados además se vieron reforzados por otro grupo de experimentos en los cuales se observó que, luego del *rundown* parcial de la endocitosis, se retardaba también moderadamente la recuperación de ETAP (figura 4.8 A, Tabla 4.1). Sin embargo, era evidente que para poder consolidar más nuestra hipótesis era necesario buscar maneras de inhibir más robustamente a la endocitosis.

La administración del anticuerpo monoclonal anti-dinamina (Artalejo *et al.*, 2002) o del péptido GST-$Dyn_{829-842}$(Fulop *et al.*, 2008; Shupliakov *et al.*, 1997) resultaron en la completa inhibición de la endocitosis rápida asociada a ETAP. Además, estas intervenciones retardaron severamente la recuperación de este *pool* de vesículas (figuras 4.8 y 4.9). Estos resultados indican que la recuperación de ETAP está acoplada a un proceso endocítico rápido dependiente de dinamina. Un modelo plausible, que se ajusta a estas evidencias experimentales, considera la existencia de un mecanismo de reciclado vesicular local, en donde las vesículas se recuperan luego de una

fusión parcial transitoria (Cardenas *et al.*, 2010, 2016). Se han descrito en la literatura mecanismos de fusión de este tipo, como la *cavicapture* o el *kiss and run* (Cardenas *et al.*, 2010; Elhamdani *et al.*, 2006a; Gonzalez-Jamett *et al.*, 2010). Experimentos de doble *patch clamp* en células cromafines (manteniéndolas en simultáneo en configuración *wholle cell y cell attached*), demostraron que fusiones vesiculares transitorias al estilo *kiss and run* están asociadas al desarrollo de endocitosis rápidas (Elhamdani *et al.*, 2006a). Estudios realizados en un contexto más fisiológico, demostraron que la estimulación de rodajas adrenales con PA aislados o a bajas frecuencias promueven fusiones vesiculares transitorias parciales, mientras que altas frecuencias de estimulación están asociadas a fusiones vesiculares completas (Fulop *et al.*, 2005; Fulop *et al.*, 2006). Por lo tanto, considerando nuestros resultados y los antecedentes descritos en la literatura, una hipótesis posible es que la estimulación con PA individuales o a bajas frecuencias promueva fusiones tipo *kiss and run*, que se endociten velozmente en forma intacta, lo que explicaría la rápida recuperación de ETAP (flecha (2), en figura 5.1). En este contexto, la dinamina tendría un rol determinante durante la fisión de las vesículas luego de la fusión transitoria, permitiendo la rápida recuperación de ETAP.

Aunque un mecanismo mediado por *kiss and run* es una hipótesis atractiva, desde nuestros resultados no podemos descartar la posibilidad de que las vesículas internalizadas por endocitosis rápida se fusionen río abajo con un endosoma intermediario, no liberable, desde donde se podrían generar vesículas liberables. En este sentido, algunos autores han propuesto que la endocitosis rápida sirve en primer lugar para remover de las zonas activas de liberación a proteínas vesiculares que han sido agregadas durante la exocitosis previa, restaurando la arquitectura de estos sitios. En simultáneo, la fracción de membrana internalizada por esta endocitosis se reciclaría hacia *pools* vesiculares río arriba, desde donde se generarían nuevas vesículas maduras liberables (Hosoi *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2014a).

5.4 EL SOSTENIMIENTO DE LA EXOCITOSIS A BAJAS FRECUENCIAS DE ESTIMULACIÓN ESTÁ LIGADO A UN MECANISMO DE ENDOCITOSIS RÁPIDA DEPENDIENTE DE DINAMINA

Nuestros resultados muestran que la recuperación de ETAP está acoplada a un proceso endocitótico rápido. Por otro lado, los resultados de las figuras 4.10 y 4.11 sugieren que el mantenimiento de la exocitosis sincrónica durante trenes de PA_{sim} a frecuencias < 0.5 Hz es dependiente de dicho mecanismo de recuperación. Por lo tanto, hipotetizamos que la inhibición de la endocitosis rápida debería afectar el sostenimiento de la exocitosis sincrónica durante trenes de PA_{sim}. En línea con esta hipótesis, los resultados de esta tesis indican que la introducción de un anticuerpo monoclonal anti-dinamina genera una disminución significativa de la exocitosis sincrónica durante la aplicación repetitiva de PA_{sim} a bajas frecuencias (0.2 y 0.5 Hz). Por otro lado, este mecanismo no tendría relevancia a altas frecuencias de estimulación (figura 4.10 y 4.11, trazados de 2 Hz y 5 Hz).

En resumen, en esta primera parte de la tesis demostramos que ETAP, luego de ser deprimido, se recupera con una velocidad muy rápida, superior a cualquier *pool* vesicular descrito hasta el momento en células cromafines. Esta rápida recuperación depende de la transferencia de vesículas desde el RRP y, a la vez, de un proceso endocitótico rápido (figura 5.1). Estos mecanismos podrían, en principio, ser parte de vías independientes de recuperación. A favor de esta esta hipótesis, observamos un efecto aditivo sobre la recuperación de ETAP cuando estos dos procesos fueron bloqueados en conjunto (figura 4.8 (iii), diamantes verdes). La recuperación residual obtenida bajo esta condición podría ser explicada por la depresión incompleta del RRP con el protocolo de doble pulso de 100 ms, o por un proceso de translocación vesicular lenta desde *pools* que se encuentran río arriba. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que la endocitosis rápida y la transferencia de vesículas desde el RRP sean parte de la misma vía.

En condiciones de estrés, las células cromafines disparan potenciales de acción a altas frecuencias, promoviendo la acumulación de Ca^{2+} residual y una exocitosis masiva, en la cual la posición de las vesículas respecto de los CCDV no es relevante (Duan *et al.*, 2003). Tales frecuencias de estimulación favorecen la exocitosis asincrónica sobre la exocitosis sincrónica (Zhou *et al.*, 1995). Por otro lado, en condiciones de reposo, la frecuencia de disparo de PA es baja, el Ca^{2+} no se acumula entre estímulos y la exocitosis estaría limitada a vesículas estrechamente acopladas a los CCDV (Alvarez *et al.*, 2011; Duan *et al.*, 2003; Voets *et al.*, 1999). Por lo tanto, es probable que la importancia fisiológica del IRP resida en su alta eficiencia de acople entre estímulo y exocitosis, que permitiría una secreción eficiente a bajas frecuencias de disparo de potenciales de acción (Cardenas *et al.*, 2016; Olivos Ore *et al.*, 2004). Si este fuera el caso, el IRP necesitaría un mecanismo rápido de recuperación compatible con las frecuencias fisiológicas basales de potenciales de acción. La recuperación rápida de ETAP podría ser la solución a este problema.

La recuperación de ETAP es lo suficientemente rápida para sostener la exocitosis a frecuencias de disparo entre 0.2 y 0.5 Hz, que es aproximadamente la frecuencia basal en células cromafines. Sin embargo, en células cromafines *in situ,* algunas variables tales como variaciones de la concentración de Ca^{2+} citosólico, la temperatura, hormonas, citosinas y la liberación de otros compuestos activos, podrían modificar el transcurso temporal de estos procesos (Gillis *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2008; Pinheiro *et al.*, 2013). En este contexto, pensamos que el entendimiento de los mecanismos regulatorios y la identificación de las variables que pueden controlar la rápida recuperación de ETAP deberían ser parte de futuras investigaciones en el campo de la neurosecreción. Por esta razón, actualmente en nuestro laboratorio se están desarrollando dos tesis doctorales que están focalizadas en identificar aquellos factores moleculares que regulan la liberación y recuperación de los *pools* altamente acoplados en células cromafines, tales como el IRP y ETAP.

6. RESULTADOS II

RESULTADOS II

6.1 CAMBIOS SINCRÓNICOS DE CAPACITANCIA (ΔCM) INDEPENDIENTES DE LA ENTRADA DE Ca^{2+}

La hipótesis clásica respecto de la secreción de neurotransmisores y neurohormonas desde la presinapsis y células neuroendocrinas, postula que esta se dispara exclusivamente por una elevación de las concentraciones de Ca^{2+} citosólico en la región del sitio activo, donde se ubican las vesículas. Sin embargo, a lo largo de los últimos 30 años se han propuesto mecanismos alternativos a la exocitosis mediada por Ca^{2+} en algunos modelos neuronales (Hochner *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2009). Resultados publicados previamente por nuestro grupo (Alvarez *et al.*, 2008), y resultados preliminares de esta tesis (ver sección anterior de resultados y figura 4.13), sugieren la posibilidad de que un mecanismo diferente de disparo de la exocitosis, independiente de la I_{Ca2+}, podría operar en células cromafines.

Para evaluar esta hipótesis, se estudiaron en tres grupos independientes de células los cambios sincrónicos de capacitancia (ΔCm) que se producían en respuesta a pulsos cuadrados despolarizantes de 100 ms (desde un potencial de *holding* de -80 mV hasta +10 mV). En el grupo control las células se expusieron a una concentración de Ca^{2+} extracelular de 5 mM, mientras que un segundo grupo de experimentos se realizó en ausencia de Ca^{2+} extracelular, agregando además 1 mM de EGTA al medio externo con el propósito de controlar las trazas de Ca^{2+}. A este último tratamiento se lo denominó "solución libre de Ca^{2+}". Finalmente, un tercer grupo de células se expuso a Ca^{2+} extracelular 5 mM más el agregado de ClCd 100 µM. Se debe mencionar que el Cd^{2+} es un bloqueante universal de los CCDV. En el primer caso, observamos una I_{Ca2+} que está de acuerdo con nuestros registros históricos (I_{Ca2+} promedio de 174 ±35 pA, ver trazado negro figura 6.1 A a modo de ejemplo). Como es esperable, bajo las dos últimas condiciones experimentales no se registraron I_{Ca2+} medibles (figura 6.1 A, trazado rojo y azul). Sin embargo,

para ambos tratamientos observamos un significativo ΔCm que fue sincrónico con el estímulo aplicado (figura 6.1 B). Por otro lado, luego del aumento de Cm, en todos los registros observamos una caída de la capacitancia con una cinética similar a la endocitosis rápida descripta en la sección anterior. Al finalizar dicha caída, Cm alcanzó un valor similar a la línea de base previa a la estimulación.

Si el ΔCm observado en ausencia de I_{Ca2+} está asociado a la exocitosis de vesículas, es probable que su magnitud aumente la duración del estímulo, ya que este afectaría de manera creciente al *pool* vesicular involucrado. Para analizar esta posibilidad se desarrollaron experimentos en donde se aplicaron pulsos cuadrados despolarizantes de duración variable (desde 3 a 400 ms). En presencia de 5 mM de Ca^{2+}, los ΔCm se incrementaron con la duración del estímulo, tendiendo a estabilizarse transitoriamente luego de los 50 ms. Esta situación podría estar asociada a la depresión del IRP (Alvarez *et al.*, 2011). Sin embargo, la aplicación de pulsos mayores a 200 ms incrementaron nuevamente los valores de ΔCm hasta valores marcadamente mayores (figura 6.1 C, barras negras). Este comportamiento bifásico de la exocitosis Ca^{2+} dependiente ya había sido observado previamente en células cromafines, tanto en nuestro como en otros laboratorios (Alvarez *et al.*, 2013; Voets *et al.*, 1999). Por el contrario, en la condición libre de Ca^{2+} se observó un comportamiento monofásico, saturándose los valores de ΔCm en pulsos mayores a 50 ms, obteniéndose para pulsos de 100 ms un valor promedio de 16.88 ± 1.61 fF (figura 6.1 C, barras azules). Por este motivo, a partir de esta observación, en los diferentes experimentos realizados en este trabajo de tesis en la condición libre de Ca^{2+} se aplicaron pulsos de 100 ms. A partir del ajuste exponencial de la exocitosis en función de la duración del estímulo, es posible estimar una constante temporal que está asociada a la velocidad de liberación del grupo de vesículas involucrado. Esto presupone que este grupo de vesículas, sometidas a un estímulo particular, se va agotando a medida que dicho estímulo se incrementa, de manera monoexponencial. A su vez, la inversa de dicha constante temporal es una estimación de la tasa media de exocitosis. En este caso en particular, las estimaciones de la constante temporal y de la tasa de

liberación, arrojaron valores de 8.8 ± 2 ms y 114 s^{-1}, respectivamente (figura 6.1 D). Esto correspondería a un grupo vesicular de liberación muy rápida, incluso superior a la de IRP (Alvarez *et al.*, 2013).

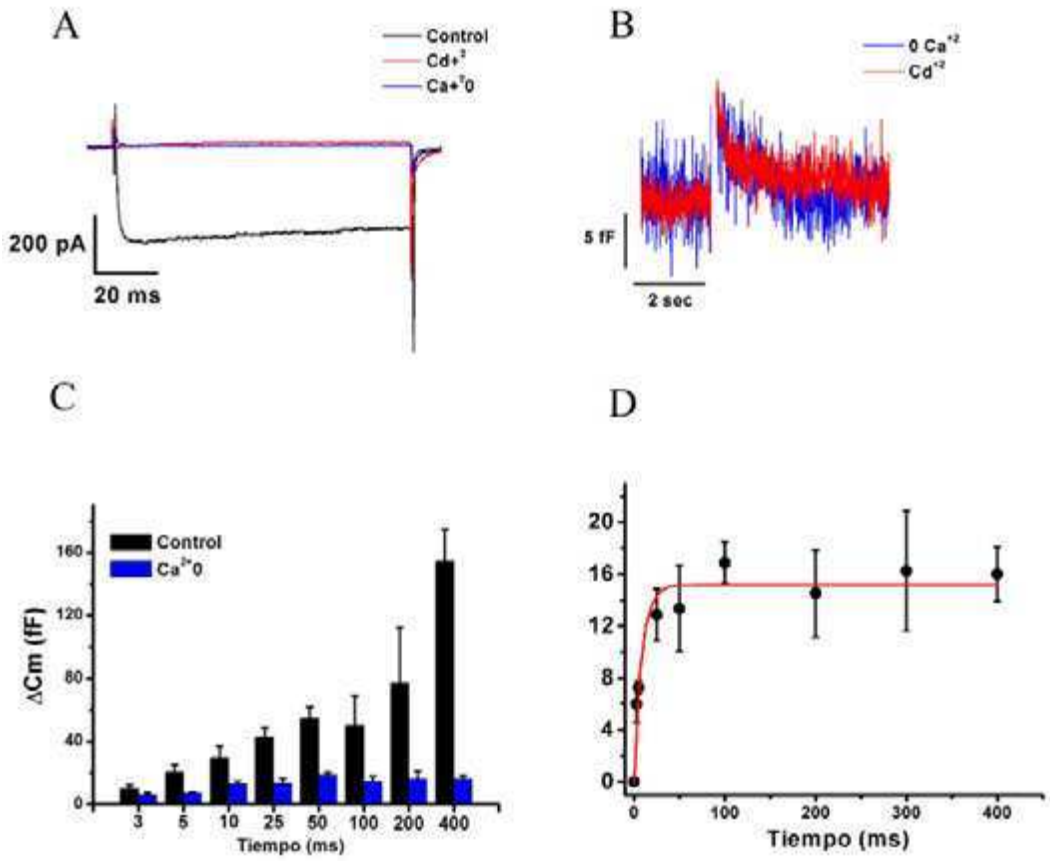

Figura 6.1- Aumentos sincrónicos de capacitancia (ΔCm) medidos en ausencia de I_{Ca2+}. (A) Trazados representativos de las I_{Ca2+} inducidas por pulsos despolarizantes en presencia de 5 mM de Ca^{2+} extracelular (trazado negro), 5 mM de Ca^{2+} extracelular más 100 μM de ClCd (trazado rojo) y solución libre de Ca^{2+} (1 mM EGTA extracelular, trazado azul). En las últimas dos condiciones las I_{Ca2+} se inhibieron totalmente. **(B)** Trazados representativos de los aumentos sincrónicos de capacitancia (ΔCm) y su posterior decaimiento, en presencia de 5 mM de Ca^{2+} extracelular mas 100 μM de ClCd (trazado rojo) y solución libre de Ca^{2+} (trazado azul). **(C)** El diagrama de barras representa el promedio de los valores de ΔCm obtenido frente a despolarizaciones cuadradas de diferente duración, en experimentos realizados a 5 mM de Ca^{2+} extracelular (barras negras) y solución libre de Ca^{2+} (barras azules; n= al menos 7 células por punto evaluado). **(D)** Los valores promedio de los ΔCm obtenidos en la condición libre de Ca^{2+} se ajustaron a una función de crecimiento monoexponencial de la forma $R = Ro + A.\left(1 - e^{\frac{-t}{\tau}}\right)$, obteniéndose una constante temporal τ de 8.8 ± 2 ms, una tasa de liberación (1/ τ) de 114 s^{-1} y un coeficiente de correlación R>0.9875. Los datos están expresados como valores promedios ± error estándar.

Resumiendo, los resultados de esta sección muestran que en

condiciones de completa ausencia de I_{Ca2+}, la despolarización de la membrana genera un aumento sincrónico de la Cm, el cual depende de la duración del estímulo, saturándose frente a la aplicación de pulsos cuadrados con duración superior a 50 ms.

6.2 LOS CAMBIOS SINCRÓNICOS DE CAPACITANCIA REGISTRADOS EN CÉLULAS CROMAFINES BAÑADAS EN SOLUCIÓN LIBRE DE CA^{2+} EXTERNO NO ESTÁN ASOCIADOS A LA LIBERACIÓN DE CA^{+2} DESDE RESERVORIOS INTRACELULARES

Se ha descrito previamente que la liberación de Ca^{+2} desde reservorios intracelulares puede inducir la exocitosis en células cromafines. (Borges *et al.*, 2012; Montero *et al.*, 1995; Neher *et al.*, 1992). En base a estos antecedentes, decidimos evaluar si los ΔCm observados en ausencia de I_{Ca2+} medibles (figura 6.1) podrían estar asociados a la liberación de Ca^{+2} desde estos reservorios.

La primera estrategia experimental utilizada fue aumentar la capacidad buffer citosólica, para reducir el efecto de cualquier proceso de liberación dependiente de Ca^{+2}. Para ello, células expuestas a la solución libre de Ca^{2+} fueron dializadas desde la pipeta de *patch* con 4 mM de BAPTA. Luego de aproximadamente 2 minutos en configuración *whole cell*, las células se estimularon con un pulso de 100 ms. Las siguientes estrategias experimentales se concentraron en inhibir específicamente la liberación de Ca^{2+} desde los compartimientos intracelulares que pueden participar potencialmente en el disparo de la exocitosis en células cromafines. Hay evidencias que indican que el retículo endoplásmico y los gránulos secretorios de células cromafines poseen bombas de Ca^{2+} de tipo SERCA que pueden acumular Ca^{2+}, como también canales de liberación tanto del tipo del receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3R), como del tipo del receptor de rianoidina (Caspersen *et al.*, 1995; Mustafa *et al.*, 2010; Rigual *et al.*, 2002). Por lo tanto, en un grupo de experimentos, las células se preincubaron por 15 minutos con la droga

thapsigargina (1 μM). Esta molécula actúa inhibiendo la bomba Ca^{+2}-ATPasa ubicada en el retículo endoplásmico, y por lo tanto induce una reducción marcada del Ca^{+2} alojado en dicho compartimiento (Caspersen *et al.*, 1995). En otro grupo de experimentos, se pretrataron por 10 minutos las células con 10 μM del inhibidor del receptor IP_3R, 2-APB (Mustafa *et al.*, 2010). Finalmente, en un cuarto grupo de experimentos, las células se dializaron con 100 μM de rianoidina a través de la pipeta de *patch*. A esta concentración, esta droga bloquea irreversiblemente los receptores de rianoidina presentes en las células cromafines (Rigual *et al.*, 2002).

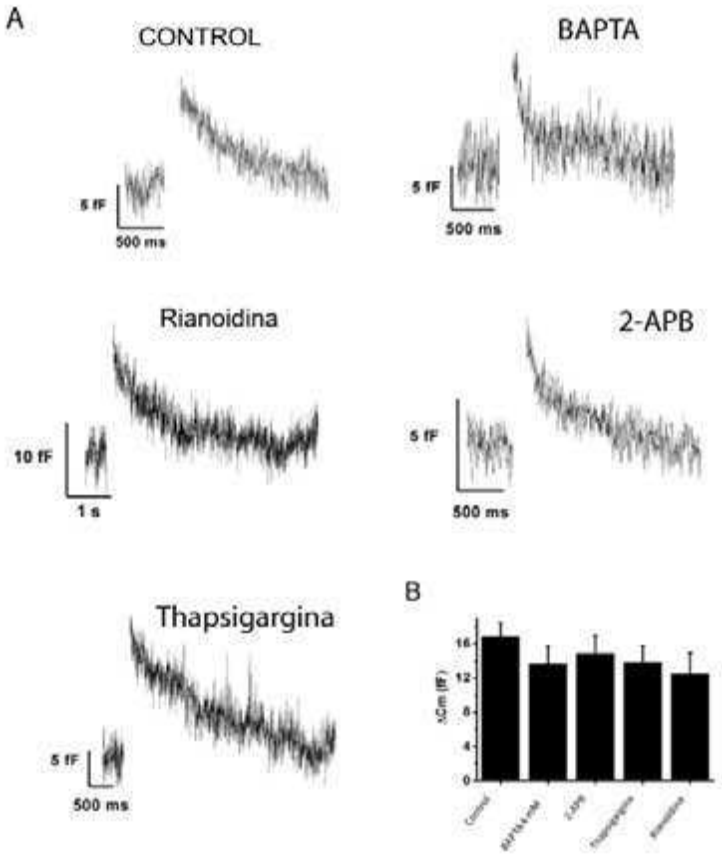

Figura 6.2- Los ΔCm medidos en células cromafines bañadas en solución libre de Ca^{2+} no están asociados a la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares. (A) Trazados representativos de los ΔCm medidos en la condición control, y en los cuatro tratamientos aplicados: BAPTA (i), 2-APB (ii), rianoidina (iii) y thapsigargina (iv). **(B)** El diagrama de barras representa el promedio de los ΔCm medidos en solución libre de Ca^{2+} en la condición control (n=9), en células dializadas con 4 mM de BAPTA intracelular (n=10), o bien en células tratadas con 2-APB (n=8), con thapsigargina (n=14), o con rianoidina (n=10). Los cuatro tratamientos descritos no modificaron los valores de ΔCm en relación a la condición control. Los datos están expresados como valores promedios ± error estándar.

Ninguno de los cuatro tratamientos experimentales descritos afectaron los valores de ΔCm inducidos por despolarizaciones de 100 ms en relación a la condición control (por favor, ver figura 6.2 A para ejemplos típicos y figura 6.2 B para valores promedios).

Finalmente, realizamos experimentos de *Ca^{2+} imaging* con el objetivo de evaluar el incremento en el [Ca^{2+}] citosólico ($[Ca^{2+}]_i$) inducido por la aplicación de pulsos de 100 ms en presencia de 5 mM de Ca^{2+} extracelular ($[Ca^{2+}]_o$), y de confirmar la ausencia de incremento de $[Ca^{2+}]_i$ en solución libre de Ca^{2+}. Dado que en algunos sistemas la despolarización de la membrana plasmática puede estar asociada en forma directa a la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico (Flucher *et al.*, 1996), creímos necesario realizar estos controles. Las células se dializaron a través de la pipeta de *patch* con el indicador de Ca^{2+} Fluo-8 a una concentración de 100 nM (400 nm EGTA en la solución interna).

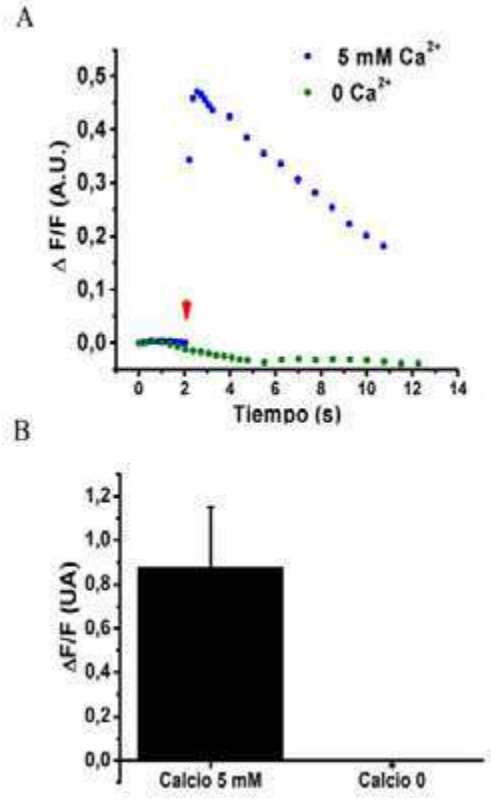

Figura 6.3- Las despolarizaciones aplicadas en solución libre de Ca^{2+} no inducen la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares. (A) Trazados representativos de los cambios relativos de fluorescencia (ΔF/F) obtenidos en células dializadas con Fluo-8 (100 nM), y estimuladas en presencia de 5 mM de $[Ca^{2+}]_o$ (puntos azules), o en solución libre de Ca^{2+} (puntos verdes). La flecha roja indica el momento cuando se aplicó el pulso despolarizante. (B) Las barras resumen los datos obtenidos a partir de experimentos como los representados en A. En presencia de 5 mM de $[Ca^{2+}]_o$ se obtuvo un valor al pico máximo de ΔF/F de 0.877±0.275 A.U, mientras que en la solución libre de Ca^{2+} no se observaron cambios de fluorescencia (medido como promedio de los valores de fluorescencia obtenidos entre los 50 y los 400 ms después del estímulo). Las mediciones se desarrollaron entre 1 a 2 minutos posteriores al establecimiento de la configuración *whole cell*. El número de células por condición fue 6. Los datos están expresados como valores promedios ± error estándar.

La figura 6.3 A muestra trazados representativos, mientras que las barras de la figura 6.3 B resume los resultados obtenidos en ambas condiciones. Tal como se esperaba, en presencia de la solución con 5 mM $[Ca^{2+}]_o$ obtuvimos un claro incremento de la señal relativa de fluorescencia (ΔF/F), alcanzando un valor al pico máximo de 0.877± 0.275 A.U, mientras que en la solución libre de Ca^{2+} estos cambios no se evidenciaron (figura 4.16 B).

En resumen, las figuras 6.2 y 6.3 demuestran que los ΔCm inducidos por despolarizaciones aplicadas en solución libre de Ca^{2+} no están asociados a la liberación de Ca^{+2} desde reservorios intracelulares.

6.3 EL AUMENTO SINCRÓNICO DE CAPACITANCIA INDEPENDIENTE DE Ca^{2+} ESTÁ ASOCIADO A UNA EXOCITOSIS QUE DEPENDE DE PROTEÍNAS SNARE FUNCIONALES

Los experimentos de las secciones anteriores, demostraron que en células cromafines de ratón, una fracción del ΔCm obtenido en respuesta a la aplicación despolarizaciones cortas no depende de fuentes extracelulares o intracelulares de Ca^{+2}. Con el objetivo de establecer si estos ΔCm estaban relacionados con un proceso exocítico dependiente de proteínas SNARE, las células se dializaron con la cadena liviana de la neurotoxina botulínica de tipo B (Bont-B) a través de la pipeta de *patch*. Esta proteína actúa clivando específicamente la proteína del complejo SNARE sinaptobrevina en el puente peptídico Gln-Phe, localizado en el motivo V2. La consecuencia directa de este clivaje es la inhibición de la exocitosis (Bittner *et al.*, 1989; Caccin *et al.*, 2003; Humeau *et al.*, 2000).

El protocolo experimental utilizado para evaluar el efecto de Bont-B sobre los cambios de capacitancia independientes de Ca^{2+}, consistió en la aplicación de pulsos despolarizantes de 100 ms a distintos tiempos luego del establecimiento del *whole cell*, que a su vez marca el inicio de la diálisis de la toxina al interior celular: 15 segundos (t_0), 5 minutos (t_5), 10 minutos (t_{10}) y 15 minutos (t_{15}). Dado que el peso molecular de dicha proteína es de aproximadamente 50 kD, se puede estimar para una resistencia en serie promedio de 10 MΩ, un tiempo característico de entrada de 3.7 min para Bont-B (Pusch *et al.*, 1988). En base a esto, y a antecedentes previos (Xu *et al.*, 1998), no esperaríamos ver efectos significativos antes de 5 minutos de diálisis.

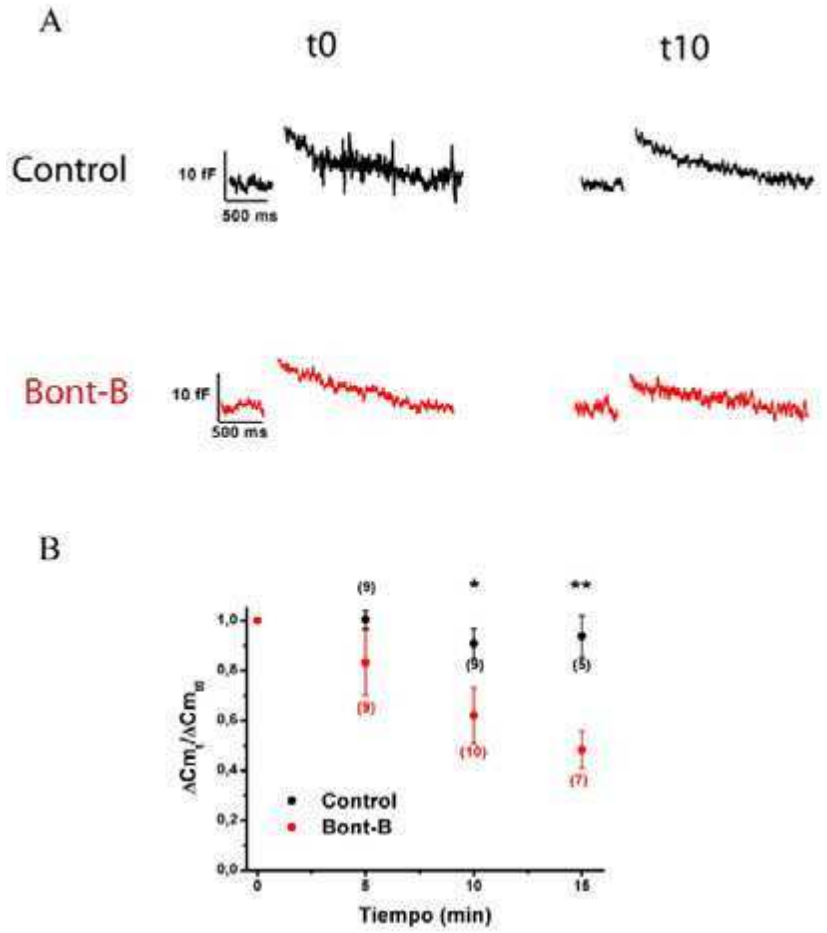

Figura 6.4- Los ΔCm medidos en células cromafines bañadas en solución libre de Ca^{2+} están asociados a una exocitosis que depende de proteínas SNARE funcionales. (A) Trazados representativos de los ΔCm inducidos por despolarizaciones de 100 ms, obtenidos en condiciones control (trazado negro) y en experimentos en los que se agregó la cadena liviana de la toxina botulínica-B en la solución interna (Bont-B; trazado rojo), inmediatamente después del establecimiento de la configuración *whole cell* y luego de 10 minutos de diálisis. **(B)** Este gráfico representa la evolución del efecto de Bont-B (puntos rojos) en relación a la condición control (puntos negros) a lo largo del tiempo luego del establecimiento del *whole cell*. El efecto de los tratamientos se representa como el cociente entre los cambios de capacitancia registrados a los distintos tiempos luego del establecimiento de *whole cell* divididos por el salto de capacitancia obtenido a los 15 s (ΔCmt_i /ΔCmt_0). No se observaron diferencias entre ambas condiciones a t_5, pero estas se volvieron estadísticamente significativas a t_{10}, y se acentuaron a t_{15}.*p<0.05, **p<0.005. El número de células evaluadas en cada condición se indican entre paréntesis. Los datos están expresados como valores promedios ± error estándar.

El efecto de la toxina sobre la exocitosis se cuantificó en términos relativos, como el cociente entre los valores de ΔCm medidos a los tiempos t_5, t_{10}, y t_{15}, y el ΔCm medido a t_0 (representado por la medición tomada a 15 s), esto es: $\Delta C_{m\_ti}/\Delta C_{m\_t0}$. A su vez, se realizaron controles midiendo ΔCm a los

mismos tiempos, pero en ausencia de la toxina. La figura 6.4 A muestra trazados representativos de Cm obtenidos en la condición control (trazados negros) y en presencia de Bont-B (trazados rojos). Es posible notar que, mientras en la condición control no se observaron cambios en la exocitosis sincrónica entre t_0 y t_{10}, en el tratamiento con Bont-B se observó una clara disminución de este parámetro en t_{10} respecto a t_0.

El gráfico 6.4 B resume el efecto de la diálisis de Bont-B (puntos rojos), en comparación al control (puntos negros), sobre los ΔCm a lo largo del tiempo. Los resultados muestran una inhibición parcial pero significativa de los ΔCm luego de 10 minutos de diálisis con la toxina, la cual fue aún más evidente después de 15 minutos.

Estos resultados indican que los ΔCm sincrónicos inducidos por la despolarización de la membrana en solución libre de Ca^{2+} están asociados a un proceso exocítico dependiente de proteínas SNARE.

6.4 VOLTAJE-DEPENDENCIA DE LA EXOCITOSIS INDEPENDIENTE DE CA^{+2}

¿Por qué mecanismo ocurre la exocitosis independiente de Ca^{+2} en células cromafines? La existencia de un acople directo entre la despolarización de la membrana y la exocitosis ya fue propuesta previamente en otros sistemas biológicos (Hochner *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2009). Con el objetivo de evaluar la relación entre estas variables en células cromafines bañadas en solución libre de Ca^{2+}, se aplicaron pulsos cuadrados de 100 ms desde un potencial de holding -80 mV hasta potenciales que fueron desde los -70 mV hasta los +70 mV, y se evaluaron los cambios de capacitancia que resultaron de dichos experimentos. La figura 6.5 A muestra registros representativos de los Cm obtenidos en respuesta a pulsos de -50 mV (negro), -30 mV (rojo) y +60 mV (verde), La figura 6.5 B representa los promedios de los valores relativos de exocitosis (normalizados por el ΔCm máximo obtenido en cada experimento individual) respecto al voltaje aplicado. Se puede observar

claramente que la exocitosis sigue una relación creciente, de tipo sigmoidea, con el potencial aplicado, la cual se ajustó satisfactoriamente a una función de Boltzmann con un valor R > 0.9921.

Es importante mencionar que esta exocitosis fue seguida de una caída rápida de la señal de capacitancia, la cual podría asociarse a un proceso endocítico posterior (ver más adelante en esta tesis). La constante temporal de caída de esta endocitosis fue similar para todos los pulsos de voltaje evaluados (figura 6.5 C).

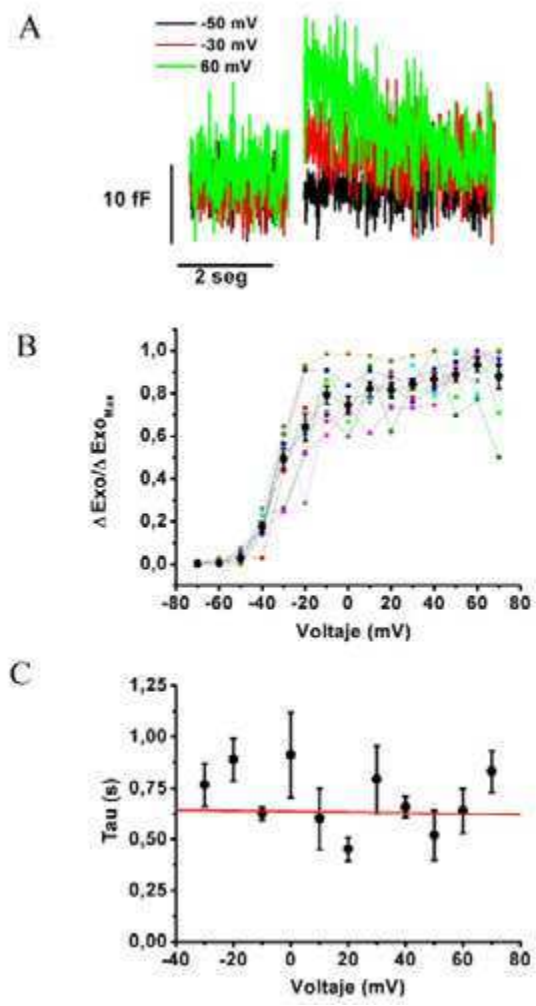

Figura 6.5- La exocitosis independiente de Ca^{2+} está funcionalmente acoplada a la despolarización de la membrana. (A) Trazados representativos de Cm en respuesta a la aplicación de pulsos cuadrados de 100 ms desde un *holding* de -80 mV hasta -50 mV (trazado negro), -30 mV, (trazado rojo) y +60 mV (trazado verde), en solución libre de Ca^{2+}. **(B)** Los ΔCm obtenidos a cada potencial se normalizaron a los ΔCm máximos registrados en cada experimento ($\Delta Exo/\Delta Exo_{Max}$), y graficados en relación al potencial aplicado. El promedio de los valores obtenidos (puntos negros) se ajustaron a una función de Boltzmann con los siguientes parámetros de ajuste: x0 de -31.12 ± 1.4 mV, una asíntota A1 de 0.003 ± 0.0021, una asíntota A2 de 0.84 ± 0.16, y un coeficiente de correlación R de 0.9921. Los puntos de colores ilustran el comportamiento de células individuales (n=10). **(C)** Este gráfico representa las constantes temporales de decaimiento de la endocitosis (ver fase de caída de Cm en A) en respuesta a distintos voltajes (n=5 por cada voltaje aplicado). La caída endocítica a 10 mV (condición control) tuvo un τ de 0.6 ±0.149 ms. La línea roja representa el ajuste lineal de los distintos valores obtenidos. Los datos están expresados como valores promedios ± error estándar.

Los resultados de esta sección muestran que existe una clara dependencia entre el potencial de membrana aplicado y la exocitosis

independiente de Ca^{2+}. Por lo tanto, podríamos asociar a este proceso a un mecanismo de exocitosis Ca^{2+}-independiente-voltaje-dependiente (ECIVD), como ya se definió en otros sistemas (Zhang *et al.*, 2002). De acuerdo a la figura 6.5 ECIVD se activaría aproximadamente a los -40, alcanzaría la mitad del valor máximo a los -30 mV aproximadamente, y se saturaría cerca de los 0 mV, lo cual se aproxima a las observaciones realizadas en neuronas del ganglio dorsal de rata para la exocitosis independiente de Ca^{2+} y dependiente de voltaje (Zhang *et al.*, 2002).

6.5 LA RECUPERACIÓN DEL POOL VESICULAR ASOCIADO A ECIVD ESTÁ LIGADA A UN PROCESO ENDOCÍTICO RÁPIDO DEPENDIENTE DE DINAMINA

Los resultados de las secciones anteriores, sustentan la existencia de una exocitosis sincrónica dependiente del complejo SNARE que se manifiesta frente a despolarizaciones cortas, y que es independiente de una señal de Ca^{2+} citosólica pero dependiente del potencial de membrana. Dado que una despolarización de 100 ms de duración y +10 mV de amplitud provoca el máximo de exocitosis registrada bajo estas condiciones experimentales, no obteniéndose respuestas mayores si se prolongan más los estímulos (figura 6.1), podemos considerar que este estímulo libera la totalidad de las vesículas asociadas a ECIVD. Con el objetivo de evaluar la cinética de recuperación del *pool* vesicular asociado a ECIVD luego de su depresión, aplicamos un pulso despolarizante de 100 ms, y luego de un tiempo variable (entre 0.2 y 10 s), aplicamos un segundo pulso. La figura 6.6 A ilustra trazados representativos de Cm obtenidos a partir de la aplicación de estos protocolos experimentales, utilizando intervalos interpulso de 0.7 y 2 s. Los trazados muestran que a 0.7 s (figura 6.6 A (i)) se recuperó aproximadamente el 50% de la exocitosis (ver los ΔCm para cada pulso) asociada a ECIVD, mientras que a 2 s esa recuperación fue casi completa (figura 6.6 A (ii)). El gráfico 6.6 D resume la evolución de la recuperación relativa de ECIVD a lo largo del tiempo, obtenida en esta serie de experimentos (puntos negros). La recuperación de ECIVD se evaluó en

términos relativos, como la relación entre el incremento de capacitancia inducido por el segundo pulso (ΔExo_2) dividido por el incremento de capacitancia inducido por el primer pulso (ΔExo_1). Los datos experimentales obtenidos se ajustaron a una función de crecimiento monoexponencial ($R > 0.9892$), obteniendo una constante temporal τ de 1,50 ±0.63 s.

Los trazados representados en la figura 6.6 A y B (trazado negro) muestran que después de la exocitosis sincrónica hubo un decaimiento de la señal de capacitancia, que alcanzó un valor de Cm similar al de preestimulación en pocos segundos. Esta caída se ajustó a una función de decaimiento monoexponencial, con un valor de τ de 1.1 ± 0.22 s ($R > 0.8295$). Esta constante temporal es similar a la descrita en la figura 4.6 A de esta tesis, y se asemeja a cinéticas descritas para procesos endocíticos rápidos dependientes de dinamina (Moya-Diaz *et al.*, 2016). Además, el hecho de que esta caída en Cm resultó igual a la exocitosis previa (figura 6.6 A (iii)) sugiere que estamos en presencia de una endocitosis de tipo compensatoria.

Para evaluar si el descenso de Cm mencionado arriba se debe realmente a una endocitosis dependiente de dinamina, las células se dializaron con anti-Dyn (7 nm) por al menos 5 minutos, y luego se aplicó un pulso de 100 ms para disparar ECIVD y consecuentemente la endocitosis. Es necesario mencionar que en los experimentos control, sin anticuerpo, también se esperaron 5 minutos después de establecer la configuración *whole cell*, a modo de poder hacer una comparación más confiable. En estos últimos, se observó un decaimiento de la señal de la Cm que se ajustó a una caída monoexponencial con un τ=1.22 ± 0.297s, llegando a un valor de Cm similar al de pre-estimulación (figura 6.6 B, trazado negro). Como segundo control, dializamos las células con un anticuerpo anti-GFP. Estos experimentos se comportaron de manera similar al control, y aunque se observó un pequeño enlentecimiento de la caída, la Cm alcanzó los valores basales en aproximadamente 5 segundos (figura 6.6 B, trazado verde). Sin embargo, en los experimentos con el anti-Dyn se obtuvo una inhibición muy marcada en el decaimiento de Cm (figura 6.6 B, trazado rojo). En varios de estos experimentos, la inhibición de la caída en Cm por anti-Dyn fue total, con lo cual

no fue posible ajustarlas. Además en otros casos las caídas fueron muy pequeñas, y su magnitud respecto del ruido del registro muy escasa. Por lo tanto, para cuantificar el grado de inhibición generado por el anticuerpo, se analizaron las magnitudes de las caídas y se las compararon con las condiciones controles. Para cuantificar la magnitud de la caída en Cm en los tratamientos descritos, se calcularon los valores de ΔCm respecto a la línea basal previa al estímulo en dos puntos extremos. Primero se promediaron los valores de ΔCm entre los 50 y 150 ms inmediatamente posteriores al estímulo (lo cual es una medida de la exocitosis, y a la vez del punto inicial del cual parte la caída posterior), y luego entre los 4900 y 5000 ms, ya hacia el final del registro, cuando la caída se ha completado en condiciones controles. Dado que se obtuvieron valores similares de ΔCm entre los 50 y 150 ms iniciales tanto los dos controles como para anti-Dyn (figura 6.6 C (i)), podemos decir que el anticuerpo no modificó la exocitosis. Sin embargo, el ΔCm medido entre los 4900 y 5000 ms fue prácticamente cero tanto para el control como para GFP, lo que indica una total caída de ΔCm. Contrariamente el valor de ΔCm registrado en este último intervalo fue significativamente mayor en el caso de anti-Dyn (figura 6.6 C (ii)). Incluso, los ΔCm registrados en los intervalos de 50-150 ms y de 4900-5000 ms luego del estímulo en anti-Dyn no resultaron significativamente diferentes entre sí, lo que indica una inhibición completa de la endocitosis bajo esta condición. Estos resultados indican que el decaimiento de la señal de Cm representa un proceso endocítico rápido dependiente de dinamina.

Tal como se presentó en la sección 1.7 de esta tesis, los procesos exocíticos y endocíticos en neuronas y células neuroendocrinas están acoplados funcionalmente. Esto es porque la endocitosis cumple un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de la membrana, y en la recuperación de los *pools* vesiculares luego de la exocitosis.

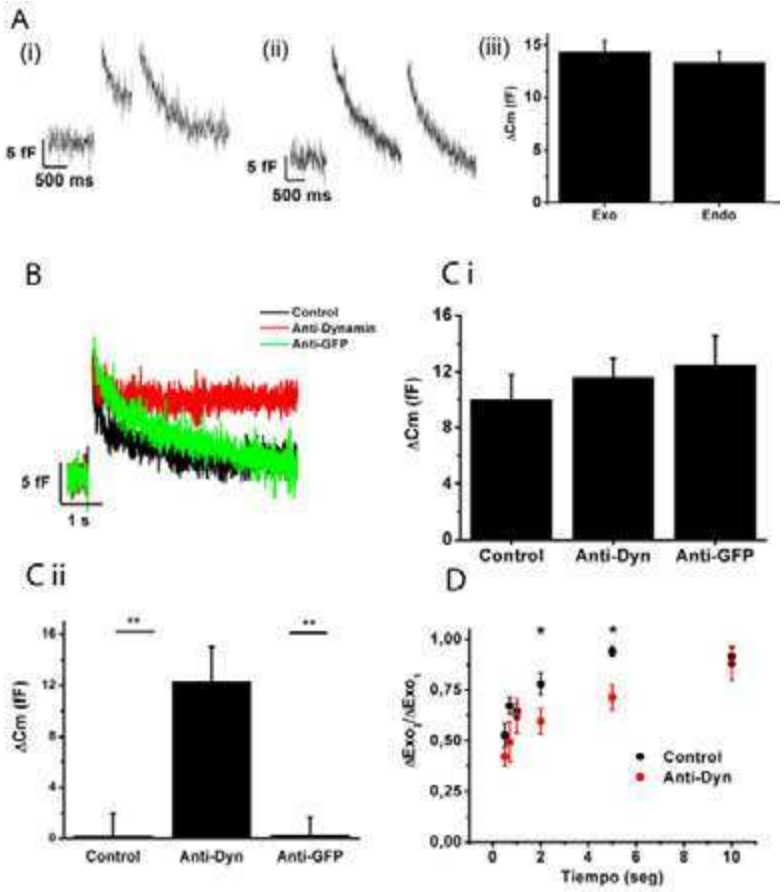

Figura 6.6- La recuperación de ECIVD depende de un proceso endocítico rápido dinamina dependiente. (A) Trazados representativos de Cm en experimentos típicos de recuperación. Se ilustran los trazados obtenidos con intervalos de recuperación de 0.7 (Ai) y 2 segundos (Aii). Se puede observar un aparente proceso endocitótico que compensa completamente a la exocitosis precedente en un tiempo cercano a los 2 segundos. En (Aiii) se representan los valores promedio de la exocitosis y la endocitosis posterior, los cuales no difieren, por lo que se comprueba la total compensación de la exocitosis por la endocitosis. **(B)** Promedio de los registros de Cm obtenidos en respuesta a un pulso despolarizante de 100 ms en solución libre de Ca^{2+}. En condiciones control (5 minutos de diálisis con la solución interna, trazado negro) se observó que después del disparo de ECIVD, hubo una caída rápida que progresó exponencialmente con un valor τ de 1.22 ± 0.297 s (n=8). A su vez, la diálisis con anti-Dyn (7nM) por 5 minutos inhibió la caída de la Cm (trazado rojo, n=13). Esta caída no se inhibió cuando se dializó un anticuerpo anti-GFP (7nM) (trazado verde; n=5). **(C)** Los gráficos representan la cuantificación de las ΔCm en los tratamientos control (n=8), anti-Dyn (n=13) y anti-GFP (n=5), medidas entre la línea de base previa al estímulo y los intervalos establecidos entre los 50-150 ms (i), y los 4900-5000 ms (ii), posteriores al final del pulso despolarizante. **(D)** Este gráfico representa la evolución de la recuperación relativa de ECIVD ($\Delta_{Exo2}/\Delta_{Exo1}$) a diferentes intervalos de tiempo. La recuperación de ECIVD en condiciones control (círculos negros), mostró una constante temporal τ de 1.50 ± 0.63 s (n=8). El anti-Dyn retardó la recuperación de ECIVD (n=13) particularmente la relación $\Delta_{Exo2}/\Delta_{Exo1}$ fue significativamente menor que control a intervalos de 2 y 5 segundos. *p<0.05, **p<0.02. Los datos están expresados como valores promedios ± error estándar.

Además, en la primera sección de resultados de esta tesis, nuestros resultados indican que la endocitosis asociada a un potencial de acción es una parte esencial de la recuperación de ETAP. Dado que en esta sección, los resultados de la figura 6.6 B y D muestran que el transcurso temporal de la endocitosis presenta una cinética similar a la recuperación de ECIVD, nos planteamos como hipótesis que dicha recuperación sea dependiente del proceso endocítico que la precede. Para poner a prueba esta hipótesis, aplicamos el protocolo de pulsos pareados de 100 ms explicado arriba pero en presencia de anti-Dyn, y evaluamos si la cinética de recuperación de ECIVD resultaba limitada por la inhibición de esta endocitosis. Los círculos rojos de la figura 6.6 D representan la evolución de la recuperación del ECIVD bajo el tratamiento con anti-Dyn, mostrando un retardo significativo respecto al control (círculos negros). Este retardo se evidencia en una caída significativa en la recuperación relativa a los 2 y 5 s respecto de la curva control. Es importante mencionar que decidimos comparar los valores de recuperación a tiempos individuales, en vez de comparar las constantes temporales de recuperación, debido a que la recuperación de ECIVD en presencia del anticuerpo no se ajustaba adecuadamente a una función de crecimiento monoexponencial. Estos resultados indican que la recuperación de ECIVD es en parte dependiente de un proceso endocítico rápido asociado a dinamina.

6.6 ECIVD PREDOMINA A BAJAS FRECUENCIAS DE ESTIMULACIÓN

Los experimentos de las secciones anteriores indican que el *pool* vesicular asociado a ECIVD se libera completamente frente a estímulos de 100 ms de duración, y se recupera totalmente en un tiempo menor a 5 segundos. Sin embargo, es importante considerar que bajo condiciones fisiológicas la exocitosis en células cromafines es inducida por potenciales de acción. Ya se mostró en la sección 4.7 (figura 4.13) de la primera parte de esta tesis, que un PA_{sim} aplicado en condiciones de total inhibición de la entrada de Ca^{2+} a la célula induce una exocitosis de aproximadamente 5 fF. Esto corresponde a

menos de la mitad del total de vesículas contenido en el *pool* vesicular asociado a ECIVD. Por otro lado, si aplicamos el tiempo característico de recuperación de ECIVD calculado en la sección anterior (τ= 1.50 segundos, figura 6.6 D), se puede estimar que la ECIVD inducida por trenes de potenciales de acción se mantendría aproximadamente constante si es que las células se estimulan con frecuencias iguales o menores a 0.2 Hz (intervalo entre estímulos > 3 τ). Para evaluar esta hipótesis, se aplicaron trenes cortos de PA_{sim} a 0.2, 2 y 5 Hz en solución libre de Ca^{2+}, y se analizó la exocitosis sincrónica.

La figura 6.7 A muestra trazados representativos de Cm obtenidos durante la aplicación de trenes cortos de PA_{sim} a 0.2 y 5 Hz. En el trazado (i) (que corresponde a la frecuencia de 0.2 Hz) se observan los aumentos de capacitancia asociados al desarrollo de una exocitosis sincrónica, y las caídas subsecuentes de la señal, asociadas al desarrollo de una respuesta endocítica rápida, de cinética similar (1.48 ± 0.33 segundos, n = 8) a la descripta en la sección anterior. Por otro lado, en el tren a 5 Hz (ii), los ΔCm inducidos por cada PA_{sim} no se pudieron compensar por la endocitosis entre los periodos inter-estímulos (200 ms), generándose la acumulación progresiva de Cm durante el tren, y una caída endocítica pronunciada después de la aplicación del último PA_{sim}.

La figura 6.7 C resume el comportamiento de la exocitosis sincrónica durante los experimentos descritos arriba. Es importante mencionar que el valor absoluto de la exocitosis inducida por el primer PA_{sim} fue similar en todas las frecuencias estudiadas (figura 6.7 B), y que en cada experimento individual los valores de ΔCm para cada pulso se normalizaron en relación al valor de este primer pulso. En la figura 6.7 C se puede observar que la exocitosis sincrónica asociada a ECIVD se mantuvo aproximadamente constante durante la aplicación de trenes cortos de PA_{sim} a 0.2 Hz (puntos negros). En cambio, la aplicación de trenes a 2 Hz afectó el sostenimiento del proceso, y provocó una caída de más del 50% respecto al valor inicial (puntos rojos). Finalmente, la aplicación de trenes a 5 Hz provocó la depresión casi completa de la exocitosis sincrónica (puntos azules). Los resultados presentados en esta sección están

en concordancia con los valores de la cinética de recuperación de ECIVD de la sección anterior. Además, a partir de estos resultados se puede inferir que este mecanismo puede potencialmente mantener una fracción de la exocitosis sincrónica a bajas frecuencias de potenciales de acción.

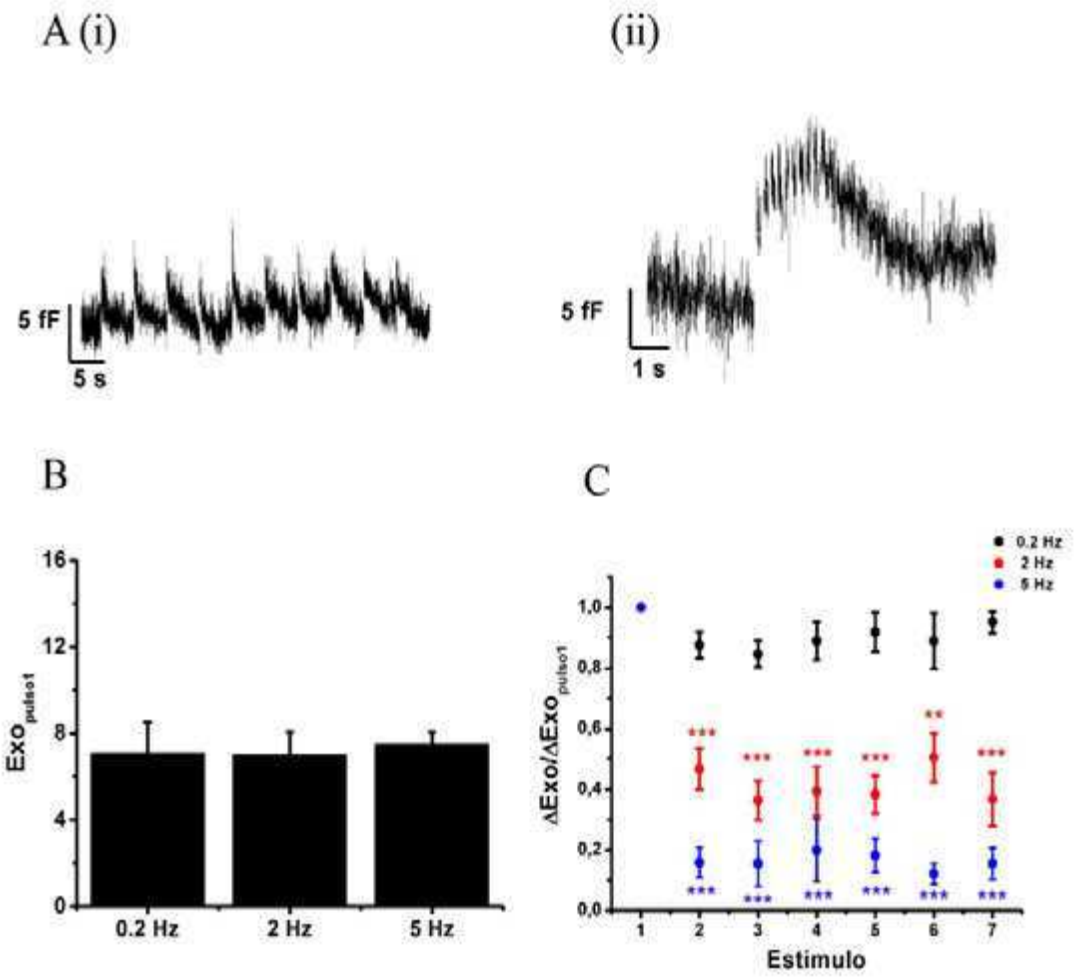

Figura 6.7- Efecto de la frecuencia de estimulación con PA_{sim} sobre el mantenimiento de ECIVD. **(A)** Trazados representativos de Cm durante trenes cortos de PA_{sim} a 0.2 (i) y 5 Hz (ii). **(B)** El gráfico representa los valores absolutos de los ΔCm inducidos por el primer PA_{sim} a 0.2, 2 y 5 Hz. **(C)** Este gráfico representa los ΔCm sincrónicos obtenidos entre el primer y séptimo PA_{sim} durante la aplicación de trenes a 0.2, 2 y 5 Hz. Las mediciones obtenidas en cada experimento individual fueron normalizadas en relación al ΔCm obtenido en el primer pulso de cada tren (n=8 por cada frecuencia estudiada). Los valores de ΔCm obtenidos para los PA_{sim} número 2, 3, 4, 5, 6 y 7 a lo largo del tren, para 2 y 5 Hz, fueron significativamente menores a los correspondientes a 0.2 Hz . **p < 0.02, ***p<0.0001. Los datos están expresados como valores promedios ± error estándar.

6.7 EN ECIVD PREDOMINARÍAN LAS FUSIONES VESICULARES TRANSITORIAS DE TIPO *KISS AND RUN*

En células cromafines se han descrito diferentes modos de fusión vesicular. Estas se clasifican en colapso completo, exocitosis compuesta, o fusión transitoria al estilo *kiss and run* (ver introducción). En general, la exocitosis compuesta se asocia a procesos de exocitosis masiva, frente a estímulos suprafisiológicos como despolarizaciones con alto K^+ (Wu *et al.*, 2014a). A su vez, la ocurrencia de fusiones transitorias o de colapsos completos depende de diversos factores fisiológicos, tales como la frecuencia de estimulación y la concentración de calcio citosólico (Elhamdani *et al.*, 2006a; Fulop *et al.*, 2005). Para elucidar qué modo de fusión vesicular predomina en ECIVD, aplicamos 15 pulsos cuadrados de 100 ms a 2 Hz y, simultáneamente, registramos los eventos sincrónicos de fusión vesicular por amperometría. Definimos como eventos sincrónicos, los ocurridos entre el comienzo de la despolarización hasta 100 ms luego de finalizada la misma. La figura 6.8 A ilustra ejemplos representativos de las espigas amperométricas obtenidas bajo estas condiciones experimentales, en donde detectamos dos tipos de señales. En la mayor parte de los casos se registraron señales pequeñas en amplitud y de bajo contenido cuántico, conocidas como *stand alone foot* (figura 6.8 A (i) y (ii)), las que han sido asociadas por otros autores a fusiones transitorias en donde el poro de fusión de la vesícula se cerraría antes de su dilatación (Berberian *et al.*, 2009; Fulop *et al.*, 2005). Las otras señales resultaron en espigas amperométricas convencionales, de mucha mayor amplitud, menor duración y mayor contenido cuántico, las cuales generalmente se asocian a procesos de colapso completo (Fulop *et al.*, 2005) (figura 6.8 A (iii)). Los criterios utilizados para detectar los *stand alone foot* respecto del ruido se basaron en los trabajos de Zhou y colaboradores, y son básicamente los siguientes: se consideraron señales tipo *stand alone foot* a aquellas espigas amperométricas que tuvieron duraciones del evento mayores a 5 ms, y cuya amplitud de corriente estuvo 3 veces por sobre el nivel del ruido basal del electrodo de registro (Zhou *et al.*, 1996). Por otro lado, aquellas espigas que tuvieron amplitudes mayores a 30 pA se consideraron como espigas

convencionales.

Con el objetivo de analizar la frecuencia de aparición de espigas sincrónicas (independientemente del tipo) a lo largo del tren, cuantificamos el total de espigas registradas y las agrupamos en función del momento de su aparición. Estas se dividieron entre un grupo 1 (del 1er al 5to pulso), un grupo 2 (del 6to al 10mo pulso) y un grupo 3 (del 11mo al 15mo pulso), y se graficaron en un histograma de frecuencias absolutas. Los resultados indican que el mayor número de espigas se detectó durante los primeros 5 estímulos (12 eventos), mientras que en el grupo 2 y 3 se detectaron únicamente 3 eventos (figura 6.8 B). Estos datos muestran que existe una mayor probabilidad de detección durante la aplicación de los primeros pulsos, lo que de acuerdo a las dos secciones anteriores, y podría deberse al vaciamiento del *pool* vesicular asociado a ECIVD frente a estimulaciones repetitivas aplicadas a 2 Hz.

Utilizando los criterios ya mencionados arriba (Zhou *et al.*, 1996), evaluamos la distribución de los tipos de eventos detectados. Observamos una clara supremacía de señales asociadas al modo de fusión de tipo *stand alone foot* (n=14; 88.88%), mientras que el número de registros asociados a espigas convencionales fue muy bajo (n=2; 11.12%) (figura 6.8 C). Los parámetros que definen a las señales clasificadas como *stand alone foot* en términos de amplitud, área y duración alcanzaron valores de 4.58 ± 0.572 pA, 39.2 ± 0.62 fC y 20.98 ± 2.51 ms, respectivamente (figura 6.8 D). Si bien la amplitud resultó similar a la detectada previamente para *stand alone foot* en cromafines de ratón, los otros dos parámetros estuvieron por debajo de los valores reportados previamente en la exocitosis dependiente de calcio (Fulop *et al*., 2005; Zhou *et al.*, 1996). Los resultados presentados en esta sección sugieren que los eventos individuales de liberación de catecolaminas durante ECIVD se asocian mayoritariamente a fusiones vesiculares transitorias de tipo *kiss and run*.

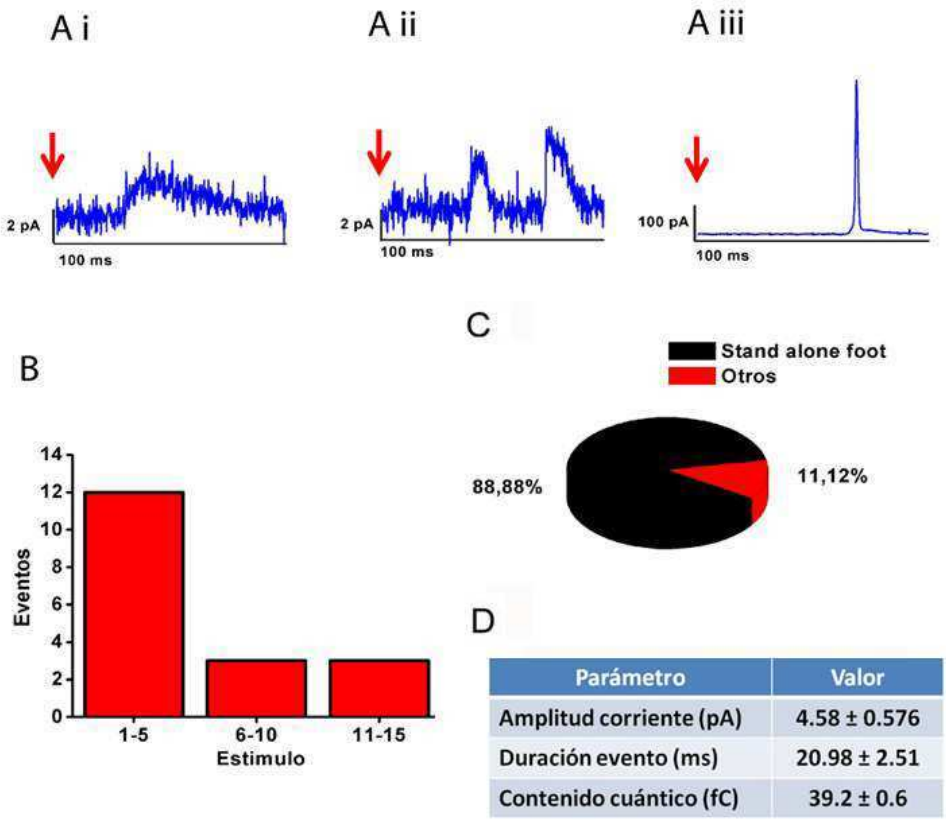

Figura 6.8- Un modo de fusión tipo *kiss and run* prevalecería en ECIVD. (A) Trazados representativos de registros amperométricos obtenidos en 3 células diferentes. Mientras que A (iii) presenta la amplitud y forma de una espiga amperométrica típica, A (i) y (ii) son más pequeñas y tienen una cinética más lenta, con lo cual pueden asimilarse a señales de tipo *stand alone foot* (Zhou *et al.*, 1996). La flecha roja indica el momento en el cual se aplicó el pulso despolarizante. **(B)** Histograma de frecuencia de aparición de eventos amperométricos. La totalidad de las espigas detectadas se agruparon respecto al número de estímulo en donde se detectaron (grupo 1: 1er al 5to estímulo; grupo 2: 6to al 10mo estímulo; grupo 3: 11mo al 15mo estímulo). La mayoría de los eventos se detectó dentro del grupo 1. **(C)** El gráfico representa la relación entre los tipos de señales detectadas sobre el número total de los eventos. Las señales de tipo *stand alone foot* fueron predominantes en relación a las espigas amperométricas convencionales (88.88%; n=14 eventos y 11.12%; n=2 eventos, respectivamente). El número total de células desde donde se adquirieron estos datos fue 11. **(D)** Valores promedio +/- error estándar de los parámetros asociados a señales clasificadas dentro del tipo *stand alone foot*.

6.8 El acople voltaje-exocitosis en la ECIVD estaría asociado a canales de Ca^{2+} de tipo P/Q

Plantear la hipótesis de un mecanismo de tipo ECIVD en células cromafines, implica la presencia de un sensor de voltaje que forme parte del

acople estímulo-secreción. Los objetivos experimentales de esta sección se centraron en poder encontrar elementos que contribuyan a la identificación de dicho sensor. Nos preguntamos si los mismos CCVDs podrían cumplir este rol. Esta suposición, se basa en primer lugar en que estas moléculas son capaces de responder a cambios en el potencial de membrana con cambios conformacionales de la proteína. Además, existen numerosos antecedentes que han reportado que estos canales interactúan físicamente con vesículas cercanas a la membrana plasmática (Alvarez *et al.*, 2013; Marom *et al.*, 2010; Mochida *et al.*, 1998). Debido a que la interacción con las vesículas se establecería fundamentalmente a través de proteínas de la maquinaria exocítica (Catterall, 1999), esto potencialmente permitía una transferencia de información entre estos canales y dicha maquinaria.

Como primera estrategia experimental para evaluar el rol de estos canales sobre la exocitosis independiente de Ca^{2+}, las células se incubaron con drogas o toxinas que afectan específicamente las propiedades de *gating* de los CCDV, y se evaluó la respuesta exocítica en solución libre de Ca^{2+} aplicando pulsos despolarizantes cuadrados de 100 ms. Ya sabíamos de resultados anteriores de nuestro laboratorio que las I_{Ca2+} no se expresan en nuestro preparado experimental, y que este que sólo presenta corrientes de tipo L, P/Q y R (Alvarez *et al.*, 2008). Por lo tanto, solamente consideramos a estos tres últimos en nuestro estudio.

Para evaluar el rol del canal de Ca^{2+} tipo L incubamos a las células con nitrendipina. Utilizamos esta droga ya que es sabido de trabajos previos en cardiomiocitos que la administración de esta droga reduce las corrientes de *gating* de estos canales (Bean, 1984; Hadley *et al.*, 1991). En otro grupo de experimentos inhibimos a los canales de Ca^{2+} tipo R con la toxina SNX-482. Ha sido demostrado a partir de los trabajos de Bourinet y colaboradores que esta toxina interactúa con los dominios III y IV de la subunidad α_{1E} de los canales tipo R, y que tal interacción inhibe la activación de las corrientes de *gating* de este canal de Ca^{2+} (Bourinet *et al.*, 2001). Como se observa en la figura 6.9 A, en ambas condiciones experimentales obtuvimos ΔCm similares a la condición control. A diferencia de estos experimentos, en los tratamientos en donde se

utilizó la toxina ω-agatoxin IVA observamos una disminución significativa de la exocitosis, obteniendo un valor promedio de 4.55 ± 0.82 fF, aproximadamente una tercera parte del valor control (figura 6.9 A). Se ha descrito que la administración de esta toxina en neuronas de purkinje afecta la activación voltaje-dependiente de las corrientes de *gating* de los canales tipo P/Q, por un mecanismo asociado a la estabilización del estado cerrado del canal (McDonough *et al.*, 1997; Mintz *et al.*, 1992).

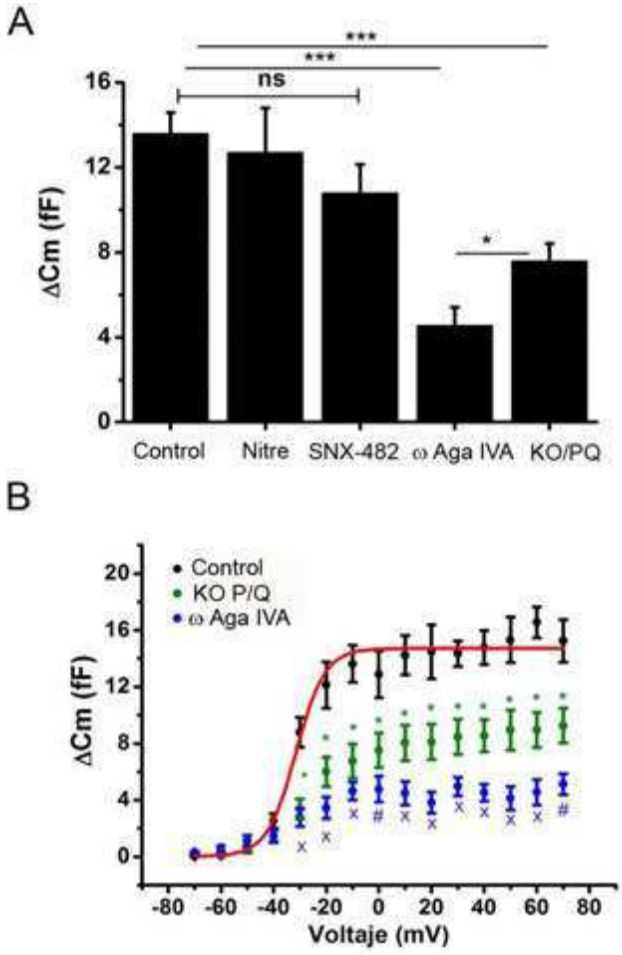

Figura 6.9 - ECIVD está acoplada al canal de Ca^{2+} tipo P/Q. (A) El diagrama de barras representa los ΔCm medidos en solución libre de Ca^{2+} en respuesta a pulsos de 100 ms, para células cromafines sometidas a diferentes condiciones. En particular se representan los promedios obtenidos en células WT en condiciones control, en presencia de los inhibidores de canales de Ca^{2+} de tipo P/Q, L y R (ω-Aga IVA 200 nM, n=26; nitrendipina 10 μM, n=10; y SNX-482 1 μM, n=11; respectivamente) que afectan el *gating* de dichos canales, y en células *KO* de canales P/Q. Se observó una inhibición de ECIVD con ω-Aga IVA y en el *KO* de P/Q, pero no se evidenciaron cambios respecto del control bajo los otros tratamientos. Los datos se compararon por un test de ANOVA de una vía, y las comparaciones a posteriori entre control y tratamientos individuales fueron realizadas por Bonferonni (***p<0.0001, *p<0.05). (Leyenda continúa)

(B) Los valores absolutos de ΔCm se graficaron respecto del potencial aplicado. Los puntos negros representan los valores del tratamiento control (n=14), mientras que los puntos verdes y azules representan los valores para el modelo *KO* del canal de Ca^{2+} tipo P/Q (n=30) y para los tratamientos con ω-Aga IVA (n=26), respectivamente. Se observó una clara disminución en el valor de ECIVD bajo los dos tratamientos a todos los potenciales mayores a -30 mV, aunque el efecto fue más evidente para ω-Aga IVA. Los datos están expresados como valores promedios ± error estándar. Las comparaciones entre los tratamientos a cada voltaje aplicado fueron evaluados por un test de ANOVA de una vía, y si las diferencias estadísticas fueron significativas ($p<0.05$) las comparaciones entre las condiciones control y tratamientos individuales fueron hechas por Bonferonni (* $p<0.05$; # $p<0.001$; x $p<0.0001$).

Con el objetivo de corroborar el rol de los canales de Ca^{2+} de tipo P/Q en ECIVD, se evaluaron los ΔCm en cultivos primarios del ratón *Knock-Out* (*KO*) del canal de Ca^{2+} tipo P/Q, obteniendo nuevamente una disminución significativa de los valores de exocitosis en relación a la condición control (valor promedio = 7.59 ± 0.82 fF). Es llamativo que en los *KO* la respuesta exocítica resultó mayor que en las células tratadas con ω-agatoxin IVA, determinándose incluso diferencias significativas entre ambos tratamientos experimentales (figura 6.9 A). Estas diferencias podrían explicarse, sin embargo, por procesos de compensación por otros tipos de canales que suelen tener lugar en el modelo *KO* del canal tipo P/Q, particularmente por parte de los canales de Ca^{2+} tipo N (Inchauspe *et al.*, 2004).

Finalmente, para completar la caracterización del efecto de ω-agatoxin IVA y del *KO* del canal P/Q sobre ECIVD, se evaluó esta exocitosis en el rango completo de voltaje de -70 a +70 mV bajo estas condiciones. Los resultados presentados en la figura 6.9 B muestran que ECIVD se redujo significativamente en ambas situaciones experimentales, obteniéndose el efecto más drástico en los experimentos con ω-agatoxin IVA (puntos verdes y azules, respectivamente, figura 6.9 B).

Tal como se expuso en la sección 1.5, algunos trabajos han demostrado que la región intracelular que conecta los dominios II y III de la subunidad α1a del canal de Ca^{2+} tipo P/Q, conocido como el sitio de interacción con proteínas sinápticas (en inglés, la llamada región *synprint*), interactuaría físicamente con proteínas de la maquinaria exocítica (Alvarez *et al.*, 2013; Rettig *et al.*, 1996;

Zamponi, 2003). Con el objetivo de evaluar si la región *synprint* del canal de tipo P/Q podía ser parte del mecanismo de acople entre ECIVD y estos canales, transfectamos los cultivos primarios de células cromafines WT con un plásmido IRES, que codificaba para el péptido *synprint* (Syn+) y para el reportero eGFP. La hipótesis de este experimento fue que el *synprint* expresado exógenamente podría competir con el *synprint* endógeno localizado en el canal de Ca^{2+}. El efecto esperado sería la disrupción de la interacción entre el canal y la maquinaria exocítica asociada a las vesículas de ECIVD. Las células transfectadas fueron identificadas por la fluorescencia asociada a eGFP. Es importante mencionar que la transfección con el péptido *synprint* no modifica la expresión de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q, tal como se demostró en un trabajo previo de nuestro laboratorio, utilizando un anticuerpo anti-subunidad α1a del canal tipo P/Q en células cromafines fijadas y permeabilizadas (Alvarez *et al.*, 2013). De modo de tener un control apropiado para estos experimentos, se transfectó a otro grupo de células con un plásmido similar que codificaba únicamente para eGFP.

La expresión del *synprint* exógeno (Syn+) generó la inhibición del ECIVD inducido por despolarizaciones de 100 ms respecto al grupo control, que expresaba únicamente eGFP. Esta inhibición resultó significativa para todos los voltajes superiores a 0 mV (figura 6.10). Es importante destacar que los valores obtenidos en las células transfectadas únicamente con eGFP, no fueron estadísticamente diferentes respecto a los controles descritos en la figura 6.9.

Estos resultados indican, al igual que la inhibición farmacológica del *gating* o la ablación molecular (KO) de los canales P/Q, que los CCDV de tipo P/Q son importantes para el disparo de ECIVD, apoyando la hipótesis de que éstos podrían ser los sensores de potencial que activen dicho proceso. Esto además sugiere que la interacción molecular entre estos canales y la maquinaria exocítica vías *synprint* es importante en este tipo de exocitosis.

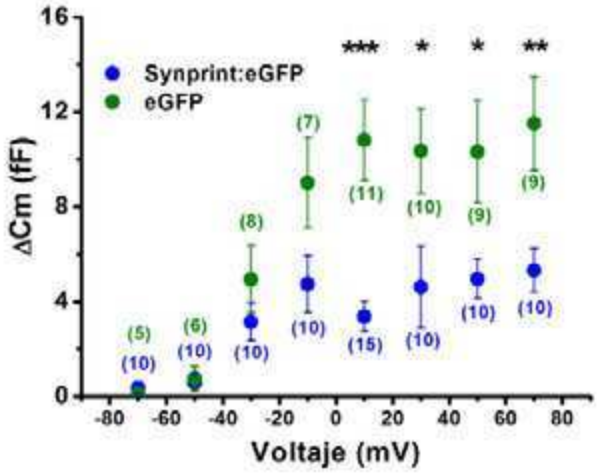

Figura 6.10- Las vesículas que conforman el *pool* asociado a ECIVD interactuarían físicamente con el canal de Ca^{2+} tipo P/Q a través del sitio de interacción con proteínas sinápticas. Los valores de ECIVD en respuesta a despolarizaciones de 100 ms fueron graficados en función del potencial aplicado. Los puntos verdes representan los valores de ΔC_m asociados a ECIVD obtenidos en células transfectadas con eGFP, y los puntos azules ilustran los valores de ΔC_m obtenidos en células transfectadas con eGFP:*synprint*. Se apreciaron diferencias significativas entre las dos condiciones a voltajes positivos. El número de células está representado entre paréntesis en el gráfico. Las comparaciones entre los tratamientos a cada voltaje aplicado fueron evaluados por un test de student de muestras independientes. *$p < 0.05$; ***$p<0.0001$. Los datos están expresados como valores promedios ± error estándar.

En resumen, las figuras 6.4, 6.9 y 6.10 ilustran una relación funcional entre ECIVD y el potencial de membrana. Además sostienen la idea de que este *pool* vesicular estaría acoplado al canal de Ca^{2+} de tipo P/Q, y que en esta interacción participaría la secuencia *synprint* de dicho canal

7. DISCUSIÓN II

7. DISCUSIÓN II

7.1 EXOCITOSIS INDEPENDIENTE DE Ca^{2+} Y DEPENDIENTE DE VOLTAJE EN CÉLULAS CROMAFINES

La teoría clásica, fuertemente establecida y corroborada por múltiples trabajos (Aguilar *et al.*, 1992; Albillos *et al.*, 2000; Aravanis *et al.*, 2003; Artalejo *et al.*, 1995; Borges *et al.*, 2012; Neher, 1998), establece que la liberación de neurotransmisores, neuropéptidos y neurohormonas en neuronas y células neuroendocrinas es disparada por un aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico, generado a partir de la activación de los CCDV. Sin embargo, observaciones previas de nuestro laboratorio muestran que en células cromafines de ratón, una vez anuladas todas las corrientes de Ca^{2+} asociadas a la exocitosis, aún persiste un aumento de capacitancia de membrana remanente altamente sincrónico al estímulo (Alvarez *et al.*, 2008). Estos resultados fueron confirmados y ampliados en esta tesis, estimándose un *pool* de aproximadamente 15 fF (ó 12 vesículas, considerando 1.3 fF/vesícula (Moser *et al.*, 1997)), cuya liberación es totalmente independiente de la activación de la corriente de Ca^{2+}. Tanto la inhibición de las corrientes utilizando toxinas específicas, Cd^{2+}, o simplemente la eliminación total del Ca^{2+} externo asegurada por el agregado de EGTA 1 mM, muestran que dicha exocitosis se manifiesta de manera consistente (figura 4.13, 6.1).

Una posibilidad para explicar la exocitosis que se genera en ausencia de I_{Ca2+}, es que haya una liberación de Ca^{2+} desde compartimientos intracelulares. Se ha reportado que en células cromafines hay cisternas del retículo endoplásmico distribuidas próximas a la membrana plasmática (Garcia-Sancho *et al.*, 2008). Por otro lado, incluso las mismas vesículas secretorias son capaces de acumular Ca^{2+} en grandes cantidades, y hay datos que muestran que estas poseen tanto Ca^{2+} ATPasas de la familia SERCA para captar Ca^{2+}, como receptores de rianoidina e IP_3 que permitirían liberarlo (Borges *et al.*,

2012). Si bien la ausencia de Ca^{2+} externo eliminaría, en principio, la posibilidad de la activación del mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} (Fabiato, 1983) por corrientes de Ca^{2+}, no podríamos descartar una activación de los receptores de IP_3, o una activación directa por voltaje de los receptores de rianodina, como ocurre en músculo esquelético (Smith *et al.*, 1988). En particular, en células cromafines se ha reportado que el Ca^{2+} alojado en el retículo endoplásmico y en los gránulos secretorios es capaz de inducir la liberación de vesículas secretorias (Borges *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2009; Montero *et al.*, 2000; Montero *et al.*, 1995). Sin embargo, los resultados de esta tesis descartaron que la exocitosis obtenida en solución libre de Ca^{2+} se genere en respuesta a la liberación de Ca^{2+} desde estos reservorios intracelulares. Cinco evidencias sostienen dicha aseveración: (i) el vaciamiento del RE (o los gránulos) a través del simultáneo bloqueo de la SERCA con thapsigargina; (ii) la aplicación del bloqueante rianoidina tampoco modificó dicha exocitosis; (iii) el bloqueo de los receptores de IP_3 con 2-APB provocó resultados similares a los mencionado en 1 y 2; (iv) no detectamos cambios en la fluorescencia de Fluo-8 cuando las células fueron estimuladas en solución libre de Ca^{2+}. (v) el agregado de BAPTA 4 mM a la solución interna no modificó a la exocitosis disparada en solución libre de Ca^{2+}. Estos resultados en su conjunto muestran que el proceso en estudio ocurre en ausencia de señales de Ca^{2+} provenientes del medio intracelular o extracelular.

¿Cuál es entonces el disparador de la exocitosis que se produce en solución libre de Ca^{2+}? Los resultados de esta tesis muestran una clara dependencia sigmoidea de la exocitosis independiente de Ca^{2+} con el potencial de membrana. Dicha relación muestra un umbral de activación de la exocitosis que se ubica próximo a los -40 mV, y un voltaje medio de activación de aproximadamente -30 mV (ver Figura 6.5). Estos valores son similares a los obtenidos por el grupo de Zhuan Zhou (2002) en neuronas del ganglio de la raíz dorsal de rata, quienes reportaron un voltaje medio de activación de – 20 mV. Estos autores encontraron un proceso similar al nuestro en ese preparado, y propusieron que se trataba de una exocitosis calcio independiente y voltaje dependiente (ECIVD). La existencia de una exocitosis dependiente directamente del voltaje había sido propuesta inicialmente por el grupo de

Parnas (Hochner *et al.*, 1989; Parnas *et al.*, 1987; Parnas *et al.*, 2010), utilizando uniones neuromusculares de cangrejo y oocitos de *Xenopus* como modelo experimental. Sin embargo, la hipótesis planteada por dicho grupo exigía también la presencia de un Ca^{2+} citosólico elevado, ya que finalmente la exocitosis resultaba de la acción del voltaje en una primera etapa, que desbloqueaba a la maquinaria exocitótica, y de Ca^{2+} en una segunda etapa, que activaba a dicha maquinaria. En este sentido, nuestros resultados se parecen más a los publicados por el grupo de Zhuan Zhou, ya que se trataría de una exocitosis minoritaria en comparación con la Ca^{2+} dependiente, pero que ocurre por un mecanismo exclusivamente dependiente del voltaje de membrana.

Todos los procesos exocíticos conocidos, y particularmente los asociados a la liberación de neurotransmisores y hormonas, implican la participación de proteínas del complejo SNARE. Las toxinas botulínicas y la tetánica han representado una herramienta fundamental en el entendimiento de los mecanismos asociados a la exocitosis, y en particular en la compresión de la acción de estas proteínas (Bittner *et al.*, 1989; Caccin *et al.*, 2003). Dichas toxinas clivan específicamente los diferentes componentes proteicos del complejo SNARE, inactivándolos, e inhibiendo la exocitosis. La técnica de *whole cell*, al brindarnos un acceso directo al medio intracelular, nos permite la utilización directa de las subunidades catalíticas de estas toxinas, las cuales son agregadas a la solución del electrodo a la concentración deseada. En particular, en esta tesis se utilizó la cadena liviana de la toxina botulínica Bont-B, que cliva específicamente la proteína v-SNARE sinaptobrevina (Caccin *et al.*, 2003; Humeau *et al.*, 2000; Lebeda *et al.*, 2010). Es importante mencionar que en células cromafines está demostrado que la aplicación de esta toxina inhibe significativamente la exocitosis dependiente de Ca^{2+} (Bittner *et al.*, 1989). Si los ΔCm inducidos en solución libre de Ca^{2+} representaban eventos exocitóticos convencionales dependientes de SNARE, estos deberían ser inhibidos por la presencia de Bont-B. La única limitante de nuestra configuración experimental es el tiempo de difusión de la proteína al citosol, que es particularmente lento. Debido a esto, es difícil alcanzar el estado estacionario de concentración de la toxina en el citosol en los tiempos de

nuestros experimentos y a temperatura ambiente (Xu *et al.*, 1998). Pese a esto, nuestros resultados mostraron una clara caída de la ECIVD en células tratadas con Bont-B en comparación a las células controles. El efecto de la toxina se hizo significativo luego de 10 minutos de diálisis con la toxina, pero este efecto se hizo aún más evidente a los 15 minutos, alcanzando casi un 50% de inhibición. Además, durante el desarrollo de estos experimentos obtuvimos 2 mediciones luego de 20 minutos diálisis, alcanzando en promedio un 70% de inhibición. En términos generales, estos experimentos muestran que ECIVD representa un proceso exocítico asociado a proteínas SNARE funcionales.

Este es el primer estudio que propone la presencia en células cromafines de un mecanismo exocítico que es totalmente independiente de Ca^{2+}, y disparado directamente por cambios en el potencial de membrana. En concordancia con nuestros resultados, la presencia de *pooles* vesiculares con estas características de liberación ha sido previamente demostrada en neuronas del ganglio de la raíz dorsal y en neuronas del ganglio cervical superior (Mochida *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2002). De acuerdo a nuestros resultados experimentales, el *pool* vesicular asociado a ECIVD de células cromafines de ratón, presenta una tasa media de exocitosis de 114 seg^{-1}. Esta velocidad corresponde a una liberación vesicular altamente acoplada al estímulo, incluso más acoplada que el IRP en este mismo preparado, el cual tiene una tasa media de 67 seg^{-1} (Alvarez *et al.*, 2013), y mucho más que el IRP de células de rata y vaca en cultivo, con una tasa de 20 seg^{-1} (Horrigan *et al.*, 1994; Marengo, 2005). Esto es coherente con una importante participación de ECIVD durante estímulos de muy corta duración, y particularmente durante potenciales de acción. Coherentemente con esto último, nuestros resultados muestran que durante un PA_{sim}, ECIVD representa aproximadamente el 50% de la exocitosis total. Por otro lado, frente a estímulos de mayor duración (figura 6.1C), o durante PA_{sim} aplicados a frecuencias moderadas o altas (figura 6.7 B), ECIVD tendría una participación muy minoritaria. Esto sugiere que ECIVD sería un mecanismo que optimizaría, junto con IRP, la exocitosis a frecuencias basales de potenciales de acción (Moya-Diaz *et al.*, 2016).

7.2 ACOPLE FUNCIONAL ENTRE LA EXOCITOSIS Y LA ENDOCITOSIS INDEPENDIENTE DE Ca^{2+}. RECUPERACIÓN DEL *POOL* VESICULAR ASOCIADO A ECIVD

Nuestros resultados indican que luego de ECIVD se produce una endocitosis rápida (τ= 1.1 ± 0.02), la cual parece activarse y desarrollase también en forma Ca^{2+} independiente. Esta conclusión se apoya en que pudimos comprobar que dicho mecanismo evoluciona en ausencia total de Ca^{2+} extracelular (figura 6.6 B), y también frente al vaciamiento o el bloqueo de fuentes de Ca^{2+} intracelulares (figura 6.2). Procesos endocitóticos independientes de Ca^{2+}, similares a los descritos en esta tesis, han sido reportados en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Zhang *et al.*, 2004). Esta endocitosis sería dependiente de dinamina, ya que la aplicación de un anticuerpo monoclonal contra dicha GTPasa provocó su casi completa anulación (figura 6.6 B, trazado rojo). Respecto a este punto, vale la pena mencionar que una endocitosis dinamina dependiente, y con cinética prácticamente idéntica a la reportada aquí, ha sido descrita en células cromafines de ratón y vaca en presencia de Ca^{2+} extracelular ((Chan *et al.*, 2001; Moya-Diaz *et al.*, 2016); primera sección de esta tesis). Dado que ha sido reportado que dicha endocitosis se inhibe con el aumento en la intensidad en la estimulación y con el aumento del Ca^{2+} intracelular (Chan *et al.*, 2003a; Chan *et al.*, 2001), se podría especular que en solución libre de Ca^{2+} estaría fuertemente activa. Sin embargo, salvo los puntos ya mencionados, no tenemos elementos adicionales para afirmar que se trate del mismo mecanismo. La Ca^{2+} independencia de esta endocitosis sugiere que el principal activador de la misma sería la propia exocitosis previa, con lo cual podemos postular que es un mecanismo funcionalmente acoplado a ECIVD. Esta hipótesis se apoya en que, (i) esta endocitosis está fuertemente asociada temporalmente a la exocitosis previa, es decir se activa siempre a continuación de ECIVD; (ii) es altamente compensatoria (figura 6.6 A, (iii)), es decir que recupera exactamente la misma cantidad de membrana que la exocitada previamente; (iii) incluso cuando ECIVD es inhibida parcialmente con Bont-B, la

endocitosis se reduce proporcionalmente, manteniendo la compensación (figura 6.4); (iv) finalmente, cuando se modifica el voltaje aplicado, la endocitosis también cambia conjuntamente a ECIVD manteniendo la compensación, pero sin embargo el τ de decaimiento de Cm no se modifica con el voltaje (figura 6.5 C).

Los resultados de esta tesis indican que la recuperación del *pool* vesicular asociado a ECIVD está ligada a la endocitosis rápida mencionada arriba. Esta conclusión se desprende de tres resultados obtenidos en este trabajo. En primer lugar, la cinética de recuperación del *pool* asociado a ECIVD (τ <1.5 segundos) es similar (incluso un poco más lenta) que el transcurso temporal de la endocitosis independiente de Ca^{2+}. Esto hace posible que este mecanismo endocítico sea potencialmente la primera etapa del proceso de recuperación de las vesículas de este *pool*. En segundo lugar, la aplicación de anti-Dyn, además de inhibir a la endocitosis rápida, retardó significativamente la recuperación de ECIVD (figura 6.6 D), lo que implica una vinculación entre ambos procesos. Finalmente, en tercer lugar, el altamente predominante porcentaje de señales amperométricas de tipo *stand alone foot* sugiere que en ECIVD prevalecen las fusiones transitorias al estilo *kiss and run*. En general, este tipo de fusiones se asocian a nivel macroscópico celular a una endocitosis rápida de cinética similar a la reportada en esta tesis (Elhamdani *et al.*, 2006a; Wu *et al.*, 2014a). Por otro lado, el mecanismo de *kiss and run* implica una recuperación rápida de las vesículas exocitadas, a través de un ciclado corto en el cual las vesículas no pierden su identidad (Betz *et al.*, 1992). Además, en lo que respecta particularmente a cromafines, la predominancia de este modo de fusión posee una importante ventaja en cuanto a la recuperación de las vesículas secretorias. Esto está relacionado con el hecho de que las fusiones transitorias preservan el núcleo denso proteico de la vesícula secretoria, permitiendo que estas se rellenen de adrenalina en un periodo muy corto de tiempo, y puedan liberarse frente a otra estimulación (Berberian *et al.*, 2009). Además, la predominancia de fusiones de tipo *kiss and run* en ausencia de Ca^{2+}, es coherente con estudios que indican que la acumulación de Ca^{2+} residual favorece el proceso de colapso completo por sobre la fusión

transitoria (Elhamdani *et al.*, 2006b; Fulop *et al.*, 2006).

En resumen, los resultados de esta tesis están de acuerdo con una hipótesis que sostiene lo siguiente: en células cromafines de ratón, expuestas a solución libre de Ca^{2+}, habría un ciclado vesicular en el que intervendrían ECIVD, una endocitosis rápida independiente de Ca^{2+}, y un proceso de recuperación también rápido. Estos tres procesos estarían funcionalmente acoplados, y podrían explicarse mecanísticamente por un modo de exocitosis-endocitosis al estilo *kiss and run*. Sin embargo, no podemos descartar una posibilidad propuesta previamente por el grupo de Takeshi Sakaba (Hosoi *et al.*, 2009). Según esta hipótesis alternativa, la endocitosis rápida serviría simplemente para "limpiar" los sitios de liberación de las proteínas agregadas a la membrana durante la exocitosis, recuperándolos para un nuevo evento exocítico. A la vez, esta endocitosis internalizaría una fracción de membrana que se fusionaría con un endosoma intermedio, no liberable, desde donde se podrían generar vesículas maduras para su liberación posterior (Wu *et al.*, 2014a).

7.3 Relevancia de ECIVD en células cromafines estimuladas con PA_{SIM}

Nuestros resultados establecen que la fracción independiente de Ca^{2+} que se exocita en respuesta a un PA_{sim} aislado, representa aproximadamente el 50% de ETAP (figura 4.13). Por otro lado, cuando se aplicaron trenes de PA_{sim} en solución libre de Ca^{2+} a una frecuencia de 0.2 Hz, la exocitosis sincrónica inducida por cada estímulo se mantuvo constante. Esto es consistente con la cinética de recuperación de ECIVD, la cual puede ser representada como un proceso monoexponencial con un tiempo característico τ de aproximadamente 1.5 segundos. Para 0.2 Hz, el tiempo entre PA_{sim} es de 5 segundos, el cual es un período 3.33 veces mayor al tiempo característico de recuperación estimado para ECIVD, siendo suficiente para que este *pool* se recupere casi totalmente. Cuando se aumentó la frecuencia de los trenes aplicados a 2 Hz, la exocitosis sincrónica inducida por cada estímulo decayó

hasta casi el 40% del valor control inicial, efecto que se volvió más notorio cuando se aplicaron trenes a 5 Hz. Esto es explicable por la reducción del período entre estímulos a 0.5 y 0.2 segundos respectivamente, dejando lugar a sólo una pequeña recuperación de ECIVD.

Estos experimentos, en conjunto con los experimentos de recuperación de ECIVD, indican que este tipo de exocitosis está capacitada para responder de manera sostenida en el límite inferior del rango fisiológico de frecuencias de la célula cromafin, cuyos valores se ubican en aproximadamente 0.2-0.5 Hz (Chan *et al.*, 2001; Holman *et al.*, 1994). Esto correspondería a las frecuencias basales, asociadas a la actividad de la glándula cuando el animal está en reposo, situación conocida cono *breed and feed*.

7.4 PROBABLES MECANISMOS DE ACOPLE ENTRE EL POTENCIAL DE MEMBRANA Y ECIVD

La neurotransmisión dependiente de voltaje fue reportada por primera vez por el grupo de Parnas en la placa neuromuscular de cangrejo, quienes luego de provocar por diferentes medios un aumento sostenido en la concentración de Ca^{2+} citosólico, observaron que la transmisión sináptica se producía de manera sincrónica con la despolarización, sin la necesidad del influjo de Ca^{2+} (Hochner *et al.*, 1989; Parnas *et al.*, 1986). Años más tarde, investigaciones realizadas en neuronas del ganglio de la raíz dorsal y del ganglio cervical simpático de rata dieron cuenta de una forma de exocitosis vesicular totalmente independiente de Ca^{2+}, donde sin necesidad de aumentar los niveles de este catión respecto a los valores basales, la liberación vesicular era disparada directamente por despolarizaciones de la membrana plasmática (Mochida *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2009).

En esta tesis se estableció una clara correlación entre el potencial de membrana y la exocitosis, bajo condiciones en las cuales estaban abolidos tanto el ingreso de Ca^{2+} del medio extracelular como la liberación de Ca^{2+} de compartimientos intracelulares. Por lo tanto, nuestros datos se asimilan más a las observaciones reportadas por el grupo de Zhuan Zhou en neuronas del

ganglio dorsal (Zhang *et al.*, 2002). No obstante, es importante resaltar que hasta el momento no se ha resuelto cuál es el sensor molecular de voltaje asociado a la transducción voltaje/exocitosis. Respecto a este punto, el grupo de Parnas (Parnas *et al.*, 2010), ha propuesto que ciertos receptores asociados a proteínas G podrían cumplir esta función. Sin embargo este mecanismo requiere la acción conjunta del potencial y del Ca^{2+} citosólico elevado para poder activar finalmente la exocitosis vesicular, además de requerir la presencia del neurotransmisor que activa a dicho receptor (Figura 1.12, página 42, Introducción). Claramente, este conjunto de condiciones no se ajustan a nuestros resultados. Por otro lado, el grupo de Atlas (Atlas *et al.*, 2001) propuso que los CCDV podrían actuar como sensores de voltaje, y activar la exocitosis sin la necesidad de vehiculizar el influjo de Ca^{2+} al interior celular. Estos autores plantearon que los canales de Ca^{2+} interactúan con las proteínas de la maquinaria exocitótica, conformando un complejo proteico llamado "excitosome", que promovería la exocitosis en respuesta a la despolarización de la célula en el orden de milisegundos (Lerner *et al.*, 2006; Marom *et al.*, 2010). La existencia del exocitosoma se ha propuesto en distintos modelos neurosecretores, incluyendo a las células PC12, las células cromafines bovinas y las células beta-pancreáticas (Lerner *et al.*, 2006; Trus *et al.*, 2007). Sin embargo, este mecanismo requiere la presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular, ya que sería la unión de Ca^{2+} al canal previamente activado por voltaje lo que finalmente promovería la activación de la maquinaria exocitótica, y consecuentemente la exocitosis. En otras palabras, el canal actuaría como un sensor de Ca^{2+} asociado a la maquinaria exocítica, pero el Ca^{2+} actuaría desde el medio extracelular (Lerner *et al.*, 2006; Marom *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en este trabajo, apoyan la hipótesis de que sería el canal de Ca^{2+} tipo P/Q la proteína responsable de responder a los cambios de potencial de la membrana, promoviendo un proceso de exocitosis que es totalmente independiente de la presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular, y también del aumento citosólico de este catión. De trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, sabemos que las células cromafines de ratón presentan un acople funcional estrecho entre el canal de Ca^{2+} de tipo P/Q y el IRP (Alvarez *et al.*, 2013; Alvarez *et al.*, 2008). Además, se comprobó

que este canal de Ca^{2+} interactúa con proteínas de la maquinaria exocitótica, tales como sintaxina 1a, SNAP-25, sinaptotagmina y sinaptobrevina (Cohen-Kutner *et al.*, 2010). Por lo tanto, es una hipótesis plausible que el canal P/Q, que tiene la capacidad de responder a los cambios de voltaje de membrana, pueda activar de manera directa a las proteínas de la maquinaria exocítica. En apoyo a esta hipótesis, debemos resaltar que los únicos tratamientos en esta tesis que fueron capaces de inhibir ECIVD fueron el clivaje de la sinaptobrevina por Bont-B, la ablación molecular del canal P/Q (*KO*), el tratamiento con ω-agatoxina IVA (una toxina que interviene sobre el *gating* del canal), y la introducción de una secuencia (*synprint*) que interviene en la interacción molecular canal-proteínas exocíticas.

Como se acaba de mencionar, los resultados de esta tesis apoyan la hipótesis de que la secuencia *synprint* de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q contribuiría al establecimiento de un acople funcional entre estos canales y la maquinaria exocitótica durante ECIVD. El péptido *synprint* exógeno, al competir con el endógeno que forma parte del canal, produciría un desacople entre la maquinaria exocítica y los canales (Alvarez *et al.*, 2013; Catterall, 1999; Mochida *et al.*, 1996). La importancia de la interacción canal-maquinaria exocitótica vía *synprint* había ya sido demostrada para la exocitosis Ca^{2+}-dependiente en varios trabajos, tanto para vesículas sinápticas como secretorias (Alvarez *et al.*, 2013; Catterall, 1999; Mochida *et al.*, 1996). Es más, existe el antecedente de un trabajo realizado en neuronas del ganglio cervical simpático por el grupo de William Catterall, quien reportó que la introducción del péptido *synprint* del canal de Ca^{2+} de tipo N inhibió significativamente una exocitosis independiente de Ca^{2+} en estas neuronas (Mochida *et al.*, 1998). Aunque la secuencia *synprint* también está presente en canales de Ca^{2+} tipo N (Harkins *et al.*, 2004; Mochida *et al.*, 1996), trabajos de nuestro laboratorio demostraron que estos canales no se expresan funcionalmente en nuestros preparados (Alvarez *et al.*, 2008). Por lo tanto, asociamos los resultados obtenidos en esta tesis con una competencia entre el *synprint* libre introducido y la secuencia *synprint* que se encuentra en los canales tipo P/Q.

Además de la secuencia *synprint*, se ha demostrado en sinapsis del sistema nervioso central que el dominio C-terminal del canal de Ca^{2+} tipo P/Q

interactúa con proteínas sinápticas adaptadoras tales como CASK, Rim o Mint 1, promoviendo la formación de complejos macromoleculares que favorecen la exocitosis altamente acoplada (Catterall *et al.*, 2005a; Maximov *et al.*, 1999). Sin embargo, en células cromafines no se ha reportado la existencia de tales complejos macromoleculares, aunque no podemos descartar la posibilidad de que otros mecanismos de acople operen en estas células.

En resumen, los resultados de esta tesis muestran que ECIVD se induce por un cambio del potencial de membrana que supera los -40 mV. El sensor de voltaje que participaría de este mecanismo sería el CCDV de tipo P/Q, el cual interacciona con la maquinaria exocitótica a través del sitio de interacción *synprint*. De esta manera, podemos especular que la despolarización de la membrana, al inducir un cambio conformacional del canal de Ca^{2+} tipo P/Q, provocaría a su vez la activación de las proteínas exocíticas del complejo SNARE, promoviendo la liberación vesicular.

8. CONCLUSIONES GENERALES Y CONSIDERACIONES FINALES

8. CONCLUSIONES GENERALES Y CONSIDERACIONES FINALES

Nuestro laboratorio, durante los últimos 20 años, se ha dedicado al estudio de la exocitosis altamente acoplada al estímulo en células cromafines (Alvarez *et al.*, 2013; Alvarez *et al.*, 2008; Alvarez *et al.*, 2011; Marengo, 2005). En estos trabajos anteriores se concluyó, entre otras cosas, que la exocitosis de IRP está mayoritariamente explicada por un acople íntimo entre los canales de Ca^{2+} de tipo P/Q y las vesículas asociadas a dicho *pool* vesicular, establecida gracias a la interacción entre la secuencia *synprint* del canal y proteínas de la maquinaria exocitótica.

En este trabajo de tesis, extendimos nuestro estudio a la exocitosis que se dispara en respuesta a un estímulo que se aproxima en amplitud y duración a un potencial de acción. Concluimos que un PA_{sim} libera un grupo de aproximadamente 8 vesículas, al que denominamos ETAP, el cual está incluido en el IRP, y su exocitosis depende en un 50% de fuentes de Ca^{2+} extracelulares y en un 50% de un mecanismo independiente del influjo de Ca^{2+}.

Para caracterizar la fracción de exocitosis independiente del influjo de Ca^{2+}, analizamos su dependencia con la duración del estímulo, y encontramos que esta alcanzaba su mayor amplitud en respuesta a despolarizaciones cuadradas de aproximadamente 50 ms de duración. Debido a esto, utilizamos despolarizaciones de 100 ms para la caracterización de este mecanismo. Encontramos que dicho fenómeno es independiente de fuentes extracelulares e intracelulares de Ca^{2+}, y está asociado a una exocitosis SNARE dependiente que se activa en forma sigmoidea con el voltaje aplicado. Estos resultados son coherentes con lo descripto previamente por el grupo de Zhuan Zhou para neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Zhang *et al.*, 2002). Adicionalmente, nuestros resultados sugieren que en células cromafines de ratón el sensor de voltaje asociado a esta exocitosis Ca^{2+} independiente y voltaje dependiente, ECIVD, sería el canal de Ca^{2+} tipo P/Q, el cual interaccionaría con la

maquinaria exocitótica a través de la secuencia *synprint*.

De acuerdo a lo mencionado, la aplicación de despolarizaciones cortas dispara, a través del mecanismo clásico Ca^{2+} dependiente y de ECIVD, una exocitosis altamente acoplada al estímulo, aunque asociada a un *pool* vesicular restringido. Suponemos que tales mecanismos pueden adquirir importancia fisiológica cuando las células cromafines son estimuladas a bajas frecuencias de potenciales de acción, lo que ocurre en una situación de reposo, convencionalmente llamada de *breed and feed*. Sin embargo, para que la exocitosis altamente acoplada pueda sostenerse en el tiempo frente a la aplicación de una frecuencia baja pero sostenida de potenciales de acción, es necesario contar con mecanismos que aseguren una apropiada recuperación de las vesículas incluidas en los pequeños *pools* vesiculares asociados. En este trabajo de tesis, encontramos que las células cromafines son capaces de recuperar a un pequeño grupo de vesículas, ETAP, a una velocidad tal que permite mantener la exocitosis a frecuencias de potenciales de acción compatibles con la actividad basal. Este proceso de recuperación ocurre a una velocidad mayor que las descriptas hasta el momento para células cromafines, y depende de dos procesos: una transferencia de vesículas desde *pools* vesiculares río arriba, y de una endocitosis rápida dependiente de dinamina.

Respecto al mecanismo de ciclado vesicular que opera a continuación de la endocitosis dinamina dependiente, los resultados de esta tesis no permiten extraer conclusiones definitivas. Como ya se mencionó, una hipótesis posible es que dicha endocitosis sea la consecuencia de un proceso de *kiss and run*, lo cual implicaría un reciclado vesicular local. Esta hipótesis está de acuerdo con lo postulado por el grupo de Corey Smith, que postula que a bajas frecuencias de potenciales de acción se dispararía un mecanismo de fusión vesicular transitorio (Fulop *et al.*, 2005), mientras que a altas frecuencias prevalecería el colapso completo. Coherentemente, nuestros resultados sugieren que ECIVD estaría asociada a fusiones tipo *stand alone foot*, las cuales fueron asociadas a *kiss and run* (Zhou *et al.*, 1996). Sin embargo más investigaciones serán necesarias para definir este punto, tanto para ETAP en general como para ECIVD.

Este trabajo de tesis también abre otras preguntas para futuras investigaciones. Por ejemplo, ¿cuales son los mecanismos de control que operan sobre la endocitosis rápida descrita, y sobre el reciclado vesicular posterior? Tenemos datos en el laboratorio que sugieren que dicha endocitosis ocurre por un mecanismo clatrina independiente, aunque esto debe ser corroborado. Variables tales como el Ca^{2+}, el grado de agregación de la actina cortical, la activación kinasas y fosfatasas que pueden modular el grado de fosforilación de la dinamina y otras fosfinas, y niveles de hormonas que actúan sobre las células cromafines, son posibles agentes reguladores de estos procesos (Wu *et al.*, 2014a). También hay que tener en cuenta que nuestros experimentos fueron realizados a temperatura ambiente, y es bien sabido que esta variable acelera tanto la endocitosis como los procesos de reciclado vesicular (Dinkelacker *et al.*, 2000). Por lo tanto, es probable que en condiciones fisiológicas ETAP pueda incluso participar en un rango de frecuencias mayor al descripto en esta tesis. Este y otros aspectos deberán ser estudiados en futuros trabajos.

9. BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar JS, Ballesta JJ, Reig JA, Palmero M, Viniegra S y Criado M (1992). *Muscarinic receptor subtypes in bovine adrenal medulla*. Neurochemical research *17*, 1235-1239.

Albillos A, Dernick G, Horstmann H, Almers W, Alvarez de Toledo G y Lindau M (1997). *The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry*. Nature *389*, 509-512.

Albillos A, Neher E y Moser T (2000). *R-Type Ca2+ channels are coupled to the rapid component of secretion in mouse adrenal slice chromaffin cells*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *20*, 8323-8330.

Aldea M, Jun K, Shin HS, Andres-Mateos E, Solis-Garrido LM, Montiel C, Garcia AG y Albillos A (2002). *A perforated patch-clamp study of calcium currents and exocytosis in chromaffin cells of wild-type and alpha(1A) knockout mice*. Journal of neurochemistry *81*, 911-921.

Ales E, Fuentealba J, Garcia AG y Lopez MG (2005). *Depolarization evokes different patterns of calcium signals and exocytosis in bovine and mouse chromaffin cells: the role of mitochondria*. The European journal of neuroscience *21*, 142-150.

Ales E, Tabares L, Poyato JM, Valero V, Lindau M y Alvarez de Toledo G (1999). *High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism*. Nature cell biology *1*, 40-44.

Aloe L y Levi-Montalcini R (1979). *Nerve growth factor-induced transformation of immature chromaffin cells in vivo into sympathetic neurons: effect of antiserum to nerve growth factor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *76*, 1246-1250.

Alvarez YD, Belingheri AV, Perez Bay AE, Javis SE, Tedford HW, Zamponi G y Marengo FD (2013). *The immediately releasable pool of mouse chromaffin cell vesicles is coupled to P/Q-type calcium channels via the synaptic protein interaction site*. PloS one *8*, e54846.

Alvarez YD, Ibanez LI, Uchitel OD y Marengo FD (2008). *P/Q Ca2+ channels are functionally coupled to exocytosis of the immediately releasable pool in mouse chromaffin cells*. Cell calcium *43*, 155-164.

Alvarez YD y Marengo FD (2011). *The immediately releasable vesicle pool: highly coupled secretion in chromaffin and other neuroendocrine cells*. Journal of neurochemistry *116*, 155-163.

Amatore C, Arbault S, Bonifas I, Guille M, Lemaitre F y Verchier Y (2007). *Relationship between amperometric pre-spike feet and secretion granule composition in chromaffin cells: an overview*. Biophysical chemistry *129*, 181-189.

Anderson DJ y Axel R (1986). *A bipotential neuroendocrine precursor whose choice of cell fate is determined by NGF and glucocorticoids*. Cell *47*, 1079-1090.

Andres-Mateos E, Renart J, Cruces J, Solis-Garrido LM, Serantes R, de Lucas-Cerrillo AM, Aldea M, Garcia AG y Montiel C (2005). *Dynamic association of the Ca2+ channel alpha1A subunit and SNAP-25 in round or neurite-emitting chromaffin cells*. The European journal of neuroscience *22*, 2187-2198.

Annaert WG, Llona I, Backer AC, Jacob WA y De Potter WP (1993). *Catecholamines are present in a synaptic-like microvesicle-enriched fraction from bovine adrenal medulla*. Journal of neurochemistry *60*, 1746-1754.

Aravanis AM, Pyle JL y Tsien RW (2003). *Single synaptic vesicles fusing transiently and successively without loss of identity*. Nature *423*, 643-647.

Arroyo G, Aldea M, Fuentealba J, Albillos A y Garcia AG (2003). *SNX482 selectively blocks P/Q Ca2+ channels and delays the inactivation of Na+ channels of chromaffin cells*. European journal of pharmacology *475*, 11-18.

Artalejo CR, Elhamdani A y Palfrey HC (2002). *Sustained stimulation shifts the mechanism of endocytosis from dynamin-1-dependent rapid endocytosis to clathrin- and dynamin-2-mediated slow endocytosis in chromaffin cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *99*, 6358-6363.

Artalejo CR, Henley JR, McNiven MA y Palfrey HC (1995). *Rapid endocytosis coupled to exocytosis in adrenal chromaffin cells involves Ca2+, GTP, and dynamin but not clathrin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *92*, 8328-8332.

Ashery U, Varoqueaux F, Voets T, Betz A, Thakur P, Koch H, Neher E, Brose N y Rettig J (2000). *Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells*. The EMBO journal *19*, 3586-3596.

Atlas D, Wiser O y Trus M (2001). *The voltage-gated Ca2+ channel is the Ca2+ sensor of fast neurotransmitter release*. Cellular and molecular neurobiology *21*, 717-731.

Balaji J, Armbruster M y Ryan TA (2008). *Calcium control of endocytic capacity at a CNS synapse*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *28*, 6742-6749.

Banks P y Helle K (1965). *The release of protein from the stimulated adrenal medulla*. The Biochemical journal *97*, 40C-41C.

Bean BP (1984). *Nitrendipine block of cardiac calcium channels: high-affinity binding to the inactivated state*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *81*, 6388-6392.

Becherer U, Moser T, Stuhmer W y Oheim M (2003). *Calcium regulates exocytosis at the level of single vesicles*. Nature neuroscience *6*, 846-853.

Becherer U, Pasche M, Nofal S, Hof D, Matti U y Rettig J (2007). *Quantifying exocytosis by combination of membrane capacitance measurements and total internal reflection fluorescence microscopy in chromaffin cells*. PloS one *2*, e505.

Becherer U y Rettig J (2006). *Vesicle pools, docking, priming, and release*. Cell and tissue research *326*, 393-407.

Ben-Chaim Y, Chanda B, Dascal N, Bezanilla F, Parnas I y Parnas H (2006). *Movement of 'gating charge' is coupled to ligand binding in a G-protein-coupled receptor*. Nature *444*, 106-109.

Bennett MK, Calakos N y Scheller RH (1992). *Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones*. Science *257*, 255-259.

Berberian K, Torres AJ, Fang Q, Kisler K y Lindau M (2009). *F-actin and myosin II accelerate catecholamine release from chromaffin granules*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *29*, 863-870.

Berridge MJ (1993). *Inositol trisphosphate and calcium signalling*. Nature *361*, 315-325.

Bert Sakmann EN (1995). Single Channel Recording

Betz WJ, Mao F y Bewick GS (1992). *Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *12*, 363-375.

Biales B, Dichter M y Tischler A (1976). *Electrical excitability of cultured adrenal chromaffin*

cells. The Journal of physiology *262*, 743-753.

Biales B, Dichter MA y Tischler A (1977). *Sodium and calcium action potential in pituitary cells*. Nature *267*, 172-174.

Bilodeau ML, Boulineau T, Hullinger RL y Andrisani OM (2000). *Cyclic AMP signaling functions as a bimodal switch in sympathoadrenal cell development in cultured primary neural crest cells*. Molecular and cellular biology *20*, 3004-3014.

Bilodeau ML, Ji M, Paris M y Andrisani OM (2005). *Adenosine signaling promotes neuronal, catecholaminergic differentiation of primary neural crest cells and CNS-derived CAD cells*. Molecular and cellular neurosciences *29*, 394-404.

Bittner MA, Habig WH y Holz RW (1989). *Isolated light chain of tetanus toxin inhibits exocytosis: studies in digitonin-permeabilized cells*. Journal of neurochemistry *53*, 966-968.

Blaschko H y Welch AD (1953). *Localization of adrenaline in cytoplasmic particles of the bovine adrenal medulla*. Naunyn-Schmiedebergs Archiv fur experimentelle Pathologie und Pharmakologie *219*, 17-22.

Borges R, Dominguez N, Estevez-Herrera J, Pereda D y Machado JD (2012). *Vesicular Ca(2+) mediates granule motion and exocytosis*. Cell calcium *51*, 338-341.

Borisovska M, Zhao Y, Tsytsyura Y, Glyvuk N, Takamori S, Matti U, Rettig J, Sudhof T y Bruns D (2005). *v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion*. The EMBO journal *24*, 2114-2126.

Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M y Scherbaum WA (1997). *Morphological and functional studies of the paracrine interaction between cortex and medulla in the adrenal gland*. Microscopy research and technique *36*, 520-533.

Bourinet E, Stotz SC, Spaetgens RL, Dayanithi G, Lemos J, Nargeot J y Zamponi GW (2001). *Interaction of SNX482 with domains III and IV inhibits activation gating of alpha(1E) (Ca(V)2.3) calcium channels*. Biophysical journal *81*, 79-88.

Brandt BL, Hagiwara S, Kidokoro Y y Miyazaki S (1976). *Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine*. The Journal of physiology *263*, 417-439.

Bruns D (2004). *Detection of transmitter release with carbon fiber electrodes*. Methods *33*, 312-321.

Caccin P, Rossetto O, Rigoni M, Johnson E, Schiavo G y Montecucco C (2003). *VAMP/synaptobrevin cleavage by tetanus and botulinum neurotoxins is strongly enhanced by acidic liposomes*. FEBS letters *542*, 132-136.

Cao H, Garcia F y McNiven MA (1998). *Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells*. Molecular biology of the cell *9*, 2595-2609.

Carbone E, Giancippoli A, Marcantoni A, Guido D y Carabelli V (2006). *A new role for T-type channels in fast "low-threshold" exocytosis*. Cell calcium *40*, 147-154.

Cardenas AM y Marengo FD (2010). *Rapid endocytosis and vesicle recycling in neuroendocrine cells*. Cellular and molecular neurobiology *30*, 1365-1370.

Cardenas AM y Marengo FD (2016). *How the stimulus defines the dynamics of vesicle pool recruitment, fusion mode, and vesicle recycling in neuroendocrine cells*. Journal of neurochemistry *137*, 867-879.

Caspersen C y Treiman M (1995). *Thapsigargin discriminates strongly between Ca(2+)-ATPase phosphorylated intermediates with different subcellular distributions in bovine adrenal chromaffin cells*. FEBS letters *377*, 31-36.

Catterall WA (1999). *Interactions of presynaptic Ca2+ channels and snare proteins in neurotransmitter release*. Annals of the New York Academy of Sciences *868*, 144-159.

Catterall WA (2000). *Structure and regulation of voltage-gated Ca2+ channels*. Annual review of cell and developmental biology *16*, 521-555.

Catterall WA, Goldin AL y Waxman SG (2005a). *International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels*.

Pharmacological reviews *57*, 397-409.

Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP y Striessnig J (2005b). *International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels*. Pharmacological reviews *57*, 411-425.

Cohen-Kutner M, Nachmanni D y Atlas D (2010). *CaV2.1 (P/Q channel) interaction with synaptic proteins is essential for depolarization-evoked release*. Channels *4*, 266-277.

Cook TA, Urrutia R y McNiven MA (1994). *Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously expressed in rat tissues*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *91*, 644-648.

Chad JE y Eckert R (1984). *Calcium domains associated with individual channels can account for anomalous voltage relations of CA-dependent responses*. Biophysical journal *45*, 993-999.

Chan SA, Chow R y Smith C (2003a). *Calcium dependence of action potential-induced endocytosis in chromaffin cells*. Pflugers Archiv : European journal of physiology *445*, 540-546.

Chan SA, Polo-Parada L, Landmesser LT y Smith C (2005a). *Adrenal chromaffin cells exhibit impaired granule trafficking in NCAM knockout mice*. Journal of neurophysiology *94*, 1037-1047.

Chan SA, Polo-Parada L y Smith C (2005b). *Action potential stimulation reveals an increased role for P/Q-calcium channel-dependent exocytosis in mouse adrenal tissue slices*. Archives of biochemistry and biophysics *435*, 65-73.

Chan SA y Smith C (2001). *Physiological stimuli evoke two forms of endocytosis in bovine chromaffin cells*. The Journal of physiology *537*, 871-885.

Chan SA y Smith C (2003b). *Low frequency stimulation of mouse adrenal slices reveals a clathrin-independent, protein kinase C-mediated endocytic mechanism*. The Journal of physiology *553*, 707-717.

Cho S, Li GL y von Gersdorff H (2011). *Recovery from short-term depression and facilitation is ultrafast and Ca2+ dependent at auditory hair cell synapses*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *31*, 5682-5692.

Chow RH, Klingauf J, Heinemann C, Zucker RS y Neher E (1996). *Mechanisms determining the time course of secretion in neuroendocrine cells*. Neuron *16*, 369-376.

Chow RH, von Ruden L y Neher E (1992). *Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells*. Nature *356*, 60-63.

Danino D, Moon KH y Hinshaw JE (2004). *Rapid constriction of lipid bilayers by the mechanochemical enzyme dynamin*. Journal of structural biology *147*, 259-267.

David C, McPherson PS, Mundigl O y de Camilli P (1996). *A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *93*, 331-335.

Davies JN y Zamponi GW (2008). *Old proteins, developing roles: The regulation of calcium channels by synaptic proteins*. Channels *2*, 130-138.

de Diego AM, Tapia L, Alvarez RM, Mosquera M, Cortes L, Lopez I, Gutierrez LM, Gandia L y Garcia AG (2008). *A low nicotine concentration augments vesicle motion and exocytosis triggered by K(+) depolarisation of chromaffin cells*. European journal of pharmacology *598*, 81-86.

Dean GE, Nelson PJ y Rudnick G (1986). *Characterization of native and reconstituted hydrogen ion pumping adenosinetriphosphatase of chromaffin granules*. Biochemistry *25*, 4918-4925.

Diaz-Flores L, Gutierrez R, Varela H, Valladares F, Alvarez-Arguelles H y Borges R (2008). *Histogenesis and morphofunctional characteristics of chromaffin cells*. Acta physiologica *192*, 145-163.

Dinkelacker V, Voets T, Neher E y Moser T (2000). *The readily releasable pool of vesicles in chromaffin cells is replenished in a temperature-dependent manner and transiently overfills at 37 degrees C*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *20*, 8377-8383.

Donald DE y Shepherd JT (1980). *Autonomic regulation of the peripheral circulation*. Annual review of physiology *42*, 429-439.

Doreian BW, Fulop TG y Smith CB (2008). *Myosin II activation and actin reorganization regulate the mode of quantal exocytosis in mouse adrenal chromaffin cells*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *28*, 4470-4478.

Douglas WW, Kanno T y Sampson SR (1967). *Influence of the ionic environment on the membrane potential of adrenal chromaffin cells and on the depolarizing effect of acetylcholine*. The Journal of physiology *191*, 107-121.

Duan K, Yu X, Zhang C y Zhou Z (2003). *Control of secretion by temporal patterns of action potentials in adrenal chromaffin cells*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *23*, 11235-11243.

Dutt S, Matasci M, Sommer L y Zimmermann DR (2006). *Guidance of neural crest cell migration: the inhibitory function of the chondroitin sulfate proteoglycan, versican*. TheScientificWorldJournal *6*, 1114-1117.

Elhamdani A, Azizi F y Artalejo CR (2006a). *Double patch clamp reveals that transient fusion (kiss-and-run) is a major mechanism of secretion in calf adrenal chromaffin cells: high calcium shifts the mechanism from kiss-and-run to complete fusion*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *26*, 3030-3036.

Elhamdani A, Azizi F, Solomaha E, Palfrey HC y Artalejo CR (2006b). *Two mechanistically distinct forms of endocytosis in adrenal chromaffin cells: Differential effects of SH3 domains and amphiphysin antagonism*. FEBS letters *580*, 3263-3269.

Engisch KL y Nowycky MC (1996). *Calcium dependence of large dense-cored vesicle exocytosis evoked by calcium influx in bovine adrenal chromaffin cells*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *16*, 1359-1369.

Engisch KL y Nowycky MC (1998). *Compensatory and excess retrieval: two types of endocytosis following single step depolarizations in bovine adrenal chromaffin cells*. The Journal of physiology *506 (Pt 3)*, 591-608.

Erickson JD, Schafer MK, Bonner TI, Eiden LE y Weihe E (1996). *Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *93*, 5166-5171.

Fabiato A (1983). *Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum*. The American journal of physiology *245*, C1-14.

Fasshauer D (2003). *Structural insights into the SNARE mechanism*. Biochimica et biophysica acta *1641*, 87-97.

Fenwick EM, Marty A y Neher E (1982). *A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine*. The Journal of physiology *331*, 577-597.

Ferguson SM y De Camilli P (2012). *Dynamin, a membrane-remodelling GTPase*. Nature reviews Molecular cell biology *13*, 75-88.

Fernando JC, Abdallah EA, Evinger M, Forray C y el-Fakahany EE (1991). *The presence of an M4 subtype muscarinic receptor in the bovine adrenal medulla revealed by mRNA and receptor binding analyses*. European journal of pharmacology *207*, 297-303.

Flucher BE y Franzini-Armstrong C (1996). *Formation of junctions involved in excitation-contraction coupling in skeletal and cardiac muscle*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *93*, 8101-8106.

Fox AP, Nowycky MC y Tsien RW (1987). *Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones*. The Journal of physiology *394*, 173-200.

Fulop T, Doreian B y Smith C (2008). *Dynamin I plays dual roles in the activity-dependent shift in exocytic mode in mouse adrenal chromaffin cells*. Archives of biochemistry and biophysics *477*, 146-154.

Fulop T, Radabaugh S y Smith C (2005). *Activity-dependent differential transmitter release in mouse adrenal chromaffin cells*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *25*, 7324-7332.

Fulop T y Smith C (2006). *Physiological stimulation regulates the exocytic mode through calcium activation of protein kinase C in mouse chromaffin cells*. The Biochemical journal *399*, 111-119.

Garcia-Sancho J (2014). *The coupling of plasma membrane calcium entry to calcium uptake by endoplasmic reticulum and mitochondria*. The Journal of physiology *592*, 261-268.

Garcia-Sancho J y Verkhratsky A (2008). *Cytoplasmic organelles determine complexity and specificity of calcium signalling in adrenal chromaffin cells*. Acta physiologica *192*, 263-271.

Garcia AG, Garcia-De-Diego AM, Gandia L, Borges R y Garcia-Sancho J (2006). *Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells*. Physiological reviews *86*, 1093-1131.

Gillis KD, Mossner R y Neher E (1996). *Protein kinase C enhances exocytosis from chromaffin cells by increasing the size of the readily releasable pool of secretory granules*. Neuron *16*, 1209-1220.

Gong LW, Di Paolo G, Diaz E, Cestra G, Diaz ME, Lindau M, De Camilli P y Toomre D (2005). *Phosphatidylinositol phosphate kinase type I gamma regulates dynamics of large dense-core vesicle fusion*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *102*, 5204-5209.

Gonzalez-Garcia C, Cena V, Keiser HR y Rojas E (1993). *Catecholamine secretion induced by tetraethylammonium from cultured bovine adrenal chromaffin cells*. Biochimica et biophysica acta *1177*, 99-105.

Gonzalez-Jamett AM, Baez-Matus X, Hevia MA, Guerra MJ, Olivares MJ, Martinez AD, Neely A y Cardenas AM (2010). *The association of dynamin with synaptophysin regulates quantal size and duration of exocytotic events in chromaffin cells*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *30*, 10683-10691.

Gormal RS, Nguyen TH, Martin S, Papadopulos A y Meunier FA (2015). *An acto-myosin II constricting ring initiates the fission of activity-dependent bulk endosomes in neurosecretory cells*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *35*, 1380-1389.

Grynkiewicz G, Poenie M y Tsien RY (1985). *A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties*. The Journal of biological chemistry *260*, 3440-3450.

Gunter KK y Gunter TE (1994). *Transport of calcium by mitochondria*. Journal of bioenergetics and biomembranes *26*, 471-485.

Gunter TE y Pfeiffer DR (1990). *Mechanisms by which mitochondria transport calcium*. The American journal of physiology *258*, C755-786.

Hadley RW y Lederer WJ (1991). *Properties of L-type calcium channel gating current in isolated guinea pig ventricular myocytes*. The Journal of general physiology *98*, 265-285.

Haller M, Heinemann C, Chow RH, Heidelberger R y Neher E (1998). *Comparison of secretory responses as measured by membrane capacitance and by amperometry*. Biophysical journal *74*, 2100-2113.

Han X, Wang CT, Bai J, Chapman ER y Jackson MB (2004). *Transmembrane segments of syntaxin line the fusion pore of Ca2+-triggered exocytosis*. Science *304*, 289-292.

Harkins AB, Cahill AL, Powers JF, Tischler AS y Fox AP (2004). *Deletion of the synaptic protein interaction site of the N-type (CaV2.2) calcium channel inhibits secretion in mouse pheochromocytoma cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *101*, 15219-15224.

Hayashi M, Raimondi A, O'Toole E, Paradise S, Collesi C, Cremona O, Ferguson SM y De Camilli P (2008). *Cell- and stimulus-dependent heterogeneity of synaptic vesicle endocytic recycling mechanisms revealed by studies of dynamin 1-null neurons*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *105*, 2175-2180.

He Z, Fan J, Kang L, Lu J, Xue Y, Xu P, Xu T y Chen L (2008). *Ca2+ triggers a novel clathrin-independent but actin-dependent fast endocytosis in pancreatic beta cells*. Traffic *9*, 910-923.

Heinemann C, Chow RH, Neher E y Zucker RS (1994). *Kinetics of the secretory response in bovine chromaffin cells following flash photolysis of caged Ca2+*. Biophysical journal *67*, 2546-2557.

Heinemann C, von Ruden L, Chow RH y Neher E (1993). *A two-step model of secretion control in neuroendocrine cells*. Pflugers Archiv : European journal of physiology *424*, 105-112.

Herrington J, Park YB, Babcock DF y Hille B (1996). *Dominant role of mitochondria in clearance of large Ca2+ loads from rat adrenal chromaffin cells*. Neuron *16*, 219-228.

Hille B (2001). Ion channels of excitable membranes.

Hinshaw JE (2000). *Dynamin and its role in membrane fission*. Annual review of cell and developmental biology *16*, 483-519.

Hirano T (1982). *Neural regulation of adrenal chromaffin cell function in the mouse--stress effect on the distribution of [3H]dopamine in denervated adrenal medulla*. Brain research *238*, 45-54.

Hochner B, Parnas H y Parnas I (1989). *Membrane depolarization evokes neurotransmitter release in the absence of calcium entry*. Nature *342*, 433-435.

Holman ME, Coleman HA, Tonta MA y Parkington HC (1994). *Synaptic transmission from splanchnic nerves to the adrenal medulla of guinea-pigs*. The Journal of physiology *478 (Pt 1)*, 115-124.

Holz RW, Bittner MA, Peppers SC, Senter RA y Eberhard DA (1989). *MgATP-independent and MgATP-dependent exocytosis. Evidence that MgATP primes adrenal chromaffin cells to undergo exocytosis*. The Journal of biological chemistry *264*, 5412-5419.

Holz RW, Bittner MA y Senter RA (1992). *Regulated exocytotic fusion I: Chromaffin cells and PC12 cells*. Methods in enzymology *219*, 165-178.

Horrigan FT y Bookman RJ (1994). *Releasable pools and the kinetics of exocytosis in adrenal chromaffin cells*. Neuron *13*, 1119-1129.

Hosoi N, Holt M y Sakaba T (2009). *Calcium dependence of exo- and endocytotic coupling at a glutamatergic synapse*. Neuron *63*, 216-229.

Huh YH, Yoo JA, Bahk SJ y Yoo SH (2005). *Distribution profile of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms in adrenal chromaffin cells*. FEBS letters *579*, 2597-2603.

Humeau Y, Doussau F, Grant NJ y Poulain B (2000). *How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release*. Biochimie *82*, 427-446.

Hutton JC (1989). *The insulin secretory granule*. Diabetologia *32*, 271-281.

Iijima T, Matsumoto G y Kidokoro Y (1992). *Synaptic activation of rat adrenal medulla examined with a large photodiode array in combination with a voltage-sensitive dye*. Neuroscience *51*, 211-219.

Ilouz N, Branski L, Parnis J, Parnas H y Linial M (1999). *Depolarization affects the binding properties of muscarinic acetylcholine receptors and their interaction with proteins of the exocytic apparatus*. The Journal of biological chemistry *274*, 29519-29528.

Inchauspe CG, Martini FJ, Forsythe ID y Uchitel OD (2004). *Functional compensation of P/Q by N-type channels blocks short-term plasticity at the calyx of Held presynaptic terminal*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *24*, 10379-10383.

Inoue M y Imanaga I (1993). *G protein-mediated inhibition of inwardly rectifying K+ channels in guinea pig chromaffin cells*. The American journal of physiology *265*, C946-956.

Inoue M, Sakamoto Y, Fujishiro N, Imanaga I, Ozaki S, Prestwich GD y Warashina A (2003). *Homogeneous Ca2+ stores in rat adrenal chromaffin cells*. Cell calcium *33*, 19-26.

Jahn R, Lang T y Sudhof TC (2003). *Membrane fusion*. Cell *112*, 519-533.

Jahn R y Sudhof TC (1999). *Membrane fusion and exocytosis*. Annual review of biochemistry

68, 863-911.

Jarvis SE y Zamponi GW (2005). *Masters or slaves? Vesicle release machinery and the regulation of presynaptic calcium channels*. Cell calcium *37*, 483-488.

Jarvis SE y Zamponi GW (2007). *Trafficking and regulation of neuronal voltage-gated calcium channels*. Current opinion in cell biology *19*, 474-482.

Kaplan JH y Ellis-Davies GC (1988). *Photolabile chelators for the rapid photorelease of divalent cations*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *85*, 6571-6575.

Keith RK, Poage RE, Yokoyama CT, Catterall WA y Meriney SD (2007). *Bidirectional modulation of transmitter release by calcium channel/syntaxin interactions in vivo*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *27*, 265-269.

Kerr LM y Yoshikami D (1984). *A venom peptide with a novel presynaptic blocking action*. Nature *308*, 282-284.

Kibble AV y Burgoyne RD (1996). *Calmodulin increases the initial rate of exocytosis in adrenal chromaffin cells*. Pflugers Archiv : European journal of physiology *431*, 464-466.

Kidokoro Y y Ritchie AK (1980). *Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla*. The Journal of physiology *307*, 199-216.

Knight DE, von Grafenstein H y Athayde CM (1989). *Calcium-dependent and calcium-independent exocytosis*. Trends in neurosciences *12*, 451-458.

Kong H, Jones PP, Koop A, Zhang L, Duff HJ y Chen SR (2008). *Caffeine induces Ca2+ release by reducing the threshold for luminal Ca2+ activation of the ryanodine receptor*. The Biochemical journal *414*, 441-452.

Koo SJ, Markovic S, Puchkov D, Mahrenholz CC, Beceren-Braun F, Maritzen T, Dernedde J, Volkmer R, Oschkinat H y Haucke V (2011). *SNARE motif-mediated sorting of synaptobrevin by the endocytic adaptors clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) and AP180 at synapses*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *108*, 13540-13545.

Koval LM, Yavorskaya EN y Lukyanetz EA (2001). *Electron microscopic evidence for multiple types of secretory vesicles in bovine chromaffin cells*. General and comparative endocrinology *121*, 261-277.

Lara B, Gandia L, Martinez-Sierra R, Torres A y Garcia AG (1998). *Q-type Ca2+ channels are located closer to secretory sites than L-type channels: functional evidence in chromaffin cells*. Pflugers Archiv : European journal of physiology *435*, 472-478.

Lara B, Zapater P, Montiel C, de la Fuente MT, Martinez-Sierra R, Ballesta JJ, Gandia L y Garcia AG (1995). *Density of apamin-sensitive Ca(2+)-dependent K+ channels in bovine chromaffin cells: relevance to secretion*. Biochemical pharmacology *49*, 1459-1468.

Lebeda FJ, Cer RZ, Mudunuri U, Stephens R, Singh BR y Adler M (2010). *The zinc-dependent protease activity of the botulinum neurotoxins*. Toxins *2*, 978-997.

Leitz J y Kavalali ET (2011). *Ca(2)(+) influx slows single synaptic vesicle endocytosis*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *31*, 16318-16326.

Lerner I, Trus M, Cohen R, Yizhar O, Nussinovitch I y Atlas D (2006). *Ion interaction at the pore of Lc-type Ca2+ channel is sufficient to mediate depolarization-induced exocytosis*. Journal of neurochemistry *97*, 116-127.

Lewis RV, Stern AS, Rossier J, Stein S y Udenfriend S (1979). *Putative enkephalin precursors in bovine adrenal medulla*. Biochemical and biophysical research communications *89*, 822-829.

Lindau M y Alvarez de Toledo G (2003). *The fusion pore*. Biochimica et biophysica acta *1641*, 167-173.

Linial M, Ilouz N y Parnas H (1997). *Voltage-dependent interaction between the muscarinic ACh receptor and proteins of the exocytic machinery*. The Journal of physiology *504 (Pt 2)*, 251-258.

Liu PS, Liu GH y Chao WL (2008). *Effects of nonylphenol on the calcium signal and*

catecholamine secretion coupled with nicotinic acetylcholine receptors in bovine adrenal chromaffin cells. Toxicology *244*, 77-85.

Livett BG (1984). *Adrenal medullary chromaffin cells in vitro*. Physiological reviews *64*, 1103-1161.

Lytton J, Westlin M y Hanley MR (1991). *Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps*. The Journal of biological chemistry *266*, 17067-17071.

Machado JD, Camacho M, Alvarez J y Borges R (2009). *On the role of intravesicular calcium in the motion and exocytosis of secretory organelles*. Communicative & integrative biology *2*, 71-73.

Marengo FD (2005). *Calcium gradients and exocytosis in bovine adrenal chromaffin cells*. Cell calcium *38*, 87-99.

Marengo FD y Monck JR (2000). *Development and dissipation of Ca(2+) gradients in adrenal chromaffin cells*. Biophysical journal *79*, 1800-1820.

Marengo FD y Monck JR (2003). *Spatial distribution of Ca(2+) signals during repetitive depolarizing stimuli in adrenal chromaffin cells*. Biophysical journal *85*, 3397-3417.

Marom M, Hagalili Y, Sebag A, Tzvier L y Atlas D (2010). *Conformational changes induced in voltage-gated calcium channel Cav1.2 by BayK 8644 or FPL64176 modify the kinetics of secretion independently of Ca2+ influx*. The Journal of biological chemistry *285*, 6996-7005.

Mathiasen D, Rossum LM, Robinson IM, Burgoyne RD, East JM, Moller M, Rasmussen HN y Treiman M (1993). *Isolation of chromaffin cell thapsigargin-sensitive Ca2+ store in light microsomes from bovine adrenal medulla*. The International journal of biochemistry *25*, 641-652.

Matthews EK (1967). *Membrane potential measurement in cells of the adrenal gland*. The Journal of physiology *189*, 139-148.

Maxfield FR y McGraw TE (2004). *Endocytic recycling*. Nature reviews Molecular cell biology *5*, 121-132.

Maximov A, Sudhof TC y Bezprozvanny I (1999). *Association of neuronal calcium channels with modular adaptor proteins*. The Journal of biological chemistry *274*, 24453-24456.

McDonough SI, Mintz IM y Bean BP (1997). *Alteration of P-type calcium channel gating by the spider toxin omega-Aga-IVA*. Biophysical journal *72*, 2117-2128.

McMahon HT y Boucrot E (2011). *Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis*. Nature reviews Molecular cell biology *12*, 517-533.

Meldolesi J y Pozzan T (1998). *The heterogeneity of ER Ca2+ stores has a key role in nonmuscle cell signaling and function*. The Journal of cell biology *142*, 1395-1398.

Micheletti M, Brioschi A, Fesce R y Grohovaz F (2005). *A novel pattern of fast calcium oscillations points to calcium and electrical activity cross-talk in rat chromaffin cells*. Cellular and molecular life sciences : CMLS *62*, 95-104.

Minta A, Kao JP y Tsien RY (1989). *Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores*. The Journal of biological chemistry *264*, 8171-8178.

Mintz IM, Venema VJ, Swiderek KM, Lee TD, Bean BP y Adams ME (1992). *P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA*. Nature *355*, 827-829.

Mochida S, Sheng ZH, Baker C, Kobayashi H y Catterall WA (1996). *Inhibition of neurotransmission by peptides containing the synaptic protein interaction site of N-type Ca2+ channels*. Neuron *17*, 781-788.

Mochida S, Yokoyama CT, Kim DK, Itoh K y Catterall WA (1998). *Evidence for a voltage-dependent enhancement of neurotransmitter release mediated via the synaptic protein interaction site of N-type Ca2+ channels*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *95*, 14523-14528.

Monck JR, Robinson IM, Escobar AL, Vergara JL y Fernandez JM (1994). *Pulsed laser imaging*

of rapid Ca2+ gradients in excitable cells. Biophysical journal *67*, 505-514.

Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibanez I, Albillos A, Garcia AG, Garcia-Sancho J y Alvarez J (2000). *Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca2+ transients that modulate secretion*. Nature cell biology *2*, 57-61.

Montero M, Brini M, Marsault R, Alvarez J, Sitia R, Pozzan T y Rizzuto R (1995). *Monitoring dynamic changes in free Ca2+ concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells*. The EMBO journal *14*, 5467-5475.

Moser T y Neher E (1997). *Rapid exocytosis in single chromaffin cells recorded from mouse adrenal slices*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *17*, 2314-2323.

Mosharov EV y Sulzer D (2005). *Analysis of exocytotic events recorded by amperometry*. Nature methods *2*, 651-658.

Moya-Diaz J, Alvarez YD, Montenegro M, Bayones L, Belingheri AV, Gonzalez-Jamett AM, Cardenas AM y Marengo FD (2016). *Sustained Exocytosis after Action Potential-Like Stimulation at Low Frequencies in Mouse Chromaffin Cells Depends on a Dynamin-Dependent Fast Endocytotic Process*. Frontiers in cellular neuroscience *10*, 184.

Muhlberg AB, Warnock DE y Schmid SL (1997). *Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase*. The EMBO journal *16*, 6676-6683.

Mustafa T, Walsh J, Grimaldi M y Eiden LE (2010). *PAC1hop receptor activation facilitates catecholamine secretion selectively through 2-APB-sensitive Ca(2+) channels in PC12 cells*. Cellular signalling *22*, 1420-1426.

Nagatsu T, Levitt M y Udenfriend S (1964). *Tyrosine Hydroxylase. The Initial Step in Norepinephrine Biosynthesis*. The Journal of biological chemistry *239*, 2910-2917.

Neely A y Lingle CJ (1992). *Two components of calcium-activated potassium current in rat adrenal chromaffin cells*. The Journal of physiology *453*, 97-131.

Neher BSE (1995). Single channel recording (USA).

Neher E (1998). *Vesicle pools and Ca2+ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release*. Neuron *20*, 389-399.

Neher E y Augustine GJ (1992). *Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells*. The Journal of physiology *450*, 273-301.

Neher E y Marty A (1982). *Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *79*, 6712-6716.

Neher E y Sakmann B (1976). *Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres*. Nature *260*, 799-802.

Neher E y Zucker RS (1993). *Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells*. Neuron *10*, 21-30.

Newcomb R, Szoke B, Palma A, Wang G, Chen X, Hopkins W, Cong R, Miller J, Urge L, Tarczy-Hornoch K, et al. (1998). *Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula Hysterocrates gigas*. Biochemistry *37*, 15353-15362.

Njus D y Radda GK (1978). *Bioenergetic processes in chromaffin granules a new perspective on some old problems*. Biochimica et biophysica acta *463*, 219-244.

Novara M, Baldelli P, Cavallari D, Carabelli V, Giancippoli A y Carbone E (2004). *Exposure to cAMP and beta-adrenergic stimulation recruits Ca(V)3 T-type channels in rat chromaffin cells through Epac cAMP-receptor proteins*. The Journal of physiology *558*, 433-449.

Olivera BM, Gray WR, Zeikus R, McIntosh JM, Varga J, Rivier J, de Santos V y Cruz LJ (1985). *Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails*. Science *230*, 1338-1343.

Olivos Ore L y Artalejo AR (2004). *Intracellular Ca2+ microdomain-triggered exocytosis in neuroendocrine cells*. Trends in neurosciences *27*, 113-115.

Orozco C, Garcia-de-Diego AM, Arias E, Hernandez-Guijo JM, Garcia AG, Villarroya M y Lopez MG (2006). *Depolarization preconditioning produces cytoprotection against veratridine-induced chromaffin cell death*. European journal of pharmacology *553*, 28-38.

Pan CY y Kao LS (1997). *Catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells: the role of the Na+/Ca2+ exchanger and the intracellular Ca2+ pool*. Journal of neurochemistry *69*, 1085-1092.

Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W y Lechleiter JD (2008). *Chemical calcium indicators*. Methods *46*, 143-151.

Park YB, Herrington J, Babcock DF y Hille B (1996). *Ca2+ clearance mechanisms in isolated rat adrenal chromaffin cells*. The Journal of physiology *492 (Pt 2)*, 329-346.

Parnas H, Dudel J y Parnas I (1986). *Neurotransmitter release and its facilitation in crayfish. VII. Another voltage dependent process beside Ca entry controls the time course of phasic release*. Pflugers Archiv : European journal of physiology *406*, 121-130.

Parnas H y Parnas I (1987). *Influence of depolarizing pulse duration on the time course of transmitter release in lobster*. The Journal of physiology *388*, 487-494.

Parnas I y Parnas H (2010). *Control of neurotransmitter release: From Ca2+ to voltage dependent G-protein coupled receptors*. Pflugers Archiv : European journal of physiology *460*, 975-990.

Perez Bay AE, Belingheri AV, Alvarez YD y Marengo FD (2012). *Membrane cycling after the excess retrieval mode of rapid endocytosis in mouse chromaffin cells*. Acta physiologica *204*, 403-418.

Perez Bay AE, Ibanez LI y Marengo FD (2007). *Rapid recovery of releasable vesicles and formation of nonreleasable endosomes follow intense exocytosis in chromaffin cells*. American journal of physiology Cell physiology *293*, C1509-1522.

Perin MS, Fried VA, Mignery GA, Jahn R y Sudhof TC (1990). *Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C*. Nature *345*, 260-263.

Perissinotti PP, Giugovaz Tropper B y Uchitel OD (2008). *L-type calcium channels are involved in fast endocytosis at the mouse neuromuscular junction*. The European journal of neuroscience *27*, 1333-1344.

Pevsner J, Hsu SC y Scheller RH (1994). *n-Sec1: a neural-specific syntaxin-binding protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *91*, 1445-1449.

Phillips JH, Burridge K, Wilson SP y Kirshner N (1983). *Visualization of the exocytosis/endocytosis secretory cycle in cultured adrenal chromaffin cells*. The Journal of cell biology *97*, 1906-1917.

Pinheiro PS, de Wit H, Walter AM, Groffen AJ, Verhage M y Sorensen JB (2013). *Doc2b synchronizes secretion from chromaffin cells by stimulating fast and inhibiting sustained release*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *33*, 16459-16470.

Poulsen JC, Caspersen C, Mathiasen D, East JM, Tunwell RE, Lai FA, Maeda N, Mikoshiba K y Treiman M (1995). *Thapsigargin-sensitive Ca(2+)-ATPases account for Ca2+ uptake to inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive and caffeine-sensitive Ca2+ stores in adrenal chromaffin cells*. The Biochemical journal *307 (Pt 3)*, 749-758.

Pozzan T, Gatti G, Dozio N, Vicentini LM y Meldolesi J (1984). *Ca2+-dependent and -independent release of neurotransmitters from PC12 cells: a role for protein kinase C activation?* The Journal of cell biology *99*, 628-638.

Preta G, Cronin JG y Sheldon IM (2015). *Dynasore - not just a dynamin inhibitor*. Cell communication and signaling : CCS *13*, 24.

Purves D (2004). Neuroscience (USA).

Pusch M y Neher E (1988). *Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring*

patch pipette. Pflugers Archiv : European journal of physiology *411*, 204-211.

Ramachandran R, Surka M, Chappie JS, Fowler DM, Foss TR, Song BD y Schmid SL (2007). *The dynamin middle domain is critical for tetramerization and higher-order self-assembly*. The EMBO journal *26*, 559-566.

Rettig J y Neher E (2002). *Emerging roles of presynaptic proteins in Ca++-triggered exocytosis*. Science *298*, 781-785.

Rettig J, Sheng ZH, Kim DK, Hodson CD, Snutch TP y Catterall WA (1996). *Isoform-specific interaction of the alpha1A subunits of brain Ca2+ channels with the presynaptic proteins syntaxin and SNAP-25*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *93*, 7363-7368.

Richards DA, Bai J y Chapman ER (2005). *Two modes of exocytosis at hippocampal synapses revealed by rate of FM1-43 efflux from individual vesicles*. The Journal of cell biology *168*, 929-939.

Rigual R, Montero M, Rico AJ, Prieto-Lloret J, Alonso MT y Alvarez J (2002). *Modulation of secretion by the endoplasmic reticulum in mouse chromaffin cells*. The European journal of neuroscience *16*, 1690-1696.

Rizo J y Sudhof TC (2002). *Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion*. Nature reviews Neuroscience *3*, 641-653.

Robinson IM, Finnegan JM, Monck JR, Wightman RM y Fernandez JM (1995). *Colocalization of calcium entry and exocytotic release sites in adrenal chromaffin cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *92*, 2474-2478.

Robitaille R, Adler EM y Charlton MP (1990). *Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses*. Neuron *5*, 773-779.

Rosa JM, de Diego AM, Gandia L y Garcia AG (2007). *L-type calcium channels are preferentially coupled to endocytosis in bovine chromaffin cells*. Biochemical and biophysical research communications *357*, 834-839.

Rosa JM, Torregrosa-Hetland CJ, Colmena I, Gutierrez LM, Garcia AG y Gandia L (2011). *Calcium entry through slow-inactivating L-type calcium channels preferentially triggers endocytosis rather than exocytosis in bovine chromaffin cells*. American journal of physiology Cell physiology *301*, C86-98.

Royle SJ y Lagnado L (2003). *Endocytosis at the synaptic terminal*. The Journal of physiology *553*, 345-355.

Royle SJ y Lagnado L (2010). *Clathrin-mediated endocytosis at the synaptic terminal: bridging the gap between physiology and molecules*. Traffic *11*, 1489-1497.

Sala F, Nistri A y Criado M (2008). *Nicotinic acetylcholine receptors of adrenal chromaffin cells*. Acta physiologica *192*, 203-212.

Santodomingo J, Vay L, Camacho M, Hernandez-Sanmiguel E, Fonteriz RI, Lobaton CD, Montero M, Moreno A y Alvarez J (2008). *Calcium dynamics in bovine adrenal medulla chromaffin cell secretory granules*. The European journal of neuroscience *28*, 1265-1274.

Sara Y, Mozhayeva MG, Liu X y Kavalali ET (2002). *Fast vesicle recycling supports neurotransmission during sustained stimulation at hippocampal synapses*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *22*, 1608-1617.

Scaife R y Margolis RL (1990). *Biochemical and immunochemical analysis of rat brain dynamin interaction with microtubules and organelles in vivo and in vitro*. The Journal of cell biology *111*, 3023-3033.

Segura J, Gil A y Soria B (2000). *Modeling study of exocytosis in neuroendocrine cells: influence of the geometrical parameters*. Biophysical journal *79*, 1771-1786.

Sever S, Muhlberg AB y Schmid SL (1999). *Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis*. Nature *398*, 481-486.

Sheng ZH, Westenbroek RE y Catterall WA (1998). *Physical link and functional coupling of*

presynaptic calcium channels and the synaptic vesicle docking/fusion machinery. Journal of bioenergetics and biomembranes *30*, 335-345.

Shupliakov O, Low P, Grabs D, Gad H, Chen H, David C, Takei K, De Camilli P y Brodin L (1997). *Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions*. Science *276*, 259-263.

Simon SM y Llinas RR (1985). *Compartmentalization of the submembrane calcium activity during calcium influx and its significance in transmitter release*. Biophysical journal *48*, 485-498.

Slepnev VI y De Camilli P (2000). *Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis*. Nature reviews Neuroscience *1*, 161-172.

Smirnova E, Shurland DL, Newman-Smith ED, Pishvaee B y van der Bliek AM (1999). *A model for dynamin self-assembly based on binding between three different protein domains*. The Journal of biological chemistry *274*, 14942-14947.

Smith C, Moser T, Xu T y Neher E (1998). *Cytosolic Ca2+ acts by two separate pathways to modulate the supply of release-competent vesicles in chromaffin cells*. Neuron *20*, 1243-1253.

Smith C y Neher E (1997). *Multiple forms of endocytosis in bovine adrenal chromaffin cells*. The Journal of cell biology *139*, 885-894.

Smith JS, Imagawa T, Ma J, Fill M, Campbell KP y Coronado R (1988). *Purified ryanodine receptor from rabbit skeletal muscle is the calcium-release channel of sarcoplasmic reticulum*. The Journal of general physiology *92*, 1-26.

Smith SM, Renden R y von Gersdorff H (2008). *Synaptic vesicle endocytosis: fast and slow modes of membrane retrieval*. Trends in neurosciences *31*, 559-568.

Solaro CR, Prakriya M, Ding JP y Lingle CJ (1995). *Inactivating and noninactivating Ca(2+)- and voltage-dependent K+ current in rat adrenal chromaffin cells*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *15*, 6110-6123.

Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P y Rothman JE (1993). *SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion*. Nature *362*, 318-324.

Sorensen JB (2004). *Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles*. Pflugers Archiv : European journal of physiology *448*, 347-362.

Sorensen JB, Nagy G, Varoqueaux F, Nehring RB, Brose N, Wilson MC y Neher E (2003). *Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23*. Cell *114*, 75-86.

Sorensen JB, Wiederhold K, Muller EM, Milosevic I, Nagy G, de Groot BL, Grubmuller H y Fasshauer D (2006). *Sequential N- to C-terminal SNARE complex assembly drives priming and fusion of secretory vesicles*. The EMBO journal *25*, 955-966.

Spruce AE, Breckenridge LJ, Lee AK y Almers W (1990). *Properties of the fusion pore that forms during exocytosis of a mast cell secretory vesicle*. Neuron *4*, 643-654.

Stettler H, Beuret N, Prescianotto-Baschong C, Fayard B, Taupenot L y Spiess M (2009). *Determinants for chromogranin A sorting into the regulated secretory pathway are also sufficient to generate granule-like structures in non-endocrine cells*. The Biochemical journal *418*, 81-91.

Stevens CF y Williams JH (2000). *"Kiss and run" exocytosis at hippocampal synapses*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *97*, 12828-12833.

Steyer JA y Almers W (2001). *A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane*. Nature reviews Molecular cell biology *2*, 268-275.

Sudhof TC (2004). *The synaptic vesicle cycle*. Annual review of neuroscience *27*, 509-547.

Sugita S (2008). *Mechanisms of exocytosis*. Acta physiologica *192*, 185-193.

Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R y Brunger AT (1998). *Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 A resolution*. Nature *395*, 347-353.

Takei K, McPherson PS, Schmid SL y De Camilli P (1995). *Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals*. Nature *374*, 186-190.

Takei K, Yoshida Y y Yamada H (2005). *Regulatory mechanisms of dynamin-dependent endocytosis*. Journal of biochemistry *137*, 243-247.

Tanner VA, Ploug T y Tao-Cheng JH (1996). *Subcellular localization of SV2 and other secretory vesicle components in PC12 cells by an efficient method of preembedding EM immunocytochemistry for cell cultures*. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society *44*, 1481-1488.

Tischler AS (2002). *Chromaffin cells as models of endocrine cells and neurons*. Annals of the New York Academy of Sciences *971*, 366-370.

Trifaro JM y Lee RW (1980). *Morphological characteristics and stimulus-secretion coupling in bovine adcrenal chromaffin cell cultures*. Neuroscience *5*, 1533-1546.

Trus M, Corkey RF, Nesher R, Richard AM, Deeney JT, Corkey BE y Atlas D (2007). *The L-type voltage-gated Ca2+ channel is the Ca2+ sensor protein of stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells*. Biochemistry *46*, 14461-14467.

Tsai CC, Lin CL, Wang TL, Chou AC, Chou MY, Lee CH, Peng IW, Liao JH, Chen YT y Pan CY (2009). *Dynasore inhibits rapid endocytosis in bovine chromaffin cells*. American journal of physiology Cell physiology *297*, C397-406.

Tsien RW, Ellinor PT y Horne WA (1991). *Molecular diversity of voltage-dependent Ca2+ channels*. Trends in pharmacological sciences *12*, 349-354.

Unsicker K, Krisch B, Otten U y Thoenen H (1978). *Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells: impairment by glucocorticoids*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *75*, 3498-3502.

van der Bliek AM y Meyerowitz EM (1991). *Dynamin-like protein encoded by the Drosophila shibire gene associated with vesicular traffic*. Nature *351*, 411-414.

Villalobos C, Nunez L, Montero M, Garcia AG, Alonso MT, Chamero P, Alvarez J y Garcia-Sancho J (2002). *Redistribution of Ca2+ among cytosol and organella during stimulation of bovine chromaffin cells*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *16*, 343-353.

Vitale ML, Seward EP y Trifaro JM (1995). *Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis*. Neuron *14*, 353-363.

Viveros OH, Diliberto EJ, Jr., Hazum E y Chang KJ (1979). *Opiate-like materials in the adrenal medulla: evidence for storage and secretion with catecholamines*. Molecular pharmacology *16*, 1101-1108.

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, Moser T, Lund PE, Chow RH, Geppert M, Sudhof TC y Neher E (2001a). *Intracellular calcium dependence of large dense-core vesicle exocytosis in the absence of synaptotagmin I*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, 11680-11685.

Voets T, Neher E y Moser T (1999). *Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices*. Neuron *23*, 607-615.

Voets T, Toonen RF, Brian EC, de Wit H, Moser T, Rettig J, Sudhof TC, Neher E y Verhage M (2001b). *Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking*. Neuron *31*, 581-591.

von Gersdorff H y Matthews G (1994). *Dynamics of synaptic vesicle fusion and membrane retrieval in synaptic terminals*. Nature *367*, 735-739.

von Gersdorff H y Matthews G (1997). *Depletion and replenishment of vesicle pools at a ribbon-type synaptic terminal*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *17*, 1919-1927.

Wallace DJ, Chen C y Marley PD (2002). *Histamine promotes excitability in bovine adrenal chromaffin cells by inhibiting an M-current*. The Journal of physiology *540*, 921-939.

Warnock DE, Baba T y Schmid SL (1997). *Ubiquitously expressed dynamin-II has a higher intrinsic GTPase activity and a greater propensity for self-assembly than neuronal dynamin-I*. Molecular biology of the cell *8*, 2553-2562.

Warnock DE y Schmid SL (1996). *Dynamin GTPase, a force-generating molecular switch*. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology *18*, 885-893.

Weston JA (1970). *The migration and differentiation of neural crest cells*. Advances in morphogenesis *8*, 41-114.

Wightman RM, Jankowski JA, Kennedy RT, Kawagoe KT, Schroeder TJ, Leszczyszyn DJ, Near JA, Diliberto EJ, Jr. y Viveros OH (1991). *Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *88*, 10754-10758.

Winkler H y Westhead E (1980). *The molecular organization of adrenal chromaffin granules*. Neuroscience *5*, 1803-1823.

Wollheim CB, Ullrich S, Meda P y Vallar L (1987). *Regulation of exocytosis in electrically permeabilized insulin-secreting cells. Evidence for Ca2+ dependent and independent secretion*. Bioscience reports *7*, 443-454.

Wu LG, Hamid E, Shin W y Chiang HC (2014a). *Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms*. Annual review of physiology *76*, 301-331.

Wu XS y Wu LG (2014b). *The yin and yang of calcium effects on synaptic vesicle endocytosis*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *34*, 2652-2659.

Xu T, Binz T, Niemann H y Neher E (1998). *Multiple kinetic components of exocytosis distinguished by neurotoxin sensitivity*. Nature neuroscience *1*, 192-200.

Yamada H, Abe T, Li SA, Masuoka Y, Isoda M, Watanabe M, Nasu Y, Kumon H, Asai A y Takei K (2009). *Dynasore, a dynamin inhibitor, suppresses lamellipodia formation and cancer cell invasion by destabilizing actin filaments*. Biochemical and biophysical research communications *390*, 1142-1148.

Zamponi GW (2003). *Regulation of presynaptic calcium channels by synaptic proteins*. Journal of pharmacological sciences *92*, 79-83.

Zhang C, Xiong W, Zheng H, Wang L, Lu B y Zhou Z (2004). *Calcium- and dynamin-independent endocytosis in dorsal root ganglion neurons*. Neuron *42*, 225-236.

Zhang C y Zhou Z (2002). *Ca(2+)-independent but voltage-dependent secretion in mammalian dorsal root ganglion neurons*. Nature neuroscience *5*, 425-430.

Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW y Tsien RW (1994). *Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels*. Nature *372*, 97-100.

Zhang L, Zhou L, Vega-Gonzalez A, Mendoza D y Drucker-Colin R (1997). *Extremely low frequency magnetic fields promote neurite varicosity formation and cell excitability in cultured rat chromaffin cells*. Comparative biochemistry and physiology Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology *118*, 295-299.

Zheng H, Fan J, Xiong W, Zhang C, Wang XB, Liu T, Liu HJ, Sun L, Wang YS, Zheng LH, et al. (2009). *Action potential modulates Ca2+-dependent and Ca2+-independent secretion in a sensory neuron*. Biophysical journal *96*, 2449-2456.

Zhou Z y Misler S (1995). *Amperometric detection of stimulus-induced quantal release of catecholamines from cultured superior cervical ganglion neurons*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *92*, 6938-6942.

Zhou Z, Misler S y Chow RH (1996). *Rapid fluctuations in transmitter release from single vesicles in bovine adrenal chromaffin cells*. Biophysical journal *70*, 1543-1552.

10. ANEXO