



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

***Modulación de los procesos de
recuperación de pools vesiculares
altamente acoplados en células cromafines
de ratón***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área Ciencias Biológicas

Mauricio Norman Montenegro

Director de Tesis: Dr. Fernando Diego Marengo

Consejero de Estudios: Dr. Francisco Urbano

Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias IFIBYNE
(UBA-CONICET), Departamento de Fisiología, Biología Molecular y
Celular.

Buenos Aires, mayo 19 de 2020

Resumen

El *pool* de vesículas inmediatamente liberables (*IRP*) es un *pool* vesicular que se libera frente a pulsos despolarizantes de corta duración debido a su proximidad a los canales de Ca^{2+} . En esta tesis estudiamos los mecanismos asociados a la recuperación del *IRP* luego de que este es deprimido por exocitosis en células cromafines adrenales. Nuestros resultados muestran que la recuperación del *IRP* presenta dos componentes cinéticos, con constantes temporales de ~ 1 s y ~ 10 s respectivamente. Mientras que el aumento del Ca^{2+} citosólico basal hace desaparecer el componente rápido y acelera al lento, la disminución del Ca^{2+} basal (por agregado de concentraciones crecientes de *BAPTA*) genera el efecto inverso, acelerando el componente rápido y anulando al lento. La presencia y velocidad del componente rápido a su vez se correlacionó con un proceso de endocitosis rápida, tanto cuando se modificó el Ca^{2+} citosólico basal, como cuando se afectó directamente la endocitosis con un anticuerpo anti-dinamina. Dado que observamos que la disminución en la concentración del Ca^{2+} citosólico basal se asociaba a un aumento de la densidad de la actina-F cortical, postulamos que dicha proteína podría estar involucrada en los cambios observados en la endocitosis y la recuperación de *IRP* con el Ca^{2+} . El pretratamiento de nuestras células con el despolimerizante de actina *citochalasin-D* logró revertir los aumentos observados en las velocidades de endocitosis y recuperación alcanzadas a alta concentración (4 mM) de *BAPTA*. A partir de los resultados descriptos arriba postulamos que a bajas concentraciones basales de Ca^{2+} la actina-F cortical se encuentra altamente agregada, favoreciendo la endocitosis rápida, que sería la primera etapa de un proceso rápido de recuperación de *IRP*. Esto es coherente con las observaciones de otros autores (ver Introducción) respecto a que los niveles bajos de Ca^{2+} citosólico y la actina-F cortical promueven un proceso de *kiss-and-run*. Dichos resultados apoyan la idea de que la remodelación de la actina-F cortical en forma Ca^{2+} dependiente es un elemento importante en la regulación de las características del ciclado de vesículas densas secretorias.

Palabras claves: *IRP*, calcio citosólico, endocitosis, actina-F cortical.

Modulation of the highly-coupled vesicular pools replenishment in mouse chromaffin cells

Abstract

The immediately releasable pool (IRP) is composed of ready releasable vesicles sensitive to short depolarizations because of their proximity to voltage-dependent calcium channels. In this thesis we studied the mechanisms involved in IRP recovery after depletion in adrenal chromaffin cells. Our results showed that IRP recovery presents two kinetic components, with time constants of ~ 1 s and ~ 10 s respectively. While high cytosolic Ca^{2+} concentrations abolished the rapid component and accelerated the slower one, low Ca^{2+} (attained by addition of increasing concentrations of intracellular BAPTA) provoked the opposite effect, inhibiting the slow component and accelerating the rapid one. There was also a positive correlation between the rapid component of recovery with a fast endocytosis process. This correlation was observed when the cytosolic Ca^{2+} was modified or when endocytosis was inhibited with an anti-dynamin antibody. Finally, we found that the decrease in cytosolic Ca^{2+} concentration is associated with cortical F-actin aggregation, and postulated that this effect can explain in part the changes observed in endocytosis and IRP recovery. In fact, the effects produced by high cytosolic (4 mM) BAPTA concentration on endocytosis and IRP recovery kinetics were reverted by application of cytochalasin-D, an actin-F depolymerizing drug. We propose that the elevated aggregation of cortical F-actin at low basal cytosolic Ca^{2+} concentrations facilitates fast endocytosis, which would be the first stage of a rapid mechanism of IRP recovery. These results support the idea that the remodeling of cortical F-actin in a Ca^{2+} dependent manner would be an important element in the regulation of the dynamics of dense secretory vesicles cycling.

Key words: IRP, cytosolic calcium, endocytosis, cortical F-actin.

Agradecimientos

Le agradezco especialmente a mi director, Dr. Fernando Marengo, de haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis doctoral en su laboratorio, brindándome su apoyo, dedicación y compromiso con mi formación durante todo este tiempo.

Para la realización de este trabajo fue fundamental la colaboración de:

- El grupo del Dr. Osvaldo Uchitel y particularmente de la Dra. Carlota Inchauspe.
- Cecilia Borassi, José Moya-Díaz, Lucas Bayonés, Martín Toscani y Luciana Gallo.

Agradezco a todas las personas que hacen mi vida feliz:

- A mis compañeros y amigos del grupo: Verónica, que me enseñó con mucha paciencia y dedicación a trabajar en el laboratorio; José, Lucas y Samuel que son personas incondicionales con las que puedo contar siempre.
- A mis amigos del Instituto: Sofía, Natalia, Matías, Celeste, Paula, Noelia, Lucía, Willy, Graciela y Nicolás.
- A mis compañeros docentes: Elena, Oscar, Sergio, Betina, Araceli, Daniel, Martín, Exequiel y Mauro que me tuvieron mucha paciencia todos estos años.
- A Cecilia y a mi familia que son las personas más importantes en mi vida.

Le dedico la tesis a mi amor Cecilia y a mis sobrinos Aquiles, Sofía, Simón y Paloma.

Abreviaturas

Aga: omega-agatoxina IVA.

AMPC: adenosín monofosfato-3',5' cíclico.

Anti-Dyn: anticuerpo monoclonal anti-dinamina.

BAPTA: 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid).

CCDV: canales de calcio dependientes de voltaje.

C_m : capacitancia de membrana celular.

ΔC_m : cambios sincrónicos de capacitancia de membrana celular.

EGTA: ethylene glycol tetraacetic acid.

ETAP: exocytosis triggered by an action potential.

HVA: high voltage activated.

$I_{Ca^{2+}}$: corriente de Ca^{2+} .

IRP: immediately releasable pool.

LVA: low voltage activated.

PA: potencial de acción.

PAs: potenciales de acción.

PA_{sim} : potencial de acción simulado.

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.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Médula Adrenal y Células Cromafines	1
1.1.1 Generalidades	1
1.1.2 Potencial de acción y exocitosis calcio dependiente	3
1.1.3 Las catecolaminas están empaquetadas en vesículas	5
1.1.4 La médula adrenal y la respuesta al estrés	7
1.1.5 Ventajas como modelo neurobiológico.....	10
1.2 Mecanismos de señalización de calcio	14
1.2.1 Fuentes de calcio	14
1.2.2 Sistemas de remoción y regulación del calcio citosólico	20
1.2.3 Características espaciales y temporales de las señales de calcio	22
1.3 Exocitosis en células cromafines.....	24
1.4 La cinética de la respuesta secretoria y su asociación con los grupos de vesículas	29
1.5 Acople entre los canales de calcio y las vesículas secretorias.....	32
1.6 Pool vesicular inmediatamente liberable	34
1.6.1 Definición y cuantificación	34
1.6.2 El acople de IRP con los canales de calcio tipo P/Q es dependiente de synprint.....	37
1.7 Endocitosis	39
1.7.1 Endocitosis dependiente de clatrina	39
1.7.2 Kiss and run	41
1.7.3 Endocitosis Ultra-Rápida	41
1.7.4 Endocitosis de tipo bulk.....	42
1.7.5 Dinamina y endocitosis.....	43

1.7.6 Dependencia de la endocitosis con el calcio	46
1.8 Reciclado y recuperación de las vesículas secretorias	47
1.8.1 Cinética de recuperación de IRP	48
1.8.2 Exocitosis asociada a un potencial de acción en células cromafines	51
1.8.3 Recuperación rápida de ETAP	54
1.9 - Rol de la actina cortical en células neuroendócrinas	54
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
2.1 Hipótesis.....	57
2.2. Objetivos	60
3. MATERIALES Y MÉTODOS	61
3.1 Cultivo de células cromafines.....	61
3.1.1 Soluciones de cultivo.....	61
3.1.2 Procedimiento para el cultivo	61
3.2 Técnicas electrofisiológicas.....	63
3.2.1 Generalidades	63
3.2.2 Circuito equivalente de la célula y medición de capacitancia celular	65
3.2.3 Dispositivo de patch clamp.....	69
3.2.4 Preparación de micropipetas.....	70
3.2.5 Soluciones para experimentos electrofisiológicos	70
3.2.6 Protocolos de estimulación utilizados.....	72
3.3 Técnica de <i>imaging</i> : medición del calcio citosólico libre.....	78
3.3.1 Características generales de los indicadores ratiométricos.....	78
3.3.2 Dispositivo experimental.....	79
3.3.3 Soluciones utilizadas.....	79
3.3.4 Protocolo utilizado	80

3.4 Técnica de <i>imaging</i> : cuantificación del grado de polimerización de la actina	81
3.4.1 Características generales de los indicadores	81
3.4.2 Protocolo para fijar y marcar las células.....	81
3.4.3 Microscopía Confocal.....	82
3.4.4 Evaluación de la densidad de actina-f en células permeabilizadas.....	82
3.4.5 Despolimerización de la actina con cytochalasin D.....	83
3.5 Análisis de datos y estadística	84
3.5.1 Procesamiento de los experimentos electrofisiológicos	84
3.5.2 Procesamiento de los experimentos de <i>imaging</i> de calcio.....	84
3.5.3 Análisis de la distribución de actina-f en células permeabilizadas y tratadas con concentraciones variables de calcio	85
3.5.4 Análisis de la distribución de actina-f en células tratadas con cytochalasin D.....	86
3.5.5 Estadística.....	86
3.6 Reactivos.....	87
4. RESULTADOS	88
4.1 Características de IRP	88
4.1.1 Estimación de IRP.....	88
4.1.2 Endocitosis acoplada a la exocitosis de IRP	90
4.1.3 Recuperación de IRP	91
4.2 Efectos de la concentración del calcio citosólico sobre la recuperación de IRP	93
4.2.1 Efectos del aumento de la concentración basal del calcio citosólico sobre IRP.....	94
4.2.2 Efectos del aumento de la capacidad buffer citosólica de calcio sobre la endocitosis y la recuperación de IRP	99

4.3 La recuperación rápida de <i>IRP</i> está ligada a una endocitosis rápida dependiente de dinamina	110
4.4 Efecto del calcio citosólico en la polimerización de la actina cortical	115
4.4.1 <i>Medición del calcio libre citosólico basal</i>	116
4.4.2 <i>El aumento del calcio citosólico libre provoca la depolimerización de la actina cortical</i>	118
4.5 Efecto de la despolimerización de la actina-F sobre la endocitosis y recuperación de <i>IRP</i>	121
4.5.1 <i>Efecto de cytochalasin D en la distribución de la actina-F</i>	122
4.5.2 <i>Despolimerización de la actina-F cortical afecta la endocitosis y la recuperación de IRP</i>	124
4.5.3 <i>Efecto de la despolimerización de la actina-F sobre la endocitosis y recuperación asociadas a ETAP</i>	128
5. DISCUSIÓN	134
5.1 Características de <i>IRP</i>	136
5.1.1 <i>Estimación de IRP</i>	136
5.1.2 <i>Endocitosis rápida asociada a la exocitosis de IRP</i>	137
5.1.3 <i>La cinética de recuperación de IRP depende de un proceso bifásico</i> ...	138
5.2 La endocitosis y la recuperación de <i>IRP</i> dependen de la concentración de calcio citosólico	139
5.2.1 <i>La endocitosis rápida se inhibe con el aumento de calcio citosólico</i>	141
5.2.2 <i>Efecto del aumento de calcio citosólico en la recuperación de IRP</i>	144
5.2.3 <i>La endocitosis rápida se potencia a concentración baja de calcio citosólico</i>	145
5.2.4 <i>La recuperación de IRP se potencia a concentración baja de calcio citosólico</i>	147
5.3 <i>La actina-F cortical favorece la endocitosis rápida y la recuperación de IRP</i>	149

5.4 Posibles relevancias fisiológicas de los mecanismos discutidos en esta tesis.....	154
6. BIBLIOGRAFÍA	156

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Médula Adrenal y Células Cromafines

1.1.1 Generalidades

Las glándulas suprarrenales son dos pequeños órganos aplanados situados sobre los polos superiores de los riñones. Las mismas están cubiertas por la fascia renal y separadas de los riñones por tejido fibroso. Además se encuentran rodeadas por tejido conjuntivo y grasa. Cada glándula está constituida por una zona cortical rica en lípidos (la corteza) y una médula interna. Dichas regiones, a pesar de su asociación topográfica, son distintas desde el punto de vista ontogénico, estructural y funcional. La corteza presenta tres zonas celulares: glomerular, fasciculada y reticular, que sintetizan mineralocorticoides, glucocorticoides y hormonas sexuales respectivamente entre otras sustancias (figura 1.1). La médula por su parte está conformada principalmente por grupos de células cromafines separadas por amplios sinusoides venosos (Gray y col., 1998) y dispuestas en cordones que favorecen la relación con los capilares, en donde liberan sus productos de secreción (Díaz-Flores y col., 2008). Estas células sintetizan y secretan fundamentalmente catecolaminas al sistema circulatorio: adrenalina (en mayor

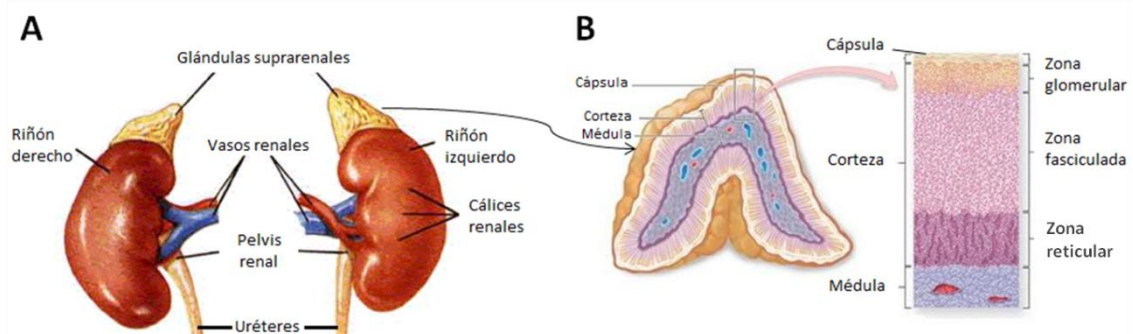


Figura 1.1 - (A) La representación muestra la localización de la glándula suprarrenal y sus relaciones anatómicas con el riñón. **(B)** El corte longitudinal en la glándula permite diferenciar los dos órganos secretorios; la corteza o córtex (por fuera) y la médula (en la zona interna), también puede observarse en el detalle la disposición de los tejidos que la constituyen.

medida) y su precursor noradrenalina. Además secretan varios péptidos activos como el neuropéptido Y, el activador tisular del plasminógeno, cromograninas, secretograninas y encefalinas (Gray y col., 1998).

La médula suprarrenal comparte su origen embriológico con el sistema simpático, ya que ambos provienen del neuroectodermo (Weston y col., 1970; Aloe y Levi-Montalcini, 1979; Tischler y col., 2002). Algunos de los progenitores neuronales que provienen de la cresta neural originan el sistema simpático, mientras que otros migran e invaden la corteza suprarrenal dando lugar a la médula (Le Douarin y col., 2008). Más tarde, como consecuencia de la actividad de diversos factores de crecimiento que estimulan la vía del adenosín monofosfato-3',5' cíclico (AMPc) (Barald y col., 1982; Dutt y col., 2006), las células se diferencian y se induce la síntesis de catecolaminas (Bilodeau y col., 2000; Bilodeau y col., 2005). Adicionalmente, al igual que en un ganglio simpático, las células cromafines son inervadas y estimuladas por terminales

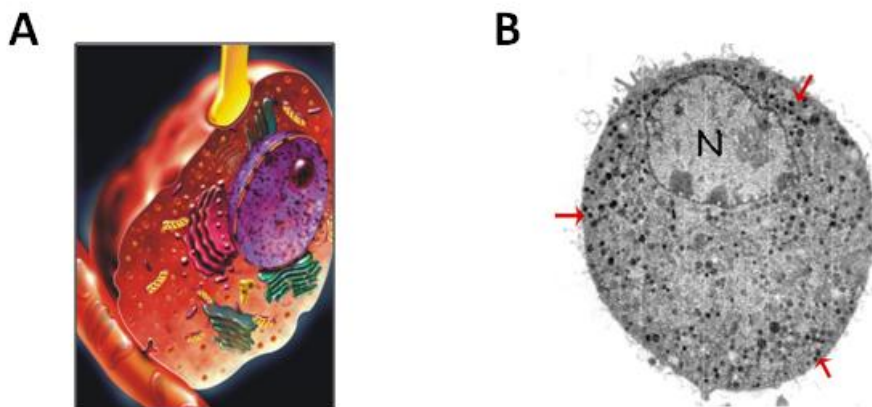


Figura 1.2 - (A) Se representa la ultraestructura de una célula cromafin. Nótese el contacto directo de la misma con un terminal nervioso responsable de su estimulación y con un capilar sanguíneo hacia donde se secretan las catecolaminas mediante exocitosis. **(B)** Imagen de una célula cromafin obtenida con microscopía electrónica de transmisión. Se observa el núcleo (indicado con una N) y un notable contenido de vesículas secretorias (algunas indicadas con flechas rojas a modo de ejemplo) que se visualizan electrodensas al microscopio electrónico, por lo que se las denomina “*DCV*” (*dense core vesicles*) (imagen extraída de Ashery y col., 2000).

colinérgicas preganglionares del sistema simpático a través de axones provenientes del nervio esplácnico (Hirano y col., 1982). Por su origen, ubicación e inervación la médula suprarrenal es considerada un ganglio simpático modificado (Díaz- Flores y col., 2008) y las células cromafines que la componen, se consideran como neuronas modificadas que no poseen axones y liberan sus productos de secreción (neurohormonas, almacenadas en vesículas secretorias denominadas *dense-core vesicles- DCV*) directamente al torrente sanguíneo (figura 1.2) (Donald y Sheperd, 1980). Las neuronas postganglionares del sistema nervioso simpático a su vez también producen y secretan catecolaminas (noradrenalina), que funcionan como neurotransmisores.

Los terminales axónicos del nervio esplácnico liberan acetilcolina sobre las células cromafines, las cuales poseen receptores colinérgicos de membrana que unen con alta afinidad este neurotransmisor. Estos receptores se clasifican en dos grupos principales: muscarínicos y nicotínicos. La secreción en las células cromafines es estimulada por la activación de receptores ionotrópicos del tipo nicotínico. Sin embargo, en estas células también hay receptores metabotrópicos acoplados a proteína G del tipo muscarínicos, que pueden contribuir a la modulación de la secreción de catecolaminas (Aguilar y col., 1992). Cuando el receptor nicotínico es activado por la acetilcolina liberada desde los terminales neuronales preganglionares, este canal aumenta su permeabilidad a cationes, ingresando fundamentalmente Na^+ y despolarizando la membrana, y consecuentemente, generando el disparo de potenciales de acción (PAs). A consecuencia de esto se activan canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV) en la membrana plasmática de la célula cromafín y se produce la entrada de este ión, que dispara la exocitosis de las vesículas secretorias liberando catecolaminas y otras sustancias activas.

1.1.2 Potencial de acción y exocitosis calcio dependiente

En todas las células existe una diferencia de potencial entre el interior y el exterior celular, denominado potencial de membrana (V_m) (por convención,

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

Cuando las células cromafines son excitadas, fisiológicamente por la acetilcolina o por distintos métodos, se disparan potenciales de acción (PAs) en la membrana plasmática (Figura 1.3A). La fase de subida (despolarización) del potencial de acción (PA) es dominada en algunos casos por la entrada de iones de Na^+ (células cromafines humanas) (Biales y col., 1976), mientras que, en otros, depende también de los canales de Ca^{2+} (células cromafines de rata) (Figura 1.3B) (Brandt y col., 1976; Kidokoro y col., 1980). La repolarización del PA en las células cromafines depende conjuntamente de la inactivación de los canales de Na^+ , de canales de K^+ dependientes de voltaje y de dos variantes de canales de K^+ activados por Ca^{2+} tipo BK (Neely y col., 1992; González-García y col., 1993; Inoue y col., 1993; Lara y col., 1995; Solaro y col., 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 y col., 1976; Kidokoro y col., 1980; Micheletti y col., 2005; Wallace y col., 2002; Zhang y col., 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 y col., 2008). Por otro lado, frente a una activación máxima, típica del estrés, las células cromafines disparan PAs a frecuencias mayores a 10 Hz (Kidokoro y col., 1980; Chan y col., 2001).

Las corrientes de Ca^{2+} (ICa^{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 ICa^{2+} para inducir exocitosis varía según el tipo de preparación. Se estimó que la exocitosis inducida 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) (Zhou y col., 1995; Moser y col., 1997). Más recientemente en nuestro laboratorio, en experimentos realizados en células de ratón en cultivo, se estimó que un PA induce una exocitosis de ~8 vesículas (Moya-Díaz y col., 2016).

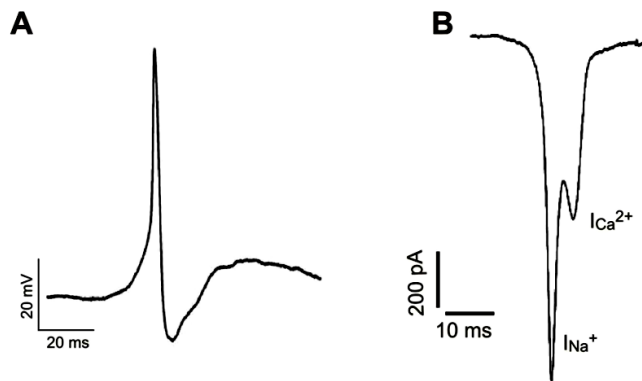


Figura 1.3 - Potencial de acción en células cromafines. (A) Ejemplo de un PA generado por un “puff” de 25 ms de acetilcolina en una célula cromafin bovina. **(B)** Las corrientes que subyacen al PA son de Na^+ y de Ca^{2+} . Por la rápida inactivación de las corrientes de Na^+ las dos corrientes están separadas temporalmente (modificados de de Diego, 2008 y de Diego, 2009).

1.1.3 Las catecolaminas están empaquetadas en vesículas

En las células cromafines se describieron fundamentalmente dos tipos de vesículas: las llamadas vesículas secretorias o gránulos secretorios, que tienen ~200 nm de diámetro en promedio y que son densas al microscopio electrónico (DCV, por *Dense Core Vesicles*); y las vesículas pequeñas (~40 nm) de baja densidad al microscopio electrónico, similares a las vesículas sinápticas (Annaert y col., 1993; Tanner y col., 1996; Koval y col., 2001). Los productos clásicos de secreción de las células cromafines, como la adrenalina, la noradrenalina y una variedad de péptidos activos, son almacenados en las vesículas secretorias. La propiedad electrodensa de estas vesículas se debe a la presencia de proteínas fuertemente empaquetadas, de las cuales la más importante es la cromogranina (Banks y Helle, 1965; O’Connor y Frigon, 1984). Además, las células cromafines secretan factores tróficos: *FGF-2* (por *fibroblast*

growth factor), miembros de la superfamilia de *TGF- β* (por *transforming growth factor*) y neurotrofinas (NT4 y otros componentes neurotróficos no identificados) que promueven la supervivencia de varios tipos neuronales (Unsicker y Krieglstein, 1996).

El producto de secreción más importante de las células cromafines es la catecolamina adrenalina, y en menor medida, su precursor noradrenalina. Una vez que la célula las produce, estas moléculas son transportadas hacia el interior de las vesículas donde se almacenan, mediante los transportadores VMAT1 y VMAT2 (Erickson y col., 1996). Estos transportadores utilizan el gradiente de H^+ generado por una bomba H^+ -ATPasa (Dean y col., 1986). Dicha bomba genera pH ácido de un valor aproximado de 5.5 en el interior vesicular, el cual es utilizado como fuerza impulsora para transportar las catecolaminas. Además, como se ha mencionado previamente, las DCV contienen una matriz proteica compuesta fundamentalmente de cromograninas (Banks y Helle, 1965; O'Connor y col., 1984), lo que le confiere su típica característica electrodensa debido al gran empaquetamiento de estas proteínas en conjunto con cationes que neutralizan sus cargas negativas (figura 1.4). Las DCV contienen además péptidos menores como el neuropéptido Y y la encefalina (Lewis y col., 1979; Viveros y col., 1979; Kataoka y col., 1985), nucleótidos de adenina (ATP), Ca^{2+} (Winkler y Westhead, 1980; Winkler y col., 1982, Winkler y Fischer-Colbrie, 1992, Winkler y col., 1993), syntaxina 1A, sinaptotagmina I (Yoo y col., 2005) y activador de plasminógeno (Parmer y col., 1997).

Asimismo, estas células expresan las enzimas necesarias para la síntesis de las catecolaminas que secretan. Esta ruta biosintética comienza con la formación de L-DOPA a partir del aminoácido tirosina, por acción de la tirosina hidroxilasa. Este primer paso es el limitante en la ruta biosintética. Luego, la enzima dopa descarboxilasa cataliza la eliminación del grupo carboxilo de la L-DOPA y la convierte en dopamina. A continuación, la dopamina es hidroxilada por la dopamina- β -hidroxilasa, transformándose en noradrenalina. Las células que secretan adrenalina, pero no las que secretan noradrenalina, expresan la feniletanolamina-N-metiltransferasa, que cataliza la reacción de metilación que convierte la noradrenalina en adrenalina. Este

último paso es regulado de manera positiva (estimulado) por glucocorticoides (Hodel y col., 2001).

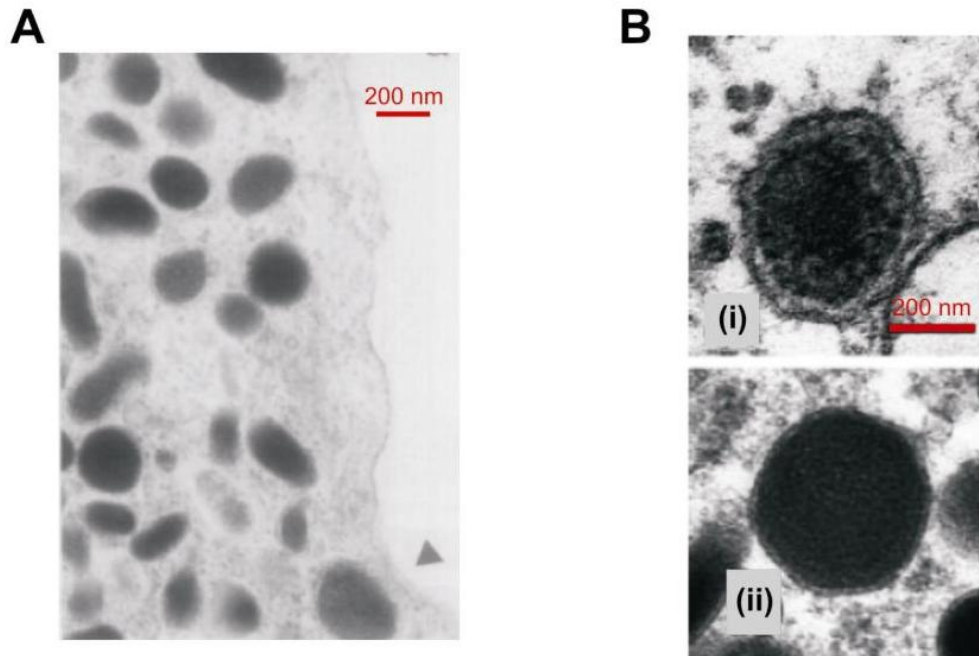


Figura 1.4 - Microscopia electrónica de la zona cortical de una célula cromafin bovina. (A) En esta imagen se observa la ubicación de las vesículas secretorias con respecto a la membrana plasmática (imagen extraída de Vitale y col., 2005). **(B)** Se observan las diferencias entre las vesículas cargadas con adrenalina de las cargadas con noradrenalina. Las vesículas que contienen adrenalina (i) muestran un halo en su periferia mientras que las que contienen noradrenalina (ii) son sólidas (imágenes modificadas de Crivellato y col., 2008).

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 (centros nerviosos situados en la médula espinal, tallo cerebral e hipotálamo) hasta la periferia, donde se hallan terminales nerviosas que regulan la función de órganos particulares. Estas acciones incluyen la modulación de la frecuencia y de la fuerza de contracción cardíacas; 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 y col., 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 y col., 2004).

En el sistema nervioso simpático, las fibras preganglionares emergen desde la médula espinal y se conectan con 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 y col., 2004). En la médula adrenal, como ya se describió, la noradrenalina es mayoritariamente convertida a adrenalina por la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa y dichas sustancias son liberadas a la sangre.

En condiciones basales, 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 0.2-1 Hz. Este estado se conoce como *breed and feed* (Brandt y col., 1976). En estas condiciones las células cromafines liberan pequeñas cantidades de catecolaminas al sistema circulatorio, contribuyendo a 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) (Brandt y col., 1976), 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 en células cromafines ha sido parcialmente indagada. En general, estos trabajos muestran que la liberación del contenido vesicular depende cuantitativamente y cualitativamente de la frecuencia de estimulación aplicada. Inicialmente esta temática fue abordada en el laboratorio de Cristina Artalejo, que utilizando la técnica de amperometría demostró que la cantidad de adrenalina liberada por vesícula secretoria (*quantal size*) dependía positivamente de la frecuencia de estimulación (Elhamdani y col., 2001). Posteriormente, Corey Smith y su grupo mostraron mediante el uso de técnicas electrofisiológicas, imágenes de fluorescencia, inmunocitoquímica y amperometría 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 (Fulop y col., 2005). 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 solo una fracción de las catecolaminas contenidas en la vesícula y no se liberaban péptidos. Dado que esto coincidía con una selectividad diferencial para distintos tamaños de dextranos fluorescentes, los autores propusieron que bajo un régimen de frecuencias de PAs basal se producían fusiones vesiculares de tipo *kiss-and-run* (ver sección 1.7, *kiss and run*), donde sólo se abre transitoriamente un poro de fusión de baja conductividad que no deja pasar moléculas grandes. Un año más tarde, este mismo grupo de investigadores demostró que la activación de la vía de la proteína quinasa C (PKC) modulaba la transición desde fusiones transitorias (PKC inactiva) a fusiones completas (PKC activa) (Fulop y col., 2006). Posteriormente, el mismo laboratorio también demostró que en esta

transición participaba una despolimerización Ca^{2+} dependiente de la actina-F cortical (Doreian y col., 2008).

1.1.5 Ventajas como modelo neurobiológico

Dado que tienen un origen embriológico común, 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 eléctricamente y la liberación de neurotransmisores o adrenalina se produce a través del disparo de PAs que activan CCDV ubicados en la membrana, generando el aumento de Ca^{2+} citosólico y la posterior liberación del contenido vesicular (Neher y col., 1992). En cuanto a la maquinaria exocitótica en las células cromafines, se ha descrito la presencia de la gran mayoría de las proteínas involucradas en la secreción que han sido identificadas en zonas activas de las terminales sinápticas (Hodel y col., 1994; Roth D y Burgoyne, 1994; Morgan y Burgoyne, 1995; Gerber y Sudhof, 2002; Burgoyne y Morgan, 2003, Sørensen y col., 2006).

Respecto a las diferencias entre las neuronas y las células cromafines, una muy importante es 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 (Neher y col., 1998), en las células cromafines no existe una relación estructural y funcional entre la mayoría de las vesículas maduras, listas para exocitarse, y los CCDV. Esto hace que la exocitosis sea más lenta y asincrónica respecto del estímulo en esta última (Chow y col., 1992; Seward y col., 1995), lo cual resulta lógico ya que la secreción de hormonas desde las células cromafines se vierte directamente al torrente sanguíneo, siendo la propia circulación sanguínea el paso limitante en el proceso de señalización. De cualquier modo, frente a una situación de estrés, estas células liberan las catecolaminas en segundos, por lo que el acople estímulo-secreción en estas células puede considerarse una situación intermedia entre neuronas y otras células endocrinas (García y col., 2006). Como se detallará más adelante en

este trabajo, las células cromafines también poseen grupos vesiculares pequeños que pueden ser liberados en forma altamente acoplada con el estímulo en tiempos que no superan unos pocos milisegundos.

Pese a las diferencias respecto a las terminales nerviosas mencionadas en el último párrafo, 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 y formación del poro de fusión vesicular, entre otras. Estas células son fácilmente cultivables y es posible obtener altas cantidades de células por cultivo (Livett y col., 1984). Además, su tamaño es mucho mayor que la mayoría de las terminales nerviosas y adoptan una geometría esférica en cultivo, con un diámetro promedio de aproximadamente 10 μm . Estas características permiten la fácil aplicación de la técnica de *patch clamp* en configuración de célula entera o *whole cell* y la fijación de su voltage. Justamente, si se utiliza esta técnica en modo *voltage clamp* se puede 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) es más sencillo fijar en ellas el potencial de membrana que en las neuronas que poseen una geometría mucho más compleja. Las corrientes de Ca^{2+} que se registran son a su vez las implicadas en el disparo de la exocitosis vesicular. 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 y col., 1982). Los fundamentos de esta técnica se basan en que las membranas biológicas se comportan eléctricamente como capacitores, por lo que la capacitancia de la membrana celular es directamente proporcional al área de la membrana celular (Gillis y col., 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 posteriormente, ya que se utilizó a lo largo de esta tesis. La técnica aplicada en

configuración *whole cell* también permite controlar la composición del citoplasma, y la adición al mismo, vía diálisis por la pipeta de registro, de proteínas, diferentes concentraciones de Ca^{2+} libre y *buffers* de Ca^{2+} , sondas fluorescentes, etc. Justamente utilizando indicadores fluorescentes 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 (Neher y Augustine 1992, Monck y col., 1994; Marengo y Monck., 2003).

Otra característica que las hacen ventajosas como modelo experimental es que pueden ser utilizadas para estudiar la secreción de adrenalina con alta resolución temporal mediante amperometría (Bruns y col., 2004). Esta técnica permite medir la corriente eléctrica generada por la oxidación de las catecolaminas en la superficie de un microelectrodo de fibra de carbono que se coloca en contacto con la superficie celular, pudiéndose detectar las catecolaminas liberadas por las vesículas secretorias individuales (Wightman y col., 1991; Chow y col., 1992). Además, puede ser aplicada simultáneamente con mediciones electrofisiológicas de corrientes y capacitancia celular (Albillos y col., 1997; Ales y col., 1999; Chan y Smith, 2001), a las que también es posible sumarle la medición de señales fluorométricas del Ca^{2+} citosólico (Monck y col., 1994; Robinson y col., 1995). Las células cromafines pueden ser utilizadas también para estudiar la exocitosis y la endocitosis mediante la obtención de imágenes de fluorescencia a partir de indicadores de tipo FM (Perez Bay y col., 2007) y la aplicación de la técnica de microscopía de reflexión total *TIRFM* (por *total internal reflection fluorescence microscope*). Por medio de la técnica de *TIRFM* es posible visualizar y seguir la evolución de las vesículas en un espacio con una profundidad de ~100 nm desde la membrana plasmática (Steyer y Almers, 2001; Becherer y col., 2007) pudiendo identificar los distintos modos de fusión, así como también diferentes estados de maduración basados en su movilidad (Nofal y col., 2007).

Existen numerosos ejemplos de la utilidad de las células cromafines como modelo neurobiológico. En estas células se logró por primera vez aislar una organela secretoria mediante ultracentrifugación (Blaschko y col., 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 y col., 1978). Además, las células cromafines han sido el modelo fundamental para definir la presencia y la dinámica de los *pools* vesiculares (Neher y col., 1993; Rettig y col., 2002; Sørensen y col., 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 y col., 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 y col., 1997; Ales y col., 1999). Mucho más recientemente, utilizando la técnica de microscopía de superresolución (*stimulated emission depletion, STED*) en combinación con indicadores fluorescentes expresados en membrana y libres extracelulares aplicados simultáneamente, se ha demostrado en estas células que el poro de fusión sería una estructura compleja que puede presentar varios estados de apertura, y que es regulado por varias proteínas como la actina y la dinamina (Shin y col., 2018). En cuanto a la maquinaria exocitótica, estas células han resultado también un modelo experimental apropiado para estudios de estructura-función de las proteínas que forman el complejo *SNARE* (por *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) (como sólo algunos ejemplos de esto se puede citar a Sørensen y col., 2003; Sørensen y col., 2006; Walter y col., 2010).

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 Mecanismos de señalización de calcio

La concentración citosólica de Ca^{2+} libre es regulada en valores extremadamente bajos, del orden de ~ 100 nM (Usachev y col., 1995; Meldolesi y col., 1998). O'Sullivan y col. (1989) midieron un Ca^{2+} basal de ~ 79 nM en células cromafines bovinas, mientras que Ales y col. (2005) determinaron valores de ~ 76 y ~ 72 nM para cromafines bovinas y de ratón respectivamente. Esto permite que el aumento de Ca^{2+} generado tanto por la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular o la liberación de Ca^{2+} desde organelas celulares se haya convertido a lo largo de la evolución en un mecanismo ampliamente generalizado de desencadenar respuestas a estímulos. La transmisión sináptica y la secreción neuroendócrina están mediadas fundamentalmente por la entrada localizada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de los CCDV localizados en la membrana plasmática (Augustine y Neher, 1992). Sin embargo, las células cromafines poseen otros mecanismos capaces de aumentar el Ca^{2+} citosólico: el retículo endoplasmático (RE) puede liberar Ca^{2+} a través de receptores de rianodina y/o de IP_3 y la membrana plasmática posee el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que actúa ingresando el Ca^{2+} como un mecanismo de reversión de la concentración de Ca^{2+} (concentración de Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]$) (Pan y Kao, 1997). A su vez estas células poseen varios mecanismos de recaptación de Ca^{2+} : la Ca^{2+} ATPasa y el intercambiador $1\text{Ca}^{2+}/3\text{Na}^+$ de la membrana plasmática (Pan y Kao, 1997), la Ca^{2+} ATPasa en el RE y la mitocondria (Herrington y col., 1996; Pan y Kao, 1997). Todos estos sistemas pueden potencialmente influir en la distribución espacio-temporal de la señal de Ca^{2+} de estas células (Marengo y Monck, 2003).

1.2.1 Fuentes de calcio

Canales de calcio

Los CCDV son proteínas oligoméricas constituidas por cinco subunidades denominadas 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 y

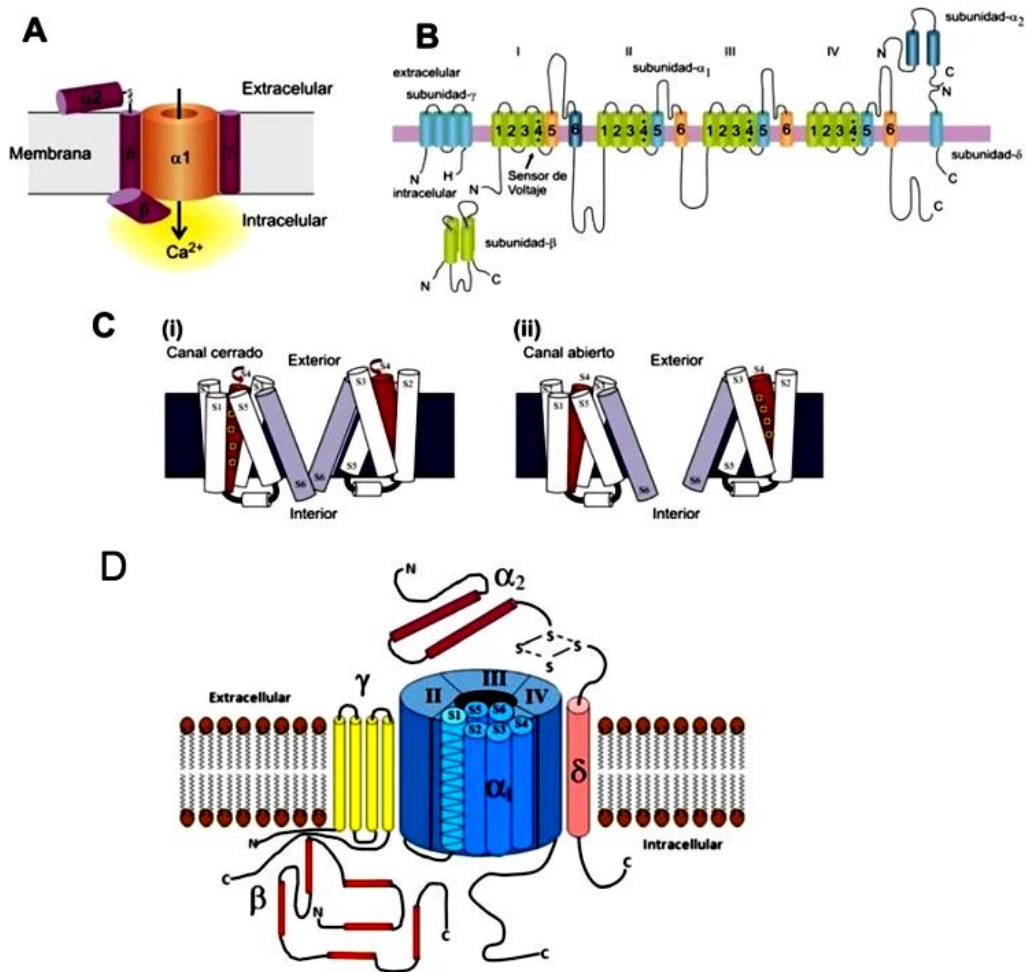


Figura 1.4 - (A) Diagrama de un canal de Ca²⁺ voltaje dependiente. La estructura molecular del canal de Ca²⁺ consta de cinco subunidades: α_1 , α_2 , δ , γ y β . La subunidad α_1 es la que distingue a los subtipos de canales y la que contiene al poro. **(B)** Representación extendida de los segmentos 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 Ca²⁺ 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 uno de estos dominios contiene 6 hélices transmembranales (S1-S6). Las subunidades α_2 , δ y β mejoran la expresión y modulan la dependencia de voltaje y la cinética de *gating* de los CCDV.

col., 2000), mientras que las otras subunidades cumplen un papel regulatorio (figura 1.4A). La subunidad α_1 tiene un tamaño aproximado de 2000 aminoácidos y posee una estructura terciaria constituida por 4 dominios que

combinados forman el poro del canal (figuras 1.4 B y D). Cada uno de estos dominios a su vez está formado por 6 segmentos transmembrana en alfa hélice y posee funciones particulares (Tsien y col., 1991). El cuarto de estos segmentos, denominado S4, está altamente cargado y actúa como sensor del voltaje, mientras que los segmentos S5 y S6, incluido el *loop* entre ellos, contribuyen a la formación del poro del canal (Hille y col., 2001).

Los CCDV, al igual que los canales dependientes de voltaje de Na^+ y K^+ , son altamente selectivos. Cuando cada canal está abierto, 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 y col., 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 1.4C). El canal de Ca^{2+} además experimenta un proceso de inactivación que es dependiente de voltaje y de Ca^{2+} (Zhang y col., 1994). Este canal 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, que además incluye a la probabilidad de apertura (p), la cual depende del potencial de membrana (V), y determina el porcentaje de canales abiertos.

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

A nivel celular la corriente de Ca^{2+} ($I_{\text{Ca}^{2+}}$) depende entonces del tipo y número de canales, del gradiente de concentración del ión entre ambos lados de la membrana y del voltaje al que está sometida la membrana (Hille y col., 2001). Las corrientes son dependientes del voltaje por dos razones: la primera

porque el voltaje afecta la probabilidad de apertura del canal y la segunda porque también afecta la fuerza impulsora que actúa sobre estos cationes, la cual es equivalente a la diferencia entre el potencial aplicado (V_m) y el potencial de equilibrio del Ca^{2+} calculado por la ecuación de Nerst ($E_{\text{Ca}^{2+}}$) (Ecuación 1.2).

$$I_{\text{Ca}^{2+}} = g_{\text{Ca}^{2+}} (V_m - E_{\text{Ca}^{2+}}) \quad (1.2)$$

Las células cromafines sometidas a despolarizaciones sucesivas desde el valor de reposo de la membrana (-80 mV) hasta potenciales más positivos en forma creciente, muestran primero un aumento en las $I_{\text{Ca}^{2+}}$ a partir del umbral de activación que llega a un máximo aproximadamente +10 mV en donde la mayoría de los canales están abiertos. A valores de V_m mayores a +10 mV las corrientes disminuyen debido a la reducción de la fuerza impulsora de los iones de Ca^{2+} cuando nos acercamos al $E_{\text{Ca}^{2+}}$ (Hille y col., 2001). En la figura 1.5 se muestra una curva que representa la corriente en función del voltaje aplicado en la despolarización (curva I/V) obtenida experimentalmente en nuestro laboratorio donde se observa la corriente máxima aproximadamente a +10 mV.

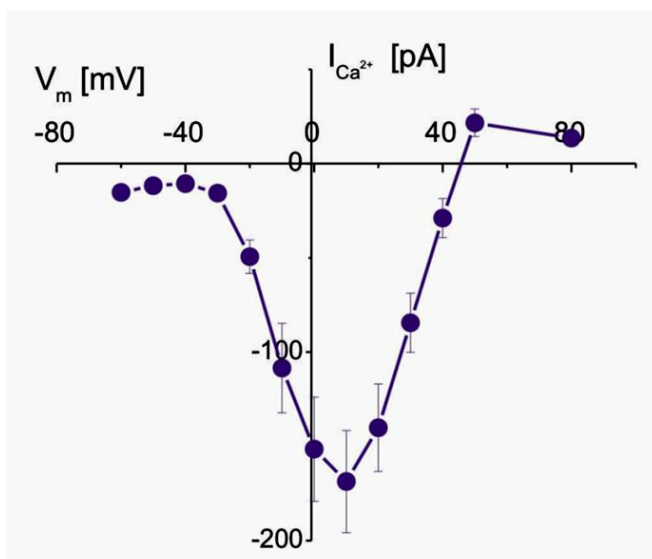


Figura 1.5 - Dependencia de la $I_{\text{Ca}^{2+}}$ con el V_m en células cromafines de ratón. En esta figura se muestra una curva de la corriente de Ca^{2+} máxima en función del potencial aplicado durante la despolarización. Esta curva se obtuvo experimentalmente mediante la aplicación de pulsos despolarizantes desde el valor del potencial reposo de la membrana (-80 mV) hasta los valores de potencial representados en la abscisa del gráfico.

En base a sus propiedades biofísicas y farmacológicas se han identificado y clasificado distintos tipos de CCDV (ver Tabla 1.1). En principio se distinguieron dos grupos: los que son activados por voltajes altos son denominados *high voltage activated (HVA)*, mientras que los que se activan por voltajes bajos son denominados *low voltage activated (LVA)*. 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 y col., 1984; Olivera y col., 1985). Las corrientes tipo P/Q son bloqueadas con alta especificidad por un componente peptídico del veneno de araña *Agelenopsis aperta* conocido como

Tipo de Corriente	Subunidad	Activación	Distribución	Farmacología
L	Ca _v 1.1	α_{1S}	Músculo esquelético	Dihidropiridinas
	Ca _v 1.2	α_{1C}	Células cromafines, SNC, músculo cardíaco, células endócrinas	
	Ca _v 1.3	α_{1D}	Células cromafines, SNC, páncreas, riñón, cóclea, oído	
	Ca _v 1.4	α_{1F}	Retina	
P/Q	Ca _v 2.1	α_{1A}	Células cromafines, dendritas, terminales nerviosas	ω -agatoxina-IVA
N	Ca _v 2.2	α_{1B}	Células cromafines, dendritas, terminales nerviosas	ω -conotoxina-GVIA
R	Ca _v 2.3	α_{1E}	Células cromafines, dendritas, terminales nerviosas, cuerpos celulares	SNX-482
T	Ca _v 3.1	α_{1G}	SNC	Mibefradil
	Ca _v 3.2	α_{1H}	Células cromafines*, neuronas, músculo cardíaco	
	Ca _v 3.3	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 García y col., 2006; Davies y Zamponi, 2008.

ω -agatoxina IVA (Mintz y col., 1992). El canal de tipo R es bloqueado específicamente por la toxina peptídica SNX-482, aislada del veneno de la tarántula africana *Hysteroocrates gigas* (Newcomb y col., 1998; Bourinet y col.,

2001). Finalmente, las corrientes denominadas de tipo L son sensibles a las dihidropiridinas (Davies y col., 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 $\alpha 1H$, que forma el poro de estos canales se expresa en respuesta a incubaciones prolongadas en AMP cíclico, a una estimulación β adrenérgica (Novara y col., 2004), o por exposición a hipoxia (Carbone y col., 2006). Farmacológicamente los canales tipo T son más sensibles al bloqueante inorgánico Ni^{2+} que a Cd^{2+} (Fox y col., 1987).

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. La mitocondria en condiciones fisiológicas no es capaz de acumular Ca^{2+} en forma significativa, de hecho, la $[Ca^{2+}]$ libre intramitocondrial es levemente más alta que la citosólica (Gunter y col., 1994). Por dicho motivo esta organela tampoco funciona como una fuente de liberación de Ca^{2+} (Gunter y col., 1994). Por ello en esta sección 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 y col., 1993), la cual es sensible a la droga tapsigargina (Lytton y col., 1991). Esta bomba, localizada en la membrana del RE, transporta Ca^{2+} desde el citosol hacia el lumen de dicha organela, en contra del gradiente de concentración y con gasto de la energía de enlace del ATP. 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 $[Ca^{2+}]$ libre basal en ambos compartimentos es del orden de $\sim 500 \mu M$ (Montero y col., 1995) y de $\sim 100 nM$ (Meldolesi y col., 1998), respectivamente. Esto 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 y juega un rol central en la homeostasis del Ca^{2+} citosólico (Fabiato, 1983; Rigual y col., 2002). Esta organela posee canales de Ca^{2+} activables por ligando que permiten la liberación de Ca^{2+} al citosol (Berridge, 1993; Inoue y col., 2003). Existen dos tipos: los canales activables por inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) denominados (IP_3R) y los receptores de rianoidina (RyR), los cuales son activados por Ca^{2+} . Estos últimos actúan como un mecanismo de amplificación de la señal de Ca^{2+} . Por ejemplo, un aumento del Ca^{2+} citosólico provocado por la activación de CCDV puede activar a los RyR conduciendo a la salida de dicho catión desde el RE y contribuyendo a un aumento aún mayor del Ca^{2+} citosólico. Este fenómeno, llamado liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} constituye la fuente principal de Ca^{2+} en células cardíacas (Fabiato y col, 1983) pero está también presente en células cromafines.

Otra posible fuente de Ca^{2+} son las vesículas secretorias. La $[\text{Ca}^{2+}]$ en estos compartimentos se ha estimado en valores tan altos como ~ 40 mM (Winkler y col., 1980; Hutton y col., 1989), aunque este catión está mayormente asociado a cromograninas de la matriz vesicular 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 y col., 2008), y se reportó que es posible inducir la liberación de este catión desde las vesículas frente al agregado de IP_3 y cafeína (Huh y col., 2005), la cual es un inductor farmacológico de los RyR (Kong y col., 2008). Se piensa por lo tanto la posibilidad de que la liberación del Ca^{2+} intravesicular pudiera contribuir a la movilización y posterior exocitosis de las mismas vesículas (Santodomingo y col., 2008; Borges y col., 2012).

1.2.2 Sistemas de remoción y regulación del calcio

citosólico

Frente a un aumento del Ca^{2+} citosólico por la entrada del catión 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 removerlo del citosol.

La remoción de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática, y por lo tanto el mantenimiento del importante gradiente en este catión entre el medio extracelular y el citosol, se debe a la operación conjunta de una Ca^{2+} -ATPasa (estequiometría 1 Ca^{2+} / 1 ATP) y del intercambiador $3\text{Na}^+/1\text{Ca}^{2+}$ (Herrington y col., 1996; Pan y col., 1997). Estos dos mecanismos son capaces de disminuir la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico a una velocidad máxima de 0.2 $\mu\text{M}/\text{s}$ en células cromafines de rata a 27°C (Park y col., 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 y col., 1995). Estas ATPasas poseen una estequiometría de 2 Ca^{2+} removidos por 1 ATP hidrolizado (Villalobos y col., 2002) y presentan una velocidad máxima de remoción de Ca^{2+} ubicada en el rango de entre 1 y 1.5 $\mu\text{M}/\text{s}$.

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 y col., 2000). Por ejemplo, durante la activación de los CCDV se genera un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ cercano a la membrana plasmática que puede alcanzar concentraciones entre 10 μM y 100 μM (Neher y col, 1992; Neher y col., 1998, Marengo y col, 2000). La presencia de *buffers* citosólicos fijos enlentecen la disipación del gradiente de Ca^{2+} , restringiéndolo en tiempo y en espacio (Neher y col., 1992; Marengo y col., 2000).

1.2.3 Características espaciales y temporales de las señales de calcio

Todos los elementos descriptos (canales, compartimientos intracelulares, *buffers*, sistemas de remoción) modulan la señal transitoria Ca^{2+} citosólico en diversos tipos celulares. Sin embargo, como ya habíamos mencionado previamente, la señal relevante de Ca^{2+} para la exocitosis en las células cromafines es la que ocurre próxima a la membrana plasmática, que se produce gracias a la activación de los CCDV y es modulada por los *buffers* presentes en el citosol (Marengo y Monck 2000). 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 (Monck y col., 1994; Marengo y Monck, 2000; Ales y col., 2005). Los *buffers* de Ca^{2+} endógenos pasivos son los responsables inmediatos de la disipación del gradiente de Ca^{2+} (Villalobos y col., 2002; Marengo y col., 2003) y recién posteriormente la $[\text{Ca}^{2+}]$ (que aún permanece levemente y uniformemente elevada) retorna lentamente a su valor basal por sistemas de transporte. En este proceso intervendrían la mitocondria, la ATPasa del RE y el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Figura 1.6) (Herrington y col., 1996; Pan y col., 1997; Villalobos y col., 2002; Marengo y col., 2003; Ales y col., 2005; Marengo y col., 2005).

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+} es espacialmente discontinua debido a que proviene de fuentes discretas, particularmente canales o *clusters* de canales de Ca^{2+} y como consecuencia se piensa que se generan micro o nanodominios de $[\text{Ca}^{2+}]$. Estudios de modelado predijeron que dichos microdominios alcanzan concentraciones mayores a 10 micromolar de Ca^{2+} (Simon y col., 1985); pero en contraposición, la $[\text{Ca}^{2+}]$ decaería a niveles cercanos al reposo a 300 nm de la boca del canal (Chad y col., 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 una técnica de laser pulsado, Monck y colaboradores (1994) midieron la generación de *hotspots* de Ca^{2+} en la periferia de células cromafines bovinas en respuesta a pulsos despolarizantes. 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 y col., 1994; Robinson y col., 1995). También en células cromafines bovinas, usando microscopia de campo evanescente para medir la $[\text{Ca}^{2+}]$ cercano a la membrana se observó una correlación entre la fusión de vesículas únicas y la aparición de microdominios de Ca^{2+} asociados a la activación de CCDV (Becherer y col., 2003).

La colocación 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. 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 y col., 1999).

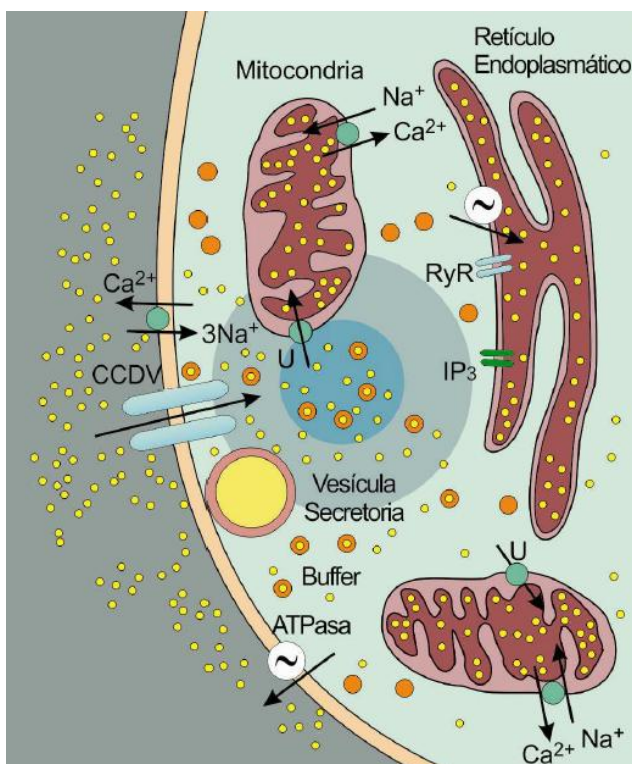


Figura 1.6 - Mecanismos involucrados en la formación y regulación de la señal de Ca^{2+} . En resumen, el Ca^{2+} que ingresa por los CCDV es el responsable fundamental de la exocitosis de las vesículas secretorias. Además, el mismo Ca^{2+} puede potencialmente inducir la liberación de Ca^{2+} por los RyR del RE. La liberación desde el RE también puede producirse por los IP_3 . Los sistemas de remoción del Ca^{2+} 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 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) y 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 y col., 2006.

1.3 Exocitosis en células cromafines

La exocitosis es el proceso de fusión de una vesícula intracelular constituida por una membrana lipoproteica a la membrana plasmática. Esto involucra la secreción al espacio extracelular de diferentes tipos de moléculas solubles contenidas en la matriz de dichas vesículas y a su vez la adición de las proteínas insertadas en la membrana vesicular a la membrana plasmática. 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 organelas intracelulares. Esta exocitosis constitutiva es activa a niveles de Ca^{2+} citosólico basales (Sørensen y col., 2004). En cambio, la secreción de mensajeros químicos como neurotransmisores u hormonas desde la presinapsis, células endócrinas y neuroendocrinas depende de una exocitosis finamente regulada por la elevación del Ca^{2+} citosólico por arriba de ciertos valores críticos (Neher y col., 1992). Si bien las exocitosis constitutiva y la regulada por Ca^{2+} cumplen funciones distintas, varios de los pasos que deben cumplir las vesículas antes de fusionarse son similares. Aunque los detalles moleculares aún no están resueltos, lo que diferencia a ambos mecanismos es la intervención de proteínas sensibles a Ca^{2+} en más de una etapa del proceso.

Luego de ser transportadas a las proximidades de la membrana, el primer paso que debe cumplir una vesícula es el anclado o *docking*, en el cual las vesículas establecen un contacto físico con la membrana plasmática (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 y col., 2000) o a menos de 50 nm (Sugita, 2008) según el autor. Sin embargo, dado que las células cromafines poseen una enorme cantidad de vesículas, 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. Hoy en día se ha avanzado bastante en estas definiciones, aunque todavía es un terreno en el que queda mucho por investigar.

Se ha reportado que la unión entre la syntaxina plegada y la sinaptotagmina son determinantes en el anclado vesicular y a su vez esta unión sería estabilizada por *Munc18-1* (Pevsner y col., 1994; Voets y col., 2001b; Sørensen y col., 2003; Borisovska y col., 2005). Algunos autores también definen el anclado como una unión inicial donde participan proteínas *SNARE* (ver más adelante para una descripción de estas proteínas). En este caso, sostienen que el anclado se establece entre el complejo aceptor syntaxina/*SNAP25* localizado en la membrana plasmática, y la sinaptotagmina-1 localizada en la membrana vesicular (Gulyás-Kovács y col., 2007; de Wit y col., 2009). En células cromafines, *Munc18-1* promueve la formación del complejo aceptor en una proporción 1:1 (de Wit y col., 2009) y es capaz de determinar el número de sitios de anclado, al modular la red subcortical de actina. Además del papel de *Munc18-1* en el anclado, se ha observado que esta proteína también tiene una función crítica en los eventos río abajo que llevan a la exocitosis (de Wit y col., 2009).

En distintos tipos de células secretorias, se ha postulado que otras proteínas también estarían involucradas en el anclado de las vesículas a la membrana, como ser Rab3A, Rab27, granofilina, exofilina/*Slp2a*. Sin embargo, parece que éstas no serían esenciales para el anclado de las DCV en células cromafines (Ashery y col., 2000; van Weering y col., 2007). Las proteínas Rabs son pequeñas GTPasas que se ligan a la membrana de las vesículas secretorias mediante grupos hidrofóbicos ubicados en el C terminal. La Rab3 se expresa en el cerebro, asociada a vesículas sinápticas (Schlüter y col., 2002) y en las vesículas secretorias de las células cromafines (Lin y col., 1997). La proteína Rab3A, en su forma unida a GTP se inserta en la membrana

vesicular y reconoce a la proteína *RIM* (*Rab3 interacting molecule*) en la membrana plasmática (Jahn y col. 2003). En particular, en células cromafines, se reportó que Rab3 necesita de la asociación/disociación de fosfatos guanidina para promover el anclado de las vesículas a la membrana plasmática (van Weering y col., 2007). Luego del anclado, las vesículas secretorias deben atravesar un proceso complejo de activación (*o priming*), que requiere ATP, Ca^{2+} y varios factores proteicos (Holz y col., 1989; Xu y col., 1998, Sørensen, 2004), durante el cual adquieren la capacidad de fusionarse frente a una señal de Ca^{2+} apropiada. Una de las primeras etapas de la activación es dependiente de ATP y consiste en el reciclado de complejos *SNARE*. En este proceso, *NSF*, que es una chaperona, utiliza la energía de hidrólisis del ATP y a α -*SNAP* como cofactor para promover 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 permitiría la reutilización de las proteínas *SNARE* en un nuevo proceso de fusión (Sollner y col., 1993; Kibble y col., 1996; Burgoyne y Morgan, 2003). Luego de esta etapa ATP dependiente, intervienen el Ca^{2+} , *Munc18*, *Munc13* y otras proteínas (Sørensen y col., 2003; Borisovska y col., 2005), para llevar finalmente a la formación/maduración del complejo *SNARE*. Para la formación de este complejo, ocurre una interacción entre las denominadas *t-SNARE*, las proteínas de la membrana plasmática (*SNAP-25* y sintaxina) y las *v-SNARE*, proteínas de la membrana vesicular, particularmente (sinaptobrevina) (Chen y Scheller, 2001). Si bien el complejo *SNARE* ya está maduro, aún falta un proceso final de “*zippering*” (ver más adelante) para que se lleve adelante la fusión.

En el caso de la exocitosis regulada por Ca^{2+} , la fusión de las vesículas ya activadas 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). Para desencadenar esta etapa final de disparo se requiere de un sensor de Ca^{2+} localizado en la zona de exocitosis. El candidato en cumplir este papel, tanto para las vesículas sinápticas como para las densas, es la sinaptotagmina. Esta proteína se encuentra insertada en la membrana vesicular y posee dos dominios citosólicos (C2A y C2B) con cuatro

sitios de unión a iones Ca^{2+} . Cuando los sitios son ocupados llevan a la activación de la proteína, favoreciendo la unión de ésta a la sintaxina (Bennett y

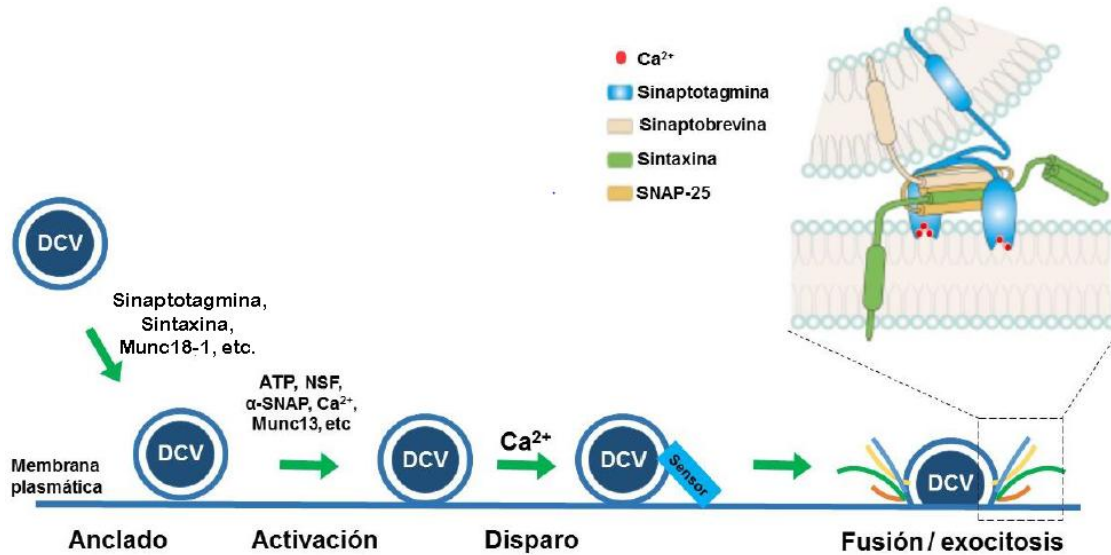


Figura 1.7 - Etapas del proceso de secreción. En el anclado, la vesícula se posiciona próxima a la membrana debido al efecto de interacciones proteicas, entre las cuales estarían involucradas sinaptotagmina, sintaxina y *Munc18-1*. En la activación, intervienen varios factores (ATP, NSF, α -SNAP, Ca^{2+} , *Munc13*, etc.) que permiten que las vesículas experimenten 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, ante el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica, en este caso debido a la entrada del catión a través de canales de membrana, se produce un cambio conformacional en las proteínas del complejo SNARE. Esto lleva a que la interacción entre las mismas pase de ser débil a fuerte progresando en sentido amino a carboxi terminal (*zippering*), conduciendo a la aposición y aproximación de las membranas vesicular y plasmática que finalmente generan el poro de fusión. En el detalle se muestra un esquema del complejo SNARE, formado por la proteína vesicular sinaptobrevina y por la sintaxina y SNAP-25 localizadas en la membrana plasmática. La sintaxina y la sinaptobrevina aportan sólo un segmento, 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 manera Ca^{2+} dependiente. Diagrama modificado de Sugita (2008).

col., 1992), una proteína del complejo SNARE que se encuentra anclada a la membrana y a ciertos lípidos de la cara interna de la membrana plasmática

(Brose y col., 1992). Juntamente con esto, el complejo *SNARE* sufre un proceso llamado *zippering* (Sutton y col., 1998) que es fuertemente exergónico desde el punto de vista energético, ya que se liberaría la energía potencial que fue almacenada en las proteínas *SNARE* durante la hidrólisis del ATP ocurrida en la activación. El *zippering* conduce a 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 y col., 2005, Sørensen y col., 2006). Esto lleva a la aproximación de una membrana con la otra, reduciendo así la energía de activación necesaria para la fusión, que es de por sí un proceso espontáneo (Jahn y col., 2003). La aproximación íntima de las dos membranas aumenta marcadamente la probabilidad de fusión entre ambas, llevando a la formación de un poro de fusión (Chang y col., 2017) que se establece entre los medios extracelular e intracelular.

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 1.8). 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 *cavcapture* (Cardenas y Marengo, 2010; Cardenas y Marengo 2016). Ambos procesos (colapso completo o *kiss and run*) permiten la liberación del contenido vesicular, ya sea a la brecha sináptica (en el caso de neuronas) o a la circulación sanguínea (en el caso de las células neuroendocrinas).

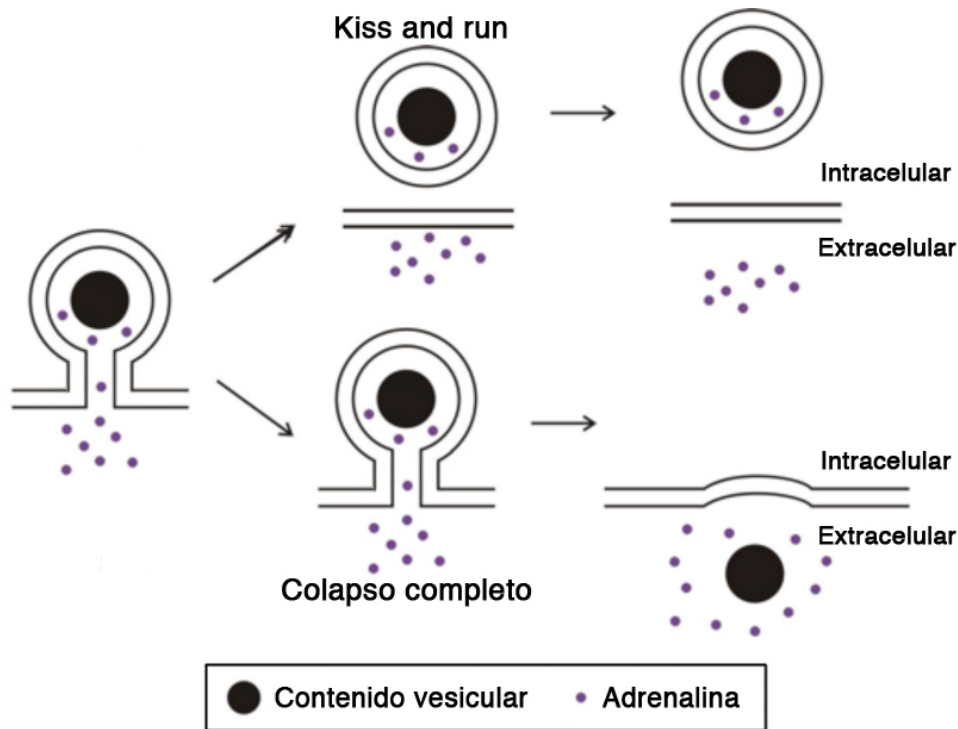


Figura 1.8 - Representación de la secuencia de eventos del mecanismo de *kiss and run* y del colapso completo. Luego de la formación del poro, la vesícula puede recuperarse sin haber perdido su identidad (*kiss and run*) o colapsarse completamente en la membrana plasmática. Figura modificada de Chan y col., 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 su biogénesis en 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 y col., 1992; Neher y col., 1993). Esta secuencia de procesos hace que en la célula cromafín se establezcan *pools* vesiculares cinéticamente diferenciables que se encuentran en distintas etapas de maduración. Para evidenciar la existencia de estos *pools* vesiculares se ha utilizado fundamentalmente la técnica de *flash photolysis* de

Ca^{2+} enjaulado (Kaplan y col., 1988), que permite disparar la exocitosis en respuesta a un aumento espacialmente homogéneo 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+} . El registro de la exocitosis debe realizarse con una técnica de alta resolución temporal, que permita diferenciar los *pools* maduros de los inmaduros, como lo es la medición de la capacitancia celular por medio de la técnica de *patch clamp* en configuración *whole cell* (Neher y col., 1982). A partir de este tipo de experimentos en células cromafines se evidenció 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 y col., 1994). Mientras que el primero fue asociado a vesículas con capacidad para liberarse en forma directa frente al aumento de Ca^{2+} , es decir constituido por vesículas que han completado el anclaje 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 y col., 1994; Sørensen y col., 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 y col., 2000).

Mediciones de capacitancia con mayor resolución temporal permitieron identificar dentro de *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 (Voets y col., 1999; Becherer y col., 2006). 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 diferentes sensores de Ca^{2+} (Voets y col., 2000; Voets y

col., 2001a). Como el llenado del *RRP* se corresponde con un vaciamiento del *SRP* (Voets y col., 1999), se postula que estos dos grupos vesiculares se ubicarían secuencialmente (Heinemann y col., 1994; Voets y col., 1999; Sørensen, 2004). En resumen, se plantea un esquema secuencial para todos los *pools* mencionados, en el sentido $RP \rightarrow UPP \rightarrow SRP \rightarrow RRP$ (Figura 1.9), donde las vesículas se movilizan desde los *pools* río arriba hacia los *pools* río abajo (Ashery y col., 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. Dado que el Ca^{2+} proviene de fuentes puntuales, este aspecto puede ser muy importante respecto de la probabilidad de experimentar exocitosis para las vesículas ya maduras. Se ha calculado que las vesículas más cercanas a los canales de Ca^{2+} deben experimentar a tiempos cortos una $[Ca^{2+}]$ mucho más alta que las vesículas distantes cuando dichos canales son activados (Neher y col., 1998). Por lo tanto, tales vesículas se deberían liberar más rápidamente frente a un estímulo adecuado. En coherencia con esta predicción, cuando se induce la liberación de *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 y col., 1994; Voets y col., 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 la del *RRP* (Voets y col., 1999) (Figura 1.9). Hoy en día existe un común acuerdo en que *IRP* es la consecuencia de un grupo de vesículas molecularmente maduras y en condiciones de liberarse que se localizan en la proximidad de CCDVs. Estos conceptos se desarrollarán en las siguientes secciones de esta Introducción.

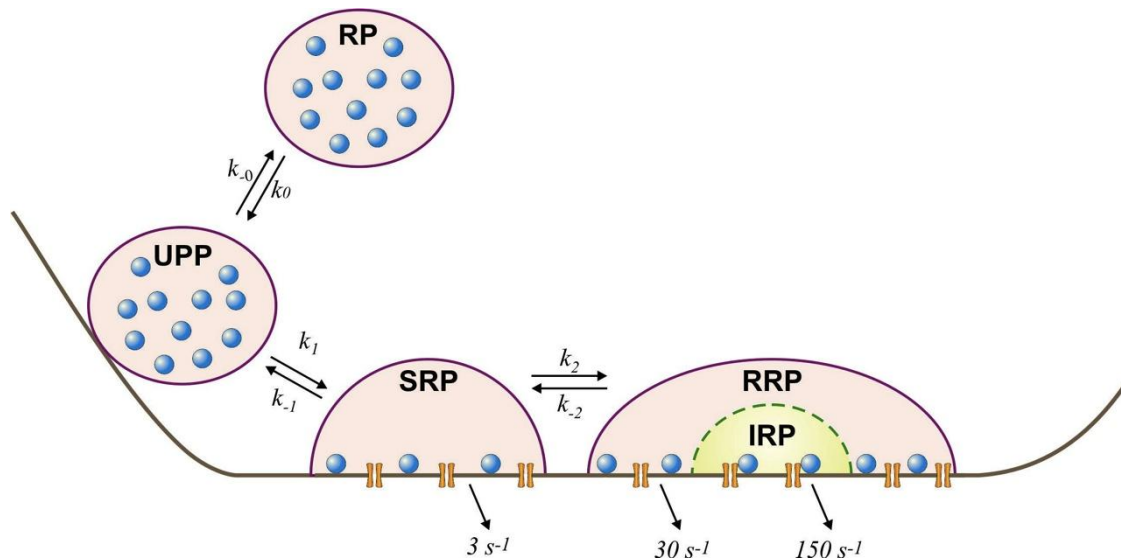


Figura 1.9 - Diagrama representativo de los diferentes *pools* funcionales de vesículas secretorias identificados en células cromafines. Estos *pools* se diferencian en su estado de maduración y/o su distribución espacial (ver texto). Figura adaptada de Voets y col. (1999) y Ashery y col. (2000).

1.5 Acople entre los canales de calcio y las vesículas secretorias

Todos los subtipos de CCDV mencionados en la sección 1.2.1 pueden contribuir a la exocitosis de vesículas secretorias en células cromafines. Se demostró que frente a despolarizaciones largas todos estos subtipos de CCDV participan en la secreción de manera proporcional a su contribución a la corriente de Ca^{2+} total (Alvarez y Marengo, 2011). 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 y col., 1994; Voets y col., 1999), debido a que genera señales de Ca^{2+} que alcanzan regiones alejadas de los CCDV.

Por otro lado, se han publicado varios trabajos que muestran que la exocitosis inducida por despolarizaciones de corta duración (< 50 ms) puede estar asociada a subtipos particulares de CCDV (Albillos y col., 2000; Alvarez y col., 2008; Alvarez y col., 2011). Esto resulta lógico, ya que cuando las

corrientes de Ca^{2+} se activan por cortos períodos de tiempo sólo generan gradientes próximos a los CCDVs, que luego se disipan sin afectar significativamente los niveles de Ca^{2+} globales celulares (Monck y col., 1994; Neher y col., 1998). Por ejemplo, existen evidencias que sugieren que el subtipo de canal R está altamente acoplado a la exocitosis en *slices* de médula adrenal en ratón (Albillos y col., 2000). Sin embargo, son más numerosos los antecedentes que muestran una asociación entre el canal P/Q y la exocitosis altamente acoplada al estímulo en células cromafines (Lara y col., 1998; Aldea y col., 2002; Chan y col., 2005). Incluso 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, y ensayos de co-inmunoprecipitación establecieron la interacción de la subunidad α_{1A} de este canal con los complejos *SNARE* (Andres-Mateos y col., 2005).

Distintos trabajos describen 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 (synprint)*, o en castellano, sitio de interacción de proteínas sinápticas, que está ubicada en el *loop* intracelular entre los dominios II y III (Sheng y col., 1998) (Figura 1.10). Se ha comprobado que *synprint* interactúa con proteínas de la maquinaria exocitótica tales como syntaxina, *SNAP-25* y sinaptotagmina (Rettig y col., 1996; Jarvis y col., 2005), y también con otras proteínas sinápticas tales como la proteína *CSP (cysteine string protein)* y *RIM* (Davies y col., 2008).

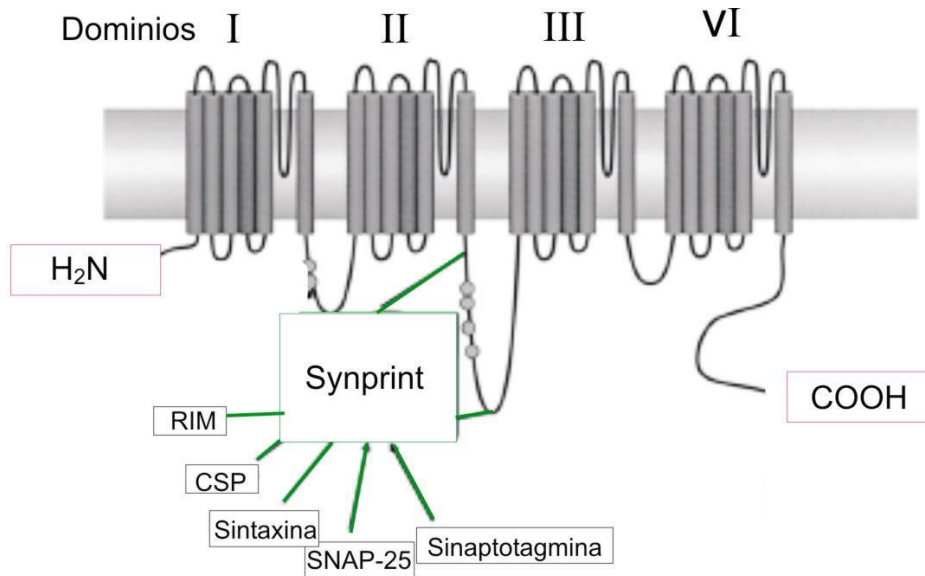


Figura 1.10- Ubicación del sitio de interacción de proteínas sinápticas (*synprint*). Este sitio se ubica entre en el *loop* entre los dominios II – III de la subunidad α_1 del canal de Ca^{2+} de tipo P/Q o N. Con este sitio interactúan proteínas tales como: CSP, syntaxin 1, synaptotagmin 1, y SNAP-25. Figura modificada de Zamponi (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 y col., 1996).

1.6 Pool vesicular inmediatamente liberable

1.6.1 Definición y cuantificación

Horrigan y Bookman (1994), trabajando con cromafines aisladas de rata, propusieron por primera vez la existencia del *IRP* en células neuroendocrinas. Brevemente, la aplicación de despolarizaciones breves reveló la existencia de un pequeño grupo de vesículas altamente acopladas al estímulo que se exocitaban sincronizadamente con este. Esta exocitosis (medida como cambios de capacitancia de membrana) progresaba con una cinética exponencial de

primer orden respecto a la duración del estímulo, presentando una constante espacial de 50 ms (Horrigan y col., 1994). Tanto el tamaño como la cinética de *IRP* presentan variaciones respecto del modelo celular estudiado (Álvarez y Marengo, 2011). En nuestro laboratorio, trabajando en células cromafines de ratón en cultivo, se observó que la exocitosis de *IRP* se satura con pulsos de aproximadamente 50 ms con una constante de tiempo de 15 ms y presenta una magnitud de 25-35 fF (Álvarez y col, 2008; Álvarez y col, 2013; Moya-Díaz y col, 2016). Considerando que la capacitancia promedio de una vesícula secretoria en células cromafines de ratón es de aproximadamente 1.3 fF (Moser y col., 1997), se puede calcular que *IRP* estaría conformado por aproximadamente 20-30 vesículas secretorias. Esto coincide con el valor estimado por Voets (1999) y con una estimación independiente que se obtuvo también en nuestro laboratorio a partir de un protocolo de pulsos pareados de 10 ms separados por 300 ms (Voets y col., 1999; Alvarez y col., 2008).

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 existe una colocalización de las vesículas secretorias que conforman este *pool* con los canales de Ca^{2+} (Voets y col., 1999). Inicialmente la tendencia era suponer que las vesículas de *RRP* se distribuían aleatoriamente alrededor de los CCDV y que el *IRP* era la consecuencia de que una pequeña fracción de vesículas se encontraba por azar cerca de estos. Recordemos que las células cromafines tienen diferentes subtipos de CCDV, pero esta hipótesis no implicaba ningún tipo de especificidad entre vesículas y 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 y col., 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 y col., 2008). Brevemente, por medio del uso de toxinas específicas para los diferentes tipos de canales se evidenció que el canal P/Q era el principal involucrado para inducir exocitosis del *IRP* (Figura 1.11) (Álvarez y col, 2008, Álvarez y col 2013) y esto fue

confirmado con el uso de ratones KO de la subunidad $\alpha 1A$ de P/Q (Figura 1.12). También se observó una contribución menor del canal de tipo R a la exocitosis de *IRP* (ver efecto de SNX en Figura 1.12). Sin embargo, la aplicación de SNX en una célula previamente tratada con Aga no era capaz de 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, lo cual ya se había descrito previamente (Arroyo y col., 2003).

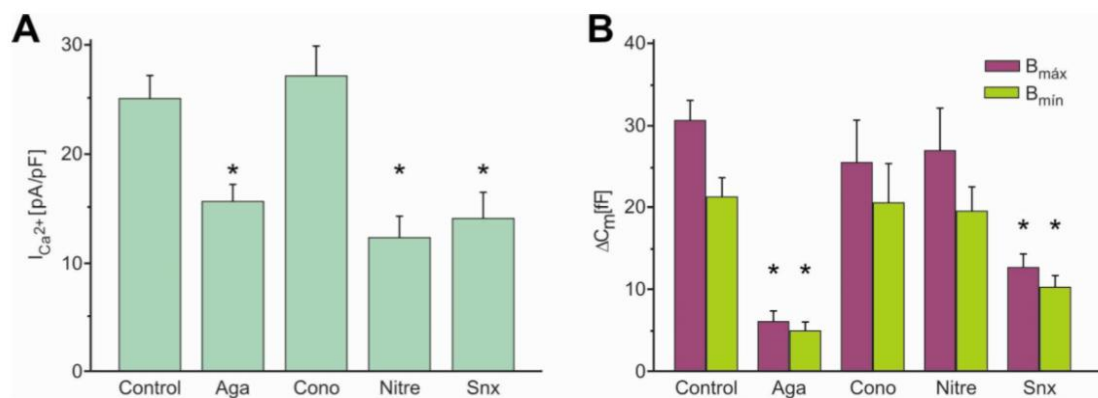


Figura 1.11 - Contribución de los distintos tipos de canales de Ca^{2+} a la liberación del *IRP*. En esta figura se muestran los valores medios (\pm error estándar) obtenidos a partir de los experimentos realizados en presencia de los distintos bloqueantes de los canales de Ca^{2+} (L, P/Q, R y N) en comparación a los controles. En **(A)** 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 μ M de Nitrendipina, Nitre), N (2 μ M ω -conotoxina GVIIA, Cono), R (1 μ M 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 **(B)** 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 ($p < 0.002$). Figura extraída y modificada de Álvarez y col. (2008).

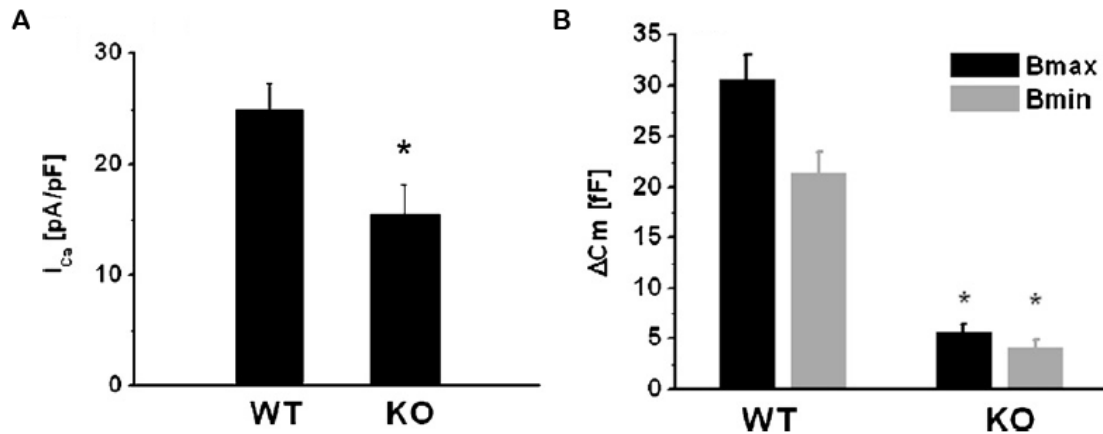


Figura 1.12 - En esta figura se muestran los promedios (+/- error estándar) obtenidos a partir de experimentos realizados con ratones *KO* para la subunidad α_{1A} y ratones WT. (A) Las barras representan las densidades de corriente. La densidad de la $I_{Ca^{2+}}$ fue levemente inferior en el modelo *KO* respecto al control ($p < 0.05$). (B) Las barras representan el tamaño del IRP estimado por el protocolo de pulsos pareados. La excitosis del IRP resultó marcadamente inferior en los *KO* ($p < 0.001$). Figura extraída y modificada de Álvarez y col., (2008).

1.6.2 El acople de IRP con los canales de calcio 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 excitotóxica (Catterall y col., 1999). Un trabajo previo de nuestro laboratorio (Alvarez y col., 2013) demostró en células cromafines de ratón, que también las vesículas del IRP se acoplan con los canales de Ca^{2+} tipo P/Q en forma *synprint* dependiente. En la figura 1.13 A se muestran ejemplos representativos de mediciones de capacitancia y ICa^{2+} obtenidas en respuesta a un protocolo de pulsos pareados para estimar cotas mínimas y máximas de IRP (Voets y col., 1999), tanto en células controles no transfectadas (*Syn*⁻) como en células transfectadas con el péptido *synprint* (*Syn*⁺). En la figura 1.13 B se muestra un resumen de estos experimentos, donde también se representan los resultados obtenidos en células controles sin transfectar, en controles transfectadas con *enhanced green fluorescence protein*

(EGFP), transfectadas con *synprint*, y con *synprint* más el agregado del bloqueante de canal P/Q ω -agatoxina IVA (AGA). 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 bloqueo de las corrientes P/Q por 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.

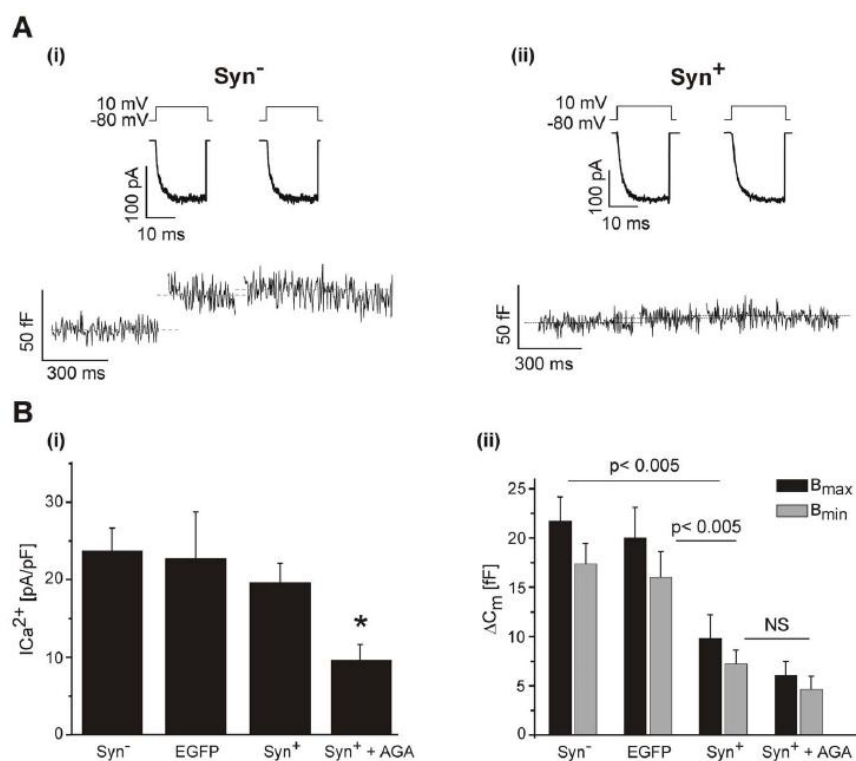


Figura 1.13 - Efecto de péptido *synprint* exógeno sobre la liberación del *IRP*. (A) Ejemplos de trazados de capacitancia y $\text{I}_{\text{Ca}^{2+}}$ frente al protocolo de doble pulso de 10 ms (300 ms de intervalo) en (i) Syn^- y (ii) Syn^+ . (B) (i) Densidades de $\text{I}_{\text{Ca}^{2+}}$ obtenidas 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 $\text{I}_{\text{Ca}^{2+}}$ similares, la exocitosis del *IRP* en Syn^+ disminuyó drásticamente respecto a los otros dos grupos experimentales. Figura extraída y modificada de Álvarez y col., 2013.

1.7 Endocitosis

En células neuroendocrinas y neuronas la exocitosis de vesículas secretorias y sinápticas genera un aumento de superficie y una alteración en la composición lipoproteica de la membrana plasmática, además de una depleción de los *pools* vesiculares que están preparados para liberarse. En consecuencia, es fundamental para la viabilidad celular que intervengan procesos celulares que mantengan tanto la homeostasis de estas variables como la capacidad secretoria de las células. Esto se lleva a cabo fundamentalmente gracias a la endocitosis y al reciclado vesicular.

La endocitosis es un proceso por el cual se producen pequeñas invaginaciones locales en la membrana plasmática y mediante la fisión de dichas invaginaciones, se forman pequeños corpúsculos intracelulares delimitados por membrana (vesículas o alternativamente cisternas o vacuolas). Por medio de este proceso, la superficie de membrana agregada por la fusión de las vesículas durante la exocitosis es recuperada, devolviendo a las fracciones de membrana plasmática e intracelular sus niveles originales. Además, la internalización y posterior reciclado de la membrana endocitada 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. Se desarrollan brevemente abajo sólo los tipos de endocitosis que se piensa que contribuyen al reciclado de vesículas secretorias y sinápticas.

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 y otras proteínas accesorias (Smith y col., 2008). En el comienzo de este proceso intervienen distintas proteínas adaptadoras, entre ellas AP2,

AP180 y epsin que son reclutadas en sitios de la membrana plasmática ricos en fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PI(4,5)P₂) (Ferguson y col., 2012). La clatrina a su vez forma trímeros que se asocian a estas proteínas adaptadoras formando una estructura polihédrica similar a un enrejado que promueve la curvatura de membrana y por lo tanto su invaginación (Slepnev y col., 2000). Finalmente, el ensamblamiento de dímeros de la GTPasa dinamina alrededor del cuello de la vesícula en formación, formando un collar o espiral, y su constricción dependiente de la hidrólisis de GTP cataliza la fisión y la separación de la vesícula de la membrana (Takei y col., 2005). Las características estructurales y funcionales de la dinamina se detallarán en esta sección bajo el título “dinamina y endocitosis”.

Trabajos iniciales en células cromafines reportaron que este tipo de endocitosis se desarrollaba muy lentamente, completándose en un tiempo de aproximadamente ~15-30 minutos (Artalejo y col., 2002; Chan y col., 2003). Sin embargo, trabajos más recientes en células β del páncreas (He y col., 2008) y en neuronas (Royle y col., 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 (Tesis Doctoral de Verónica Belingheri, 2016). La endocitosis mediada por clatrina es un mecanismo dependiente de la [Ca²⁺] citosólico, (Smith y col., 1997; Engisch y col., 1998) y hay datos que sugieren que sería activada preferentemente por una entrada de Ca²⁺ desde los canales de tipo L (Rosa y col., 2011).

Es importante tener en cuenta que durante el colapso completo se secreta el núcleo proteico denso de las vesículas secretorias, formado por cromogranina y otras proteínas, el cual no puede ser recuperado por la endocitosis clatrina dependiente posterior. Por lo tanto, en general se considera que este mecanismo 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 vesicular se sintetizan *de novo* (Maxfield y col., 2004).

1.7.2 Kiss and run

Tal como se describió en la sección 1.1, la médula adrenal y la respuesta al estrés, luego de formarse el poro de fusión la vesícula se puede recuperar intacta *in situ* mediante el proceso de *kiss and run*. Este proceso fue propuesto por primera vez en 1973 por el grupo de Ceccarelli (Ceccarelli y col., 1973) a partir de imágenes de microscopía electrónica en placa motora de rana. Luego de estimular el preparado a una frecuencia baja (2 Hz) observaron la aparición inmediata de vesículas sinápticas nuevas cargadas con peroxinasa del rabanito, sin evidencias de vesículas cubiertas con clatrina. Esto contrastaba con los experimentos que Heuser y Reese publicaron ese mismo año (Heuser y Reese, 1973), donde estimulando a mayor frecuencia (10 Hz) sí observaron vesículas cubiertas por clatrina, mientras que las vesículas sinápticas aparecían recién luego de varios minutos. El *kiss-and-run* conlleva por lo tanto una endocitosis altamente acoplada e inmediata a la exocitosis previa. Se ha confirmado a lo largo de los años que este mecanismo endocítico es muy rápido (se completa en pocos segundos o menos de un segundo) y predomina a bajas concentraciones de Ca^{2+} y/o bajo la aplicación de PAs a bajas frecuencias (Chan y Smith, 2001; Elhamedani y col., 2006; Wu y col., 2014a).

1.7.3 Endocitosis Ultra-Rápida

Se ha descrito en terminales nerviosas de hipocampo un mecanismo muy rápido de endocitosis (*Ultra-Fast endocytosis*), que a diferencia del *kiss and run* no ocurre en el sitio de exocitosis sino en la región periaxial de la sinapsis y se produce luego de eventos de colapso completo de vesículas sinápticas (figura 1.14) (Watanabe y col., 2013). Este mecanismo es dependiente de actina-F y de dinamina, pero independiente de clatrina, y se completa en 50-100 milisegundos). Posteriormente se observó que a partir de los endosomas formados por endocitosis ultra-rápida se regeneran vesículas sinápticas en aproximadamente 5-6 s luego del estímulo que provocó la exocitosis (Watanabe y col., 2014).

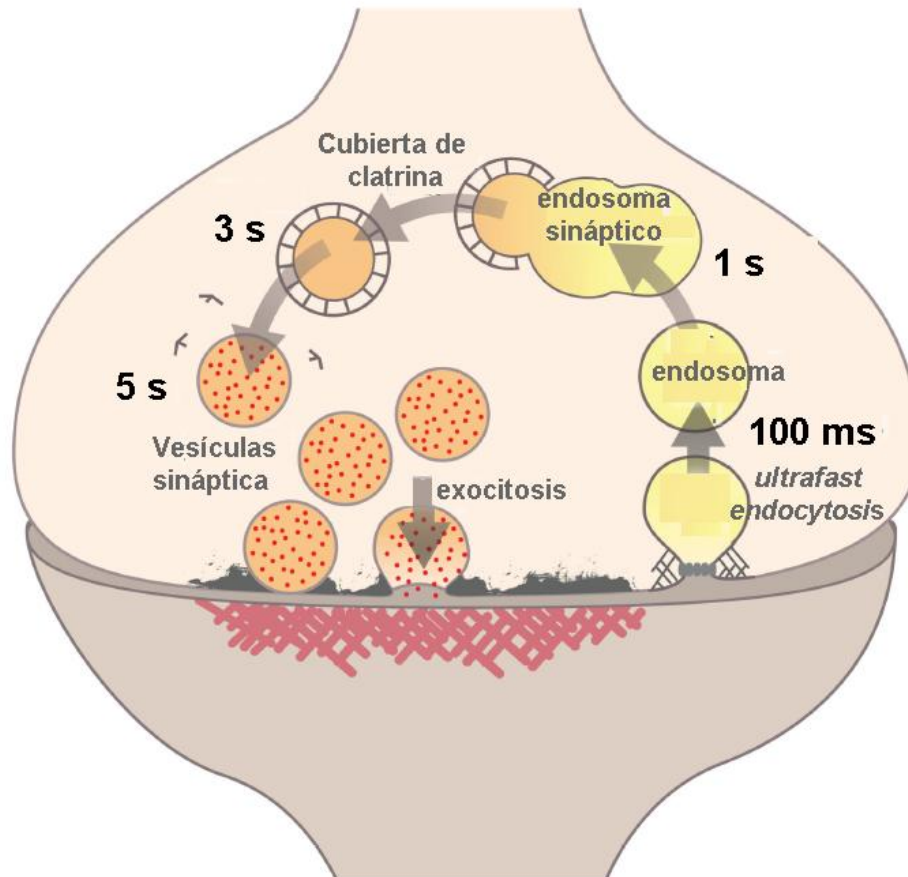


Figura 1.14 - *Ultrafast endocytosis* regenera las vesículas sinápticas en un proceso de dos etapas. Primero, internaliza la membrana añadida por fusión de vesículas en el límite lateral de la zona activa. Luego las vesículas endocitadas se fusionan a un endosoma. A partir de estos endosomas luego se generan vesículas sinápticas mediante un proceso dependiente de clatrina. Las vesículas recientemente formadas pueden ser reclutadas hacia la zona activa. Figura modificada de Watanabe y col. (2014).

1.7.4 Endocitosis de tipo bulk

En experimentos realizados bajo situaciones de estimulación muy intensa, donde se genera una exocitosis masiva, aparece otro tipo de endocitosis denominada *bulk* endocytosis (Smith y Betz, 1996; Holt y col., 2003; Pérez Bay y col., 2007, 2012). La endocitosis de tipo *bulk* es un fenómeno por el cual se invaginan grandes porciones de membrana que forman vacuolas o cisternas y se piensa que es una respuesta a condiciones que pueden poner en riesgo la viabilidad celular (Betz y col., 1992). Sería un mecanismo de control

homeostático que intenta mantener la superficie y la composición de la membrana plasmática. El mecanismo molecular operante en este tipo de endocitosis es desconocido, pero hay datos recientes que sugieren que es dependiente de actina y de dinamina (Gormal y col., 2015). Este tipo de endocitosis es la responsable del fenómeno llamado recuperación en exceso (*excess retrieval*) o endocitosis en exceso por la cual se endocita una cantidad de membrana mayor a la exocitosis previa, siendo esto finalmente compensado por exocitosis asincrónica (Pérez Bay y col., 2012).

1.7.5 Dinamina y endocitosis

La fisión de las vesículas recubiertas de clatrina respecto de la membrana plasmática requiere de la GTPasa dinamina. 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 prolina y argininas (Ramachandran y col., 2007; Ferguson y col., 2012) (Figura 1.15). En mamíferos se han identificado tres isoformas de dinamina. La dinamina 1, que se localiza específicamente en el tejido neuronal (Scaife y col., 1990), dinamina 2, que se expresa ubicuamente (Cook y col., 1994) y la dinamina 3 que se expresa en el tejido testicular (Cao y col., 1998). En células cromafines se expresan las isoformas 1 y 2.

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 20°C las moscas mutantes son normales, pero a T° de 30°C 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 y col., 1991). Estudios subsecuentes revelaron que la fisión de las vesículas resultaba inhibida luego de la exposición de células a GTP γ S o ante la mutante de dinamina K44A que tiene modificado el sitio de unión a GTP (Takei y col., 1995; McMahon y col., 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 dependiente de clatrina. La dinamina se polimeriza alrededor del cuello vesicular y provee la energía mecánica necesaria para la fisión.

Además, hay fuertes indicios de que la dinamina polimerizada alrededor del cuello estabiliza el poro de fusión favoreciendo el *kiss and run* y completaría luego la fisión vesicular en este mecanismo exo-endocítico (González-Jamett y col., 2010). Actualmente incluso se propone que el poro de fusión sería una estructura finamente regulada y la dinamina uno de sus principales reguladores (Shin y col., 2018). 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 y col., 2015), otros han propuesto lo contrario (Hayashi y col., 2008).

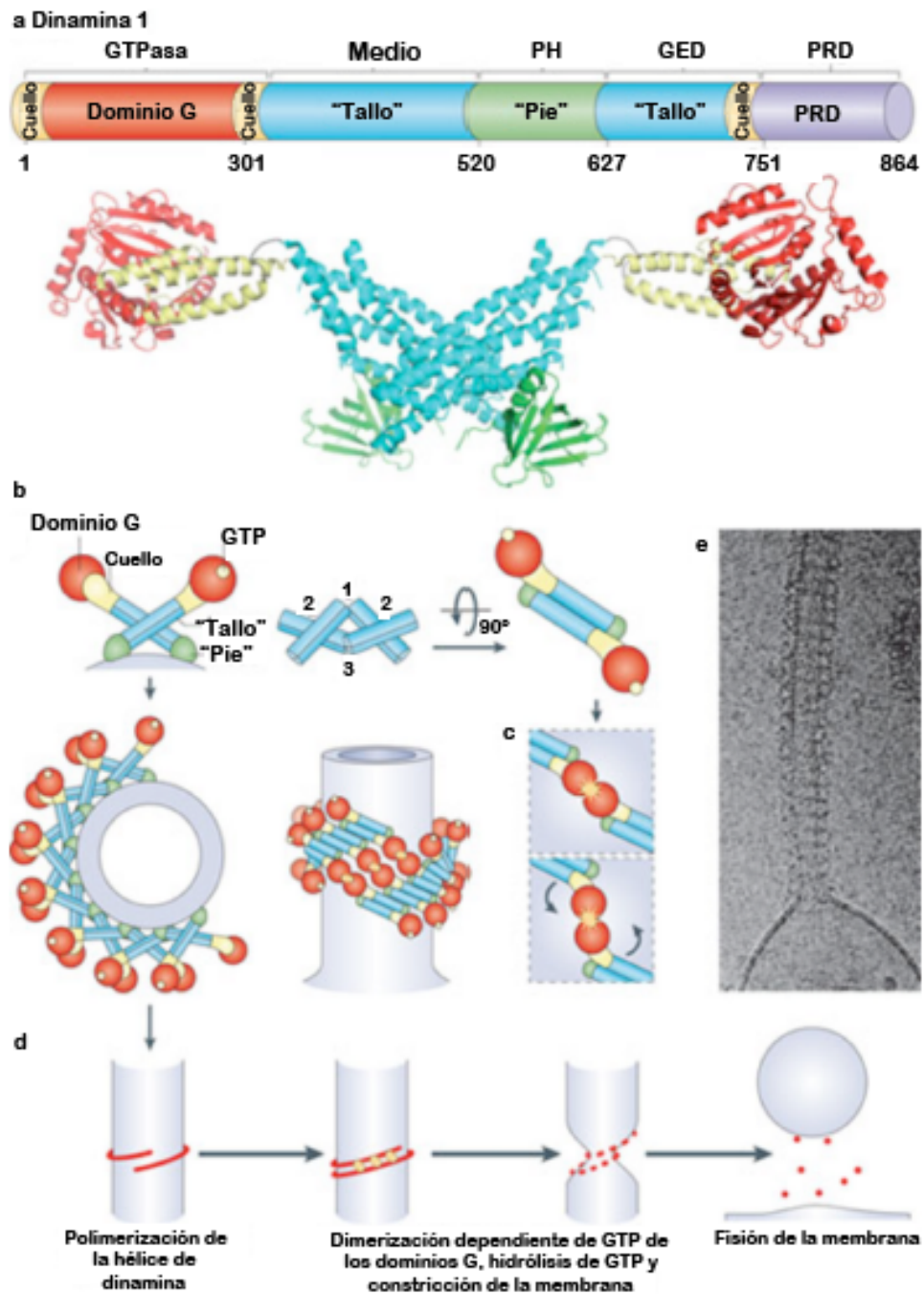


Figura 1.15 - Estructura molecular de la dinamina y mecanismo de fisión de membrana.

(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 (90° 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 microscopía 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).

1.7.6 Dependencia de la endocitosis con el calcio

Uno de los principales factores que regula la endocitosis 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 modula positivamente por Ca^{2+} , GTP y dinamina (Artalejo y col., 1995). Del mismo modo, Engisch y Nowycky (1998) demostraron que la endocitosis compensatoria se acelera con la entrada de Ca^{2+} por canales. 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. Un efecto positivo del Ca^{2+} sobre la endocitosis también se manifestó en terminales nerviosas hipocampales, en donde se demostró que la estimulación con PAs a altas frecuencias (un escenario en donde hay acumulación de Ca^{2+} residual) aceleraba dicho proceso (Balaji y col., 2008). Efectos similares del Ca^{2+} también se reportaron en retina, cáliz de Held y células ciliadas del oído (Wu y col., 2014a).

Sin embargo, también existen varias evidencias que sugieren que la presencia de Ca^{2+} puede retardar la endocitosis y/o el reciclado. Por ejemplo, en neuronas de hipocampo se demostró que el reciclado vesicular se retardaba cuando estas células se exponían a altas concentraciones de Ca^{2+} extracelular (Leitz y col., 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 y col., 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 para la endocitosis y bajo otras circunstancias es inhibitorio. 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 este ión inhibiría el desarrollo de la endocitosis, el aumento transitorio de la concentración del mismo en micro/nanodominios facilitaría su desarrollo (Wu y Wu, 2014b).

En células cromafines se describió un comportamiento bifásico de la endocitosis dependiente de la frecuencia de PAs aplicada. Este punto se desarrollará más adelante en esta Introducción.

1.8 Reciclado y recuperación de las vesículas

secretorias

Luego de un estímulo que induce exocitosis, se deprimen los *pools* vesiculares. Por lo tanto, el mantenimiento de la secreción a lo largo del tiempo depende de varios procesos asociados al reciclado y consecuente recuperación de las vesículas secretorias. Entre estos procesos podemos citar a diferentes formas de endocitosis, la generación de las vesículas secretorias en el aparato de Golgi y a varias etapas de maduración tales como el tráfico de vesículas a través del citoesqueleto, el *docking* a la membrana y las distintas etapas de *priming* (ver capítulos 1.3 y 1.4 de esta introducción).

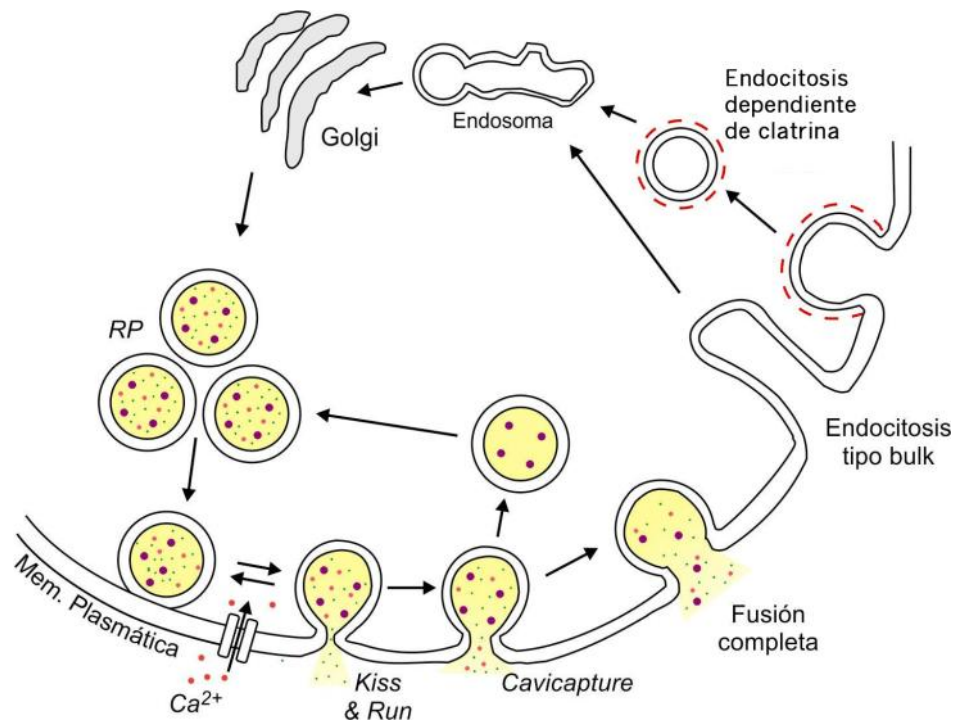


Figura 1.16 - Tipos de endocitosis y ciclado vesicular. Las vesículas del *pool* de reserva (*RP*) son translocadas a la membrana. Una vez activadas, la entrada de Ca^{2+} dispara la fusión, que puede ser transitoria, de tipo *kiss and run* o *cavicapture*, o una fusión completa. En este último caso 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).

1.8.1 Cinética de recuperación de IRP

Debido a que *IRP* es un grupo de vesículas altamente acoplado a CCDVs y capaz de exocitarse en respuesta a estímulos breves se postuló que podría ser el responsable de mantener la exocitosis a frecuencias basales de PAs (Olivos Oré y Artalejo, 2005; Cárdenas y Marengo, 2016; Moya-Díaz y col., 2016). En otras palabras, en el reposo las células cromafines disparan PAs a frecuencias muy bajas (0,2-1 Hz) y no es esperable que haya significativos incrementos del Ca^{2+} basal. En dicha situación la exocitosis sería fundamentalmente dependiente de los gradientes de Ca^{2+} que se forman en la

periferia de los canales y solamente las vesículas próximas a estos serían excitadas. Por lo tanto, sería esperable que *IRP* sea capaz de recuperarse, luego de ser deprimido, a una velocidad compatible con las frecuencias basales de las células cromafines.

A partir de la pregunta planteada en el párrafo anterior, en nuestro laboratorio se estudió 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 (Moya-Díaz y col., 2016). 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 1.17 Ai). Las figuras 1.17 Aii y Aiii ilustran registros típicos de la ICa^{2+} y los ΔC_m obtenidos por la aplicación de este protocolo a intervalos de 5 y 20 segundos, respectivamente. Luego de 5 segundos, solo una pequeña fracción de la ΔC_m asociada al *IRP* fue recuperada, mientras que 20 segundos fueron suficientes para recuperar casi completamente la exocitosis de este *pool* de vesículas.

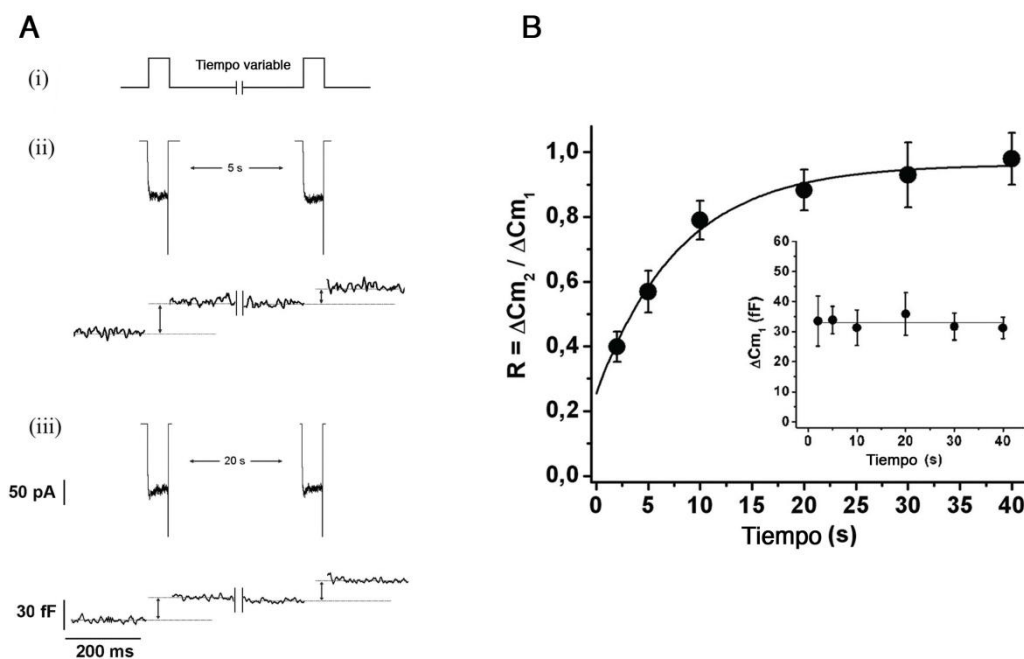


Figura 1.17- Recuperación del *IRP* luego de su depresión. (A) (i) Esquema del protocolo de estimulación. Con el objetivo de determinar la cinética de recuperación del *IRP*, se aplicó un protocolo de pulsos pareados de despolarizaciones de 50 ms (-80 mV a 10 mV) con intervalos de tiempo variable entre ellos. **(ii y iii)** ICa^{2+} (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 $\Delta C_{m2}/\Delta C_{m1}$) donde ΔC_{m1} y ΔC_{m2} 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 $R = R_0 + A (1 - e^{-t/\tau})$. 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 y col., 2016).

La figura 1.17 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 (ΔC_{m2}) dividido por el cambio de capacitancia inducido por el primer pulso (ΔC_{m1}). Los puntos experimentales de la figura 1.16 B se ajustaron a una función de crecimiento monoexponencial, obteniendo una constante de tiempo 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 y col., 1997; Smith y col., 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 PAs 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 mayor al tiempo entre estímulos a una frecuencia de 0.5 Hz.

1.8.2 Exocitosis asociada a un potencial de acción en células cromafines

Si bien *IRP* no recupera a una velocidad correspondiente a las frecuencias basales, debemos tener en cuenta que el estímulo natural de las células cromafines es el PA. Por lo tanto, en nuestro laboratorio se estudió la exocitosis disparada por una despolarización de duración y amplitud similar a un potencial de acción nativo (PA_{sim}) (ver Materiales y Métodos, sección 3.2.6). Este tipo de estímulos genera una integral y amplitud corriente de Ca^{2+} de 8 pC, 488 pA fF, y una exocitosis de 11 fF (Figura 1.8), similares a las obtenidas en respuesta a un PA nativo (Moya-Díaz y col., 2016). Por otro lado, en ese mismo trabajo se demuestra que la exocitosis disparada por un PA_{sim} libera un grupo de vesículas que forma parte de *IRP*, a las que se las denomino como *ETAP*, por *exocytosis triggered by action potential like stimulus*.

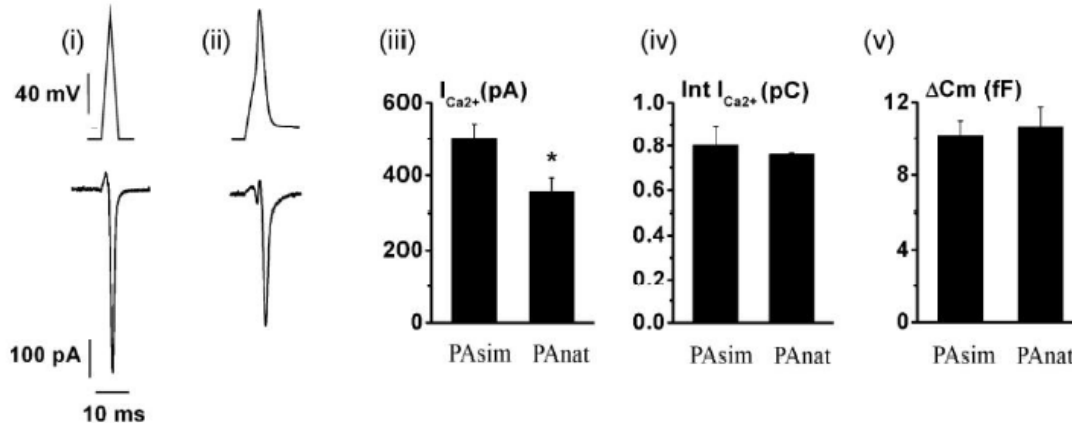


Figura 1.18 - La aplicación de un potencial de acción simulado (PA_{sim}) induce una entrada de Ca^{2+} y una exocitosis similar a la de un potencial de acción nativo (PA_{nat}). (i)

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 $[Ca^{2+}]_e/70$ μ M $[EGTA]_i$ (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 $I_{Ca^{2+}}$ para todas las condiciones se representan debajo de cada

PA. Los gráficos de barras en (iii), (iv) y (v) resumen los valores de las ICa^{2+} , integral de la ICa^{2+} (Int- ICa^{2+}) y los C_m , respectivamente. * $p < 0.05$. Los datos están expresados como valores promedios \pm error estándar. (Figura tomada y modificada de Moya-Díaz y col., 2016).

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 otro depende de la frecuencia de PA_{sim} aplicados. En ese sentido, se reportó que la estimulación con PA_{sim} 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, la cual es clatrina independiente, dinamina dependiente, y posee tiempos característicos menores a 1 segundo (Chan y col., 2001; Chan y col. 2003; Moya-Díaz y col., 2016). En la figura 1.18A se representa un registro original de este tipo de endocitosis que se desarrolla luego de *ETAP*. 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 ($K_{act} = 1.46 \mu M$) y está asociado a la acción de la fosfatasa calcineurina (Chan y col., 2001, 2003).

Los trabajos publicados por Elhamdani y colaboradores (2006) complementaron estas observaciones. Utilizando la técnica de doble *patch-clamp* (configuración *whole cell/cell attached*) en células cromafines bovinas 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 y col., 2006). Por otro lado, el grupo de Corey Smith analizó la cinética de liberación de adrenalina desde vesículas únicas por medio de la técnica de amperometría y encontró

resultados que apuntaron en la misma dirección. Particularmente, la aplicación de frecuencias basales (0.5 Hz) inducía la aparición de espigas amperométricas pequeñas, coherentes con vesículas que se liberan por fusiones de tipo *kiss and run*, mientras que frecuencias mayores provocaban la desaparición de las espigas pequeñas y la aparición de las espigas grandes típicas del proceso de colapso completo (Fulop y col., 2005).

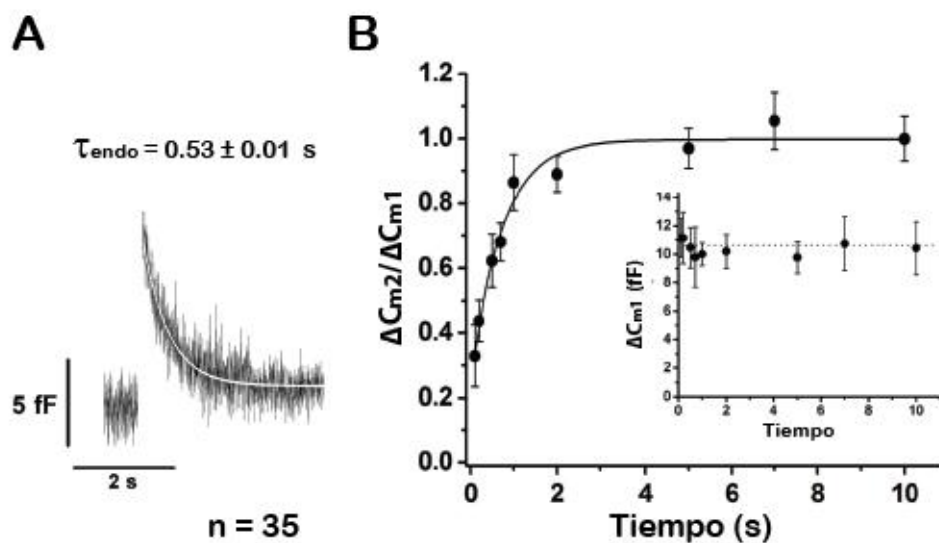


Figura 1.19 – (A) Luego de ETAP, la superficie de membrana es recuperada por una endocitosis rápida. La figura representa el promedio de los registros obtenidos en 35 células independientes. El decaimiento de la capacitancia de membrana fue ajustada a una ecuación monoexponencial de caída ($= 0.53 \pm 0.01$ s; $R > 0.9446$). **(B)** La recuperación relativa de ETAP (expresada como C_{m2}/C_{m1} ; donde C_{m1} y C_{m2} representan los cambios de capacitancia inducidos por el primer y segundo PA_{sim} , respectivamente) fueron graficados en relación al intervalo de tiempo entre los PA_{sim} . Cada punto representa el promedio de las mediciones obtenidas en al menos 11 células independientes. Los valores promedio fueron ajustados a una función de crecimiento monoexponencial de la forma $Y = A e^{-t/\tau} + Y_0$, obteniendo un valor Y_0 a tiempo cero de 0.24 ± 0.05 , una asíntota A de 0.75 ± 0.05 , una constante temporal de 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 \pm error estándar. (Figura tomada y modificada de Moya-Díaz y col., 2016).

1.8.3 Recuperación rápida de ETAP

El proceso de recuperación de *ETAP* se estudió en nuestro laboratorio por medio de un protocolo similar al aplicado para *IRP*, pero reemplazando las depolarizaciones cuadradas de 50 ms por PA_{sim} (ver Materiales y Métodos, sección 3.2.6). A partir de dichos experimentos se obtuvo la curva promedio de la Figura 1.18B (Moya-Díaz y col., 2016), que muestra una recuperación 10 veces más rápida que *IRP*, con una constante de tiempo de ~ 0.7 s. Esto indica que *ETAP* alcanza una recuperación de más del 90% en 2 s y que por lo tanto este sistema es capaz de mantener una exocitosis aproximadamente constante cuando la célula es estimulada a 0.5 Hz, lo cual está en el rango de los valores de frecuencias fisiológicas de las células cromafines. Esto último se demostró aplicando trenes de PA_{sim} , donde se observó que *ETAP* se mantenía a frecuencias de 0.2 y 0.5 Hz pero caía muy marcadamente para frecuencias mayores de 2 Hz.

Se demostró que la recuperación de *ETAP* está fuertemente ligada a la endocitosis rápida acoplada a este tipo de exocitosis. Si se inhibe dicho proceso endocítico con tratamientos que bloquean la acción de la dinamina (como un anticuerpo monoclonal o un péptido que compite con la dinamina en su reclutamiento al cuello vesicular) se retarda significativamente la recuperación y se observa un significativo decaimiento de *ETAP* aún a frecuencias bajas de estimulación (Moya-Díaz y col., 2016).

1.9 - Rol de la actina cortical en células

neuroendócrinas

La actina es una de las proteínas celulares más abundantes. Los monómeros globulares de M-actina se polimerizan formando filamentos de F-actina que juegan un rol fundamental en la arquitectura celular, como también en la movilidad, tráfico y otras funciones celulares esenciales. Su distribución citoplasmática es muy abundante en una zona cercana a la membrana celular,

formando la llamada red de actina cortical. Esta red cumple importantes funciones en la topología de la membrana celular como también en ciertos procesos que ocurren en la membrana y en particular en la secreción. Respecto a esta última, la primera función importante que fue determinada para esta red fue la de barrera física para las vesículas secretorias del *pool* de reserva, evitando que estas interactúen libremente con la membrana plasmática cuando la célula está en reposo (Trifaro y col., 1985; Cheek y col., 1986; Aunis y col., 1988; Trifaro y col., 2008; Meunier y col., 2016; Gutiérrez y col., 2018). Estudios realizados en células cromafines mostraron que el aumento de Ca^{2+} citosólico (por ejemplo, inducido por un estímulo) activa la proteína de clivaje scinderin que desensambla la red de filamentos de actina-F, permitiendo que las vesículas secretorias alcancen la membrana plasmática (Trifaró y col., 2000; Wollman y col., 2012; Olivares y col., 2014). Esta visión un tanto simplista se fue modificando a lo largo del tiempo y hoy se sabe que la actina-F cortical no actúa solamente como una barrera, sino que también participa activamente en el tráfico de vesículas hasta la membrana plasmática, como también de la expansión del poro de fusión durante las últimas etapas de la exocitosis (Gutiérrez y col., 2018; Li y col., 2018; Shin y col., 2018). Por lo tanto, la corteza de actina puede funcionar paradójicamente como un facilitador y como una barrera para la secreción de vesículas (Wollman y Meyer, 2012; Porat-Shliom y col., 2013).

En adición con su rol general de estructura celular de soporte, la actina del citoesqueleto ha sido tradicionalmente asociada al transporte de organelas, tales como los gránulos densos que contienen catecolaminas en las células cromafines (Trifaro y col., 2008). El uso de la técnica de *TIRFM* permitió demostrar que la inhibición de la formación de actina-F afecta negativamente el transporte de gránulos próximos a la membrana plasmática (Oheim y col., 2000; Lang y col., 2000; Gutiérrez y col., 2018). Resultados obtenidos en células cromafines bovinas sugieren que tanto la disrupción de la red de actina cortical como la formación de nuevos filamentos de actina son inducidos por los mismos cambios en la $[Ca^{2+}]$ citosólico que activan las etapas finales de la exocitosis (González-Jamett y col., 2013; Olivares y col., 2014). En el proceso de tráfico de las vesículas a la membrana a través de la actina cortical tendrían

también una función importante los motores moleculares miosinas VI y II (Trifaro y col., 2008; Wollman y Meyer 2012; Papadopulos y col., 2013; Meunier y col., 2016).

Finalmente, también hay trabajos que indican que la actina-F y la miosina cumplirían un rol importante en la regulación del modo de fusión vesicular. Esto también estaría controlado por el Ca^{2+} citosólico, y por lo tanto por la actividad eléctrica de la célula cromafín. La aplicación de PAs a bajas frecuencias mantiene a los filamentos de actina cortical en configuración actina-F (filamentosa), lo cual favorece a las fusiones transitorias de tipo *kiss and run*. Por el contrario, altas frecuencias de estimulación, que provocan la elevación del Ca^{2+} citosólico, desestabilizan estas redes y favorecen la despolimerización de la actina-F, promoviendo fusiones de tipo completas (Doreian y col., 2008; Meunier y col., 2016). Es más, mientras que la miosina II no sería necesaria para el proceso de *kiss and run*, la acción de esta proteína sí sería importante para el desarrollo de las fusiones vesiculares completas que se evidencian frente al aumento de Ca^{2+} (Doreian y col., 2008), aparentemente a través de la generación de fuerzas mecánicas que facilitarían la expansión vesicular (Berberian y col., 2009). Trabajos más recientes indican que el aumento de Ca^{2+} provocaría simultáneamente la disrupción de la actina-F cortical, que permitiría el pasaje de las vesículas hacia la membrana, y también la formación de nuevos filamentos de actina-F que contribuirían al transporte de las vesículas y a la expansión del poro de fusión (Olivares y col., 2014; Shin y col., 2018).

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. ¿Cuáles son los componentes asociados a la recuperación vesicular que ocurre posteriormente a la exocitosis de *IRP*?

Hipótesis 1:

Luego de ser excitado, un *pool* vesicular es recuperado por diferentes mecanismos de modo de que se mantenga la homeostasis del mismo y la capacidad secretoria de la célula. En el caso de *IRP*, su recuperación ocurre según publicaciones previas en forma monoexponencial con una constante de tiempo de 7-10 seg (Moser y Neher 1997; Moya-Díaz y col., 2016). Un posible mecanismo planteado consiste en la movilización de vesículas desde *pools* río arriba (Voets y col., 1999).

Por otro lado, en una publicación previa de nuestro grupo (Moya-Díaz y col., 2016) describimos que la recuperación de una fracción de *IRP* excitada por un estímulo en forma de potencial de acción (PA_{sim}) está asociada a una endocitosis rápida dependiente de dinamina. Esta recuperación es también monoexponencial, pero sumamente rápida (constante temporal < 1 seg).

Con este último conocimiento, el re-análisis de la recuperación que ocurre luego de la exocitosis total de *IRP* nos permitió plantear la hipótesis de que la recuperación de *IRP* ocurriría en realidad de manera bifásica (se forzó un ajuste a dos componentes), incluyendo un primer componente rápido dependiente de una endocitosis dinamina dependiente asociado a un reciclado vesicular corto, y un segundo componente más lento dependiente de la transferencia de vesículas de *pools* río arriba.

Pregunta 2. Cómo afecta la $[Ca^{2+}]$ citosólico a la endocitosis y la recuperación vesicular que ocurren posteriormente a la exocitosis de *IRP*?

Hipótesis 2:

La dependencia de la endocitosis con el Ca^{2+} es un tema no resuelto. Se han descrito modos de endocitosis que son facilitados y otros que son inhibidos por el Ca^{2+} citosólico. Por lo tanto, un tema que nos interesa abordar en este trabajo de tesis es el efecto de Ca^{2+} citosólico sobre la endocitosis y la recuperación vesicular asociadas a *IRP*.

Por otro lado, se ha planteado que la transferencia de vesículas desde *pools* río arriba es dependiente de una $[Ca^{2+}]$ citosólico residual moderadamente elevada que se sostiene durante un tiempo luego del estímulo responsable de la apertura de los CCVD y la exocitosis (Heinemann y col., 1993; Voets y col., 1999).

Por lo tanto, planteamos como hipótesis que la recuperación de *IRP* es dependiente del Ca^{2+} citosólico, pudiendo este tanto afectar la endocitosis y consecuentemente al hipotético componente rápido, como también al previamente descrito componente lento.

Pregunta 3. ¿Depende la endocitosis y recuperación de *IRP* del grado de polimerización de la actina cortical?

Hipótesis 3:

Resultados previos en células cromafines muestran que la actina-F cortical favorece que la exocitosis se desarrolle preponderantemente a través de eventos de fusión de tipo *kiss-and-run* (Doreian y col., 2008). Este tipo de fusión vesicular coincide con una endocitosis y un reciclado vesicular particularmente rápidos. Por otro lado, se ha demostrado que la actina-F cortical facilita diferentes tipos de endocitosis (Gormal y col., 2015). También se sabe que el Ca^{2+} modula el grado de polimerización de la actina, y hay evidencias que a bajas frecuencias de APs, donde el Ca^{2+} basal citosólico se mantiene en niveles bajos, se favorece un estado de actina cortical bastante

polimerizado, en estado filamentoso (Doreian y col., 2008). El incremento del estímulo a frecuencias mayores produce la disrupción de la actina-F cortical, y la preponderancia de la función total. Por lo tanto es esperable que una intervención que disgregue a la actina-F cortical favorezca la fusión total por encima del *kiss-and-run* y que además pueda afectar distintos mecanismos endocíticos. Proponemos que esto debería coincidir con enlentecimientos de la endocitosis y de la recuperación del *pool* vesicular.

La actina-F cortical actúa también como una barrera para la traslocación de las vesículas inmaduras hacia los sitios de *docking*. Por lo tanto, un segundo efecto de la disgregación de la actina-F cortical podría ser una mayor provisión de vesículas provenientes río arriba de *IRP*. En este caso la disgregación de la actina-F cortical podría provocar una magnificación de este *pool*.

Por lo tanto, frente a la alteración de la polimerización de la actina cortical tenemos hipotéticamente tres mecanismos que se podrían estar alterando, la endocitosis, el modo de fusión y la traslocación de vesículas, y que podrían modificar el reciclado de *IRP* de formas diferentes.

Pregunta 4. ¿Tiene relación el grado de polimerización de la actina cortical con los rápidos procesos de endocitosis y recuperación de la exocitosis que se observa luego de la estimulación con un PA_{sim} ?

Hipótesis 4: 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. Es esperable que en estas condiciones la actina cortical tenga un grado de alta polimerización, y consecuentemente se favorezcan un mecanismo rápido de endocitosis y de recuperación, posiblemente de tipo *kiss-and-run*. De acuerdo con lo mencionado, sabemos a partir de un trabajo previo (Moya-Díaz y col., 2016) que frente a este tipo de estímulo se activa una muy veloz endocitosis dinámica dependiente y, asociadamente, un reciclado rápido vesicular. Por lo tanto, proponemos que interviniendo sobre el grado de polimerización de la actina podríamos modificar la cinética de la endocitosis y en consecuencia la cinética de la recuperación vesicular frente a este tipo de estímulo.

2.2. Objetivos

Objetivo general:

- Estudiar los mecanismos de endocitosis y recuperación asociados a la exocitosis vesicular altamente acoplada al estímulo, lo cual es esencial para evaluar y entender su mantenimiento en respuesta a la estimulación repetitiva.

Objetivos particulares:

- Re-analizar los componentes asociados a la recuperación de *IRP*.
- Analizar cómo afecta el Ca^{+2} citosólico los procesos de endocitosis acoplados a la fusión vesicular de *IRP*.
- Analizar cómo afecta el Ca^{+2} citosólico los procesos de recuperación de *IRP*.
- Evaluar la importancia de la actina cortical en la endocitosis acoplada a la exocitosis de *IRP*, y a la recuperación de dicho *pool*.
- Evaluar la importancia de la actina cortical en la endocitosis acoplada a la exocitosis de *ETAP*, y a la recuperación de dicho *pool*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivo 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.

3.1.1 Soluciones de cultivo

Hanks (en mg/ml): 0,4 KCl, 0,06 KH₂PO₄, 8 NaCl, 0,35 NaHCO₃, 0,05 Na₂HPO₄ anhidro, 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, 1 mg/ml de seroalbúmina bovina, 1 µl/ml µM de citosina-1-β-D-arabinofuranósido.

3.1.2 Procedimiento para el cultivo

Los animales fueron anestesiados con una sobredosis (0.5 ml) de avertina 2%*m/v*, administrada en forma intraperitoneal. Una vez que se accedió a las cavidades peritoneal y torácica utilizando el 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 médulas fueron colocadas en un tubo tipo eppendorf de 1,5 ml y digeridas en solución de Hanks conteniendo 1,1 mg/ml de papaína durante 20 minutos a 37°C.

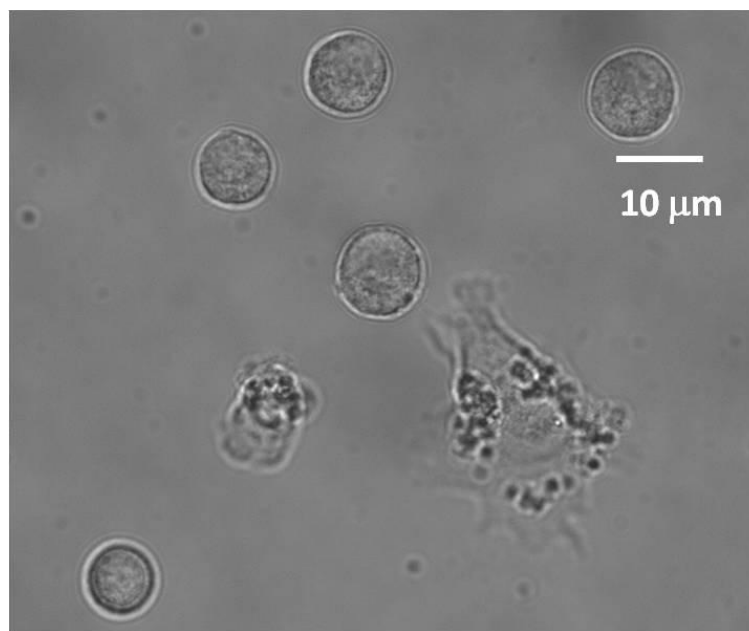


Figura 3.1- Imagen DIC de células cromafines en cultivo tomadas con un objetivo 40X. Las células cromafines pueden distinguirse fácilmente de los fibroblastos, eventualmente presentes en el cultivo, debido a su forma esférica, a su tamaño, a la presencia de un núcleo que ocupa un volumen importante de 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 y se las suspendió en un volumen final de 300 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 μ l de suspensión celular por cuarto de cubreobjeto) y colocados en cajas de petri de 35 mm (cinco cuartos de cubreobjetos por caja). Luego de incubar por 40 minutos en estufa a 37 °C con una atmósfera de 95% O₂ - 5% CO₂, se agregaron 2 ml de medio de cultivo *DMEM* por cada caja de petri, las cuales se mantuvieron en la estufa hasta su uso. Las células fueron utilizadas para realizar experimentos entre las 24 y las 48 horas luego de realizado el cultivo. En la figura 3.1 se observan fotos tomadas de un cultivo típico de células cromafines de ratón realizado en nuestro laboratorio.

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 (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 micropipeta de vidrio de alrededor de 1 μ m 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 $1\text{ g}\Omega$, a lo que se le denomina gigasello. La primera configuración obtenida una vez formado el gigasello entre la pipeta y la membrana es la denominada *cell attached* (Figura 3.2A), que es útil para medir la corriente a través de un canal único. Pero la configuración aplicada a lo largo de este trabajo de tesis es la llamada *whole cell*. Para lograr esta última configuración, una vez obtenida la configuración *cell attached* se lleva a la membrana al potencial de *holding*, en nuestro caso de -80 mV y luego se succiona hasta romper la sección de membrana dentro de la pipeta (Figura 3.2B). De este modo el electrodo queda en contacto directo con el citosol celular y forma un circuito continuo con el interior de la célula (Figura 3.3A). Esta configuración puede utilizarse para medir, a un nivel celular global, tanto los cambios de potencial y de capacitancia de la membrana, como las corrientes que atraviesan la membrana. En la configuración *whole cell* la solución incluida en la pipeta (solución interna) ingresa al interior de la célula, reemplazando a la solución citosólica. Debido a ello, esta solución debe ser preparada 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 potencial del lado exterior estará en continuidad con el del electrodo de referencia conectado a tierra.

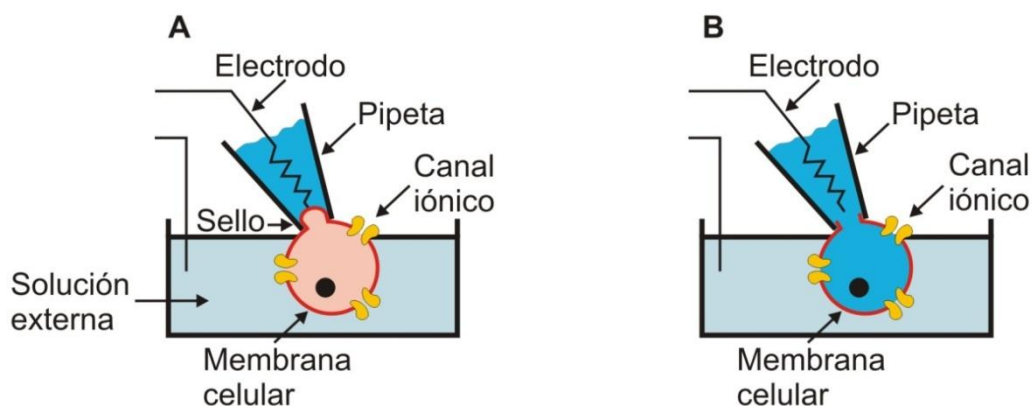


Figura 3.2 - Esquema de la formación del gigasello y del establecimiento del modo *whole cell*. (A) La pipeta se apoya sobre la superficie de la membrana y con presión negativa se

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 ($V_{\text{intra}}-V_{\text{extra}}$), 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 y se podrá medir una corriente neta a través de la membrana.

3.2.2 Circuito equivalente de la célula y medición de capacitancia celular

Utilizando la técnica de *patch clamp* en configuración *whole cell* y modo *voltage clamp*, además de las corrientes iónicas que atraviesan la membrana pueden medirse otros parámetros eléctricos, como la capacitancia. Dado que la capacitancia es directamente proporcional a la superficie de la membrana celular, los cambios de capacitancia 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. Una 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 (Sakmann y Neher, 1995). Otra desventaja de esta técnica es que no posee resolución

espacial, es decir que no da información sobre la región de la célula donde se produce el proceso de fusión o fisión de membrana.

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*. Las células aproximadamente esféricas como las cromafines se ajustan a un modelo simple que consta de una resistencia de acceso R_a que está en serie con un circuito compuesto por una resistencia de membrana R_m en paralelo con una capacitancia C_m (Figura 3.3). 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 1 GΩ. La capacitancia de la membrana plasmática, C_m , es aproximadamente 1μF/cm² suponiendo un espesor uniforme de 5 nm para la misma y una constante dieléctrica relativa entre 2 y 3. En las células cromafines la capacitancia total de la membrana suele estar entre 4-10 pF (valores experimentales). La resistencia de acceso R_a es la resultante de la resistencia del microelectrodo más contribuciones de la membrana adherida a la punta de la micropipeta como consecuencia de la ruptura del sello. En los experimentos que se presentan en esta Tesis, los valores de R_a fueron ≤ 10 MΩ. Bajo este modelo, la corriente de membrana (I_m) tiene una parte iónica ($I_{ión}$) y una capacitiva (Ecuación 3.1).

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

Donde " I_m " es la corriente total que circula por la membrana., " V " es el potencial aplicado, " C_m " es la capacitancia de la membrana e " I_{ion} " es la corriente iónica.

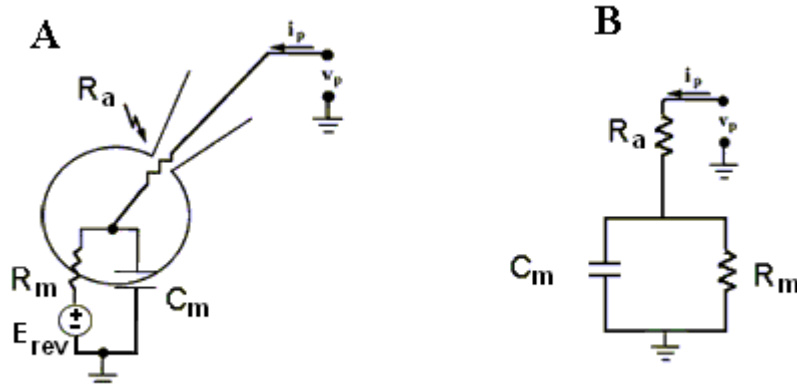


Figura 3.3 - (A) Circuito equivalente para una célula de forma esférica bajo configuración *whole cell*. Este modelo tiene en cuenta la capacitancia celular de la membrana C_m , la resistencia de los canales iónicos R_m y la resistencia de acceso R_a . V_p es el voltaje entre la pipeta y el baño (conectado 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.

Si el potencial de membrana se mantiene constante bajo el modo de *voltage clamp*, como ocurre durante el *holding*, el segundo término de 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*. Estos cambios sinusoidales en el potencial eléctrico 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. 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 laboratorio es el Seno+DC, desarrollado por Manfred Lindau y Erwin Neher (Sakmann y col., 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. En consecuencia, la aplicación del voltaje sinusoidal es suspendida durante el estímulo eléctrico (despolarización) aplicado. Así, es posible registrar la capacitancia de membrana antes y después de un determinado estímulo, siendo la diferencia entre ambas una medida de la exocitosis inducida por ese estímulo.

Por lo explicado arriba, es posible cuantificar la exocitosis que se produce en la totalidad 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 3.4) (Neher y col., 1982). Conociendo el valor promedio de capacitancia de una vesícula única, aproximadamente 1.3 fF (Moser y col., 1997), se puede estimar el número de vesículas fusionadas.

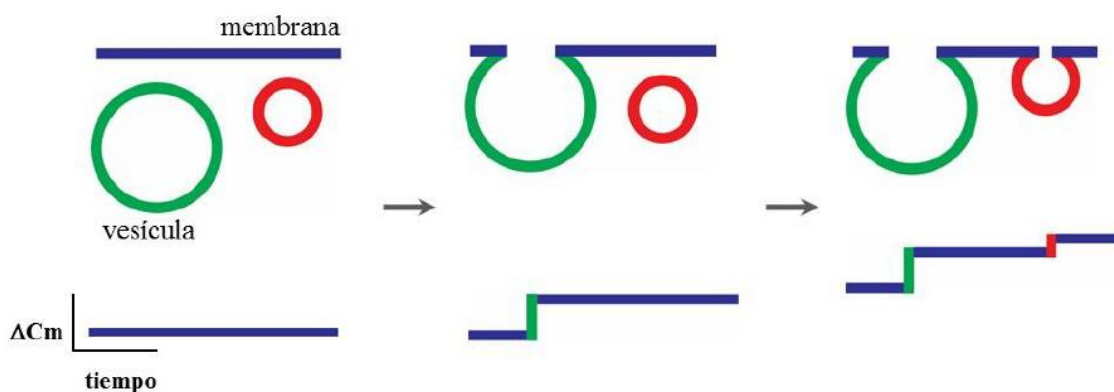


Figura 3.4 - Un modo de cuantificar la exocitosis es a través de la medición de la capacitancia celular. A medida que se estimula a la célula con pulsos despolarizantes se observa un aumento en la capacitancia celular como consecuencia de la fusión de las vesículas con la

membrana plasmática. En las células cromafines se estimó que el tamaño de una vesícula es de 1,3 fF (Moser y col., 1997).

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 mecánicamente estable y permite manipular la posición del microelectrodo respecto de la célula; un amplificador doble de *patch clamp* con sistema conversor A/D-D/A integrado EPC10 *double-patch* (Heka Elektronik), que permite controlar el voltaje aplicado, medir y adquirir las corrientes y los cambios de capacitancia durante los experimentos; 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.

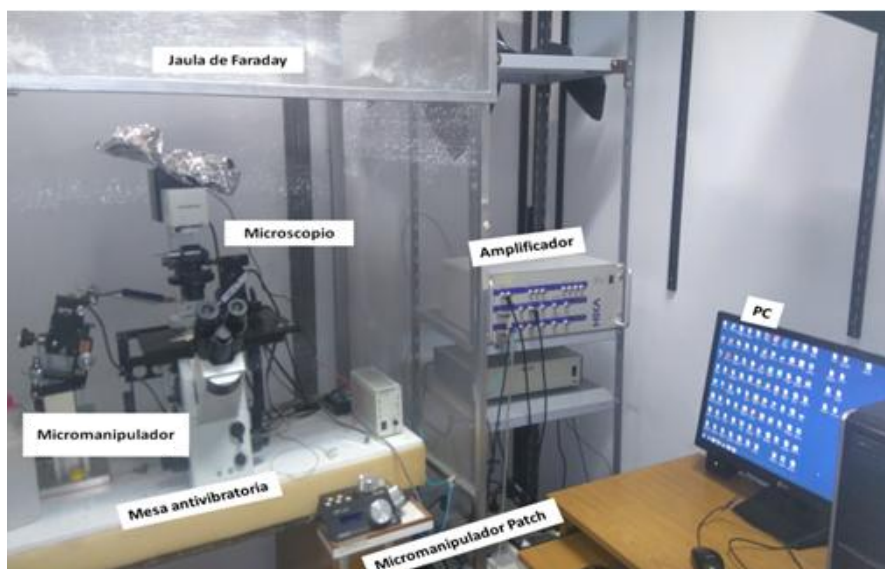


Figura 3.5 - Dispositivo experimental de *patch clamp* utilizado para realizar registros de capacitancia.

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 4 M Ω . Luego se les pulió la punta en una microforja, sometiénolas 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 G Ω .

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 reduce la adsorción agua-vidrio y además aislante. 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) e incluso cambios asociados a tratamientos experimentales en particular. 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 soluble, en nuestro caso D-Glutamato. La capacidad *buffer* de pH del citosol es provista por *HEPES* y la de Ca^{2+} es suplementada por *EGTA*. La solución externa también debe contener aproximadamente las concentraciones fisiológicas del líquido extracelular (Tabla 3.1).

<i>Solución interna</i>	<i>Concentración</i>	<i>Solución externa</i>	<i>Concentración</i>
<i>HEPES</i> , pH 7.2	23 mM	Hepes, pH 7.2	20 mM
Cs-Glutamato	95 mM	Glucosa	30 mM
CsCl	30 mM	CaCl ₂	5 mM
NaCl	8 mM	NaCl	120 mM
MgCl ₂	1 mM	MgCl ₂	4 mM
Cs-EGTA	0,5 mM	TTX	1 μM
Mg-ATP	2 mM		
Li-GTP	0,3 mM		

Tabla 3.1- Soluciones controles utilizadas en los experimentos electrofisiológicos de esta tesis, 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 corriente 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 la corriente de K^+ se reemplazó el K^+ por Cs^+ en la solución intracelular, 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 la corriente de Na^+ se usó 1 μM de tetrodotoxina (TTX) en la solución extracelular.

En un grupo de experimentos se fijó la $[\text{Ca}^{2+}]$ libre en la solución interna en 500 nM. Para esto se agregó una $[\text{Ca}^{2+}]$ total de 383 μM a la solución interna (tabla 3.1) para lograr una $[\text{Ca}^{2+}]$ libre de 500 nM. La $[\text{Ca}^{2+}]$ libre

deseada es función del Ca^{2+} total agregado y de los compuestos con capacidad *buffer* de Ca^{2+} presentes en la solución y fue calculada a partir del programa de acceso libre MAXCHELATOR (Bers y col., 2010) aplicado para dos quelantes (ATP y EGTA) y dos metales (Ca^{2+} y Mg^{2+}), fijado para 25°C y fuerza iónica de 0,156 N (<http://maxchelator.stanford.edu/references.htm>).

En los experimentos en los que se varió la capacidad *buffer* de Ca^{2+} se reemplazó en la solución interna presentada en la tabla 3.1, el EGTA por distintas concentraciones del *buffer* BAPTA (0.5, 1, 2 o 4 mM) modificando a su vez la concentración del Cs-glutamato de manera de mantener constante la osmolaridad en la solución.

3.2.6 Protocolos de estimulación utilizados

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. Todos los protocolos de estimulación involucran la aplicación de una sinusoidal de voltaje a una frecuencia de 800 Hz y una amplitud de ± 30 mV sumada al potencial de *holding*. Se llegó a esta combinación luego de analizar diferentes combinaciones de frecuencia y amplitud, de modo de reducir el ruido de la medición. Dado que por cada ciclo de la sinusoide se obtiene una estimación de la capacitancia, la frecuencia mencionada permite una resolución temporal de un punto cada 1.25 milisegundos en el registro de capacitancia. Los protocolos además involucran una cierta secuencia de despolarizaciones para activar a los canales de Ca^{2+} y en consecuencia disparar la exocitosis. En esta tesis, para estimar la exocitosis asociada al *pool* vesicular IRP, se aplicaron despolarizaciones en forma de pulsos cuadrados de 50 ms desde el potencial de *holding* (-80 mV) hasta +10 mV (figura 3.6A). Por otro lado, para estimar la exocitosis del *pool* vesicular ETAP, se aplicaron despolarizaciones de duración y amplitud similar a un potencial de acción nativo (PA_{sim}). Cada PA_{sim} consistía de una rampa ascendente desde del potencial de *holding* hasta

un potencial de +50 mV en 2.5 milisegundos y luego de una rampa descendente que regresaba al potencial de *holding* en el mismo tiempo (ver figura 3.7A).

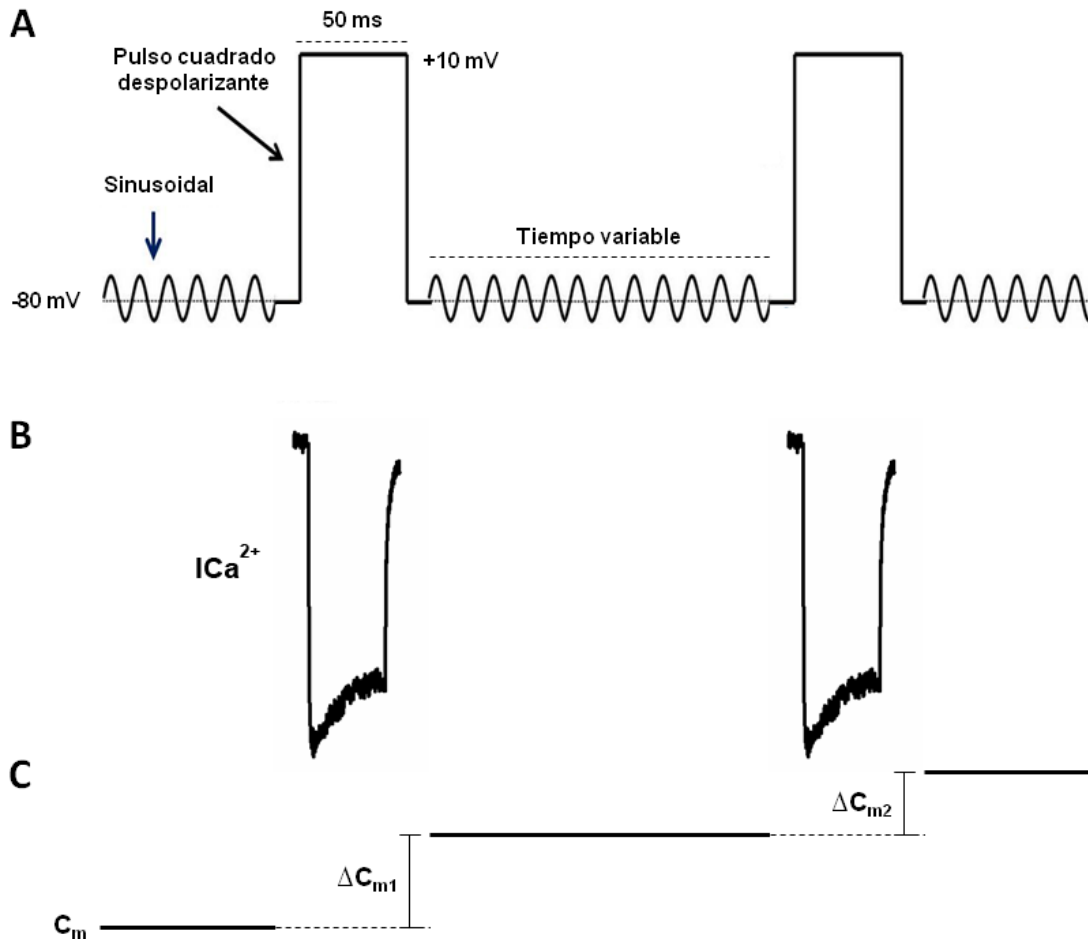


Figura 3.6 - Protocolo de estimulación con pulsos cuadrados. (A) Se inicia con la aplicación del potencial de *holding* sumado a una sinusoidal de 200 ms de duración que permite medir la capacitancia previa al estímulo. El estímulo consta de un incremento instantáneo del voltaje desde el potencial de *holding* (-80 mV) hasta 10 mV durante 50 ms seguido por un descenso instantáneo hasta el potencial de *holding* nuevamente. Luego se mantiene el potencial de *holding* + sinusoidal durante un tiempo variable (0,2; 0,4; 1, 2, 5, 7, 10, 20 y 40 s), se aplica una despolarización cuadrada idéntica a la anterior y finalmente el protocolo termina con 200 ms de aplicación del potencial de *holding* + sinusoidal. La sinusoidal es siempre interrumpida por un periodo de 10 ms antes y después de los estímulos de modo de tener una línea de base para los registros de corriente de Ca^{2+} , que se describen más adelante. Este protocolo se repitió en una misma célula a intervalos de 1 minuto, hasta completar todos los períodos interpulso mencionados. En (B) se representa un ejemplo característico de corrientes registradas en respuesta a los pulsos cuadrados. En (C) se

esquematisa el incremento de capacitancia (ΔC_m) provocado por cada pulso cuadrado, llamando ΔC_{m1} al salto de capacitancia inducido por el primero y ΔC_{m2} al provocado por el segundo.

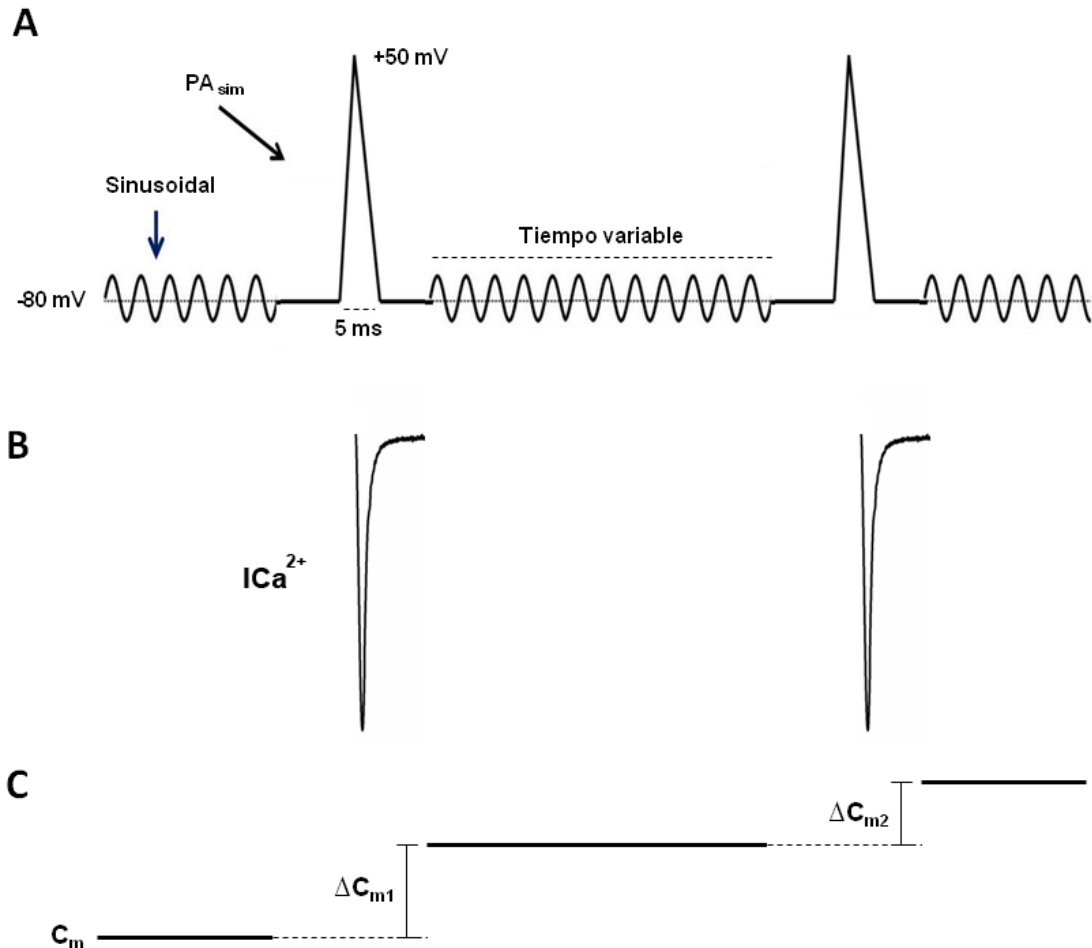


Figura 3.7 - Protocolo de estimulación con PA_{sim}. (A) Se muestra el mismo protocolo utilizado en la figura 3.6 pero reemplazando los pulsos cuadrados por PA_{sim}. El PA_{sim} estuvo formado por una rampa que parte del potencial de holding de -80 mV hasta un potencial de +50 mV en 2.5 milisegundos y que luego vuelve al potencial de holding en el mismo tiempo. Este protocolo se repitió en una misma célula a intervalos de 1 minuto, hasta completar todos los períodos interpulso utilizados (0,2; 0,4; 1, 2, 5, 7, 10, 20 y 40 s). En (B) se representan corrientes características en respuesta a los PA_{sim}. En (C) se esquematiza el incremento de capacitancia (ΔC_m) provocado por cada PA_{sim}, llamando ΔC_{m1} al salto de capacitancia inducido por el primero y ΔC_{m2} al provocado por el segundo.

Con el objetivo de estandarizar los valores obtenidos de las mediciones, todos los ejemplos y promedios de corriente de Ca²⁺, exocitosis y endocitosis

que serán presentados a lo largo de esta tesis, se obtuvieron a partir de registros adquiridos en respuesta al primer estímulo del primer protocolo de doble pulso aplicado sobre cada célula (figura 3.8A). Como se muestra en esta figura, la corriente de Ca^{2+} se calculó como la amplitud (ICa^{2+}) desde la línea de base hasta el pico del registro.

Es importante mencionar que en algunas células, inmediatamente después del pulso despolarizante, notamos la presencia de un pequeño cambio de capacitancia transitorio que decae muy rápidamente, probablemente asociado a las corrientes de *gating* de los canales de Na^+ (Horrigan y col., 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 y col., 1996; Gong y col., 2005). Por lo tanto, para evitar cualquier influencia de este transitorio capacitivo en nuestras mediciones decidimos cuantificar la capacitancia luego de cada estímulo a partir de los 60 ms de finalizada despolarización. En todos los casos se estimó la exocitosis sincrónica a cada estímulo, definida como la diferencia ($\Delta C_m \text{ exo}$) entre el valor de capacitancia posterior al estímulo (C_{mp}) menos el valor de capacitancia anterior al estímulo (C_{ma}) donde $\Delta C_m \text{ exo} = C_{mp} - C_{ma}$ (figuras 3.6C, 3.7C y 3.8 B). Para obtener ΔC_m , tanto C_{mp} como C_{ma} se obtuvieron del promedio de la capacitancia medida en ventanas de 100 ms, posteriores y previas al estímulo respectivamente.

Frecuentemente en nuestros experimentos, inmediatamente luego completada la exocitosis se observó una disminución de la capacitancia de membrana, resultado de un proceso de endocitosis acoplada ($\Delta C_m \text{ endo}$) (figura 3.8B). Dado que para las condiciones experimentales de esta tesis observamos que este proceso de endocitosis se completa (llega a un *plateau*) siempre en un tiempo ≤ 5 s, se calculó $\Delta C_m \text{ endo}$ como la diferencia entre el valor de capacitancia obtenido al finalizar la exocitosis menos el valor de capacitancia luego de 5 s. Al igual que para la medición de $\Delta C_m \text{ exo}$, estos valores de capacitancia se obtuvieron como promedios de una ventana de 100 ms. Como los pares de estímulos con los distintos interpulsos aplicados fueron ordenados aleatoriamente, se produjeron casos en los que no se llegaron a

obtener registros con interpulsos ≥ 5 s, por lo que en dichos experimentos no se pudo calcular ΔC_m endo. Es importante también aclarar que ΔC_m endo se obtuvo siempre a partir de los registros generados por el primer pulso del primer par aplicado en cada experimento cuyo tiempo de interpulso era ≥ 5 s. Para analizar la eficiencia con que la endocitosis recupera la superficie de membrana adicionada por la exocitosis en nuestras condiciones experimentales se calculó para cada medición el cociente endo/exo, que relaciona la amplitud de la exocitosis (ΔC_m exo) y la amplitud de la endocitosis subsecuente (ΔC_m endo) (figura 3.8B). Adicionalmente, para estudiar la cinética del proceso endocítico en cada condición experimental, la caída de la capacitancia de cada medición se ajustó a una función monoexponencial de la forma $Y = A e^{-t/\tau} + Y_0$. Luego se calculó el promedio de las constantes de tiempo τ de los ajustes individuales (τ endo).

Para evaluar la recuperación vesicular de *IRP* o de *ETAP* respectivamente luego que dichos *pools* vesiculares son deprimidos, se utilizaron los protocolos de estimulación que se describen en las figuras 3.6 y 3.7, que estuvieron compuestos de pulsos cuadrados o bien de PA_{sim} organizados de a pares (pulsos pareados). El tiempo entre ambos pulsos es variado durante el experimento entre los valores 0,2; 0,4, 1; 2; 5; 7; 10; 20 o 40 s; los cuales se aplican en un orden aleatorio. El primer pulso (cuadrado o PA_{sim} según el caso) del par libera aproximadamente la totalidad del *pool* en cuestión y el segundo pulso (idéntico al primero) nos indicará el grado de recuperación de dicho *pool* luego del tiempo transcurrido entre ambos. Llamando ΔC_{m1} y ΔC_{m2} a los aumentos en capacitancia inducidos por esas dos despolarizaciones, utilizamos a la relación $\Delta C_{m2}/\Delta C_{m1}$ como un estimador de la recuperación relativa del *pool*.

La recuperación vesicular fue representada como $\Delta C_{m2}/\Delta C_{m1}$ en función del tiempo entre estímulos. Cada curva de recuperación fue ajustada a una función monoexponencial de la forma $Y = Y_0 + A (1 - e^{-t/\tau})$ y también a una función biexponencial de la forma $Y = Y_0 + A_1 (1 - e^{-t/\tau_1}) + A_2 (1 - e^{-t/\tau_2})$. Se seleccionó finalmente por criterios estadísticos cual de las dos funciones representaba el mejor ajuste (ver sección 3.5.5, Estadística).

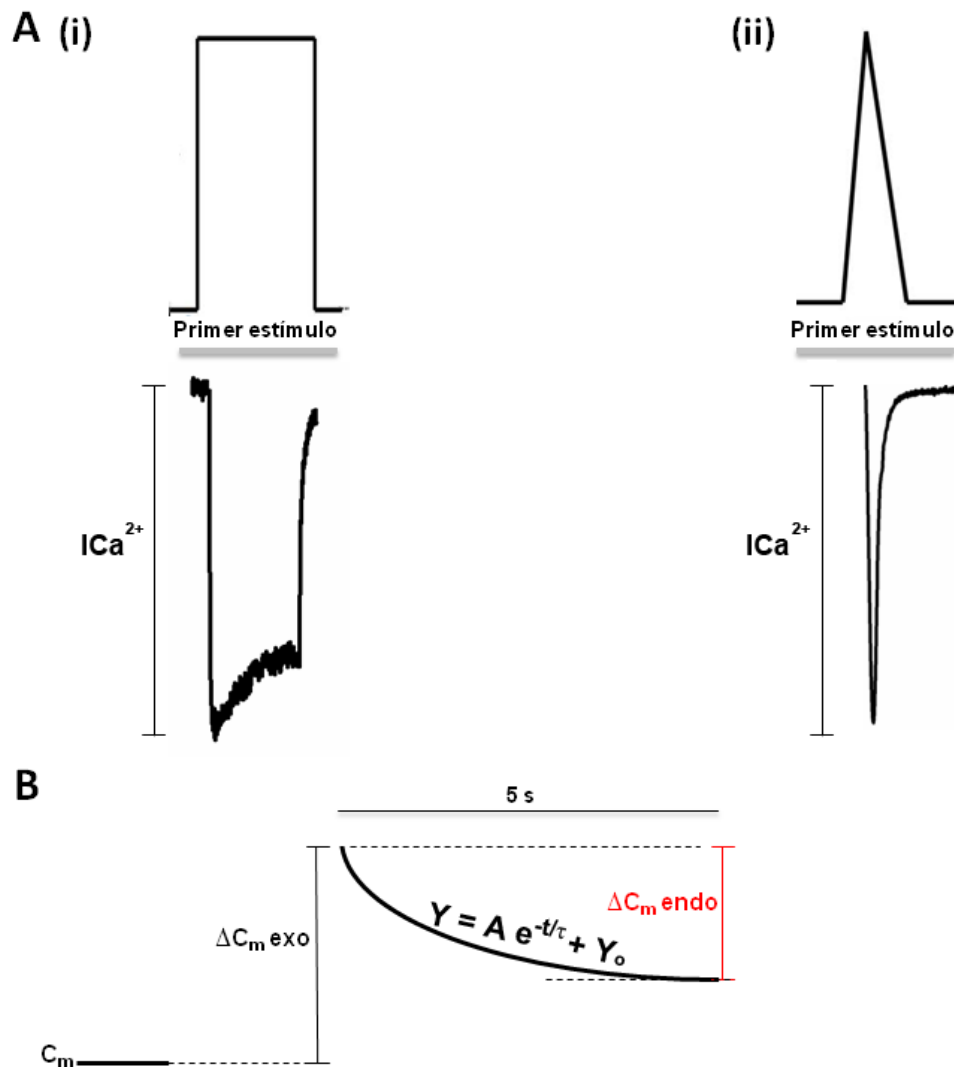


Figura 3.8 - Análisis de la $I_{Ca^{2+}}$, exocitosis y endocitosis. (A) El primer estímulo de los protocolos de doble pulsos descritos en las figuras 3.6 y 3.7 respectivamente fue utilizado para evaluar la corriente de Ca^{2+} , la exocitosis y la endocitosis en cada célula. En (i) y (ii) se observan un pulso cuadrado y un PA_{sim} con sus corrientes de Ca^{2+} asociadas. La amplitud de $I_{Ca^{2+}}$ fue medida desde la línea de base previa hasta el pico del trazado. (B) ΔC_m exo fue calculado como la diferencia entre la capacitancia posterior al estímulo (obtenida de promediar el trazado registrado 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). ΔC_m endo se midió como la diferencia entre el promedio de la capacitancia medida en una ventana de 100 ms luego que la endocitosis llega a su *plateau* (arbitrariamente se utilizaron los 100 ms anteriores a los 5 s de iniciada la endocitosis), menos el promedio de la capacitancia medida en una ventana de 100 ms, partiendo desde los 60 ms después de la primera despolarización. Para estudiar la cinética del proceso endocítico, se ajustó la caída de la capacitancia que se produce luego de la exocitosis (representada por el trazado de C_m posterior a ΔC_m exo) a una función de la forma $Y = A e^{-t/\tau} + Y_0$.

3.3 Técnica de *imaging*: medición del calcio citosólico

libre

3.3.1 Características generales de los indicadores

raciométricos

El Ca^{2+} es un segundo mensajero clave en la regulación de numerosos procesos celulares. En ese sentido, la caracterización de las señales de Ca^{2+} que disparan dichos 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 ratiométricos (o también llamados *dual wavelength*) y no ratiométricos (*single wavelength*). Los indicadores ratiométricos se utilizan para realizar mediciones cuantitativas de las concentraciones de Ca^{2+} , mientras que los no ratiométricos 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 y col., 1985; Minta y col., 1989).

El Fura-2 es un indicador ratiométrico cuyo espectro de excitación se desplaza en función de la $[\text{Ca}^{2+}]$. Esto permite monitorear la concentración de este catión en función de la relación de intensidades de fluorescencia que se registra en respuesta a la excitación con dos longitudes de onda diferentes, λ_1 y λ_2 . Si F_1 es la intensidad de fluorescencia registrada a la longitud de onda de excitación λ_1 y F_2 es la intensidad de fluorescencia registrada a la longitud de onda λ_2 , y definimos $R = F_1/F_2$, entonces la $[\text{Ca}^{2+}]$ libre puede ser calculada con la ecuación $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d [(R - R_{\min})/(R_{\max} - R)] (S_{r2}/S_{b2})$ (Grynkiewicz y col., 1985). Donde K_d es la constante de disociación del indicador, R_{\min} es el valor límite de R cuando todo el indicador está en su forma libre de Ca^{2+} y R_{\max} es el valor límite de R cuando todo el indicador está saturado de Ca^{2+} . Finalmente, el factor S_{r2}/S_{b2} es el cociente entre la intensidad de fluorescencia obtenida cuando todo el indicador está libre de Ca^{2+} sobre la intensidad de fluorescencia cuando todo el indicador está unido a Ca^{2+} , ambas medidas en respuesta a la excitación con λ_2 .

En esta tesis se utilizó *Fura-2* en su forma salina, dializado a la célula a través de la solución interna del microelectrodo. Esto otorga importantes ventajas experimentales en comparación a la forma membrana-permeable de los indicadores (llamada forma éster o AM): particularmente que no se compartimentalice en organelas, y que podamos fijar y conocer de manera precisa su concentración intracelular. La K_d utilizada para *Fura-2*/ Ca^{2+} fue 224 nM (Grynkiewicz y col., 1985).

3.3.2 Dispositivo experimental

El sistema de Ca^{2+} *imaging* consiste por un microscopio modelo BX51WI, con un lente objetivo LUMPlanFI/IR 60X/0.90 W (OLYMPUS), un monocromador (Polychrome V; Till Photonics) utilizando rangos de excitación de 340/10 nm y 380/10 nm, una cámara EMCCD (Andor iXon, Oxford Instruments) controlada por el software "*cell-M System Coordinator/ cell- Real Time controller*". Además se utilizó un cubo de filtro (Chroma 79001 ET-*Fura-2*, Chroma Technology) que permitió la adquisición de imágenes a una longitud de emisión de de 510 nm.

3.3.3 Soluciones utilizadas

- (1) Solución interna para la condición de 0.5 mM de *EGTA* (mM): 95 Cs-Glutamato, 23 HEPES, 30 CsCl, 8 NaCl, 0.1 *Fura-2*, 0.5 Cs-*EGTA*, 2 Mg-ATP, 0.3 Li-GTP.
- (2) Solución interna para la condición de 0.5 mM de *BAPTA*: se reemplaza *EGTA* por la misma concentración de *BAPTA*.
- (3) Solución interna para la condición de 4 mM de *BAPTA*: se reemplaza *EGTA* por 4 mM de *BAPTA*.
- (4) Solución interna libre de Ca^{2+} (para calibración): se reemplaza *EGTA* por 10 mM de *BAPTA*.

(5) Solución externa estándar (mM): 20 HEPES, 30 glucosa, 5 CaCl₂, 120 NaCl, 4 MgCl₂, 1 TTX.

(6) Solución externa libre de Ca²⁺ (para calibración): se reemplaza el CaCl₂ por 10 mM de *BAPTA*.

3.3.4 Protocolo utilizado

Las células fueron colocadas en una cámara de perfusión con solución estándar externa (5), y el foco del microscopio se localizó aproximadamente en el plano ecuatorial de la célula seleccionada. Luego del establecimiento de la configuración *whole cell* las células fueron dializadas por 2-3 min con la solución interna antes de comenzar los registros. Posteriormente se aplicó el protocolo experimental que consistió en la adquisición de imágenes a 340 y 380 nm de excitación a una frecuencia de 5 Hz con un tiempo de exposición de 15 ms por imagen y por un tiempo total de 5 s. Esto permitió obtener a posteriori el coeficiente R (F340-F380) para todo el plano celular registrado.

Para la medición del cociente R en las condiciones de 0.5 mM de *EGTA*, 0.5 mM de *BAPTA* y 4 mM de *BAPTA* se aplicó el protocolo experimental utilizando las soluciones 1, 2 y 3 respectivamente, y en todos los casos la solución 5. Posteriormente en las mismas células se provocó la ruptura de la micropipeta para permitir el ingreso de la solución 5 en el citosol y saturarlo con Ca²⁺. Se repitió el protocolo experimental de modo de poder obtener el cociente R_{máx}. Es importante mencionar que es esta etapa siempre se observa un gran aumento de la fluorescencia celular. Para la medición del cociente R_{min}, para cada condición se aplicó el protocolo en células independientes utilizando las soluciones 4 y 6.

3.4 Técnica de *imaging*: cuantificación del grado de polimerización de la actina

3.4.1 Características generales de los indicadores

Para evaluar el grado de polimerización de la actina cortical se utilizó una sonda de alta afinidad por la actina *Phalloidin-rhodamine*. *Phalloidin* es un péptido bicíclico perteneciente a una familia de toxinas aisladas de la seta venenosa *Amanita phalloides*. Dicho péptido conjugado con el marcador fluorescente *tetramethylrhodamine (rhodamine)* se utiliza frecuentemente en para marcar selectivamente a la actina filamentosa o actina-F. Este fluoróforo es excitado a longitudes de onda centradas en 540 nm y alcanza su emisión máxima a 560 nm. En algunos experimentos se utilizó también *Diamidino-2-phenylindole (DAPI)*, una sonda fluorescente permeable a la membrana que se une selectivamente al surco mayor de la doble cadena de ADN. *DAPI* emite en azul y se utiliza para lograr una eficiente tinción del núcleo. Este fluoróforo presenta un rango de excitación máxima de 350 nm y de absorción máxima de 470 nm.

3.4.2 Protocolo para fijar y marcar las células

Las células se fijaron con 4% de paraformaldehído (*PFA*) y 4% de sacarosa en solución *phosphate-buffered saline (PBS)*. Luego se realizó un primer lavado con *PBS* y se incubaron 10 minutos con 10 mM de *tris(hidroximetil)aminometano (TRIS)* en *PBS* para desactivar la fluorescencia del *PFA*. Posteriormente se realizó un segundo lavado con *PBS* y se incubaron por 10 minutos con *rhodamine-phalloidin* (1 μ M) y *DAPI* (5 μ g/ml) también en *PBS*. Por último, se realizaron 10 lavados con *PBS* para luego aplicar sobre las células el medio de montaje Mowiol®, el cual se endurece a temperatura ambiente luego de 16 horas en oscuridad.

3.4.3 Microscopía Confocal

La adquisición de imágenes se realizó con un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta (OLYMPUS), empleando el objetivo Plan-Apochomat 63X/1.4 Oil DIC (OLYMPUS). Para la observación de *rhodamine-phalloidin* la excitación se realizó a 543 nm y la emisión fue registrada a 560-620 nm; para la observación de *DAPI* la excitación se realizó a 405 nm y la emisión se registró a 430-470 nm. Para la adquisición de imágenes se realizaron z-stacks (planos focales tomados cada 1 μm de distancia a lo largo del eje z), los cuales fueron procesados posteriormente con el software Image-J. Las imágenes confocales fueron analizadas y procesadas usando el programa Image-J (NIH, USA).

3.4.4 Evaluación de la densidad de actina-f en células

permeabilizadas

La digitonina es una saponina obtenida de una planta del género *Digitalis ssp* y es utilizada comúnmente como detergente suave para permeabilizar las membranas plasmáticas (Fan y col. 2017). Para evaluar cómo el Ca^{2+} citosólico libre afecta el grado de polimerización de la actina-F, luego de 24 horas de realizado el protocolo de cultivo (ver sección 3.1.2), las células se permeabilizaron durante 6 minutos con 20 μM de digitonina en la siguiente solución, la cual es similar a la solución interna utilizada en los experimentos de *patch-clamp*, : (en mM) 139 Cs-Glutamato, 33 HEPES (pH 7.2), 30 CsCl, 8 NaCl, 1 MgCl_2 10 Cs-EGTA, 2 Mg-ATP, 0.3 Li-GTP y diferentes concentraciones de Ca^{2+} libre. Para calcular las distintas concentraciones de Ca^{2+} libre (ver tabla 3.2) se utilizó el programa de acceso libre MAXCHELATOR, utilizando un cálculo para dos quelantes (ATP y EGTA) y dos metales (Ca^{2+} y Mg^{2+}), y fijado para 25°C y una fuerza iónica de 0.173N (Schoenmakers, 1992). Se utilizaron como control células del mismo cultivo que no recibieron el protocolo de permeabilización con digitonina. Para las

distintas condiciones las células fueron fijadas y luego marcadas con *phalloidin-rodhamine* como se se explicó previamente. Luego se adquirieron imágenes por microscopía confocal. Las imágenes confocales fueron analizadas y procesadas usando el programa Image-J (NIH, USA) ver sección 3.5.3.

[Ca ²⁺] libre [μM]	[Ca ²⁺] total agregada [μM]
0,01	550
0,1	3700
1	8500
10	9850

Tabla 3.2 - En esta tabla se muestran la [Ca²⁺] total agregada a la solución intracelular para obtener la concentración libre deseada compatible con los *buffers* presentes en la solución interna.

3.4.5 Despolimerización de la actina con cytochalasin D

Cytochalasin D (*Cyto D*) es una toxina fúngica permeable a las células. Este compuesto causa la ruptura de los filamentos de actina y la inhibición de la polimerización de actina. Dado que teníamos como objetivo estudiar el efecto de la despolimerización de la actina-F sobre la endocitosis y la recuperación de *IRP*, primero debíamos confirmar el efecto de *Cyto D* sobre la polimerización de la actina en nuestro preparado. Para esto, después de 24 horas de realizado el protocolo de cultivo (ver sección 3.1.2), las células se incubaron por 10 minutos con *Cyto D* (2 μM) en el mismo medio de cultivo a 37°C y con una atmósfera de 95% O₂ - 5% CO₂. Posteriormente fueron fijadas y marcadas con *phalloidin-rodhamine* y con *DAPI*. Finalmente se adquirieron imágenes por microscopía confocal, las que fueron analizadas y procesadas usando el programa Image-J (NIH, USA), ver sección 3.5.3.

3.5 Análisis de datos y estadística

3.5.1 Procesamiento de los experimentos

electrofisiológicos

Una primera visualización y preanálisis de los experimentos fue realizada con el programa patchmaster (Heka electronics). Posteriormente, los experimentos electrofisiológicos fueron analizados con *Origin 8* (OriginLab, Northhampton, MA) y los parámetros calculados pasados a tablas en *Microsoft Office Excel 2007*. 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 la membrana celular está deteriorada. Los valores de las resistencias en serie variaron en general entre 7 y 10 M Ω . Aquellos experimentos que presentaron resistencias en serie superiores a 12 M Ω fueron descartados de los análisis.

3.5.2 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 (ésta puede adaptarse perfectamente a la célula cromafin, que es redondeada o elíptica). Para cada longitud de onda de excitación se calculó el promedio espacial de fluorescencia en unidades arbitrarias, tomada sobre el plano ecuatorial de la célula completa, al que se le sustrajo el valor de fluorescencia promedio basal o *background*. Para obtener *el background* se utilizó el promedio de tres regiones rectangulares (4.11x1.37 μm) definidas arbitrariamente y siempre ubicadas en los mismos lugares de la periferia que rodea a la célula. Luego se calculó el cociente de intensidad de

fluorescencia $R = F_{340}/F_{380}$ para cada célula, y se aplicó en la ecuación $[Ca^{2+}]_i = K_d [(R - R_{min})/(R_{máx} - R)] (S_{r2}/S_{b2})$ para calcular la $[Ca^{2+}]$ libre.

3.5.3 Análisis de la distribución de actina-f en células permeabilizadas y tratadas con concentraciones variables de calcio

Utilizando el programa *Image J*, se seleccionaron cuatro áreas rectangulares ($4.11 \times 1.37 \mu\text{m}$) equidistantes en la región cortical de la célula. En cada área se calculó promedio espacial de intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias y a dicho valor se le restó el valor de fluorescencia basal o *background* obtenido de un área externa a la célula de las mismas dimensiones (ver figura 3.9). Por último, se obtuvo el valor promedio de la intensidad de fluorescencia de las cuatro áreas (ya restado el *background*) y se lo relativizó respecto de la intensidad de fluorescencia promedio del total de las células control (células del mismo cultivo sin el tratamiento con digitonina). Las áreas siempre se ubicaron en el mismo lugar en cada célula analizada.

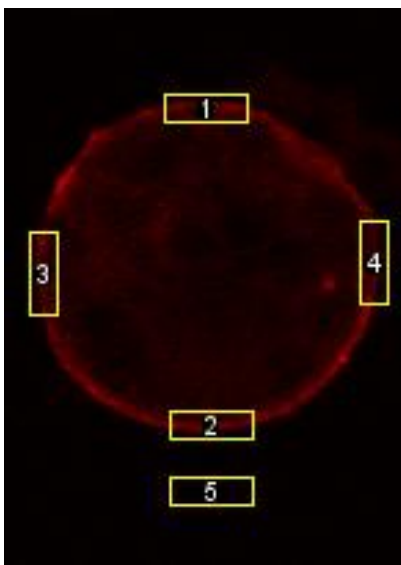


Figura 3.9 - Utilizando el programa *Image J* se seleccionaron cuatro áreas (1-4) en la región cortical de la célula y se calculó la intensidad de fluorescencia promedio de cada área. A la intensidad de fluorescencia de cada área se le restó el valor de fluorescencia basal o *background* obtenido de una región externa a la célula (5). Por último, el promedio de la intensidad de fluorescencia de las cuatro áreas se relativizó a la intensidad de fluorescencia promedio del total de las células control. La imagen se obtuvo a través de microscopía confocal utilizando un objetivo 60x. En rojo se visualiza la tinción de actina- F con *phalloidin rhodamine*. Cada área delimitada por los rectángulos amarillos tiene una dimensión de $4.11 \times 1.37 \mu\text{m}$.

3.5.4 Análisis de la distribución de actina-f en células

tratadas con cytochalasin D

Para estas imágenes también se utilizó el programa *Image J*. La intensidad de fluorescencia total de la célula se calculó utilizando un área circular que delimitaba la superficie de la célula. Para calcular la intensidad de fluorescencia del centro de la célula se delimitó un área circular a una distancia de un micrómetro hacia el interior celular. La intensidad de fluorescencia de la corteza celular se obtuvo de la diferencia entre el valor de fluorescencia total y del centro de la célula.

3.5.5 Estadística

Los resultados experimentales fueron expresados como medias muestrales \pm 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. La elección del tipo de ajuste (monoexponencial o biexponencial) se realizó aunando varios criterios. En primer lugar se compararon los valores de R^2 y Chi cuadrado, evaluando si el modelo biexponencial aumentaba el primero y reducía al segundo de manera apreciable. Posteriormente se aplicó un *test* de Fisher para modelos de ajuste con distinto número de componentes que evalúa la suma de errores residuales cuadrados y el número de grados de libertad de cada modelo. Solamente se seleccionaba modelo biexponencial si estos parámetros estadísticos nos indicaban que el ajuste había sido mejorado, sino se elgía el modelo más sencillo, es decir el monoexponencial. Estos *tests* se realizaron mediante el software Origin 7.5 (Microcal Software, Northhampton, MA) y SigmaPlot 11.0.

3.6 Reactivos

La Poli-L-lisina, citosina-1- β -arabinofuranósido, papaína, albúmina sérica bovina, el ATP, *EGTA*, *BAPTA* y el GTP se adquirieron de Sigma (St Louis, MO, EEUU). El Medio de cultivo Dulbecco (DMEM), suero fetal bovino, la gentamicina, penicilina/estreptomicina, son de GIBCO® (Carlsbad, CA, EEUU). El TTX se adquirió de Alomone Laboratories (Har Hotzvim Hi-Tech Park, Jerusalem, Israel). El anticuerpo monoclonal contra dinamina se adquirió de BD Biosciences (San Jose, CA, EEUU). *Rhodamine phalloidin* y *cytochalasin D* se adquirieron de Thermo Fisher *Scientific* (Massachusetts, EEUU). *Digitonin* se adquirió de Merck (Darmstadt, Alemania). Fura-2 es de Invitrogen (St Louis, MO, EEUU).

4. RESULTADOS

4.1 Características de IRP

4.1.1 Estimación de IRP

Clásicamente, un modo de estudiar las características de los *pool*s vesiculares presentes en células cromafines, en otras células neuroendócrinas y en neuronas ha sido mediante el análisis de la respuesta exocitótica a pulsos de duración variable. Conceptualmente un *pool* vesicular único se deprime de manera monoexponencial, con lo cual se espera que, a determinados valores de duración del estímulo, el *pool* en cuestión se libere completamente alcanzando un *plateau* en la respuesta exocitótica. Dicho *plateau* se utiliza como una estimación del tamaño del *pool* y la constante de tiempo o su inversa como una medida de la velocidad con la cual el *pool* se deprime. La exocitosis del IRP en células cromafines se caracteriza por estar asociada a el aumento de la capacitancia celular (ΔC_m exo) que se satura cuando se aplican despolarizaciones cuadradas de duración menor a 100 ms, (Horrigan y Bookman, 1994; Moser y Neher, 1997; Voets y col., 1999; Marengo y col., 2005). En nuestro laboratorio, trabajando en células cromafines de ratón, demostramos que, frente a la aplicación de despolarizaciones cuadradas de duración variable, la exocitosis del IRP seguía un comportamiento exponencial de primer orden, con una constante de tiempo de aproximadamente 16 s y saturándose prácticamente con pulsos de 50 ms (Alvarez y col., 2013).

En la figura 4.1A ii y iii se muestran trazados representativos de corrientes de Ca^{2+} ($I_{Ca^{2+}}$) y de saltos de capacitancia asociados a exocitosis (ΔC_m exo), provocados por pulsos de 50 ms aplicados en forma pareada particularmente con una separación entre ellos de 5 s (figura 4.1 (i)). Estos experimentos se realizaron en la condición control que utilizamos clásicamente en nuestro laboratorio (5 mM de Ca^{2+} extracelular y 0.5 mM de EGTA intracelular). Como se explicó en sección de Materiales y Métodos, este tipo de protocolo se utiliza para estimar la cinética de recuperación de IRP (ver sección 3.2.6 figura 3.6A). Es preciso recordar (ver Materiales y Métodos sección 3.2.6,

figura 3.8) que los valores promedios de ΔC_m exo, ICa^{2+} , ΔC_m endo, exo/endo y τ endo que serán informados a lo largo de este trabajo se obtuvieron siempre a partir de los registros generados por el primer pulso del primer par aplicado en cada experimento. En este trabajo de Tesis, la aplicación de un pulso cuadrado de 50 ms en condición control indujo una (ICa^{2+}) de 163 ± 19 pA y un ΔC_m exo de 21 ± 2 fF ($n=28$; ver barras control en figuras 4.2B i y ii), valores que son coherentes con resultados previos de nuestro laboratorio (Moya-Díaz y col., 2016; ver Discusión, sección 5.1.1).

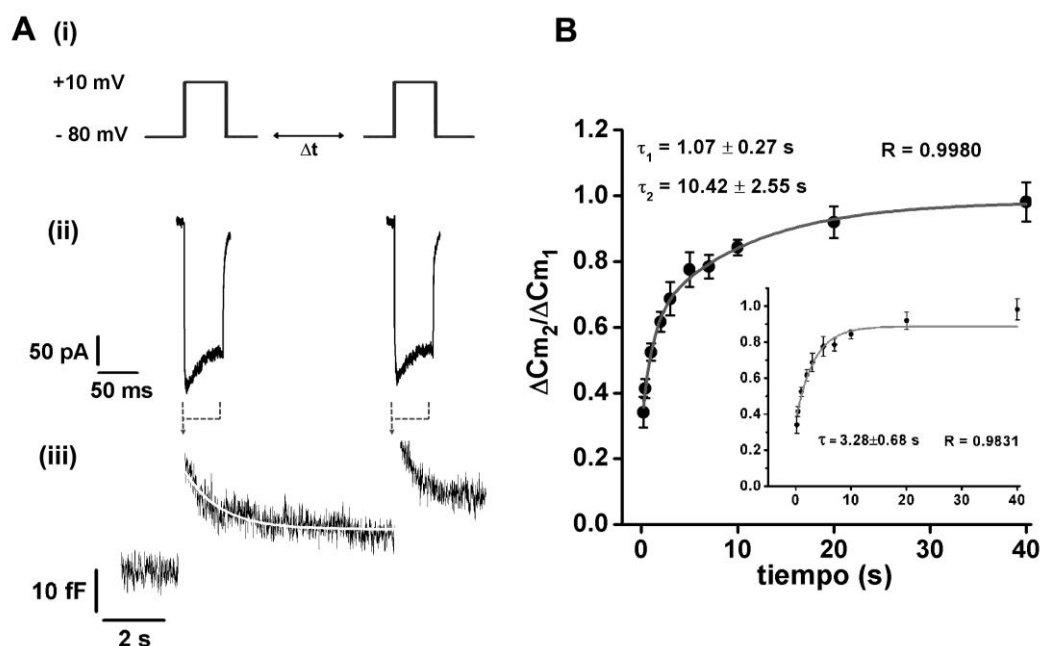


Figura 4.1 - (A) Exocitosis sincrónica y ICa^{2+} en respuesta al protocolo de estimulación. (i) El protocolo consiste en 2 pulsos separados por un tiempo variable: 0,2; 0,4; 1; 2; 3; 5; 7; 10; 20 y 40 s. Cada estímulo estuvo compuesto por una despolarización de 50 ms desde el potencial de holding (-80 mV) hasta +10 mV. (ii) y (iii) son ejemplos representativos de las ICa^{2+} y los saltos de capacitancia inducidos por cada estímulo en un experimento donde se aplicó una separación entre pulsos de 5 s. El registro de la medición de capacitancia está en una escala temporal distinta. En (iii) la línea blanca superpuesta al trazado de capacitancia representa el ajuste con una función de la forma $Y = A e^{-t/\tau} + Y_0$ de la caída de la capacitancia representativa de la endocitosis. (B) Recuperación de *IRP*. La recuperación relativa de *IRP* (expresada como $\Delta C_m2 / \Delta C_m1$; donde ΔC_m1 y ΔC_m2 representan los cambios de capacitancia inducidos por el primer y segundo estímulos, respectivamente) fueron graficados en relación al intervalo de tiempo entre estímulos. Cada punto representa el promedio de las mediciones obtenidas en células independientes ($n = 9 - 21$). Los valores promedios fueron ajustados a una

función de crecimiento biexponencial de la forma $Y = Y_0 + A_1 (1 - e^{-t/\tau_1}) + A_2 (1 - e^{-t/\tau_2})$. El parámetro Y_0 representa el valor de Y a tiempo cero, A_1 y A_2 son los valores de las asíntotas, cuya suma más Y_0 representa el valor de Y para un tiempo infinito entre pulsos. Finalmente τ_1 y τ_2 , son las constantes temporales. El inserto bajo la curva muestra los valores promedios pero ajustados a una función de crecimiento monoexponencial de la forma $Y = Y_0 + A (1 - e^{-t/\tau})$.

4.1.2 Endocitosis acoplada a la exocitosis de IRP

Frente a una despolarización que genera exocitosis, la presencia de endocitosis se observa como una posterior disminución de la capacitancia celular (ΔC_m endo) (Engisch y col. 1998). En nuestros experimentos se observó que la aplicación de un pulso cuadrado de 50 ms en condición control produce, luego del aumento en la capacitancia celular, una clara disminución en esta misma variable que no llega a compensar totalmente la exocitosis previa. En la figura 4.1A-iii se muestra un ejemplo representativo de un trazado de capacitancia con este comportamiento. Se puede observar que luego del aumento de capacitancia inducido por el primer pulso cuadrado hay una clara disminución monotónica que se completa alcanzando un *plateau*, representativa de un proceso endocítico. Hay que aclarar (ver Materiales y Métodos, sección 3.2.6) que las estimaciones de endocitosis se obtuvieron siempre a partir del primer pulso del primer par aplicado en cada experimento con una duración entre estímulos mayor o igual a 5 s. Esto se realizó de este modo para obtener una confiable estimación de la amplitud y cinética de la endocitosis, la cual se completa en ese período. La ΔC_m endo promedio fue de $8,5 \pm 1,6$ fF ($n=21$) (ver barra control en la figura 4.2B-iii). La cinética de decaimiento de la capacitancia se evaluó aplicando un ajuste monoexponencial decreciente sobre cada experimento (ver línea blanca en la figura 4.1A-iii) (Moya-Díaz y col., 2016). El valor de la constante de tiempo de decaimiento (τ endo) de este proceso fue de $1,23 \pm 0,18$ s ($n=12$). Para analizar la eficiencia con que la endocitosis recupera la superficie de membrana adicionada por la exocitosis en nuestras condiciones experimentales se calculó para cada medición el cociente endo/exo, que relaciona la amplitud de la exocitosis (exo) y la amplitud de la endocitosis subsecuente (endo) (ver Materiales y Métodos,

sección 3.2.6), obteniéndose un valor promedio de $0,45 \pm 0,06$ ($n=21$) (control en figura 4.2B-iv).

4.1.3 Recuperación de IRP

Otra característica importante asociada a un *pool* vesicular es su velocidad de recuperación luego de haber sido excitado. Esta variable es importante porque está íntimamente relacionada con la frecuencia de estímulos a la que el *pool* es capaz de responder, lo cual tiene claras implicancias fisiológicas. Para estudiar la recuperación de *IRP* en función del tiempo se utilizó el protocolo representado en la figura 4.1A-i, que como se describe en el texto de la figura, consiste en la aplicación de un par de pulsos despolarizantes de 50 ms separados por un tiempo variable. El primer pulso, libera aproximadamente la totalidad de *IRP*. Por otro lado, la exocitosis inducida por el segundo pulso nos indicará el grado de recuperación de este *pool*, utilizando la exocitosis resultante del primer estímulo como referencia. Llamando ΔC_{m1} y ΔC_{m2} a los aumentos en capacitancia inducidos por esas despolarizaciones, utilizamos a la relación $\Delta C_{m2}/\Delta C_{m1}$ como estimador de la recuperación. Este protocolo de estimulación de doble pulso será utilizado a lo largo de esta tesis para evaluar la recuperación vesicular del *pool*, para las distintas condiciones experimentales. Es importante remarcar que a diferencia de trabajos anteriores (Moser y Neher, 1997; Moya-Díaz y col., 2016) incluimos en nuestro experimento intervalos de tiempo menores a 2 s. Esto se debe a que a partir de los resultados obtenidos para una publicación previa de nuestro laboratorio (Moya-Díaz y col., 2016), planteamos la hipótesis de que la recuperación de *IRP* está constituida por un componente lento que tarda 20-30 s en completarse como indican esos trabajos previos, pero también de uno rápido que se completa en 2-3 s. Estas evidencias previas son: (i) dentro de *IRP* hay un componente exocítico (*ETAP*, por *exocytosis triggered by action potencial*) que en forma aislada se recupera con un tiempo característico de aproximadamente 0,7 s (Moya-Díaz y col., 2016) y (ii) si ajustamos la recuperación de *IRP* obtenida en trabajos anteriores a dos componentes,

fijando el componente rápido asociado a *ETAP*, el ajuste mejora respecto al monoexponencial (datos no publicados).

En la figura 4.1A-ii están representados los registros de ICa^{2+} obtenidos de uno de los experimentos en el que se utilizó un tiempo entre estímulos de 5 s. Una condición importante para la utilización de este tipo de protocolo es que la segunda despolarización genere la misma corriente de Ca^{2+} que la primera. Se puede ver en el registro de la figura que las dos corrientes son similares, y para la totalidad de la muestra los promedios de ambas corrientes no fueron significativamente diferentes $I_1Ca^{2+} = 163 \pm 19$ pA y $I_2Ca^{2+} = 157 \pm 18$ pA (*test de Student* para muestras dependientes; $n=28$). La figura 4.1A-iii muestra los trazados de capacitancia correspondientes a dicho ejemplo, donde puede observarse que luego de 5 s la exocitosis se recuperó parcialmente.

En la figura 4.1B se muestran los promedios de la relación $\Delta C_{m2}/\Delta C_{m1}$ (círculos negros), para tiempos entre 0,2 y 40 s donde se observa un comportamiento creciente, con un valor asintótico que se aproxima a 1. La curva experimental fue ajustada con una función biexponencial de la forma $Y = Y_0 + A_1 (1 - e^{-t/\tau_1}) + A_2 (1 - e^{-t/\tau_2})$. Las constantes de tiempo de esta curva fueron $\tau_1 = 1,07 \pm 0,27$ s y $\tau_2 = 10,42 \pm 2,55$ s, con valores para A_1 y A_2 de $0,32 \pm 0,04$ y $0,37 \pm 0,04$ respectivamente, mientras que Y_0 tuvo un valor de $0,30 \pm 0,02$. El valor de Y_0 mayor a cero puede deberse a que un pulso de 50 ms no deprime totalmente a *IRP*, dejando un cierto remanente, o que a tiempos cortos entre pulsos el Ca^{2+} que ingresa en la segunda estimulación se suma a un Ca^{2+} residual resultante de la primera, generando mayor liberación.

Inicialmente los valores de recuperación para los distintos tiempos fueron ajustados a una función monoexponencial de la forma $Y = Y_0 + A (1 - e^{-t/\tau})$, lo cual está representado por el gráfico incluido en el inserto de la figura 4.1B. Puede observarse que el ajuste monoexponencial ignora los puntos obtenidos con intervalos de 0,2, 20 y 40 s, tendiendo a promediar al componente rápido y lento en uno de velocidad intermedia ($\tau = 3,28 \pm 0,68$ s), el cual es aproximadamente la mitad del obtenido previamente por nosotros y otros autores para *IRP* (Moser y Neher 1997; Moya-Díaz y col., 2016). Esto probablemente se deba a que en esos trabajos no se incluyeron en el experimento intervalos entre estímulos inferiores a 2 s, ignorando seguramente

la presencia del componente rápido que tiene un tiempo característico de sólo 1 s, y por lo tanto ajustando solamente los puntos correspondientes fundamentalmente al componente lento. Finalmente, convalidamos también la elección del ajuste biexponencial por medio de un *test* de Fisher que permite comparar diferentes modelos de ajuste (paquete de Origin) evaluando la suma de errores residuales cuadrados y el número de grados de libertad de cada modelo, resultando en que el modelo biexponencial mejora la calidad del ajuste con un $p < 0.002$. Esto es además coincidente con un aumento de R^2 de 0,9665 a 0,9960 y de la reducción de Chi cuadrado de 1,05363 a 0,12243 para los modelos mono y biexponencial respectivamente. La respuesta bifásica obtenida podría ser el resultado de dos procesos recuperación vesicular que utilizan diferentes mecanismos.

4.2 Efectos de la concentración del calcio citosólico sobre la recuperación de *IRP*

El comportamiento bifásico observado en la recuperación de *IRP* sugiere que dicho proceso es dependiente de al menos dos mecanismos. La movilización de vesículas desde *pools* río arriba es un mecanismo planteado clásicamente para explicar la recuperación de *RRP* e *IRP* (Voets y col., 1999; Marengo y col., 2005). Este mecanismo es estimulado por concentraciones de Ca^{2+} citosólico moderadamente elevadas ($< 1 \mu M$, Heinemann y col, 1993) y sostenidas en el tiempo luego del estímulo. Por otro lado, resultados de nuestro laboratorio demostraron que una fracción de *IRP* que es excitada en respuesta a un estímulo que posee una forma y duración similar a un potencial de acción (PA_{sim}) se recupera rápidamente a través de un mecanismo asociado a una endocitosis rápida dependiente de dinamina (Moya-Díaz y col., 2016). Como el PA_{sim} es un estímulo muy breve (5 ms), dicha fracción de *IRP* debería ser liberada en principio por señales transitorias de Ca^{2+} localizadas alrededor de los *CCVD*, pero que no generan significativos aumentos en el Ca^{2+} citosólico global. En esta sección nuestro interés se dirigió a estudiar cómo afecta el cambio en la $[Ca^{2+}]$ citosólico a la endocitosis y a la cinética de la recuperación

vesicular de *IRP*. Nuestra hipótesis de trabajo es que la recuperación de *IRP* depende de al menos dos mecanismos que son afectados diferencialmente por el Ca^{2+} citosólico.

4.2.1 Efectos del aumento de la concentración basal del calcio citosólico sobre *IRP*

Está demostrado desde hace más de dos décadas que el aumento del Ca^{2+} citosólico basal a valores $<1 \mu\text{M}$ (como el Ca^{2+} residual que queda luego de una estimulación intensa) facilita la movilización de vesículas hacia el *RRP* y el *IRP* (Heinemann y col, 1993; Voets y col, 1999). Para reproducir una situación similar, se dializó el medio intracelular desde la pipeta de *patch* con una solución interna con $[\text{Ca}^{2+}]$ libre de 500 nM en *EGTA* 0.5 mM. La $[\text{Ca}^{2+}]$ total introducida en la pipeta fue calculada teniendo en cuenta la concentración y propiedades cinéticas del *EGTA* y de otros componentes de la solución interna que unen a dicho catión, de forma que el Ca^{2+} libre sea el deseado (ver en la sección 3.2.5 de Materiales y Métodos).

El aumento de la concentración de calcio citosólico no modifica la exocitosis de *IRP*

En esta sección de la tesis se estudió el efecto del aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico basal sobre la exocitosis inducida por pulsos despolarizantes de 50 ms. Se utilizó el protocolo de doble pulso para poder analizar luego la recuperación de la exocitosis en esta condición experimental (ver más adelante efecto del aumento de Ca^{2+} citosólico basal sobre la velocidad de recuperación de *IRP*).

En la figura 4.2A se muestra un ejemplo representativo de un trazado de capacitancia para la condición de 500 nM de Ca^{2+} libre intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ 500 nM), donde se pueden observar los ΔC_m exo provocados por pulsos de 50 ms aplicados en forma pareada y separados por un intervalo de 5 s. Los promedios de las corrientes generadas por cada pulso del par no fueron significativamente

diferentes entre sí: $I_1Ca^{2+} = 100.14 \pm 14.06$ pA y $I_2Ca^{2+} = 90.71 \pm 13.00$ pA; $n=22$). Las figuras 4.2B i y ii comparan los promedios de la ICa^{2+} y del ΔC_m exo obtenidas en $[Ca^{2+}]_i$ 500 nM con la condición control descrita en la sección previa. El aumento de Ca^{2+} citosólico generó una disminución significativa en la ICa^{2+} pero no modificó la exocitosis de *IRP*. Existen evidencias de que el aumento en el Ca^{2+} citosólico estimula la aproximación de las vesículas hacia los canales de Ca^{2+} , aumentando el tamaño de *IRP* (Becherer y col., 2003; Marengo y col., 2005, Alvarez y col., 2011). Sin embargo, también está claramente establecido que el efecto del Ca^{2+} es en realidad bifásico, debido a que una concentración citosólica alta de este catión también promueve exocitosis espontánea y vaciamiento de los *pools* vesiculares (Mathias Pasche y col., 2012). Además, se debe notar que el aumento de Ca^{2+} citosólico a 500 nM generó una disminución significativa en la ICa^{2+} , probablemente por favorecer la inactivación de los CCVD (K. Lee y col., 1985; A. Lee y col., 1999), lo cual tiene evidentemente un efecto negativo sobre la exocitosis. Por lo tanto, es probable que la acción de estos efectos en simultáneo (aumento de la transferencia de vesículas a *IRP*, vaciamiento espontáneo del *pool* y menor ICa^{2+}) sean la explicación de porqué no se observó un aumento significativo de la exocitosis en la condición de $[Ca^{2+}]_i$ 500 nM (ver Discusión, sección 5.2.1).

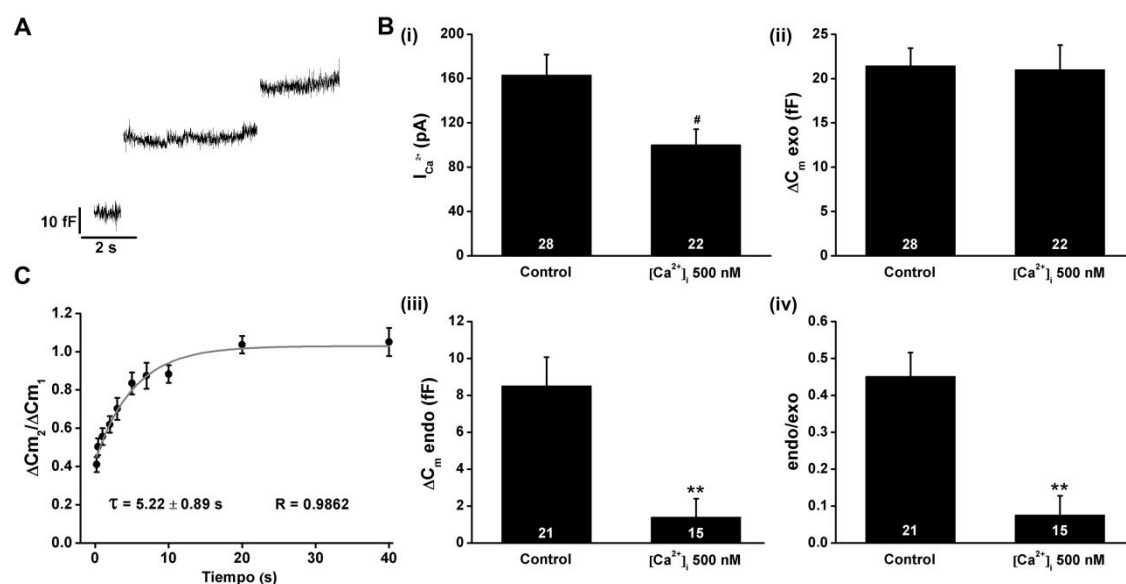


Figura 4.2 - Efecto del aumento de calcio citosólico sobre la exocitosis de *IRP*. (A) Trazado típico de capacitancia de membrana obtenido en la condición de $[Ca^{2+}]_i$ 500 nM y en

respuesta a una estimulación pareada. Cada estímulo estuvo compuesto por una despolarización de 50 ms desde el potencial de *holding* (-80 mV) hasta +10 mV, separados en este caso por 5 s. Notar que luego de los ΔC_m exo provocados por ambas despolarizaciones no se observa una caída de la capacitancia (representativa de la endocitosis). Notar también que el segundo ΔC_m exo es menor que el primero mostrando una recuperación parcial de la exocitosis. (B) Gráficos de barras representando la ICa^{2+} (i), ΔC_m exo (ii), ΔC_m endo (iii) y la relación endo/exo (iv) en respuesta al primer pulso cuadrado despolarizante de 50 ms del protocolo de estimulación. El aumento de Ca^{2+} citosólico generó una disminución significativa en la amplitud de la endocitosis y del cociente endo/exo. Test de *Student* para dos muestras independientes: ** $p < 0,01$; # $p < 0,001$. El número de células evaluadas (n) se representa en cada columna como números en blanco. (C) Recuperación de *IRP* con $[Ca^{2+}]_i$ 500 nM. La recuperación relativa (expresada como $\Delta C_{m2}/\Delta C_{m1}$) fue graficada en relación al intervalo de tiempo entre estímulos. Cada punto representa el promedio de las mediciones obtenidas en células independientes a los diferentes intervalos: 0,2 s (n=15); 0,4 s (n=17); 1 s (n=13); 2 s (n=15); 3 s (n=13); 5 s (n=10); 7 s (n=11); 10 s (n=10); 20 s (n=6) y 40 s (n=10). Los valores promedios fueron ajustados a una función de crecimiento monoexponencial de la forma $Y = Y_0 + A(1 - e^{-t/\tau})$. El "n" de las barras que representan parámetros asociados a la endocitosis son menores a los de exocitosis debido a que no en todos los experimentos se obtuvieron registros con intervalos entre estímulos ≥ 5 s, necesarios para tener una estimación completa de ΔC_m endo.

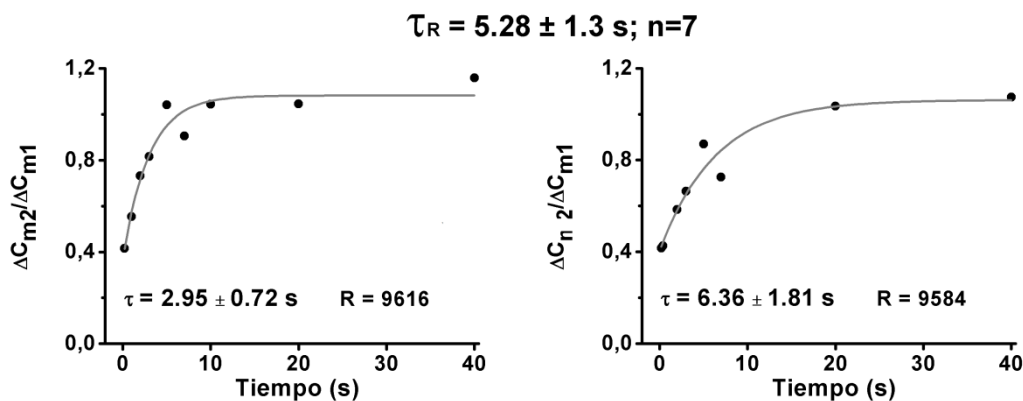


Figura 4.3 - Gráficos de recuperación para dos células independientes en la condición de $[Ca^{2+}]_i$ 500 nM. Igual que en la figura anterior, los puntos fueron ajustados a una función de crecimiento monoexponencial de la forma $Y = Y_0 + A(1 - e^{-t/\tau})$. De los ajustes realizados a 7 células se obtuvo una constante temporal de recuperación promedio (τ_R) de 5.28 ± 1.3 s. Dicho valor fue similar al observado para el ajuste de la curva donde se incluyen los promedios de todas las células (figura 4.2C).

El aumento de calcio citosólico basal inhibe la endocitosis en respuesta a un pulso de 50 ms

El trazado representado en la figura 4.2A muestra que en condiciones de $[Ca^{2+}]_i$ 500 nM no se desarrolla endocitosis posteriormente a la exocitosis inducida por un pulso cuadrado de 50 ms. Las figuras 4.2B iii y iv resumen los resultados obtenidos en los experimentos realizados en la condición control (sin agregar Ca^{2+} al medio interno, ver Figura 4.1) y el tratamiento con $[Ca^{2+}]_i$ 500 nM para la amplitud de la endocitosis y el cociente endo/exo. Tanto la amplitud de la endocitosis como el cociente endo/exo disminuyeron significativamente con respecto al control (n=18). Del total de células analizadas solo tres mostraron una respuesta apreciable de endocitosis.

Efecto del aumento de calcio citosólico basal sobre la velocidad de recuperación de IRP

Para evaluar si el aumento de Ca^{2+} intracelular podría afectar la velocidad de recuperación del *IRP* se analizaron los resultados obtenidos a partir de la aplicación del protocolo de doble pulso, en presencia de Ca^{2+} 500 nM. En el trazado de la figura 4.2A se puede observar que una segunda estimulación aplicada a 5 s de la primera indujo una exocitosis claramente inferior, lo que implica que la recuperación sólo se llevó a cabo parcialmente. En la figura 4.2C están representados los promedios de recuperación relativa de *IRP* ($\Delta C_{m2}/\Delta C_{m1}$) para los distintos intervalos de tiempo entre estímulos, que van desde 0,2 s hasta 40 s. Los promedios experimentales fueron ajustados a función monoexponencial de la forma $Y = Y_0 + A (1 - e^{-t/\tau})$. La constante de tiempo de esta curva fue de $\tau = 5,22 \pm 0,89$ s con valor para la asíntota de A de $0,60 \pm 0,04$ mientras que Y_0 tuvo un valor de $0,43 \pm 0,02$ ($R^2 = 0,97262$, Chi cuadrado = 0,58705). Es importante aclarar que inicialmente los datos experimentales fueron ajustados a una función biexponencial de la forma $Y = Y_0 + A_1 (1 - e^{-t/\tau_1}) + A_2 (1 - e^{-t/\tau_2})$ como se realizó en la sección 4.1 para los datos controles. Sin embargo, esto no mejoró el ajuste significativamente ($R^2 = 0,97546$, Chi cuadrado = 0,52621, y de la aplicación del *test* de Fisher se obtuvo un $p > 0,3280$) por lo que la aplicación del modelo monoexponencial

resulta más apropiada por ser el más sencillo. Además se debe notar que, a diferencia de lo obtenido en condiciones controles, el ajuste monoexponencial atraviesa o pasa muy próximo a todos los puntos experimentales promedio sin evidenciarse rachas evidentes que sugieran la presencia de otro componente. En consecuencia, concluimos que en condiciones de $[Ca^{2+}]_i$ 500 nM la recuperación de *IRP* se lleva a cabo por un proceso monoexponencial con un tiempo característico de varios segundos.

De modo de confirmar la cinética de recuperación de *IRP* plateada en el párrafo anterior se aplicó un ajuste monoexponencial a las curvas de recuperación obtenidas para cada célula. Para esto, se seleccionaron sólo los experimentos en los cuales se obtuvieron registros para más de 5 tiempos de recuperación planificados en el experimento, distribuidos homogéneamente a través de la curva y cuyo R de ajuste fue mayor a 0,89. En la figura 4.3 se representan ejemplos de ajustes de dos experimentos individuales. Posteriormente a la realización de los ajustes, se promediaron las constantes temporales obtenidas, en donde (τ_R) indica la constante temporal de recuperación promedio. Se puede observar que el valor de dicha constante es muy similar al calculado a partir del ajuste de la curva promedio.

Los resultados obtenidos en esta sección muestran que, el aumento del Ca^{2+} citosólico, provoca la desaparición de la endocitosis rápida previamente observada luego de la exocitosis de *IRP* en condición control (ver sección 4.1.2). Sumado a esto, el análisis de la recuperación de *IRP* indica que uno de los componentes observado en condición control es abolido por el aumento de Ca^{2+} citosólico. A partir de esto planteamos la hipótesis de que existiría un proceso de recuperación independiente de la endocitosis rápida acoplada a la exocitosis. Este proceso de recuperación sería el que se manifiesta en forma aislada cuando se aumenta el Ca^{2+} citosólico a 500 nM. Por otro lado, existiría un proceso de recuperación que coexiste con una endocitosis rápida que se activa inmediatamente luego de la exocitosis. En las próximas secciones analizaremos el efecto del aumento de la capacidad *buffer* de Ca^{2+} citosólico de modo de reducir el Ca^{2+} citosólico. Postulamos en primera instancia que a la inversa de lo observado en esta sección, este tratamiento podría favorecer a la

endocitosis rápida. A posteriori también analizaremos su efecto sobre la recuperación de la exocitosis.

4.2.2 Efectos del aumento de la capacidad buffer citosólica de calcio sobre la endocitosis y la recuperación de IRP

Los resultados de la sección 4.2.1 mostraron que el aumento del Ca^{2+} citosólico basal a 500 nM provocó la desaparición conjunta de la endocitosis rápida y de uno de los componentes de recuperación de *IRP*, los cuales se producían en respuesta a una despolarización de 50 ms aplicada en nuestra condición control. Una interpretación razonable para dicha coincidencia es que esta endocitosis sea una etapa asociada directamente a ese componente de recuperación y que ambos procesos se vean impedidos por algún motivo cuando es aumentada la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico. El efecto del Ca^{2+} sobre la endocitosis es un tema discutido, mientras que varios autores mostraron que el aumento de Ca^{2+} favorece la endocitosis, otros reportaron efectos inhibitorios sobre ciertos tipos de endocitosis (von Gersdorff y Matthews, 1994; Artalejo y col, 1995; Wu y Wu; 2014b). En esta sección, en primer lugar, se analizará el efecto del agregado del *buffer* rápido *BAPTA* en reemplazo de *EGTA* (a concentración equimolar), sobre la endocitosis y la recuperación vesicular de *IRP*. *BAPTA* tiene una tasa para ligarse al Ca^{2+} entre 50-160 veces mayor que el *EGTA*, sin embargo, ambos tienen un K_d similar con valores entre 0,1-0,22 (Naraghi y Neher, 1997; Kits y col., 1999; Segura y col., 2000). Por sus características, el *BAPTA* agregado en la solución intracelular es capaz de ligar al Ca^{2+} entrante en tiempos muy breves luego de su ingreso al citosol, disminuyendo la $[\text{Ca}^{2+}]$ libre en una región muy próxima a los canales. Como en el caso del *EGTA*, el *BAPTA* es agregado al medio intracelular desde la pipeta de *patch* (ver Materiales y Métodos, sección 3.2.5). En segundo lugar, se analizará el efecto de la variación de la concentración de *BAPTA* (0,5; 1; 2 y 4

mM), de modo de aumentar la capacidad *buffer* citosólica y reducir el Ca^{2+} basal.

Comparación del efecto de EGTA y BAPTA sobre la exocitosis de IRP y la endocitosis asociada.

Primero se compararon los efectos de *BAPTA* y *EGTA* agregados a la solución interna a concentraciones equimolares de 0.5 mM sobre ICa^{2+} , ΔC_m exo, ΔC_m endo, endo/exo y τ endo desarrolladas luego de un estímulo de 50 ms (tabla 4.1). No se observaron diferencias significativas entre los valores de ninguna de las variables comparadas. En base a resultados previos de nuestro grupo esperábamos una moderada disminución de ΔC_m exo (Álvarez y col, 2013). En esta serie de experimentos, sin embargo, se observó una tenue tendencia de la exocitosis a disminuir, pero no alcanzó niveles significativos. Respecto a esto, se debe tener en cuenta que, en dicho trabajo previo, la disminución de la exocitosis al utilizar 0.5 mM de *BAPTA* en vez de *EGTA* en concentraciones equimolares, resultó mucho más marcado para despolarizaciones más cortas, mientras que para pulsos cuadrados de 50 ms se observó una caída de sólo un 30% (Álvarez y col, 2013). Estos resultados sugieren que el Ca^{2+} localizado próximo a los canales (que es más sensible al *BAPTA* que al *EGTA*) no sería el responsable de modular a la endocitosis rápida. Por el contrario, y de acuerdo a los resultados de la sección previa, esta endocitosis parecería dependiente de los niveles citosólicos basales de Ca^{2+} .

[Buffer]_i 0,5 mM	ICa^{2+} (pA)	ΔC_m exo (fF)	ΔC_m endo (fF)	endo/exo	τ endo (s)
<i>EGTA</i>	166±26 (19)	22±2,8 (19)	9,5±2,3 (13)	0,47±0,09 (13)	1,39±0,21 (9)
<i>BAPTA</i>	159±21 (16)	18±2,2 (16)	7,1±1,4 (13)	0,41±0,11 (13)	1,38±0,28 (8)

Tabla 4.1 - Comparación del efecto de *EGTA* y *BAPTA* sobre ICa^{2+} , ΔC_m exo, ΔC_m endo, endo/exo y τ endo. No se observan diferencias significativas entre las variables comparadas. El número de experimentos en cada caso está representado entre paréntesis. *Test de Student* para muestras independientes.

Efecto de la concentración de BAPTA sobre la exocitosis de IRP

La figura 4.4-i muestra el promedio de trazados de capacitancia (ver leyenda de la figura) que fueron obtenidos en respuesta a despolarizaciones de 50 ms aplicadas sobre células dializadas con 0,5 o 4 mM de *BAPTA* respectivamente. En la misma se observa que mientras ΔC_m exo es similar, ΔC_m endo es marcadamente mayor para 4 mM de *BAPTA*. En las figuras 4.4 ii y iii se representan los valores promedios de $I_{Ca^{2+}}$ y de ΔC_m exo. Mientras que el valor de $I_{Ca^{2+}}$ aumentó significativamente con el aumento de *BAPTA*, no se observaron variaciones significativas en ΔC_m exo. Se ha descrito que el incremento en la concentración de *BAPTA* produce un aumento en la amplitud de $I_{Ca^{2+}}$ debido a que, al reducir las concentraciones de Ca^{2+} citosólicas y por lo tanto disminuir el grado de inactivación Ca^{2+} dependiente, aumenta la población de canales activables (Bödding y col., 1999). Por otro lado, sería esperable que el aumento de *BAPTA* reduzca a la exocitosis debido a la reducción de los microdominios de Ca^{2+} libre que rodea a las vesículas de *IRP* y que se forman cuando se activa la $I_{Ca^{2+}}$. Suponemos que el aumento observado en la corriente de Ca^{2+} contrarresta a este efecto, por lo que los cambios de ΔC_m exo no llegaron a ser significativos.

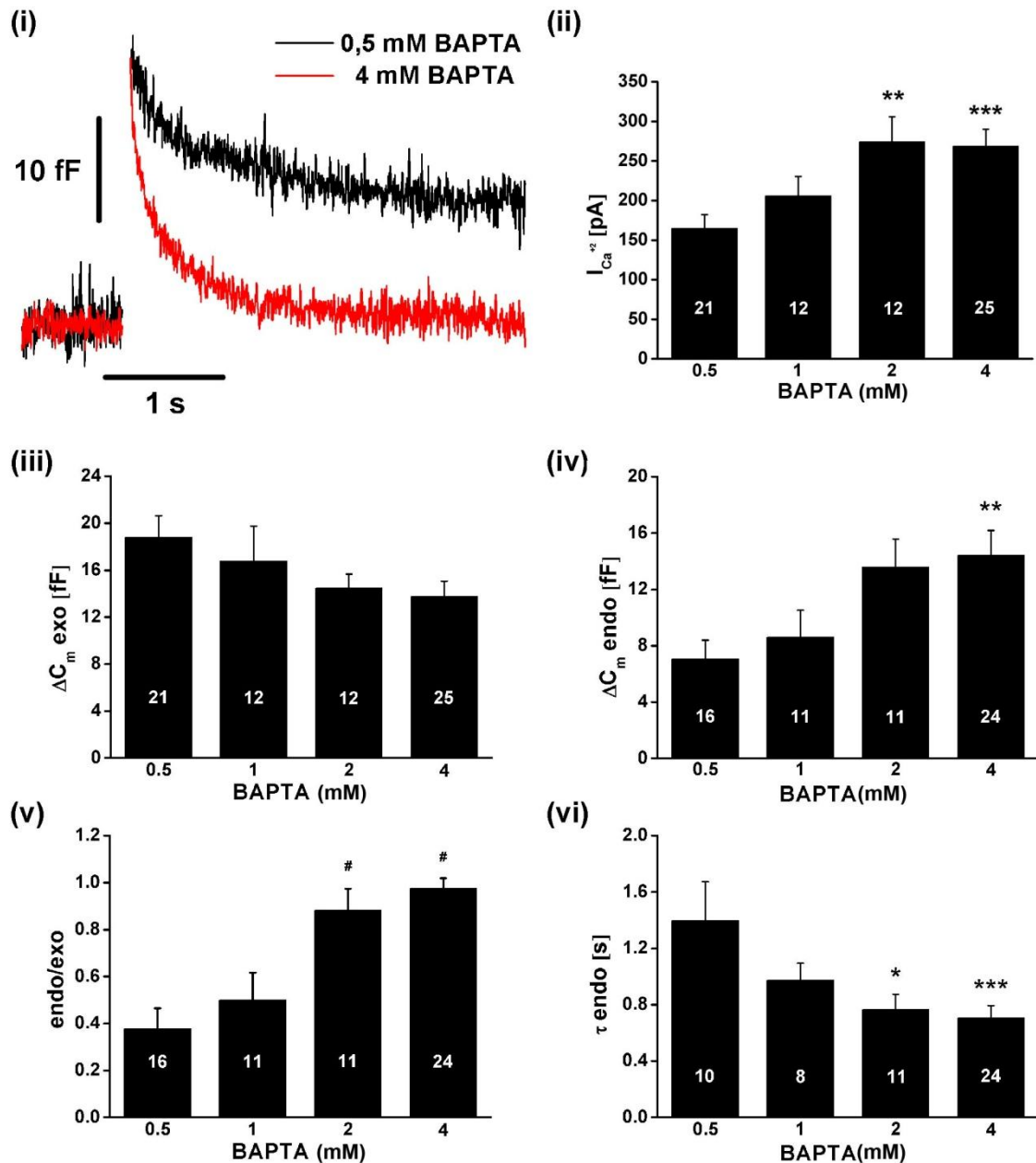


Figura 4.4 - Efecto de BAPTA sobre la corriente de Ca^{2+} , la exocitosis de IRP y la endocitosis asociada. (i) Comparación de los registros promedios de capacitancia para 0,5 ($n = 16$) y 4 mM de BAPTA ($n=24$). La aplicación de una despolarización de 50 ms muestra un valor similar en ΔC_m exo para las dos condiciones, pero un notable aumento del valor de ΔC_m endo para 4 mM de BAPTA. Notar que en 4 mM BAPTA la capacitancia disminuye hasta su valor inicial previo a la exocitosis, indicando que se trata de un proceso de endocitosis compensatoria. En (ii) y (iii) se muestran los gráficos de barras de $I_{Ca^{2+}}$ y de ΔC_m exo. El aumento de BAPTA generó una mayor $I_{Ca^{2+}}$ pero no se observan cambios significativos en el ΔC_m exo. (iv) y (v) indican los gráficos de barras de la ΔC_m endo y del cociente endo/exo en respuesta al estímulo. El incremento de BAPTA resultó en aumentos de la ΔC_m endo y de la relación endo/exo. El gráfico de barras en (vi) muestra una aceleración de la τ endo con el

incremento de *BAPTA*. Análisis de varianza (ANOVA) - Test de *Bonferroni*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$ y # $p < 0.001$. El número de células evaluadas (n) se representa en cada columna como números en blanco. El “n” de las barras que representan parámetros asociados a la endocitosis son menores a los de exocitosis debido a que no en todos los experimentos se obtuvieron registros con intervalos entre estímulos ≥ 5 s, necesarios para tener una estimación completa de ΔC_m endo. A su vez esto coincide lógicamente con el número de registros promediados en (i). Por otro lado, se ajustó τ endo solamente en los experimentos en los que se observó una caída de la capacitancia.

El aumento de BAPTA favorece la endocitosis

En la figura 4.4-i se puede notar que *BAPTA* 4 mM favorece marcadamente a la endocitosis respecto de *BAPTA* 0.5 mM. Es más, la disminución de la capacitancia celular medida para *BAPTA* 4 mM llega a compensar completamente al aumento previo producido por la exocitosis, lo cual la define como una endocitosis de tipo compensatoria (Engisch y Nowycky, 1998; Alvarez y col., 2011; Moya-Díaz y col., 2016). Los valores promedios de ΔC_m endo y del cociente endo/exo para las distintas condiciones se muestran en las figuras 4.4 iv y v respectivamente, donde se puede observar que ambas variables aumentaron muy marcadamente con el incremento de *BAPTA*. Notar que debido a que la endocitosis se hace compensatoria, cuando se aumenta *BAPTA* la relación endo/exo tiende a 1. Para estudiar la cinética del proceso endocítico, se ajustó la caída de la capacitancia que se produce luego de la exocitosis a una función de la forma $Y = A e^{-t/\tau} + Y_0$. Los promedios de la constante temporal τ de los ajustes individuales para las distintas condiciones experimentales se representan en la figura 4.4-vi. Notar que el incremento de *BAPTA* generó una disminución muy significativa en el valor de la constante temporal, lo cual implica una clara aceleración de la endocitosis.

El aumento de la concentración extracelular de calcio incrementa la corriente de calcio, pero no afecta la endocitosis

En la sección anterior se observó que el aumento de la concentración de *BAPTA* incrementa y acelera la endocitosis que se produce luego de la

exocitosis de *IRP*. Dado que *BAPTA* es un quelante de Ca^{2+} , un aumento en la concentración de este *buffer* disminuye la $[\text{Ca}^{2+}]$ libre citosólica, pero se observó que también produjo un incremento en la ICa^{2+} (figura 4.4-ii). Debido a esto creímos importante discernir a cuál de estas dos variables era sensible la endocitosis. Nos preguntamos entonces si el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ local generado por la ICa^{2+} durante el estímulo (ver Introducción, sección 1.2.3) podría ser un modulador positivo de la endocitosis estudiada. Para responder a dicha pregunta nos propusimos aumentar la ICa^{2+} , en la condición 0,5 mM de *BAPTA*, hasta valores equivalentes a los observados para 4 mM de *BAPTA* y estudiar su efecto sobre la endocitosis. Para esto aumentamos la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el medio extracelular a 10 mM de modo de incrementar la fuerza impulsora que gobierna la ICa^{2+} . Se compararon los resultados obtenidos bajo esta condición con nuevos experimentos realizados a 5 mM de Ca^{2+} también a 0.5 mM de *BAPTA*. La figura 4.5-i muestra los trazados de capacitancia promedio para 0,5 mM de *BAPTA* en condiciones de 5 y 10 mM de Ca^{2+} externo. Pese a que el aumento de Ca^{2+} externo a 10 mM provocó un significativo aumento en la ICa^{2+} (figura 4.5-ii) (similar al obtenido en los experimentos con *BAPTA* 2 y 4 mM donde la $[\text{Ca}^{2+}]$ externo fue de 5 mM, figura 4.4-ii), esta condición no afectó a la amplitud de la endocitosis (figuras 4.5 i y iv). Se observó también una clara tendencia a disminuir en el cociente endo/exo (figura 4.5 v), seguramente debido al aumento de ΔC_m exo (figuras 4.5 i y iii), pero que no alcanzó significancia estadística. Estos resultados indican que no es el aumento de ICa^{2+} lo que genera una mayor activación de la endocitosis. Por lo tanto, podemos suponer que lo que determina dicho efecto sería la disminución del Ca^{2+} libre basal generada por el aumento de *BAPTA*. Por lo tanto, esto apoya la hipótesis de que la endocitosis rápida bajo estudio es sensible a concentraciones de Ca^{2+} globales en el orden de los valores de reposo, y no a los marcados gradientes localizados que se generan ante la activación de la ICa^{2+} . Esto es también coherente con la inhibición de la endocitosis observada en la sección previa, cuando se fijó el Ca^{2+} citosólico en 500 nM.

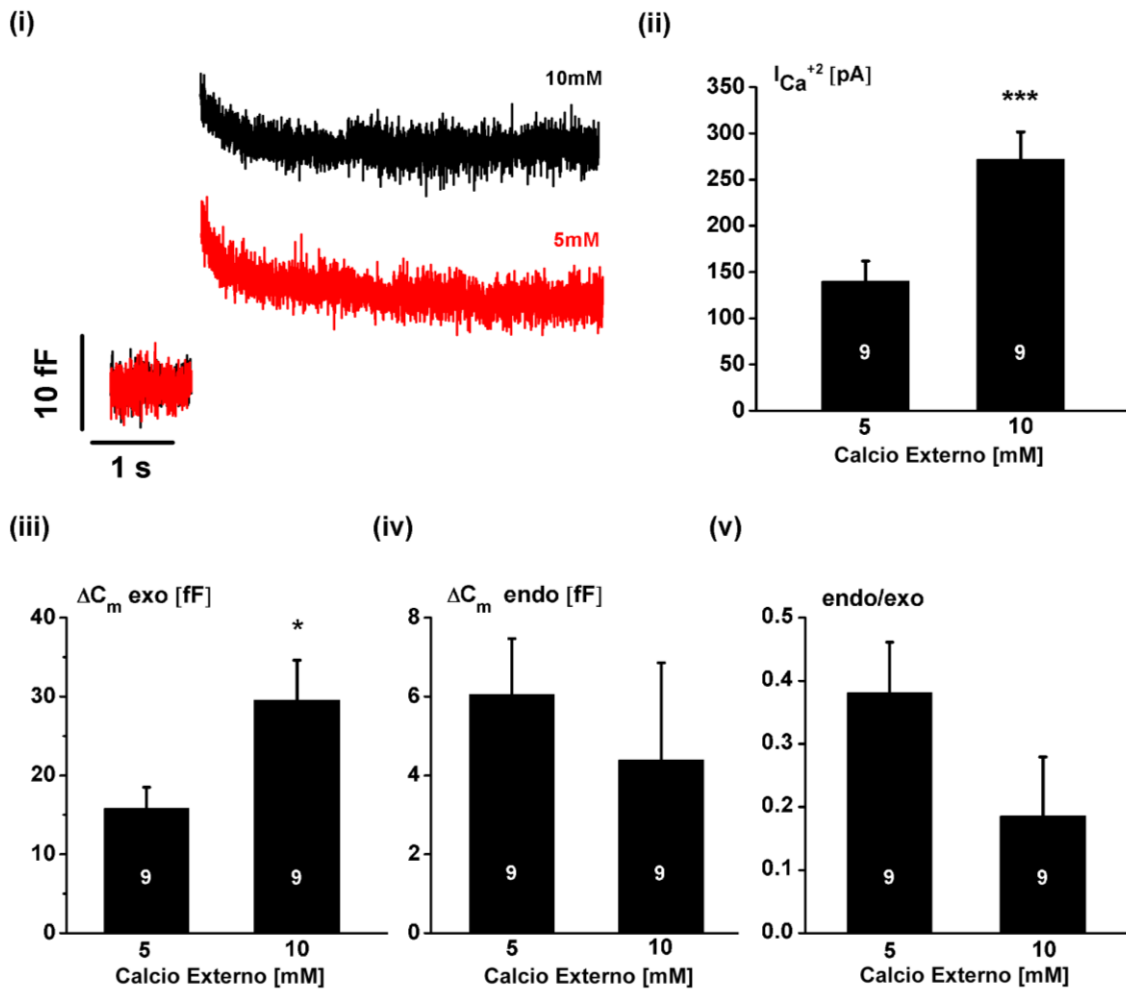


Figura 4.5 - Efectos del aumento de la concentración extracelular de Ca²⁺ sobre la I_{Ca²⁺} y la endocitosis. Los experimentos fueron realizados en la condición de 0,5 mM de *BAPTA* citosólico. (i) Comparación de los registros de capacitancia promedio para concentraciones de calcio externo de 5 y 10 mM (n=9). Se observa que la mayor [Ca²⁺] provoca un aumento en ΔC_m exo, pero no en ΔC_m endo. De (ii) a (v) las barras representan los valores promedios de I_{Ca²⁺}, ΔC_m exo, ΔC_m endo y endo/exo para experimentos con las dos concentraciones de Ca²⁺ externo. Para 10 mM se observa un aumento en I_{Ca²⁺} y en la exocitosis, pero no se modifican significativamente la magnitud de la endocitosis ni la relación endo/exo. *Test de Student* para muestras independientes; * p<0.05 y *** p<0.005. El número de células evaluadas (n) se representa en cada columna como números en blanco.

Efecto de la concentración de BAPTA en la recuperación de IRP

El siguiente paso fue estudiar si el *buffer* de Ca^{2+} *BAPTA* afecta la recuperación de *IRP*. Se realizaron experimentos midiendo la recuperación con el protocolo de dos pulsos de 50 ms separados por un tiempo variable (igual al utilizado en la sección 4.1) pero introduciendo *BAPTA* en vez de *EGTA* en la micropipeta de *patch-clamp*, a las concentraciones de 0,5; 1; 2 y 4 mM en experimentos independientes. Las curvas experimentales promedio de $\Delta C_{m2}/\Delta C_{m1}$ vs el tiempo entre estímulos obtenidas en las distintas condiciones fueron ajustadas con una función monoexponencial de la forma $Y = Y_0 + A(1 - e^{-t/\tau})$. Se utilizó en estos casos un ajuste de este tipo debido a que la utilización de una biexponencial no mejoraba la calidad de los ajustes ($p > 0.20551$, $p > 0.08894$, $p > 0.75468$ y $p > 0.08367$, para 0.5, 1, 2 y 4 mM *BAPTA* respectivamente). En el gráfico de la figura 4.6-i se puede ver que a diferencia de 0.5 mM *EGTA*, para 0.5 mM *BAPTA* no se observa el componente lento de recuperación definido por los valores de $\Delta C_{m2}/\Delta C_{m1}$ obtenidos a 20 y 40 s. La curva experimental llega a una meseta a los 5 s aproximadamente, no hay rachas en el ajuste y la curva teórica pasa por la proximidad de todos los puntos experimentales. Además, la constante de tiempo de recuperación obtenida en estas condiciones resultó muy similar a la que se obtuvo para el componente rápido ajustado en *EGTA* 0.5 mM. Se puede observar también una clara disminución en la constante de tiempo con el aumento de *BAPTA* (el número de células registradas a cada tiempo se muestran en la tabla 4.2). Notar que existe un cierto paralelismo entre la aceleración e incremento de la endocitosis y la aceleración de la recuperación inducidas por el aumento de *BAPTA*. Esto está de acuerdo con la hipótesis que plantea que dicha endocitosis es un paso necesario para el proceso de recuperación rápida (Moya-Díaz y col., 2016) y a su vez agrega que este mecanismo estaría regulado negativamente por el Ca^{2+} libre citosólico.

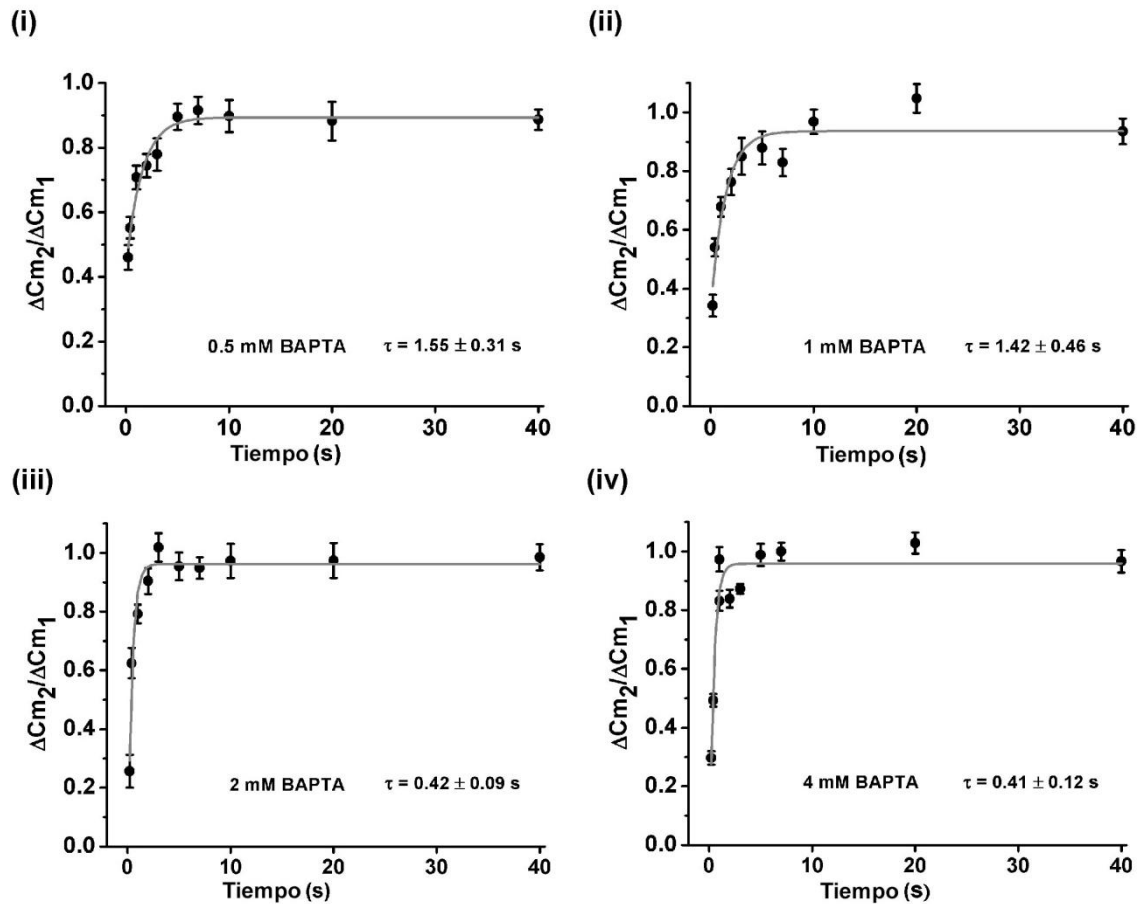


Figura 4.6 - Efecto de la concentración de BAPTA sobre la velocidad de recuperación promedio de IRP. En esta figura se representa la recuperación de IRP para las distintas concentraciones del buffer BAPTA, (i) 0,5; (ii) 1; (iii) 2 y (iv) 4 mM respectivamente. La recuperación relativa (expresada como $\Delta C_{m2}/\Delta C_{m1}$) fue graficada en relación al intervalo de tiempo entre estímulos. Cada punto representa el promedio de las mediciones obtenidas en células independientes (ver tabla 4.2). Los valores promedios fueron ajustados a una función de crecimiento monoexponencial de la forma $Y = Y_0 + A(1 - e^{-t/\tau})$. Notar que el aumento de BAPTA reduce la constante temporal, por lo que se acelera la recuperación de IRP. Los coeficientes de correlación R para 0,5, 1, 2 y 4 mM BAPTA fueron 0,9763, 0,9409, 0,9755 y 0,9464 respectivamente.

[BAPTA] _i (mM)	n									
	0,2 s	0,4 s	1 s	2 s	3 s	5 s	7 s	10 s	20 s	40 s
0,5	18	16	17	14	17	17	14	12	12	12
1	13	14	12	13	12	10	12	11	12	10
2	7	9	9	8	8	8	7	10	8	7
4	24	22	22	20	12	14	13	17	18	14

Tabla 4.2 – Números de experimentos (n) utilizados generar las curvas de recuperación en las distintas concentraciones de BAPTA. Se muestran el número de células analizadas para cada uno de los inter pulsos del protocolo de recuperación en las distintas condiciones experimentales.

Posteriormente, para corroborar los datos obtenidos con las curvas experimentales promedio, se ajustaron las curvas de recuperación obtenidas en cada célula con la función monoexponencial de la forma $Y = Y_0 + A (1 - e^{-t/\tau})$. En las figuras 4.7 i y ii se representan ejemplos de ajustes de dos experimentos individuales realizados con 0,5 y 4 mM de BAPTA respectivamente. Posteriormente a la realización de los ajustes se promediaron las constantes temporales obtenidas para cada concentración de BAPTA y se representaron en el diagrama de barras de la figura 4.7 iii. Se puede observar que al igual que en las curvas experimentales promedio el incremento de BAPTA provocó una significativa disminución de la constante temporal.

Los resultados de esta sección muestran que el aumento de la concentración citosólica de BAPTA favorece a la endocitosis rápida compensatoria posterior al estímulo que excita a IRP y además acelera la velocidad de recuperación de dicho *pool* vesicular. Este efecto del BAPTA parece estar asociado al aumento de la capacidad *buffer* de Ca²⁺ del citosol y no al aumento de la ICa²⁺ que se produce paralelamente. Considerando la correlación que se observa entre las aceleraciones de la endocitosis y de la recuperación de IRP cuando se aumenta BAPTA, postulamos la hipótesis de que ambos procesos están acoplados funcionalmente. Esto, como se dijo antes, también se apoya en el hecho de que el aumento de la [Ca²⁺] citosólica tiende a inhibir a la endocitosis rápida y al componente rápido de recuperación (sección 4.2.1). Dicho de otra manera, la endocitosis rápida descrita podría ser

el primer paso de una secuencia de eventos que lleva finalmente a la recuperación vesicular.

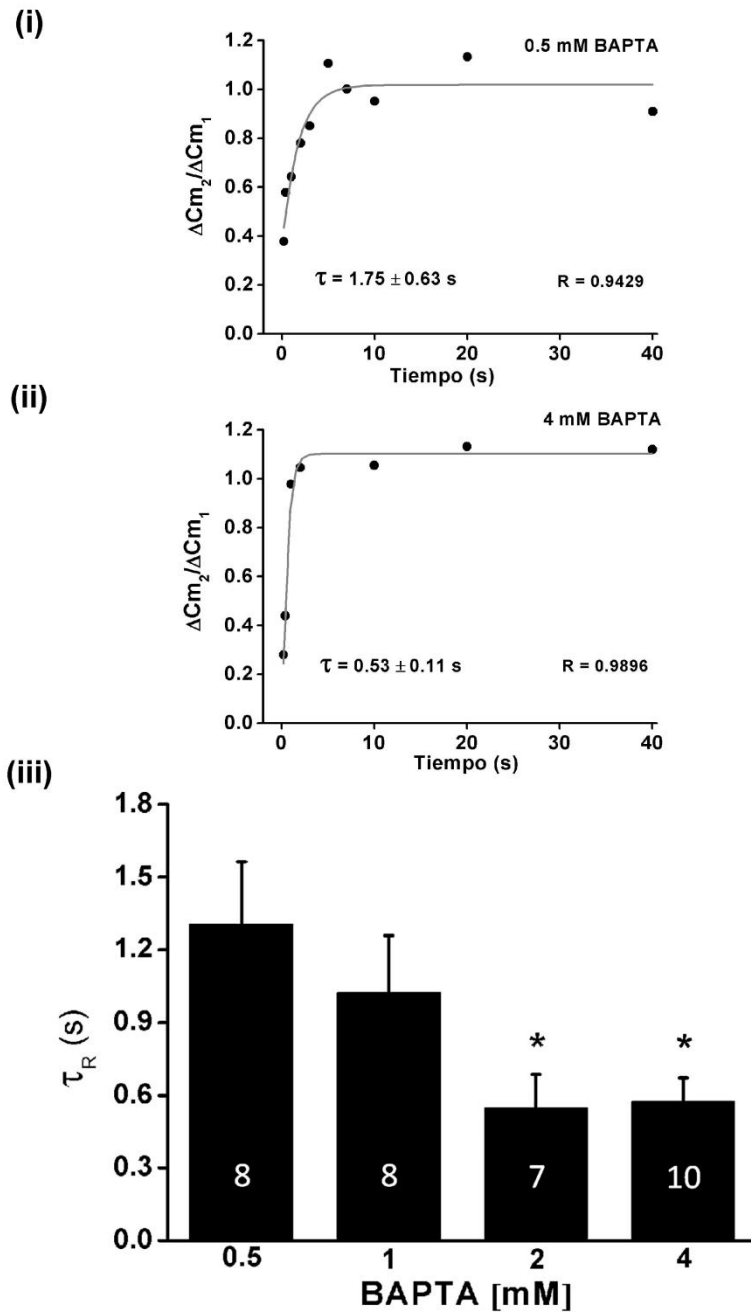


Figura 4.7 – Efecto de la concentración de BAPTA sobre la velocidad de recuperación de IRP registrada en células individuales. En (i) y (ii) se muestran gráficos de recuperación para dos células independientes en las condiciones de 0,5 y 4 mM del quelante. Los ajustes realizados con una función monoexponencial de la forma $Y = Y_0 + A(1 - e^{-t/\tau})$ muestran un menor valor del τ para 4 mM de BAPTA. Los promedios de los τ se representan en los gráficos de barra en (iii). El incremento de BAPTA provocó una disminución en la constante temporal. Análisis de varianza (ANOVA) - Test de Bonferroni. * $p < 0.05$. El número de células evaluadas (n) se representa en cada columna como números en blanco.

4.3 La recuperación rápida de *IRP* está ligada a una endocitosis rápida dependiente de dinamina

Nuestros resultados muestran que las velocidades de endocitosis y de recuperación de *IRP* se aceleraron paralelamente con el incremento de *BAPTA*. Esto sugiere la existencia de un acople funcional entre ambos procesos. Si esta hipótesis fuese cierta, la cinética de recuperación de *IRP* debería estar limitada por la velocidad de la endocitosis. Consecuentemente si se inhibiese o enlenteciese la endocitosis a través de un tratamiento específico, esto debería acompañarse por una inhibición o enlentecimiento de la recuperación de *IRP*. Con el objetivo de estudiar dicha hipótesis, en esta sección se inhibió a la proteína dinamina dializando a través de la pipeta de *patch* un anticuerpo monoclonal (*Anti-Dyn*) contra esta proteína en células expuestas a una concentración citosólica de *BAPTA* 4 mM.

La dinamina es una GTPasa que interviene en las últimas etapas de varios procesos endocíticos (van der Blik y Meyerowitz, 1991; González-Jamett y col, 2010; González-Jamett y col., 2013; Wu y col., 2014a). Esta proteína se polimeriza y se ensambla como un collar alrededor del cuello de los *budding pits* para luego, con gasto de energía del GTP, cerrar el poro de fisión cortando el cuello que liga a la vesícula a la membrana y completar la endocitosis (ver en Introducción la sección 1.7.5). Ha sido publicado que la dinamina interviene en la llamada *ultrafast endocytosis* en neuronas y en la endocitosis rápida en células cromafines (Watanabe y col., 2013; Moya-Díaz y col., 2016), que son dos procesos con cinéticas similares a las observadas en este trabajo en presencia de *BAPTA* 4 mM.

Anti-Dyn (7 nM) se agregó a la solución interna (en la pipeta de *patch-clamp*) y fue dializada al citosol a partir del establecimiento de la configuración de *whole-cell* y previamente al comienzo de los registros experimentales por un tiempo mínimo de 5 minutos. Este tiempo, si se considera el peso molecular del anticuerpo (aproximadamente 150 kD) y una resistencia en serie de 10 M Ω (se seleccionaron experimentos con una resistencia en serie menor a dicho valor), asegura que se alcance más del 63% de la concentración de la proteína

introducida en la pipeta (Pusch y col., 1988). Se ha descrito que luego de mantener por varios minutos a las células cromafines bajo la configuración de *whole cell* hay una cierta caída espontánea (*rundown*) de la endocitosis, supuestamente debido a la pérdida de factores solubles (Smith y col., 1997; Moya-Díaz y col., 2016). Debido a esto, se aplicó también a la condición control (en este caso, células dializadas con *BAPTA* 4 mM, pero en ausencia del anticuerpo) el período de 5 minutos de espera previo al comienzo del protocolo de estimulación. Se seleccionó la condición experimental de 4 mM *BAPTA* para estos experimentos porque fue donde observamos los mayores valores de ΔC_m endo y las velocidades de endocitosis y recuperación más altas (ver figura 4.4 en sección 4.2.2). Por lo tanto, pensamos que en esta condición se incrementaría la probabilidad de obtener resultados significativos con el anticuerpo.

Se puede observar en los trazados promedio de la figura 4.8A y en las barras de la figura 4.9-ii que *Anti-Dyn* disminuyó significativamente la exocitosis aunque no afectó a ICa^{2+} (figura 4.9-i). Ya habíamos observado previamente que la diálisis de ciertas proteínas en la condición *whole-cell* disminuye la exocitosis, probablemente de manera inespecífica. También se puede ver en los trazados promedios de capacitancia de la figura 4.8A que el anticuerpo provoca una disminución en la amplitud de la endocitosis, aunque no resultó significativa (figura 4.9-iii). Dicha tendencia de la endocitosis a caer en presencia del anticuerpo parece deberse a la disminución de la exocitosis. De hecho, se observa que el trazado de capacitancia promedio vuelve finalmente a un valor similar al basal previo a la estimulación (figura 4.8A, derecha) y consecuentemente el cociente endo/exo no se modifica (figura 4.9-iv), con lo cual en presencia de *Anti-Dyn* se mantiene la propiedad compensatoria de la endocitosis. Dichos trazados promedio también muestran que *Anti-Dyn* provocó un significativo enlentecimiento de la endocitosis, evidenciado por el aumento de la constante temporal de decaimiento. Finalmente, y coherentemente con el enlentecimiento de la endocitosis, este tratamiento también generó un enlentecimiento en la recuperación de *IRP* en relación a la condición control, como muestran los gráficos de valores promedio y las constantes de tiempo representados en las figuras 4.8B y 4.9-vi respectivamente.

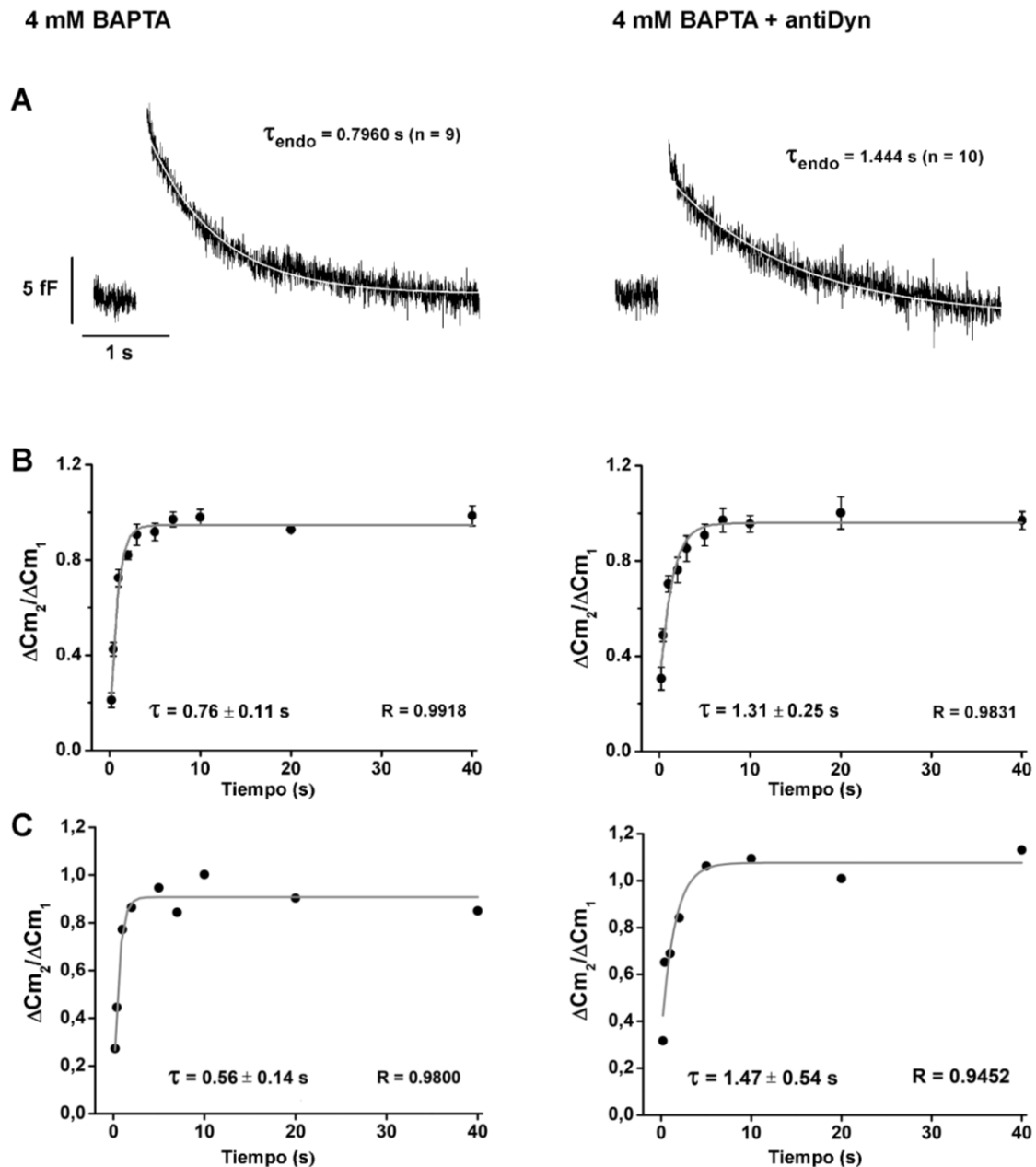


Figura 4.8- La recuperación de *IRP* depende de un proceso endocítico rápido. (A) Comparación de los registros promedios de capacitancia obtenidos en 9 (control) (i) y 10 (*Anti-Dyn*) (ii) células independientes. Los ajustes monoexponenciales en la endocitosis (trazados blancos) muestran un enlentecimiento de la constante temporal en las células tratadas con el anticuerpo. Para el ajuste de la endocitosis se utilizó una función monoexponencial de la forma $Y = A e^{-t/\tau} + Y_0$. En (B) se muestran los gráficos de recuperación de *IRP* en condición control (izquierda) y en presencia de *Anti-Dyn* (derecha). En (C) se muestran gráficos de recuperación para dos células independientes en condición control (izquierda) y en presencia de *Anti-Dyn* (derecha). Tanto en (B) como en (C), los gráficos de recuperación fueron ajustados a una función de crecimiento monoexponencial de la forma $Y = Y_0 + A (1 - e^{-t/\tau})$. En ambos ítems se observa que *Anti-Dyn* provocó un retardo en la recuperación de *IRP*.

Con el objetivo de confirmar el efecto de *Anti-Dyn* sobre las cinéticas de la endocitosis y la recuperación de *IRP* se ajustaron las caídas de los trazados individuales de capacitancia, representativos de la endocitosis registrados en cada célula y los gráficos de recuperación obtenidos también de experimentos individuales (ver figura 4.8C). Los promedios de las constantes temporales obtenidas en dichos ajustes se representan en las figuras 4.9 (v) y (vi). Se puede observar que *Anti-Dyn* aumenta significativamente ambas constantes. Incluso es llamativo el hecho que existe una marcada similitud entre los valores de las constantes temporales de endocitosis y las de recuperación, en condiciones control como en presencia de *Anti-Dyn*. Esto refuerza la hipótesis de que el proceso de recuperación depende en buena medida de la endocitosis.

Los experimentos presentados en esta sección apoyan la hipótesis que sostiene que la recuperación rápida de *IRP* depende en parte de un mecanismo endocítico rápido y además muestran que dicha endocitosis sería dependiente de dinamina. En este contexto conviene recordar los resultados de la sección 4.2.1, que muestran que el aumento del calcio citosólico a 500 nM provoca la desaparición de dicha endocitosis rápida, por lo que la recuperación de *IRP* en esas condiciones dependería de otro tipo de mecanismo más lento e independiente de la endocitosis (ver figura 4.2C). En base a este conjunto de datos podríamos explicar el comportamiento bifásico de la recuperación de *IRP* observado en la primera sección de resultados (figura 4.1) de la siguiente manera: por un lado, tendríamos (1) una fase de recuperación rápida con constantes de tiempo que varían entre valores de algunos cientos de milisegundos a levemente superiores a 1 segundo y que depende de una endocitosis rápida. Y por otro lado tendríamos (2) una fase lenta de recuperación con constantes de tiempo de varios segundos e independiente de la endocitosis rápida. Tentativamente podríamos especular que este último mecanismo esté asociado a una translocación vesicular desde *pools* ubicados río arriba de *IRP* (ver introducción en sección 1.4 y Voets y col 1999). Podría parecer en principio paradójico que una $[Ca^{2+}]$ alta (sección 4.2.1) favorezca un mecanismo más lento de recuperación. Esto es sin embargo coherente con la propuesta del laboratorio de Corey Smith (Fulop y col, 2005), que propusieron

que la elevación del Ca^{2+} citosólico que se alcanza ante una estimulación repetitiva a 10 Hz promueve la fusión completa en lugar del *kiss-and-run*, el cual sería predominante a bajas frecuencias y concentraciones bajas de Ca^{2+} citosólico. El mecanismo de *kiss-and-run* ha sido asociado en general a un proceso de endocitosis rápida (Wu y col, 2014a). Por tal motivo, sería lógico pensar que la endocitosis rápida representaría el primer paso del proceso rápido de recuperación, que podría proceder de manera localizada, al estilo *kiss-and-run*. Por lo tanto, la concentración citosólica de Ca^{2+} sería de manera indirecta un modulador de los distintos modos de recuperación de *IRP*.

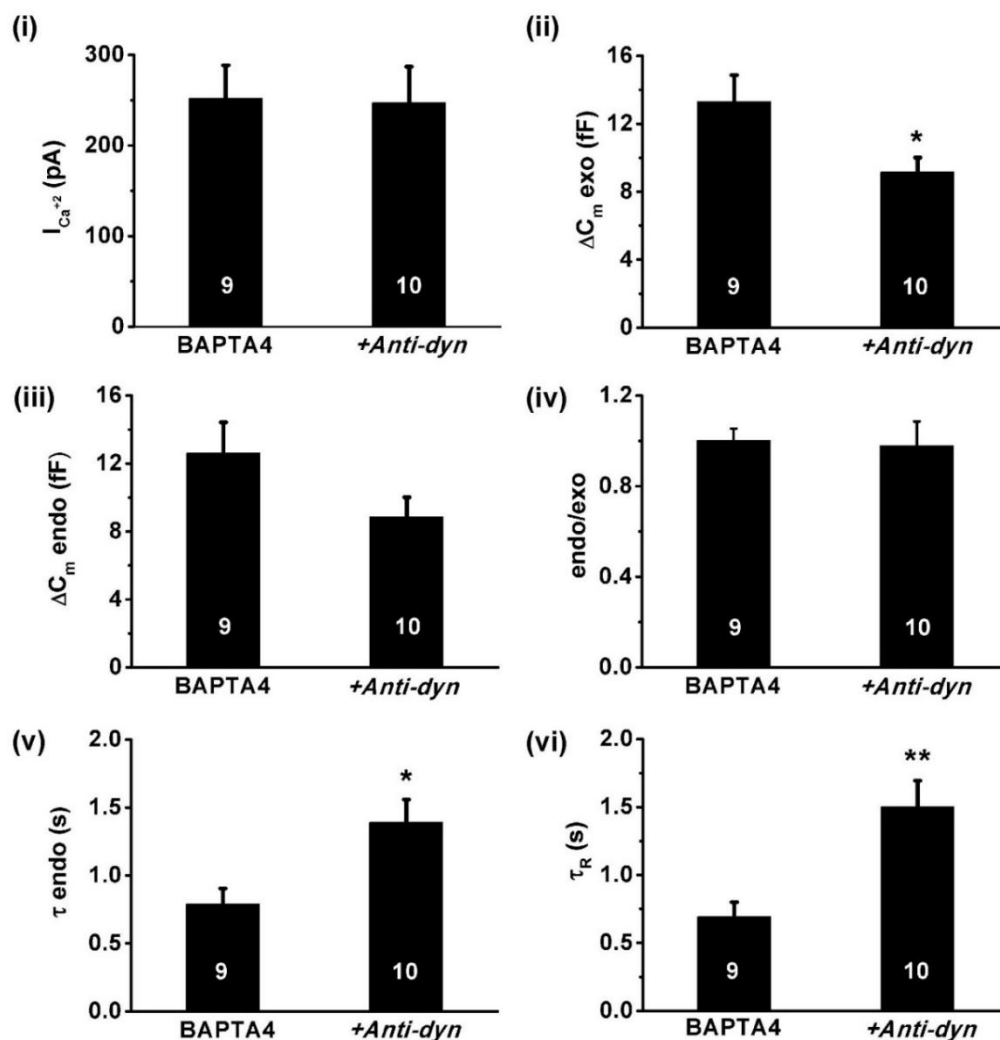


Figura 4.9 - Efecto de *Anti-dyn* sobre la corriente de Ca^{2+} , exocitosis, endocitosis y cinética de recuperación de *IRP*. Todos los experimentos se realizaron en presencia de BAPTA 4 mM citosólico, en ausencia (control) o en presencia de *Anti-dyn*. Los diagramas de

barras muestran que *Anti-dyn* no afectó la ICa^{2+} (i), pero generó una reducción de ΔC_m exo (ii). Se puede observar además que *Anti-dyn* no modificó significativamente ΔC_m endo (iii) ni la relación endo/exo (iv), pero sin embargo provocó el aumento de la constante de tiempo de la endocitosis τ_{endo} (v). En (vi) se muestra los gráficos de barras con los promedios de las constantes de tiempo de recuperación de *IRP* (τ_R) para experimentos en condición control y con el agregado de *Anti-dyn*. Se observa un enlentecimiento en la constante temporal en los experimentos tratados con el anticuerpo. Test de *Student* para muestras independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. El número de células evaluadas (n) se representa en cada columna como números en blanco.

Ha sido propuesto previamente que la actina-F cortical favorece el modo de fusión tipo *kiss-and-run* (Doreian y col., 2008) y facilita varios tipos de endocitosis, incluida la *ultrafast endocytosis* (Watanabe y col., 2013; He y col., 2018). Por lo tanto, en la próxima sección analizaremos el estado de la actina cortical en nuestro preparado dentro del rango de concentraciones citosólicas de Ca^{2+} utilizadas en este trabajo.

4.4 Efecto del calcio citosólico en la polimerización de la actina cortical

Previamente en este trabajo de tesis (sección 4.2.2) se mostró como una alta concentración citosólica de *buffer* de Ca^{2+} aumenta y acelera un proceso de endocitosis rápida y a su vez acelera la recuperación de *IRP*. Por otro lado, en la sección 4.2.1 se había mostrado que una concentración alta (500 nM) de Ca^{2+} citosólico basal impuesto a la célula hacía desaparecer la endocitosis rápida, mientras que la recuperación se resumía a un único componente exponencial lento. Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que el Ca^{2+} libre citosólico sería un modulador de estos procesos. En consecuencia, en esta sección nos propusimos en primer lugar estimar las concentraciones de Ca^{2+} basal en las dos condiciones extremas estudiadas en la sección 4.2.2, es decir 0.5 y 4 mM *BAPTA* citosólico.

Es sabido que el Ca^{2+} citosólico regula un número importante de procesos moleculares asociados a la exocitosis y a la endocitosis, y las nuevas investigaciones aumentan ese número día a día (Von Rüden and Neher, 1993; Wu y col., 2014a). Un factor común que es Ca^{2+} regulable y que está a su vez asociado a varias etapas del reciclado de las vesículas secretorias y sinápticas es el citoesqueleto de actina cortical. Esto incluye a la endocitosis en sí misma, a la exocitosis, al modo (*kiss-and run* o fusión total) por el cual esta última ocurre, a la accesibilidad de las vesículas secretorias a la membrana y al tráfico de estas a través del citoesqueleto (Vitale y col., 1995; Neco y col. 2002; Doreian y col., 2008; para más detalles ver introducción, sección 1.9). Por lo tanto, en segundo lugar, en esta sección vamos a analizar el efecto de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico sobre el estado de la actina-F cortical.

4.4.1 Medición del calcio libre citosólico basal

En esta sección se midió la concentración de Ca^{2+} libre citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) basal en células dializadas con soluciones internas conteniendo el quelante de Ca^{2+} *BAPTA* a concentraciones de 0,5 y 4 mM. Para esto se utilizó un *setup* de Ca^{2+} *imaging* (ver Sección 3.3 de Materiales y Métodos) y el indicador ratiométrico de Ca^{2+} *Fura-2*, el cual presenta un máximo de emisión a 510 nm y un máximo de absorción a 380 nm que se desplaza a 340 nm al unir Ca^{2+} . Gracias a esta propiedad, la relación de fluorescencia (*R*) a 340/380, aplicada en la ecuación $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d [(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)] (S_{r2}/S_{b2})$, resulta ser una medida cuantitativa de la concentración citosólica de Ca^{2+} (Grynkiewicz y col., 1985) (ver Materiales y Métodos, sección 3.3.1). Las células, en configuración *whole-cell*, se dializaron a través de la pipeta de *patch* con una solución interna similar a la utilizada en la sección previa (con *BAPTA* 0,5 o 4 mM en experimentos independientes) pero incluyendo *Fura-2* (100 μM) y se mantuvieron a un potencial de membrana de -80 mV por medio de la técnica de fijación de voltaje. Luego de los 5 minutos de diálisis se adquirieron imágenes de fluorescencia cada 200 ms durante 5 s y a partir de dichas imágenes se calculó la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para cada tiempo. En la figura 4.10A se muestran ejemplos representativos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en función del tiempo para las dos condiciones

estudiadas. Las $[Ca^{2+}]_i$ basales promedio obtenidas en varias células estudiadas en cada condición se representan en las barras de la figura 4.10B. Se puede observar, como es esperable, que la $[Ca^{2+}]_i$ basal obtenida para 4 mM de *BAPTA* fue significativamente menor que a 0.5 mM de *BAPTA*. Por otro lado, en experimentos similares en presencia de 0.5 mM *EGTA* se obtuvo una $[Ca^{2+}]_i$ basal (70 ± 26 nM) que no difirió de la obtenida en 0.5 mM *BAPTA* (*test* de *Student* para muestras independientes). Esto último es razonable, ya que ambos *buffers* si bien difieren marcadamente en la velocidad con la que unen el Ca^{2+} son muy similares en cuanto a su afinidad (ver Resultados, sección 4.2.2).

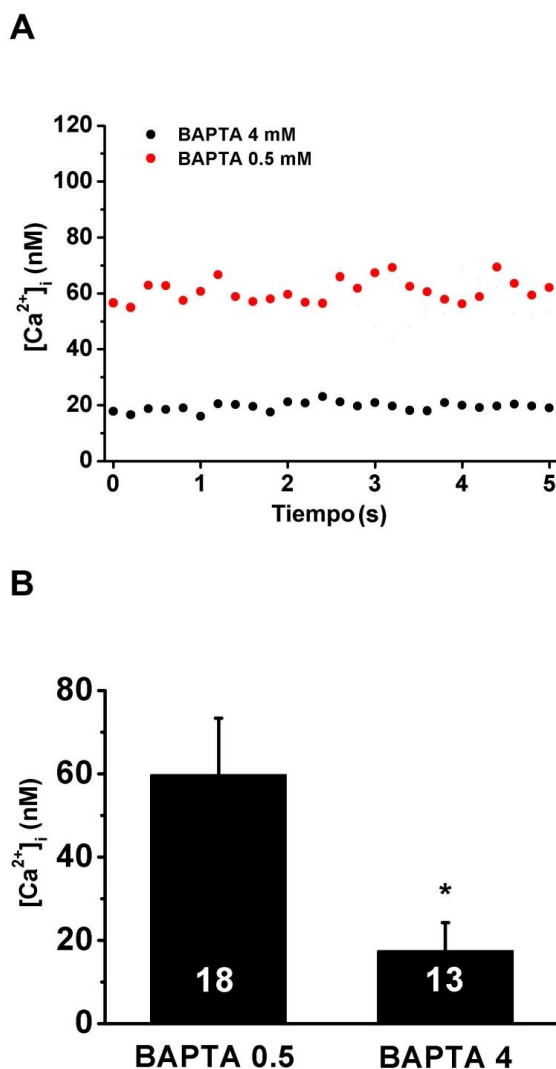


Figura 4.10 – Medición de la concentración de calcio citosólico libre.

Las células cromafines se cargaron con el indicador de Ca^{2+} fluorescente *Fura-2* (0.1 mM) y el *buffer BAPTA* (0,5 o 4 mM), ambos agregados a la solución interna la micropipeta de *patch-clamp*. Las células, en configuración *whole-cell*, se mantuvieron en un potencial de *holding* de -80mV durante el experimento. Se adquirieron imágenes de fluorescencia cada 200 ms durante 5 s (ver sección 3.3.1). Aplicando la relación R calculada de cada medición en la ecuación $[Ca^{2+}]_i = K_d [(R - R_{min}) / (R_{max} - R)] (S_{r2} / S_{b2})$ se estimó la $[Ca^{2+}]$ libre (Grynkiewicz y col., 1985). (A) Ejemplos representativos de la medición del Ca^{2+} libre a través del tiempo para las dos concentraciones de *BAPTA* en dos células independientes. (B) Gráfico de barras que representa los valores promedios de la $[Ca^{2+}]$ para cada condición (0,5 mM y 4 mM de *BAPTA*). La $[Ca^{2+}]_i$ promedio para *BAPTA* 0.5 resultó ser tres veces mayor a la observada para *BAPTA* 4. El número de células evaluadas (n) se indican en cada columna como números en blanco. Test de

Student para muestras independientes. * $p < 0.05$. La $[Ca^{2+}]_i$ de cada célula fue calculada promediando los valores obtenidos durante los 5 s de cada experimento.

En la próxima sección se analizará el efecto de la variación de $[Ca^{2+}]_i$ basal sobre la actina cortical, en un rango que incluye a las $[Ca^{2+}]_i$ determinadas en esta sección y a los 500 nM impuestos en la sección 4.2.1.

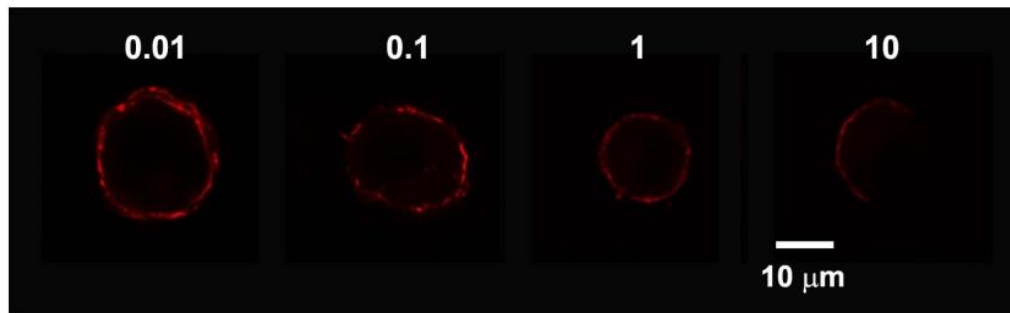
4.4.2 El aumento del calcio citosólico libre provoca la depolimerización de la actina cortical

Evidencias experimentales sugieren que la red de microfilamentos de actina-F cortical juega un importante rol en la regulación del reciclado vesicular. Por un lado, se propuso que dicha red actuaría como una barrera bloqueando el acceso de las vesículas secretorias hacia el sitio donde se produce la exocitosis, por lo que el desensamblado de la misma favorecería la traslocación vesicular desde *pools* de reserva hacia *pools* que se encuentran río abajo como el *RRP* y el *IRP* (Trifaró y col., 2000). Posteriormente se demostró también que la actina-F cortical participa positivamente de la traslocación de vesículas a la membrana (Ñeco y col., 2003). De acuerdo a este último efecto el estado de polimerización de la actina produciría en principio un efecto inverso al predicho en el mecanismo de “barrera” propuesto anteriormente, aunque en realidad se piensa que lo que ocurre sería una remodelación dinámica de la actina-F donde ambos procesos combinados permitirían el paso y a su vez el transporte vesicular. Sumado a esto la polimerización de la actina-F cortical favorece el modo de fusión *kiss-and-run* (asociado a una endocitosis y un reciclado vesicular rápidos (Wu y col., 2014a), frente a la fusión completa (Doreian y col., 2008). Finalmente, la actina-F cumpliría un rol central en la *ultrafast endocytosis* (Watanabe y col., 2013) y un rol secundario en la endocitosis clásica clatrina dependiente (Daste y col., 2017). Todo esto hace, como dijimos, que la actina-F tenga un papel central y variado en el reciclado vesicular.

Dado que la estructura y dinámica de polimerización del citoesqueleto de actina están fuertemente reguladas por el Ca^{2+} citosólico (Rodríguez Del Castillo y col., 1990), consideramos necesario evaluar los efectos de la $[Ca^{2+}]_i$

sobre la actina-F cortical. Para ello las células cromafines fueron permeabilizadas con digitonina en presencia de distintas $[Ca^{2+}]$ (0,01; 0,1; 1 o 10 μ M). Se debe remarcar que este rango cubre las concentraciones registradas de aproximadamente 0.02 y 0.06 μ M en presencia de *BAPTA* 0.5 y 4 mM respectivamente y la concentración fijada de 0.5 μ M en secciones previas. Luego las células fueron fijadas y teñidas con *phalloidine-rhodamine* (que tiñe selectivamente a la actina-F) y se evaluó la intensidad de fluorescencia en regiones de interés definidas en el área cortical celular (ver Materiales y Métodos, sección 3.5.3) sobre imágenes adquiridas por medio de un microscopio confocal. En la figura 4.11A se muestran ejemplos de células que fueron tratadas con las distintas $[Ca^{2+}]$. Se puede observar una disminución de la fluorescencia en la región cortical celular con el aumento de la $[Ca^{2+}]$. En la figura 4.11B se grafica el promedio de la intensidad de fluorescencia relativa en la región cortical de las células para las distintas concentraciones de Ca^{2+} libre. Se observa una disminución monótonica en la señal fluorescente de *phalloidine-rhodamine* respecto a la $[Ca^{2+}]$ (representada en una escala logarítmica en base 10) en el intervalo 0.01 a 1 μ M, el cual incluye todas las concentraciones que fueron evaluadas en este trabajo. Luego, a $[Ca^{2+}]$ de \sim 10 μ M el efecto parece aproximarse a una meseta.

A



B

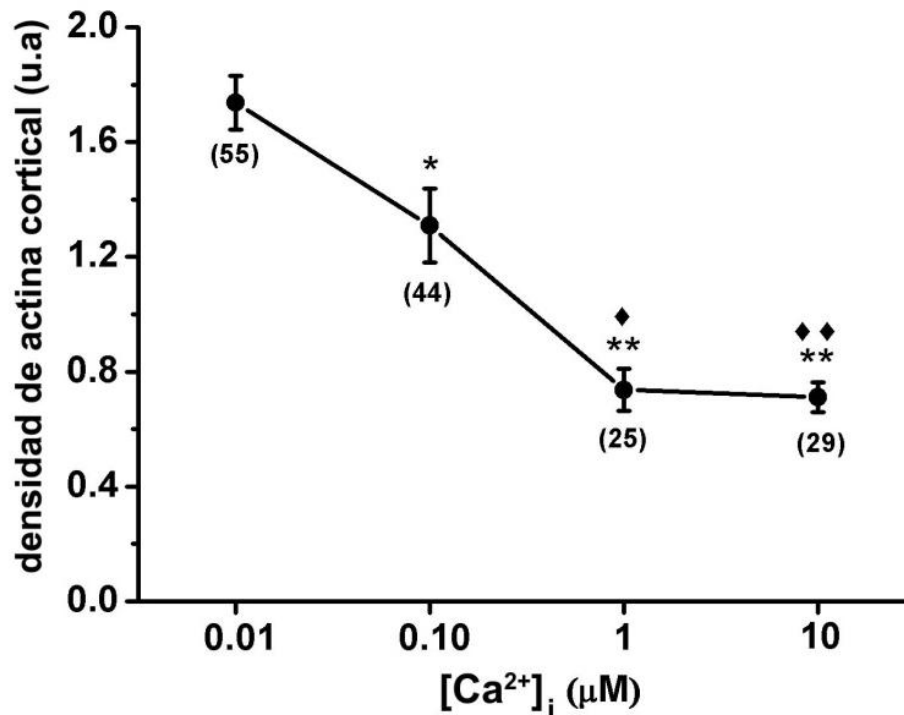


Figura 4.11 – La densidad de la actina-F cortical depende de la concentración de calcio citosólico. (A) Células cromafines fueron permeabilizadas con digitonina (20 μM) en presencia de concentraciones crecientes de Ca²⁺ libre, fijadas y teñidas con *phalloidine-rhodamine*; y luego visualizadas en el microscopio confocal. Notar la disminución de la marca de fluorescencia con el aumento de la [Ca²⁺]_i libre. Barra = 10 μm. (B) Promedio de la intensidad relativa de fluorescencia para las diferentes concentraciones de Ca²⁺ libre. Para cada [Ca²⁺]_i libre la intensidad de fluorescencia registrada en regiones de interés definidas en la zona cortical de cada célula individual (ver Materiales y Métodos) fue normalizada a la intensidad de fluorescencia registrada en las mismas regiones del control (células fijadas y teñidas con *phalloidine-rhodamine*, pero sin permeabilizar con digitonina). El análisis estadístico fue realizado con un ANOVA seguido por un test de Bonferroni. * p<0.01 y ** p<0.001 para la concentración de 0.01 μM vs las demás. ♦ p<0.01 y ♦♦ p<0.001 para la concentración de 0.10 μM vs las demás.

Resultados de las secciones previas de esta tesis muestran que el aumento de la concentración citosólica de *BAPTA* favorece una endocitosis rápida compensatoria de la exocitosis de *IRP* y además acelera la velocidad de recuperación de dicho *pool* vesicular. En esta sección encontramos que el aumento de la concentración de dicho quelante de Ca^{2+} generó una disminución significativa en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal, desde 58 ± 12 nM en 0.5 mM de *BAPTA* a 18 ± 8 nM en 4 mM de *BAPTA* (figura 4.10). A partir de dicha información analizamos el efecto del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal sobre la polimerización de la actina-F cortical. Encontramos que el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal generó un claro efecto despolimerizador de la actina-F (figura 4.11). Observar que la variación entre ~ 58 a ~ 18 nM de Ca^{2+} se halla en la región de mayor pendiente de la curva de dicha figura, y que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 500 nM utilizada en la sección 4.2.1 implica un nivel importante de despolimerización adicional y se encuentra ya cerca de la saturación del efecto. Debido a esto es razonable pensar que los cambios inducidos sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal pueden alterar significativamente a la actina-F celular durante nuestros experimentos. Por lo tanto, planteamos como hipótesis que la polimerización de la actina-F favorece los procesos de endocitosis y recuperación vesicular estudiados, y que el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal, al promover la despolimerización de actina-F, los desfavorece. En la siguiente sección aplicaremos un tratamiento farmacológico que induce la despolimerización de la actina-F para intentar revertir los efectos promovidos por la condición de 4 mM de *BAPTA*, tanto sobre la endocitosis, como sobre la recuperación vesicular.

4.5 Efecto de la despolimerización de la actina-F sobre la endocitosis y recuperación de *IRP*

Nuestros resultados muestran que el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal genera un claro efecto despolimerizador de la actina-F, el cual fue particularmente efectivo en el rango de concentraciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el que se realizaron los experimentos presentados en secciones anteriores (~ 18 y ~ 58 nM calculadas por Ca^{2+} *imaging* para 4 y 0,5 mM de *BAPTA* respectivamente, y 500 nM

impuesta por diálisis de la solución interna). Dado que en las condiciones en las que se redujeron $[Ca^{2+}]_i$ (sobre todo 2 y 4 mM de *BAPTA*) se observaron velocidades de endocitosis y de recuperación de *IRP* particularmente elevadas, y que a 500 mM de $[Ca^{2+}]_i$ la endocitosis rápida y el componente rápido de recuperación fueron básicamente eliminados, en la sección anterior planteamos como hipótesis que la polimerización de la actina-F favorece los procesos de endocitosis y recuperación vesicular estudiados. Para poner a prueba dicha hipótesis, en esta sección aplicamos un tratamiento farmacológico que induce la despolimerización de la actina-F para intentar revertir los efectos generados por 4 mM de *BAPTA* sobre la endocitosis y la recuperación vesicular.

4.5.1 Efecto de cytochalasin D en la distribución de la actina-F

Cytochalasin D (*Cyto D*) es una toxina fúngica permeable a través de la membrana plasmática que causa la interrupción de los filamentos de actina e inhibe su polimerización. Para evaluar el efecto de esta droga sobre nuestro preparado experimental se utilizaron células cromafines cultivadas durante 24 horas, a las que se aplicó un tratamiento de 10 minutos con 2 μ M de *Cyto D* (en medio *DMEM* de baja glucosa a 37°C). También se reservaron placas controles de los mismos cultivos a las que no se les aplicó ningún tratamiento. Tanto las células tratadas como las controles fueron luego fijadas y marcadas con *phalloidine-rhodamine* y DAPI (ver Materiales y Métodos, sección 3.4.1). El efecto de *Cyto D* sobre la distribución espacial de actina-F fue analizado mediante microscopía confocal.

En la figura 4.12A se puede observar que *Cyto D* genera un claro efecto disruptivo sobre el citoesqueleto cortical de actina-F (marca de *phalloidine-rhodamine* en rojo). Si comparamos con las células controles (arriba), podemos ver que *Cyto D* (abajo) provocó una discontinuidad y una disminución en la densidad de la marca fluorescente en la zona cortical y un patrón punteado en todo el plano celular con exclusión del núcleo (azul, marcado con *DAPI*).

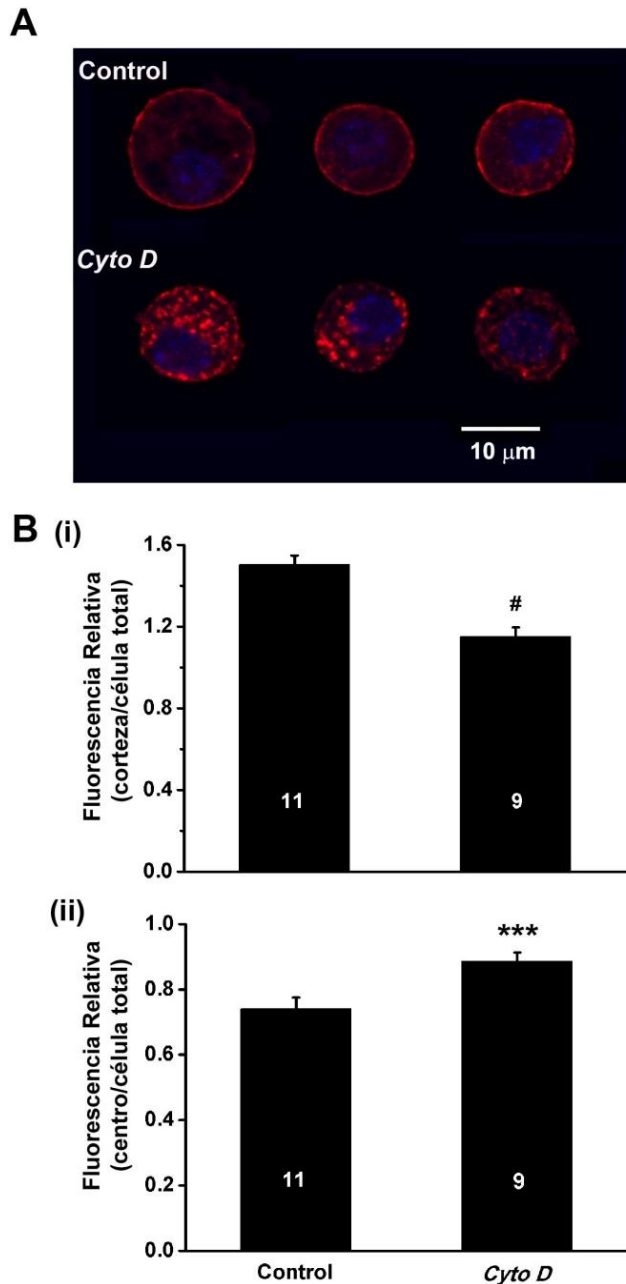


Figura 4.12 – Cytochalasin D afecta la distribución de la actina-F. (A)

Imágenes de microscopía confocal en condición control y en células tratadas con 2 μ M de Cyto D. Las células fueron fijadas luego de 10 minutos de incubación con la droga y se les realizaron tinciones con *phalloidine-rhodamine* (para visualizar la actina-F) y *DAPI* (para visualizar el núcleo) (ver Materiales y Métodos, sección 3.4.4). Barra = 10 μ m. (B) Promedios de la intensidad relativa de fluorescencia para cada condición. La intensidad de fluorescencia (promedio espacial, por pixel) registrada en la zona cortical (i) o en la zona central (ii) de cada célula individual fue normalizada a la intensidad de fluorescencia (promedio espacial por pixel) registrada en la superficie total del plano de corte celular. Luego dichos valores fueron promediados y expresados en los diagramas de barras. El número de células evaluadas (n) se indica en blanco en cada columna. El análisis estadístico fue realizado con un Test de *Student* para muestras independientes. *** $p < 0.005$ y # $p < 0.001$.

Resultados similares fueron observados en células cromafines bovinas por Berberian y col. (2009) y por González-Jamett y col. (2013), y en células cromafines de ratón por Doreian y col (2008). Para poder cuantificar apropiadamente estas observaciones, cuantificamos la fluorescencia asociada a *phalloidine-rhodamine* en una región de interés definida en la zona cortical y la relativizamos respecto de la medida en el plano celular total (figura 4.12B-i), y por otro lado evaluamos la fluorescencia registrada en el centro celular

respecto también de la medida en el plano celular total (figura 4.12B-ii; para detalles de cómo se definieron las regiones de interés ver Materiales y Métodos, sección 3.5.4). Este análisis semi-cuantitativo mostró que en comparación con las células control, las células tratadas con *cytochalasin D* evidenciaron una disminución significativa de la intensidad de fluorescencia relativa asociada a actina-F en la región cortical (figura 4.12B-i), mientras que opuestamente se observaba un aumento significativo de la fluorescencia relativa registrada en la región central (figura 4.12B-ii).

4.5.2 Despolimerización de la actina-F cortical afecta la endocitosis y la recuperación de IRP

La condición experimental de 4 mM *BAPTA* es en la que se observó la máxima aceleración en las velocidades de endocitosis y recuperación de *IRP* (figuras 4.4 y 4.7). Por otro lado, las bajas concentraciones de Ca^{2+} libre citosólico provocadas por dicha condición se asocian a una actina cortical muy organizada y densa (figura 4.11). Dado que *Cyto D* demostró ser un efectivo despolimerizador de actina-F en nuestras condiciones experimentales (figura 4.12), se quiso evaluar si esta droga era capaz de reducir las velocidades de endocitosis y de recuperación vesicular obtenidas en 4 mM *BAPTA*. Para esto se realizaron registros electrofisiológicos utilizando el protocolo de estimulación de dos pulsos de 50 ms separados por un tiempo variable, pero en células pretratadas con *Cyto D* (2 μM por 10 minutos).

En las figuras 4.13A i y ii se muestran trazados representativos de capacitancia de experimentos realizados en presencia de 4 mM de *BAPTA* en condición control y luego del pretratamiento con *Cyto D*. Como en casos anteriores, para estudiar la cinética de la endocitosis se ajustó la caída de la capacitancia que se produce luego de la exocitosis a una función de la forma $Y = A e^{-t/\tau} + Y_0$. Por otro lado, en la figura 4.13B i y ii se muestran curvas de recuperación de *IRP* obtenidas en células individuales para las dos mismas condiciones, ajustadas a una función de crecimiento monoexponencial de la forma $Y = Y_0 + A (1 - e^{-t/\tau})$. A simple vista se puede observar que *Cyto D* generó

una disminución en las magnitudes de la exocitosis y de la endocitosis (que sigue siendo compensatoria), pero también indujo enlentecimientos en la cinética esta última y en la recuperación (comparar las constantes temporales respectivas).

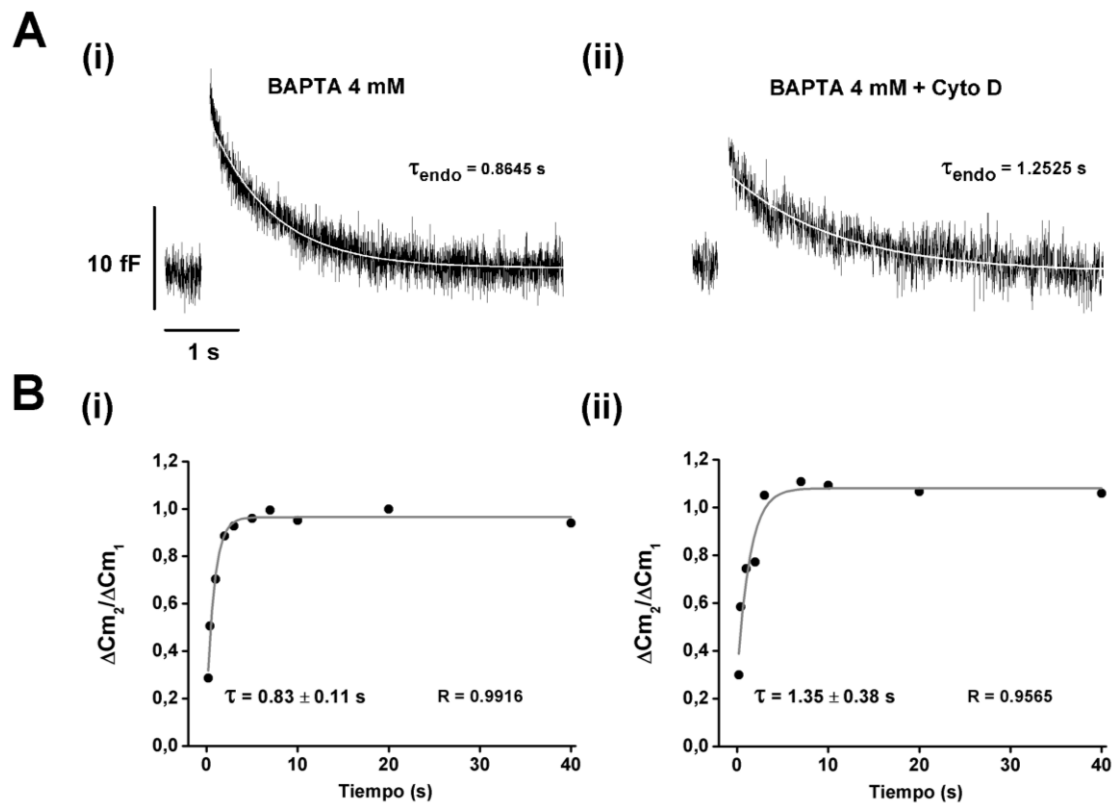


Figura 4.13 – Registros representativos de endocitosis y recuperación de IRP. (A) Trazados representativos de capacitancia de membrana en la condición control (i) y en una célula pretratada con *Cyto D* (ii). Para cada célula la caída de la capacitancia generada por la endocitosis fue ajustada a una función monoexponencial decreciente de la forma $Y = A e^{-t/\tau} + Y_0$. Se puede observar que en *Cyto D* se produce un aumento de la constante de tiempo en la endocitosis. (B) En (i) y (ii) se muestran los gráficos de recuperación para dos experimentos independientes en las condiciones control y *con Cyto D*. Los ajustes realizados con una función monoexponencial de la forma $Y = Y_0 + A (1 - e^{-t/\tau})$ muestran un aumento de la constante temporal de la recuperación en las células tratadas con la droga. Los experimentos se realizaron con 4 mM de *BAPTA* en la solución interna.

La figura 4.14A resume los promedios de estas observaciones. Se puede ver que mientras que *Cyto D* no afectó la ICa^{2+} , sí redujo a la exocitosis y a la endocitosis (figura 4.14A i, ii y iii). Si bien *Cyto D* redujo la endocitosis, esta no dejó de ser compensatoria, y esto se refleja en el hecho de que la relación endo/exo no se modificó significativamente respecto al control (Figura 4.14A iv). Finalmente, como anticipaba el análisis de los ejemplos individuales mostrados previamente, *Cyto D* generó un enlentecimiento significativo en la endocitosis y de la recuperación con respecto a la condición control (figura 4.14A v y vi). El enlentecimiento de la recuperación de *IRP* también se manifestó cuando se ajustaron las curvas promedio de todos los experimentos realizados (figura 4.14B i y ii), donde se puede ver un claro aumento de la constante de tiempo.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que al menos uno de los causantes de la aceleración de la endocitosis y la recuperación de la exocitosis observadas en 4 mM *BAPTA* es la formación de una actina cortical altamente polimerizada. Por otro lado también refuerzan la idea de una relación de causalidad entre la endocitosis rápida y la recuperación rápida, ya que son consistentes con lo observado en las secciones 4.2.2 y 4.3 donde también existió una correlación entre el enlentecimiento de la endocitosis y el enlentecimiento de la velocidad de recuperación de *IRP*.

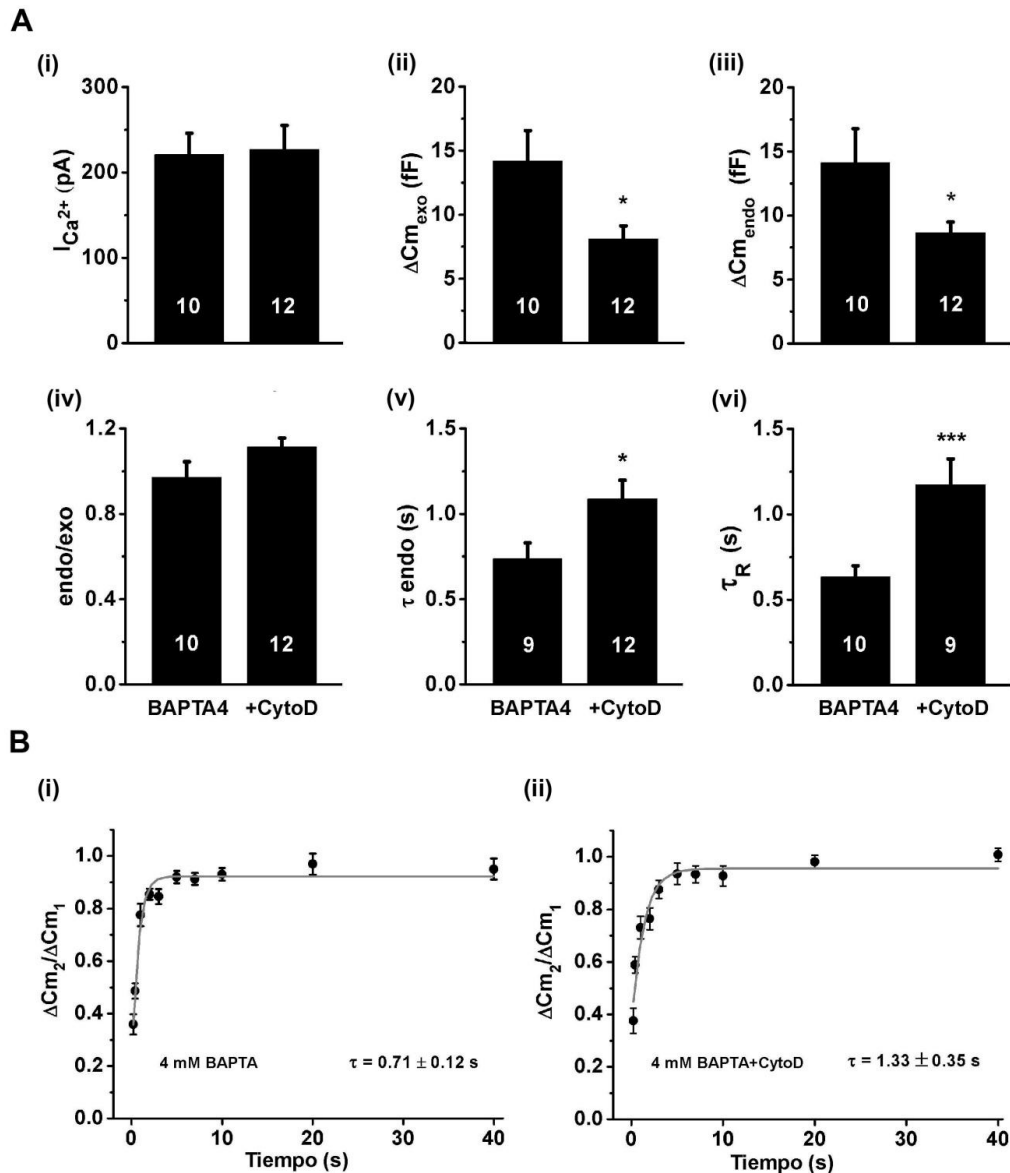


Figura 4.14 – Efecto de *cytochalasin D* en la endocitosis y la recuperación de *IRP*. Para despolimerizar la actina-F, las células fueron pretratadas con 2 μM de *cytochalasin D* (+Cyto D). Todos los experimentos fueron realizados en la condición de 4mM de *BAPTA* en la solución interna. (A) Los gráficos de barras (i)-(v) representan los promedios de $I_{\text{Ca}^{2+}}$, $\Delta C_m \text{ exo}$, $\Delta C_m \text{ endo}$, la relación endo/exo y la constante temporal de la endocitosis ($\tau \text{ endo}$) obtenidos a partir de los registros correspondientes al primer pulso cuadrado despolarizante de 50 ms del protocolo de estimulación. En (vi) se muestra el gráfico de barras conteniendo los promedios de la constante temporal de recuperación (τ_R). En todos los casos se presentan los valores promedios obtenidos para experimentos realizados en la condición control y bajo el tratamiento con *Cyto D*. *Test de Student* para muestras independientes. * $p < 0.05$; *** $p < 0.005$. El número de células evaluadas (n) se representa en cada columna como números en blanco. (B) Curva promedio de recuperación de *IRP*. La recuperación relativa de *IRP* (expresada como $\Delta C_{m2}/\Delta C_{m1}$) fue graficada en relación al intervalo de tiempo entre los dos estímulos de 50 ms aplicados. Cada punto representa el promedio de las mediciones obtenidas en células

independientes. Los valores promedios fueron ajustados a una función de crecimiento monoexponencial de la forma $Y = Y_0 + A (1 - e^{-t/\tau})$.

4.5.3 Efecto de la despolimerización de la actina-F sobre la endocitosis y recuperación asociadas a ETAP

Antecedentes de nuestro laboratorio muestran que en condiciones experimentales estándar (5 mM $[Ca^{2+}]$ externo/0.5 mM $[EGTA]$); ver en Materiales y Métodos, la sección 3.2.5) la aplicación de un estímulo similar en amplitud, forma y duración a un potencial de acción (PA_{sim}), excita una fracción (40%) de vesículas de *IRP* a la cual se la denominó *exocytosis triggered by action potential (ETAP)* (Moya-Díaz y col., 2016). *ETAP* es seguido en forma prácticamente inmediata por una endocitosis rápida dependiente de dinamina y se recupera por un proceso también muy rápido que es altamente dependiente de la endocitosis previa. Estas características son muy similares a las observadas en la condición experimental de 4 mM *BAPTA* en este trabajo de tesis. También es importante remarcar que las τ_{endo} y τ_R obtenidas para 4mM de *BAPTA* fueron muy parecidas a las obtenidas para *ETAP* por Moya-Díaz y col. (2016). Dado estas similitudes, nos planteamos como hipótesis de que ambos procesos ocurren a través de mecanismos similares.

Dado que los resultados de la sección anterior mostraron que en la condición experimental de 4 mM de *BAPTA* la despolimerización de la actina con *Cyto D* entorpece las velocidades de endocitosis y recuperación de *IRP*, decidimos evaluar el efecto de este tratamiento sobre la endocitosis y la recuperación que suceden a *ETAP*. Por lo tanto, evaluamos la hipótesis de que la actina-F favorece la endocitosis rápida y la cinética de la recuperación de *ETAP*.

Para estudiar el efecto de la despolimerización de la *actina-F* sobre la endocitosis y recuperación de *ETAP* las células fueron pretratadas con *Cyto D* (2 μ M por 10 minutos) y luego se aplicó un protocolo compuesto por pares de PA_{sim} con períodos interpulso variables. Al igual que en las secciones previas los períodos interpulso fueron de: 0,2; 0,4; 1; 2; 3; 5; 7; 10; 20 y 40 s. Los pares

de pulsos fueron ordenados al azar durante el experimento y siempre entre par y par se dejó a la célula en reposo durante 30 s. Como se muestra en la figura 4.15A, cada PA_{sim} está formado por una rampa que parte del potencial de reposo en -80 mV y llega hasta un potencial de +50 mV en 2,5 ms, y luego vuelve al potencial de reposo en el mismo tiempo (Chan y col., 2005; Moya-Díaz y col., 2016). Es importante mencionar que la corriente inducida por el segundo pulso del par resultó similar estadísticamente a la primera tanto para los experimentos controles ($I_1Ca^{2+} = 336 \pm 32$; $I_2Ca^{2+} = 330 \pm 31$) como para *Cyto D* ($I_1Ca^{2+} = 363 \pm 39$; $I_2Ca^{2+} = 352 \pm 38$) (*test de Student* para muestras dependientes). En las figuras 4.15B i y ii se presentan trazados representativos de la ICa^{2+} para las condiciones control y *Cyto D* obtenidos en dos células diferentes. Los promedios de las amplitudes de dicha variable se representan en la figura 4.16A-i. Se puede ver que *Cyto D* no afecta significativamente a la ICa^{2+} . La figura 4.15C muestra dos registros que describen la exocitosis y la posterior endocitosis en respuesta a un PA_{sim} para ambas condiciones experimentales. *Cyto D* tampoco afectó significativamente los valores de ΔC_m exo, ΔC_m endo y endo/exo (figuras 4.16 ii, iii y iv). La caída de capacitancia asociada a la endocitosis que se produce luego de *ETAP* fue ajustada a una función monoexponencial de la forma $Y = A e^{-t/\tau} + Y_0$ (ejemplos en figuras 4.15C i y ii para control y *Cyto D* respectivamente). Los promedios de las constantes de tiempo de dichos ajustes se muestran en la figura 4.16A-v. Al igual a lo obtenido en la sección previa con las células tratadas con *BAPTA* 4 mM, *Cyto D* provocó un enlentecimiento significativo del proceso de endocitosis asociado a *ETAP*. Es importante aclarar que al igual que en los casos anteriores presentados en esta tesis, los promedios de ICa^{2+} y ΔC_m exo se obtuvieron a partir de los registros de corriente y capacitancia del primer PA_{sim} del primer par aplicado en cada experimento. Además, los valores promedio de ΔC_m endo, endo/exo y τ endo se obtuvieron a partir de los registros de capacitancia del primer par de pulsos aplicado en cada experimento cuyo tiempo de interpulso fue \geq a 5 s (ver Materiales y Métodos, sección 3.2.6).

Por último, se analizaron los resultados obtenidos con el protocolo de doble pulso para estudiar la recuperación de *ETAP*. En las figuras 4.16B i y ii se muestran las curvas de recuperación promedio de *ETAP* obtenidas en las

condiciones control y *Cyto D*. Las curvas fueron ajustadas a la función monoexponencial creciente de la forma $Y = Y_0 + A (1 - e^{-t/\tau})$. De la misma manera que para la endocitosis, *Cyto D* provocó un enlentecimiento de la cinética de recuperación de *ETAP*, aumentando la constante de tiempo en aproximadamente el doble del valor observado para el control. También el análisis de los ajustes de las curvas de recuperación individuales (de cada célula) muestra que *Cyto D* provocó un enlentecimiento significativo en la cinética de recuperación de *ETAP* (figura 4.16A vi). Estos resultados son coherentes con lo descrito por Moya-Díaz y col. (2016) en donde se observó una correlación entre los enlentecimientos de la endocitosis y de la velocidad de recuperación de *ETAP* en presencia de *Anti-Dyn*, y también son coherentes con lo ya descrito en esta Tesis respecto a *IRP*.

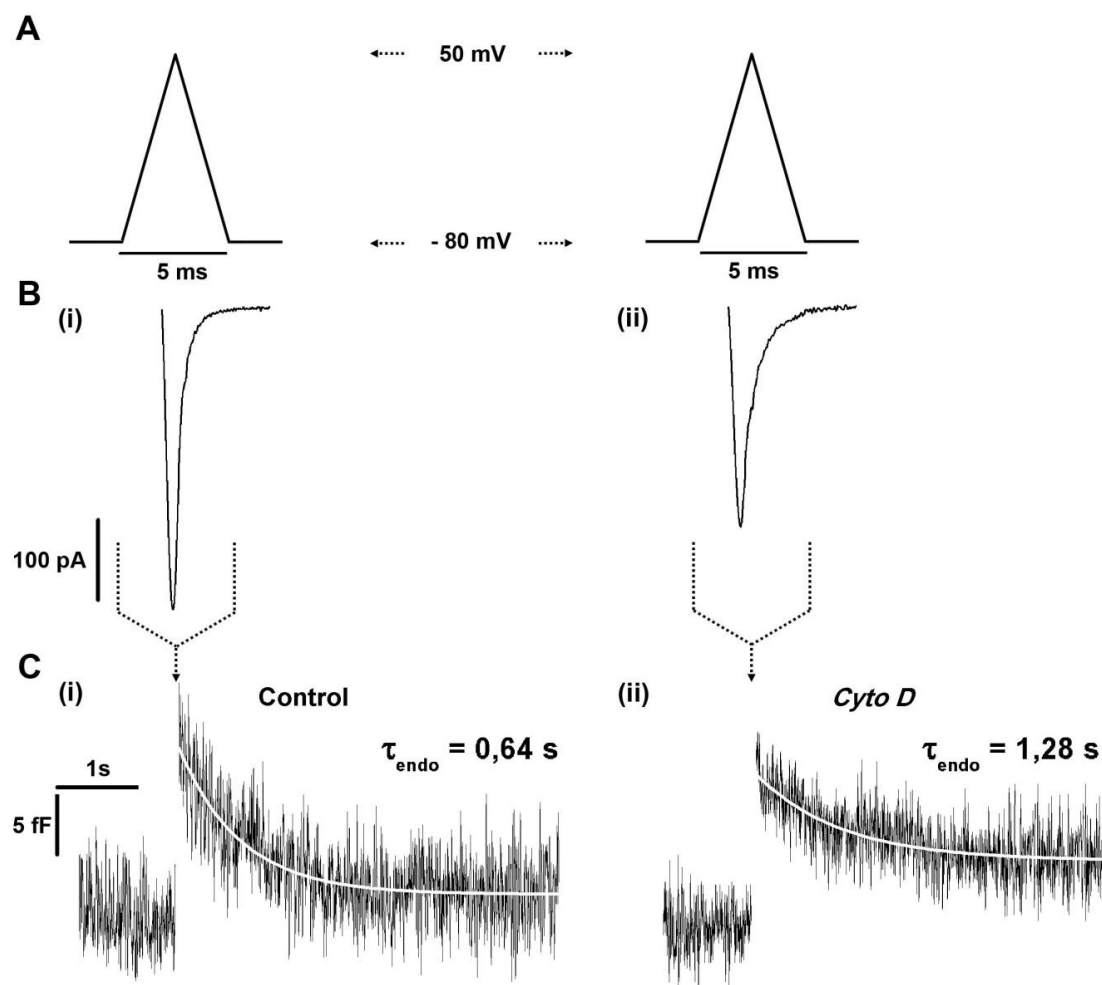


Figura 4.15 – ICa^{2+} , exocitosis y endocitosis en respuesta a la aplicación de un PA_{sim} . (A)

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*. (B) Trazados representativos de ICa^{2+} en respuesta a PA_{sim} para la condición control (i) y para el tratamiento con *Cyto D* (ii). (C) Trazados representativos de capacitancia celular en la condición control (i) y con el tratamiento con *Cyto D* (ii). Se puede observar la exocitosis y la posterior endocitosis en respuesta al estímulo. La línea blanca superpuesta a los trazados de capacitancia representa el ajuste de la endocitosis con una función de la forma $Y = A e^{-t/\tau} + Y_0$. El ajuste muestra que *Cyto D* produce un aumento de la constante temporal (τ endo). Los registros de corriente y capacitancia están en escalas temporales distintas.

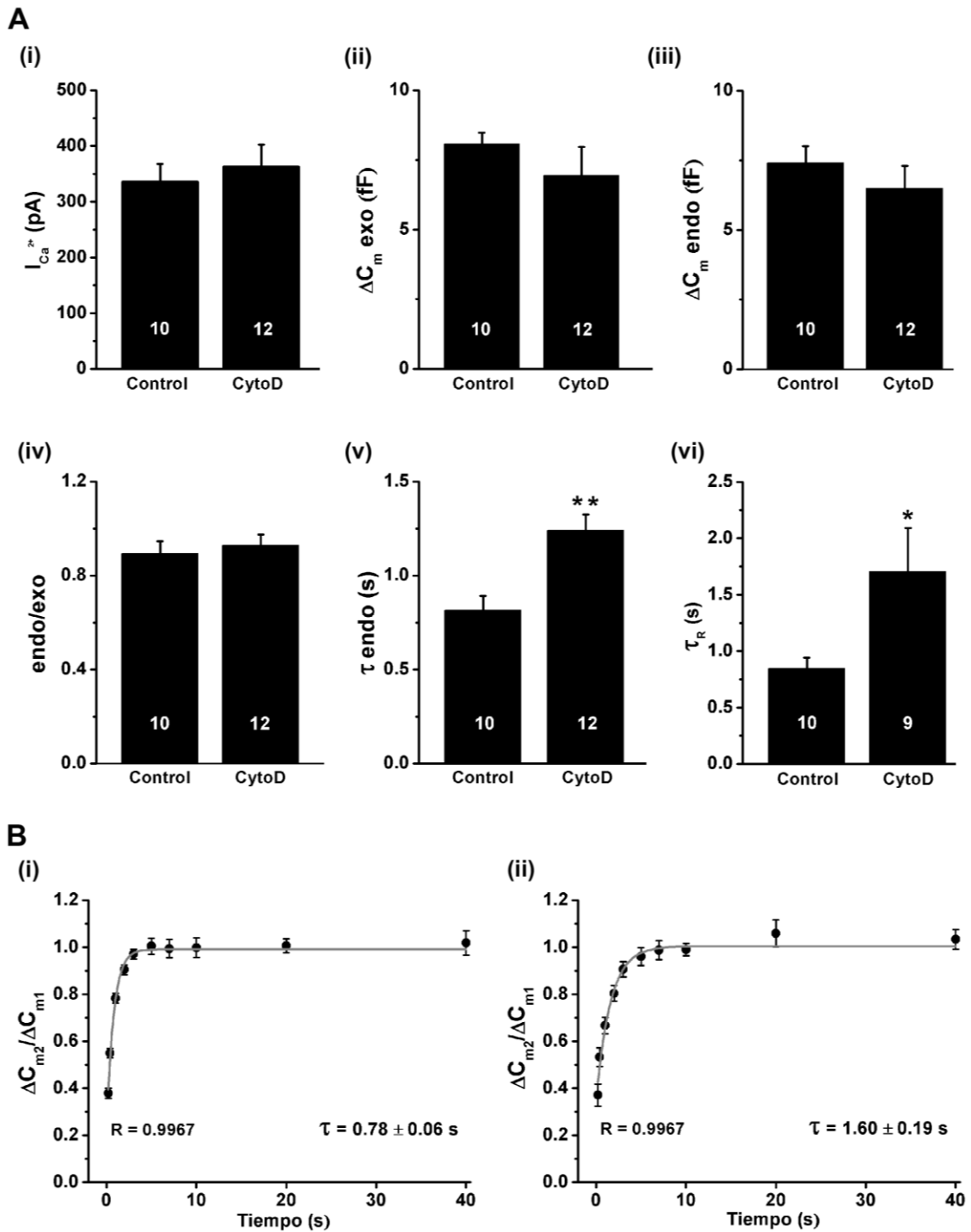


Figura 4.16 – Efecto de *cytochalasin D* en la endocitosis y la recuperación de *ETAP*. Para despolimerizar la actina-F, las células fueron pretratadas con 2 μ M de *Cyto D*. (A) Los gráficos de barras (i)-(vi) representan los promedios de $I_{Ca^{2+}}$, ΔC_m exo, ΔC_m endo, la relación endo/exo, la constante temporal de la endocitosis (τ endo) y la constante temporal de recuperación (τ_R). *Cyto D* provocó un aumento significativo de los valores de τ endo y τ_R . *Test de Student* para muestras independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. El número de células evaluadas (n) se representa en cada columna como números en blanco. (B) Curva promedio de recuperación de

ETAP. La recuperación relativa de *ETAP* (expresada como $\Delta C_{m2}/\Delta C_{m1}$) fue graficada en relación al intervalo de tiempo entre los dos PA_{sim} aplicados. Cada punto representa el promedio de las mediciones obtenidas en células independientes (n). Los valores promedios fueron ajustados a una función de crecimiento monoexponencial de la forma $Y = Y_o + A (1 - e^{-t/\tau})$.

Los resultados presentados en esta sección afirman que en la condición control *ETAP* representa aproximadamente el 40% de *IRP* (ver sección 4.1.1). *ETAP* además es seguido por una endocitosis y un proceso de recuperación con constantes de tiempo de aproximadamente 800 ms. Todos estos valores son muy similares a lo reportado previamente por Moya-Díaz y col. (2016). Además, el hecho de que la recuperación de *ETAP* muestre una constante de tiempo muy similar a la endocitosis es coherente con que exista un acople entre ambos procesos, como fue propuesto por Moya-Díaz y col. (2016). Finalmente, como ya anticipamos al comienzo de esta sección, los valores de las constantes de tiempo τ_{endo} y τ_R para *ETAP* en condición control, resultaron similares a los calculados en este trabajo de tesis para *IRP* en la condición de 4 mM de *BAPTA*.

Los resultados muestran que el pretratamiento con *Cyto D* no afectó los valores de ICa^{2+} , ΔC_m^{exo} , ΔC_m^{endo} y $endo/exo$ que ocurren ante la aplicación de un PA_{sim} . Pero, sin embargo, al igual que lo observado en la condición de 4 mM de *BAPTA*, *Cyto D* provocó el enlentecimiento de la endocitosis y la recuperación de *ETAP*, lo cual indica que la actina-F es importante en los procesos de endocitosis y recuperación rápidas que suceden a *ETAP*.

Finalmente, el conjunto de los resultados obtenidos en esta y las precedentes secciones nos permiten sugerir la acción de mecanismos similares durante los procesos de endocitosis y recuperación que suceden a *ETAP* y la exocitosis en presencia de altas concentraciones de *BAPTA*. Estas coincidencias son básicamente, cinéticas similares, dependencia de dinamina, dependencia de un citoesqueleto de actina-F constituido e interdependencia entre ambos procesos (endocitosis y recuperación).

5. DISCUSIÓN

Resumidamente, en este trabajo observamos que un estímulo de 50 ms aplicado en las condiciones *standard* de nuestro laboratorio (5 mM de Ca^{2+} extracelular y 0.5 mM *EGTA* intracelular, lo cual es suficiente para secretar la mayor parte de *IRP*) provocó una exocitosis de aproximadamente 21 fF. Esto fue seguido en el 75% de los casos por una endocitosis rápida ($\tau_{\text{endo}} \sim 1,2$ s) que no llegó a compensar a la exocitosis previa. Al evaluar la recuperación de *IRP* se observó un proceso bifásico constituido por una primera fase rápida ($\tau \sim 1$ s) y una segunda fase más lenta ($\tau \sim 10$ s), lo que nos llevó a la hipótesis de que este *pool* podría recuperarse por dos procesos independientes. Si esto fuera cierto sería esperable que estos procesos de recuperación respondan diferencialmente a ciertos tratamientos experimentales. Por ejemplo, se sabe que el Ca^{2+} interviene en distintas etapas del proceso de reciclado vesicular, como la traslocación entre *pools* vesiculares, el transporte de vesículas por el citoesqueleto, *el priming* y la endocitosis (Voet y col., 1997; Marengo y col. 2005; Elhamdani y col. 2006; Wu y Wu, 2014b). Por lo tanto, decidimos evaluar la endocitosis y la recuperación de *IRP* variando la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico. Los resultados mostraron que el aumento de Ca^{2+} citosólico a ~ 500 nM provocó un efecto inhibitorio total de la endocitosis y una recuperación relativamente lenta y monofásica de *IRP*. Por otro lado, la disminución del Ca^{2+} citosólico a aproximadamente ~ 20 nM (inducida por aumento de la capacidad *buffer* citoplasmática) favoreció una endocitosis rápida compensatoria que correlacionaba con una recuperación monofásica similarmente rápida. Coherentemente con este último resultado, el bloqueo de la dinamina provocó un enlentecimiento significativo tanto en la endocitosis y en la recuperación de *IRP*. En segundo lugar, los antecedentes bibliográficos muestran también que el citoesqueleto de actina-F cortical participa de distintas etapas del ciclo vesicular, por ejemplo actuando como barrera de la translocación de las vesículas secretorias de reserva hacia el sitio activo de liberación, en el transporte de vesículas hacia la membrana, modulando el tipo de fusión entre *kiss-and-run* y fusión completa y en la endocitosis (Vitale y col., 1995; Doreian y

col., 2008; Watanabe y col., 2013; Gutiérrez y Villanueva, 2018; Shin y col., 2018). A su vez se sabe que la $[Ca^{2+}]$ citosólico modula el ensamblado/desensamblado de la actina-F cortical (Rodríguez del Castillo y col., 1990; Doreian y col., 2008). Nuestros resultados muestran una disminución significativa de la densidad de actina cortical con el aumento en la $[Ca^{2+}]$ citosólico de ~10 nM a ~1000 nM. Este rango cubre los cambios de $[Ca^{2+}]$ citosólico fijadas o estimadas en nuestras condiciones experimentales. Particularmente, mientras que a 500 nM de Ca^{2+} la densidad de actina-F cortical es muy baja, a 20 nM (correspondiente a 4 mM de *BAPTA* según nuestras estimaciones) la densidad es mucho más alta. Esto permite hipotetizar que los cambios observados en la endocitosis y el reciclado vesicular para las diferentes condiciones de Ca^{2+} citosólico y *BAPTA* podrían deberse en parte a estados diferentes de polimerización de la actina-F. En otras palabras, a 4 mM de *BAPTA* (~20 nM de Ca^{2+} citosólico) la actina estaría muy polimerizada, facilitando la endocitosis rápida y acelerando la recuperación de *IRP*, mientras que en 500 nM de Ca^{2+} esta proteína estaría muy despolimerizada, desfavoreciendo la endocitosis rápida y forzando la recuperación por un mecanismo más lento. En coherencia con estas ideas, al despolimerizar la actina por medio de un pretratamiento con *Cyto D* se observó un enlentecimiento simultáneo en la endocitosis y en la recuperación de *IRP*. Finalmente, se analizó el efecto de la despolimerización de la actina-F cortical sobre la endocitosis y la recuperación vesicular asociadas a la exocitosis de *ETAP*. Sabemos de un trabajo previo que esta fracción de *IRP* inducida por PA_{sim} se recupera muy rápidamente a través de un mecanismo asociado a una endocitosis rápida dependiente de dinamina (Moya-Díaz y col., 2016). Coherentemente con lo observado en la parte previa de esta Tesis, el tratamiento con *Cyto D* provocó el enlentecimiento simultáneo de la endocitosis y la recuperación de *ETAP*, reforzando la idea de que el citoesqueleto cortical de actina-F contribuye al establecimiento de un proceso de recuperación vesicular rápida asociado a una endocitosis rápida dependiente de dinamina. Todos esos puntos serán tratados con detalle durante la siguiente discusión, donde se presentarán mecanismos celulares posibles que expliquen dichos resultados.

5.1 Características de *IRP*

El *IRP* es un *pool* vesicular de aproximadamente 15-30 vesículas, altamente acoplado a *CCVD* y capaz de liberarse en respuesta a despolarizaciones breves. Estas características proveen a este *pool* de una alta eficiencia en la respuesta estímulo-secreción, debido a lo cual se propuso que su participación sería importante principalmente a frecuencias bajas de potenciales de acción como las que ocurren en condiciones fisiológicas basales en las células cromafines (Voets y col., 1999; Moya-Díaz y col, 2016). Esta primera sección está dedicada a discutir los resultados obtenidos en cuanto a la magnitud y dinámica de reciclado de *IRP* en nuestras condiciones estándar de 5 mM de Ca^{2+} extracelular y 0.5 mM de EGTA intracelular sin tratamientos experimentales particulares, y compararlos con nuestros datos previos en condiciones similares y con la literatura vigente.

5.1.1 Estimación de *IRP*

Clásicamente se ha analizado la respuesta excitotóxica a pulsos de duración variable a modo de estudiar *pools* vesiculares con diferente probabilidad de liberación. Una despolarización de mayor duración genera más entrada de Ca^{2+} , induciendo una mayor liberación de vesículas. Conceptualmente un *pool* vesicular único, como el *IRP*, se deprime de manera monoexponencial, con lo cual se espera que a determinada duración del estímulo el *pool* en cuestión se libere completamente, alcanzando un *plateau* en la respuesta excitotóxica. Dicho *plateau* se utiliza como una estimación del tamaño del *pool* y la constante de tiempo o su inversa como una medida de la velocidad con la cual el *pool* se deprime. Previamente en nuestro laboratorio, trabajando en células cromafines de ratón, demostramos que frente a la aplicación de despolarizaciones cuadradas de duración variable la exocitosis del *IRP* sigue un comportamiento exponencial de primer orden con una constante de tiempo de aproximadamente 16 s, por lo que se satura prácticamente con pulsos de 50 ms (Alvarez y col., 2013).

Por lo tanto, para evaluar la exocitosis de *IRP* en nuestras condiciones experimentales, se aplicó un pulso cuadrado de 50 ms el cual provocó un ΔC_m exo de 21 ± 2 fF (figura 4.2B-ii). Esta estimación de *IRP* está dentro del rango de las reportadas previamente (Horrigan y Bookman, 1994; Voets y col., 1999; Marengo 2005; Alvarez y col., 2008; Alvarez y Marengo, 2011; Alvarez y col., 2013, Moya-Díaz y col 2016). Asumiendo que el valor de capacitancia de una vesícula es de 1,3 fF (Moser y Neher, 1997b; Voets, 1999; Alvarez, 2013), este valor es equivalente a 16 vesículas. Los valores medidos del tamaño del *IRP* suelen variar dependiendo de los distintos preparados de células cromafines. En rodajas de glándula adrenal de ratón se estimó un *IRP* de 35 vesículas (Voets y col., 1999), 17 vesículas en células de rata en cultivo (Horrigan y Bookman, 1994) y 14 vesículas en células bovinas en cultivo (Gillis y col., 1996; Marengo 2005). Esta diferencia en tamaño de *IRP* se debería en parte a diferencias interespecie y también a los diferentes tipos de preparado. Particularmente se piensa que la célula "*in situ*" (rodajas) mantiene un mayor acople entre las fuentes de Ca^{2+} y las vesículas liberables, lo cual se perdería parcialmente en el cultivo (Moser y Neher, 1997a).

5.1.2 Endocitosis rápida asociada a la exocitosis de *IRP*

La endocitosis es un proceso crucial que se produce en todas las células y que permite, en conjunto con la exocitosis, el reciclado de los componentes de la membrana plasmática y por lo tanto el mantenimiento su homeostasis. Además, en las células secretoras, como las células neuroendocrinas y las neuronas, representa una etapa fundamental del reciclado de vesículas secretorias y sinápticas, y por ende del mantenimiento de la capacidad de secreción hormonal o de neurotransmisores.

En nuestros experimentos en condiciones estándar se observó que la aplicación de un pulso cuadrado de 50 ms produce, luego del aumento en la capacitancia celular, una clara y rápida disminución en esta variable que en la mayoría de las células no llegó a compensar totalmente a la exocitosis previa (figuras 4.1A-iii y 4.2B-iv). La cinética de decaimiento de la capacitancia se

evaluó aplicando un ajuste monoexponencial decreciente sobre cada experimento (Moya-Díaz y col., 2016), obteniendo una constante temporal promedio τ_{endo} de $1,23 \pm 0,18$ s. Procesos de endocitosis parcial ya fueron observados anteriormente en nuestro laboratorio luego de un estímulo cuadrado de 50 ms (Marengo y col., 2005), pero sin embargo no fueron cuantificados. Respecto a la velocidad a la que ocurre este proceso, otros autores ya habían descrito en células cromafines una endocitosis rápida luego de una excitación inducida por despolarizaciones individuales cortas (Chan y Smith, 2001). Particularmente en nuestro laboratorio describimos una endocitosis rápida ($\tau_{\text{endo}} = 0.5$ s) dinámica dependiente en cromafines de ratón estimuladas con potenciales de acción aislados (Moya-Díaz y col., 2016). Mediciones de capacitancia en terminales nerviosas de mamíferos (Hsu y Jackson, 1996; Sun y col., 2002; Hull y von Gersdorff, 2004) y de células bipolares de *goldfish* estimuladas eléctricamente (von Gersdorff y Matthews, 1994) también han revelado un componente rápido de endocitosis (τ_{endo} 0,2 - 2,0 s).

5.1.3 La cinética de recuperación de IRP depende de un proceso bifásico

Durante el reposo la frecuencia de disparo de potenciales de acción de las células cromafines es de 0.1-1 Hz, mientras que en condiciones de estrés puede aumentar hasta ~20 Hz (Kidokoro y Ritchie, 1980; de Diego y col., 2008) generando la liberación masiva de adrenalina y otras sustancias activas (Winkler y Westhead, 1980). El mantenimiento de la secreción en cualquier rango de frecuencias de estimulación requiere del llenado continuo de los *pools* vesiculares a tasas que coincidan con la actividad exocítica (Smith y col. 1998; Sørensen 2004; Cádenas y Marengo, 2016). Se ha especulado que la importancia fisiológica de IRP estaría basada en que comprende un grupo de vesículas capaces de liberarse en respuesta a potenciales de acción aplicados a frecuencias bajas, del orden de las existentes en reposo (Chan y col. 2005; Alvarez y col., 2013; Moya-Díaz y col., 2016). Esto es debido a que a dichas

frecuencias la acumulación de Ca^{2+} residual es nula o muy limitada y sería esperable que solamente las vesículas próximas a canales de Ca^{2+} (característica distintiva de *IRP*) puedan exocitarse (Neher, 1998). Pero *IRP* podría ser considerado un *pool* vesicular fisiológicamente relevante solamente si es capaz de recuperarse luego de ser deprimido con una velocidad suficiente como para mantener la exocitosis frente a frecuencias de PA de al menos el rango existente en el reposo de las células cromafines. En esta Tesis la recuperación de *IRP* se ajustó a una función biexponencial con un componente rápido ($\tau_1 \sim 1$ s) y uno lento ($\tau_2 \sim 10$ s). Esto concilia resultados previos de la literatura, ya que (i) clásicamente se definió una única constante de recuperación de *IRP* en el orden de 7-10 s (Moser y Neher 1997; Moya-Díaz y col 2016), (ii) pero en nuestro laboratorio determinamos que dentro de *IRP* existe también una fracción de vesículas (*ETAP*, por *exocytosis triggered by action potencial*) que en forma aislada se recupera con una constante de tiempo diez veces más rápida, de aproximadamente 0,7 s (Moya-Díaz, 2016).

Para evaluar la posibilidad de que los dos componentes cinéticos de recuperación descritos para *IRP* correspondan a dos mecanismos celulares diferentes se realizaron intervenciones que intenten modificar diferencialmente a estos.

5.2 La endocitosis y la recuperación de *IRP* dependen de la concentración de calcio citosólico

Además de ser el disparador final de la fusión vesicular, el Ca^{2+} citosólico modula la secreción de las células cromafines a distintos niveles. Particularmente hay que tener en cuenta el perfil de $[\text{Ca}^{2+}]$ que se genera durante las estimulaciones, por ejemplo, cuando se modifica la frecuencia de potenciales de acción (Voets y col., 1999; Elhamedani y col., 2001; Fulop y col., 2005; Cárdenas y Marengo 2016). A frecuencias bajas de potenciales de acción como las que ocurren en condiciones fisiológicas basales, el Ca^{2+} citosólico no se acumula marcadamente (Klingauf y Neher 1997; Becherer y

col., 2003; Fulop y Smith, 2006) y por lo tanto la exocitosis se limita a un grupo de vesículas estrechamente acopladas a los CCVD (Voets y col. 1999; Marengo 2005; Oré y Artalejo, 2005; Álvarez y col. 2008). Contrariamente, una alta frecuencia de potenciales de acción como la que ocurre en condiciones de estrés (10-20 Hz), lo mismo que trenes de despolarizaciones cuadradas, provoca la acumulación sostenida de Ca^{2+} residual global (Klingauf y Neher 1997; Marengo y Monck 2003; Fulop y Smith 2006), induciendo la exocitosis de vesículas secretorias independientemente de su localización y además movilizándolas río abajo hacia los sitios de fusión (Voets y col. 1999; Marengo, 2005). Esto en conjunto conduce a liberación de una importante población de gránulos secretorios (Elhamdani y col. 2001; Fulop y col. 2005). Los efectos del Ca^{2+} residual sobre la movilización/maduración vesicular merecen una mención aparte por su complejidad. Se observó clásicamente que la movilización de vesículas desde el *pool* de reserva hacia el *RRP* e *IRP* es estimulada por aumentos sostenidos del Ca^{2+} citosólico global del orden de 0.5-1 μM (Heinemann y col, 1993; Voets y col., 1999; Marengo y col., 2005). Este comportamiento cinético global puede explicarse en realidad como un conjunto de fenómenos que son estimulados por Ca^{2+} , como lo son el tráfico de vesículas a través del citoesqueleto, la transferencia de las vesículas a la membrana plasmática a través de la barrera que constituye el citoesqueleto de actina cortical y el priming vesicular (Ñeco y col., 2003; Sørensen, 2004; Pin Li y col., 2018). Se demostró también que la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico modula, positivamente o negativamente según los casos, distintos procesos de endocitosis (von Gersdorff y col 1994; Artalejo y col., 1995, 1996, 2002; Elhamdani y col. 2006, Wu y Wu, 2014b). Es bien sabido que la endocitosis clásica clatrina dependiente es acelerada por el aumento del Ca^{2+} citosólico (Engisch y Nowyck, 1998). El efecto inhibitorio del Ca^{2+} sobre ciertos tipos de endocitosis será discutido en forma más detallada posteriormente.

Para explicar la recuperación bifásica de *IRP* observada en este trabajo de Tesis partimos de una simple hipótesis inicial, que consistió en asumir que esta dependía de dos mecanismos independientes, los cuales podían potencialmente ser afectados diferencialmente por el Ca^{2+} citosólico. Uno de estos mecanismos es la movilización/maduración de vesículas desde *pools* río

arriba, que como se describió previamente ya había sido planteado por distintos laboratorios como una vía de recuperación de *RRP* e *IRP* que es potenciada frente a aumentos sostenidos del Ca^{2+} citosólico. El segundo mecanismo planteado surge de resultados previos de nuestro laboratorio (Moya-Díaz y col, 2016), que demostraron que una fracción de *IRP* a la cual llamamos *ETAP* (exocitada en respuesta a un estímulo similar a un potencial de acción (PA_{sim}) nativo, ver Introducción, sección 1.8.2) se recuperaba rápidamente (constante temporal de ~ 0.7 s) a través de un mecanismo asociado a una endocitosis rápida dependiente de dinamina (Moya-Díaz y col., 2016). La velocidad cinética de recuperación de *ETAP* y su alto acople a la endocitosis sugieren un mecanismo de reciclado local, independiente del prolongado proceso de generación y maduración de gránulos que se inicia en el aparato de Golgi.

5.2.1 La endocitosis rápida se inhibe con el aumento de calcio citosólico

Para simular un aumento sostenido del Ca^{2+} residual citosólico se dializó el medio intracelular desde la pipeta de *patch* con una solución interna conteniendo una $[\text{Ca}^{2+}]$ libre de ~ 500 nM (en *EGTA* 0,5 mM). En esta condición experimental un estímulo de 50 ms provocó una exocitosis similar a la observada en condición control. Este resultado se contradice con hallazgos previos nuestros y de otros autores, debido a que un aumento de este orden en el Ca^{2+} citosólico estimula la maduración y movilización de las vesículas secretorias hacia los sitios de liberación, aumentando el tamaño de *IRP* (Becherer y col., 2003; Marengo y col., 2005, Alvarez y col., 2011; Mathias Pasche y col, 2012; Marengo 2015). Sin embargo, este resultado puede ser explicado si tomamos en cuenta otros procesos que se alteran frente a este tratamiento. En primer lugar, la elevación del Ca^{2+} promueve la exocitosis espontánea y el vaciamiento de los *pools* vesiculares (Mathias Pasche y col, 2012). En segundo lugar, y particularmente en los experimentos de esta Tesis, el aumento del calcio citosólico a 500 nM generó una disminución significativa en la ICa^{2+} , probablemente asociada a una inactivación Ca^{2+} dependiente de

los CCVD (K. Lee y col., 1985; A. Lee y col., 1999), lo cual conlleva evidentemente a un efecto negativo sobre la exocitosis. Por lo tanto, es probable que la acción combinada de estos efectos en simultáneo (aumento de la transferencia de vesículas a *IRP*, vaciamiento espontáneo del *pool* y menor $[Ca^{2+}]_i$) sean la explicación de porqué no se observó un aumento significativo de la exocitosis en la condición de $[Ca^{2+}]_i$ 500 nM.

Notoriamente, luego de la exocitosis inducida por el estímulo de 50 ms en presencia de 500 nM de Ca^{2+} citosólico basal no se observó una posterior endocitosis. Otros autores ya han observado una inhibición total o parcial de la endocitosis en respuesta a un aumento del Ca^{2+} citosólico. Este tipo de respuesta podría deberse en términos generales a dos razones. i) Una inhibición directa o indirecta por parte del Ca^{2+} citosólico de alguna de las etapas de la endocitosis. Un ejemplo de esto son los resultados obtenidos en neuronas bipolares de la retina de *gold fish* por parte de von Gersdorff y col., que muestran que la endocitosis rápida provocada por un estímulo de 200 ms es inhibida al aumentar la $[Ca^{2+}]_i$ citosólico basal a valores cercanos 1 μ M (Von Gersdorff y col., 1994). Otro ejemplo son los experimentos realizados en la presinapsis del *calyx of Hell* de ratas por el grupo de Lig Gang Wu, los cuales indican que un aumento leve pero prolongado del Ca^{2+} inhibe la endocitosis (Wu y Wu, 2014b). Un posible mecanismo subyacente a estos fenómenos podría ser la activación de una corriente de Cl^- dependiente de Ca^{2+} (Hu y Von Gersdorff, 2004), que con la consecuente elevación del Cl^- intracelular podría alterar las cargas de superficie del lado interno de la membrana celular que son responsables de la unión electrostática de proteínas claves en la regulación de la endocitosis como algunas proteínas G y *PKC*, que junto a la calcineurina y otras enzimas pueden modular la endocitosis asociada a vesículas sinápticas (Hull y Von Gersdorff, 2004). Otro posible mecanismo sería la alteración del ciclo de fosforilación/desfosforilación de fosfinas asociadas a la endocitosis (Marks y McMahon, 1998; Armbruster y col., 2013). Si el aumento prolongado del Ca^{2+} favoreciese la fosforilación de algunas de estas proteínas, por ejemplo, de la dinamina, esto llevaría a su desactivación y por lo tanto a la inhibición de la endocitosis (Wu y Wu, 2014b). ii) El segundo motivo puede ser el favorecimiento de un tipo de endocitosis más lenta que reemplace a la

endocitosis rápida, imponiéndose como el mecanismo dominante. Un claro ejemplo de esto último se observó en células cromafines bovinas y murinas. Particularmente trenes de PA_{sim} aplicados a frecuencias bajas (0,5 Hz) provocan una endocitosis muy rápida e independiente de clatrina y de la actividad de la proteína fosfatasa calcineurina. Por el contrario, a frecuencias mayores de 6 Hz, que inducen el aumento de Ca^{2+} citosólico por arriba de 600 nM, dicho proceso es reemplazado por una endocitosis clatrina y calcineurina dependiente (Chan y col., 2001; Chan y col., 2003). Estos autores a su vez muestran que esta endocitosis clatrina dependiente se potencia progresivamente cuando aumenta la frecuencia de estimulación, lo cual coincide con los resultados de Engisch y Nowycky en cromafines bovinas, que mostraron que el aumento de la entrada de Ca^{2+} acelera y potencia a la endocitosis compensatoria dependiente de calcineurina (Engisch y Nowycky, 1998). Artalejo y colaboradores (Artalejo y col., 2002) también encontraron una transición de una endocitosis rápida clatrina independiente y dependiente de dinamina-1, a una endocitosis clatrina y dinamina-2 dependiente cuando la estimulación era sostenida por tiempos más largos. Estos autores propusieron que dichos resultados podían ser interpretados en términos de un cambio en el modo de fusión vesicular, donde frente a estímulos débiles (frecuencias bajas, bajo Ca^{2+} citosólico) predominaría un mecanismo de tipo *kiss-and-run* asociado lógicamente a una endocitosis rápida, mientras que estímulos más potentes o sostenidos que promueven mayor incremento de Ca^{2+} citosólico activarían la fusión completa seguida de una endocitosis clatrina dependiente. Esta hipótesis fue revalidada en experimentos de doble *patch* (*whole-cell* para fijar el potencial, y *cell attached* para el registro del cambio de capacitancia provocado por la fusión de vesículas individuales), donde se demostró que el aumento de la concentración citosólica de Ca^{2+} a niveles micromolares provocaba la transición desde un mecanismo de *kiss-and-run* a uno de fusión total (Elhamdani y col. 2006). En la misma línea conceptual, el grupo de Corey Smith mostró en células cromafines de ratón que mientras frecuencias bajas (0.5 Hz) de potenciales de acción promovían una fusión de tipo *kiss and run*, frecuencias altas (10 Hz) favorecían el modo de fusión total a través de un mecanismo mediado por *PKC* (Fulop y col., 2005; Fulop y col., 2006). Estos autores sostenían que la dinamina I estaba involucrada en ambos mecanismos (Fulop y

col., 2008). Es importante aclarar que esta transición a una endocitosis clásica dependiente de clatrina redundaría en nuestros experimentos en una reducción de la endocitosis registrada, ya que su velocidad es mucho más lenta y sólo se aceleraría a muy altas concentraciones de Ca^{2+} . Debido a esto es esperable que resulte en una baja o inexistente endocitosis en el marco temporal de nuestros registros (el período en que realizamos nuestros registros, unos pocos segundos, no es suficiente para que este tipo de endocitosis se desarrolle).

El reciclado vesicular depende en última instancia en la capacidad de la célula de recuperar, a través de la endocitosis, la membrana exocitada. Por lo tanto, la magnitud y la velocidad de la endocitosis pueden redundar potencialmente en la eficiencia y cinética del proceso de reciclado y de recuperación de los *pools* vesiculares liberables. Por lo tanto, nos preguntamos si el aumento de Ca^{2+} basal, al inhibir la endocitosis rápida, estaría influyendo en la magnitud y/o cinética de la recuperación del *IRP*.

5.2.2 Efecto del aumento de calcio citosólico en la recuperación de *IRP*

Nuestros resultados muestran que el aumento sostenido del Ca^{2+} citosólico en ~500 nM no solo inhibió la endocitosis rápida, sino que también provocó la aparente desaparición del componente rápido de recuperación de *IRP* (figura 4.2C). Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad que este componente haya sólo disminuido y que por lo tanto nuestro ajuste no sea capaz de identificarlo. De todas formas, estos resultados en conjunto sugieren que bajo estas condiciones experimentales *IRP* se recupera principalmente por un mecanismo que no está acoplado estrechamente a la endocitosis. Una explicación posible es que el rellenado de *IRP*, luego de su depresión, ocurra a través de la translocación vesicular desde otros *pools* vesiculares que se encuentran río arriba. Esto no quiere decir que en última instancia no sea necesario un proceso endocítico para el mantenimiento homeostático del sistema, pero esta endocitosis puede ocurrir de manera lenta y/o desacoplada a la exocitosis.

Como se describió en la introducción de esta tesis, se sabe que las vesículas secretorias, a partir de su gestación en Golgi, pasan por una compleja secuencia de procesos en la que se establecen *pools* vesiculares de distintos estados de maduración organizados secuencialmente. Según estos modelos, las vesículas se movilizarían desde los *pools* río arriba hacia los *pools* río abajo, permitiendo la recuperación de los *pools* liberables (Neher y col., 1982; Kaplan y col., 1988; Heinemann y col., 1994; Voets y col., 1999; Ashery y col., 2000; Becherer y col., 2006). En esta Tesis se estimó una constante temporal de recuperación de *IRP* en presencia de Ca^{2+} 500 nM de ~5 s, la cual es dos veces más rápida que los ~10 s estimados para el componente lento en las condiciones control. Esto indica que el proceso representado por el componente lento se acelerará con el aumento del Ca^{2+} citosólico. Esto es coherente con las hipótesis vigentes. Se sabe que el proceso de translocación vesicular es favorecido con el aumento del Ca^{2+} citosólico (Heinemann y col., 1994). Resultados previos de nuestro y de otros laboratorios demostraron que el tamaño de *IRP* y su recuperación luego de ser deprimido son dependientes de un proceso de traslocación vesicular favorecido por Ca^{2+} (Voets y col, 1999; Marengo, 2005), e incluso hay evidencias que sugieren que esta traslocación ocurriría desde el *RRP* (Chan y col., 2005; Moya-Díaz y col, 2016).

5.2.3 La endocitosis rápida se potencia a concentración

baja de calcio citosólico

De acuerdo a lo explicado arriba, nuestros resultados indican que la endocitosis se inhibe al elevar la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico, y esto concide con la desaparición del componente rápido de recuperación. Por lo tanto, el siguiente paso consistió evaluar estos procesos en condiciones de bajas concentraciones de Ca^{2+} citosólico basal. Esto se efectivizó por medio del agregado de concentraciones crecientes del quelante de Ca^{2+} *BAPTA*. En la figura 4.4 se muestra que el incremento de *BAPTA* desde 0,5 a 4 mM favorece marcadamente la endocitosis: mientras que a 0,5 mM; el proceso de

endocitosis es incompleto (compensa menos del 50% de la exocitosis previa) y presenta una constante temporal $\tau_{\text{endo}} \sim 1,3$ s; a 4 mM la compensación es completa y ocurre más rápidamente ($\tau_{\text{endo}} \sim 0,7$ s). Esta cinética de endocitosis está entre las más rápidas registradas en células cromafines y en neuronas. Un proceso endocítico similar se observa cuando las células cromafines son estimuladas por medio de estímulos leves, como un PA_{sim} aplicado en forma aislada o a bajas frecuencias (Chan y Smith., 2001; Chan y Smith., 2003; Moya-Díaz y col., 2016), lo cual se asocia a bajas concentraciones de Ca^{2+} citosólico (Chan y col., 2003). Se propuso que esta endocitosis rápida que ocurre a bajas concentraciones de Ca^{2+} es independiente de clatrina (Artalejo y col., 1995, 1996, 2002) pero dependiente de dinamina, y que podría ser el paso final de una fusión transitoria de tipo *kiss-and-run* (Elhamdani y col. 2006). Otro tipo de endocitosis con una cinética del orden de la observada en esta Tesis para concentraciones altas de *BAPTA* es la denominada *ultrafast endocytosis* (Watanabe y col., 2013) descrita en neuronas de hipocampo. Este tipo de endocitosis presenta tres características que descartan la posibilidad que esté relacionada con el *kiss-and-run*: en primer lugar la fusión vesicular que la antecede no se presenta en forma de estructura omega, sino con una amplia abertura del poro de fusión que sugiere un colapso completo; en segundo lugar ocurre en una zona periférica a la zona activa (donde ocurre la fusión); y tercero, la superficie de las vesículas invaginadas durante la endocitosis es equivalente a 4 vesículas sinápticas y no a una como en el caso del *kiss-and-run*. A partir de los resultados de esta Tesis no es posible decidir entre estos dos modelos. Sin embargo hay que considerar varios aspectos. En principio, hasta el momento no se ha determinado la existencia de *ultrafast endocytosis* en las células cromafines. Por otro lado la *ultrafast endocytosis* solamente se manifiesta en hipocampo a 37° C y no a temperatura ambiente (Watanabe y col., 2014), que es la condición de la presente Tesis. Finalmente, la *ultrafast endocytosis* implica un camino de reciclado más largo y más lento que el *kiss and run*, ya que en hipocampo las vesículas endocitadas se reciclan a través de endosomas y aún a 37° C tardan aproximadamente 10 s en generar vesículas sinápticas (Watanabe y col., 2014). Este tiempo de reciclado no

coincide con lo observado en esta Tesis para *IRP* en presencia de *BAPTA*, como se discutirá a continuación.

5.2.4 La recuperación de *IRP* se potencia a concentración baja de calcio citosólico

El siguiente paso fue estudiar si la disminución de la concentración citosólica de Ca^{2+} por medio del agregado de concentraciones crecientes de *BAPTA* afecta la recuperación de *IRP*. Las curvas experimentales de recuperación fueron ajustadas con una función monoexponencial de la forma $Y = Y_0 + A(1 - e^{-t/\tau})$ debido a que la utilización de una biexponencial no mejoraba la calidad de los ajustes. En la figura 4.6 se puede ver que, a diferencia de 0.5 mM *EGTA*, en todas las concentraciones de *BAPTA* utilizadas solamente se observa el componente rápido de recuperación. No tenemos datos empíricos que nos permitan explicar la desaparición del componente lento. Sin embargo, basándose en las propiedades cinéticas de ambos *buffers* es posible especular que este resultado puede estar asociado a la capacidad de *BAPTA* de restringir espacialmente los gradientes de Ca^{2+} en los microdominios próximos a los canales (Neher, 1998). En otras palabras, es posible que al menos en parte la traslocación de vesículas hacia *IRP* dependa del aumento local de Ca^{2+} , y dado que *BAPTA* tiene una mayor velocidad para quelar el Ca^{2+} que *EGTA* estaría restringiendo la elevación del Ca^{2+} en una zona cercana al canal y por lo tanto desfavoreciendo la recuperación de *IRP*. Becherer y col. observaron por *TIRFM* que los gradientes de Ca^{2+} favorecían la traslocación de vesículas hacia los canales donde estos mismos gradientes se formaban (Becherer y col., 2003). Dado que *IRP* es un grupo de vesículas maduras acopladas espacialmente a los canales de Ca^{2+} , podemos interpretar estos resultados como un proceso de llenado de este *pool*. Es importante mencionar que *EGTA* y *BAPTA* tienen un K_d similar, por lo que no esperaríamos variaciones significativas en el Ca^{2+} citosólico global entre los dos quelantes.

Por otra parte, el aumento en la concentración de *BAPTA* desde 0.5 a 4 mM provocó la aceleración en la recuperación de *IRP*, como muestra la

marcada disminución de la constante temporal desde ~1,5 s hasta ~0,5 s respectivamente. Esto se observa tanto en los ajustes de los promedios (figura 4.6) como en los de los experimentos individuales (Figura 4.7). Si nos detenemos en los valores previamente mencionados para la constante de tiempo de la endocitosis observaremos un cierto paralelismo entre el comportamiento de ésta y de la recuperación de *IRP* frente a las distintas concentraciones de *BAPTA*. Esto sugiere que el componente rápido de recuperación está asociado de alguna manera a la endocitosis rápida. En otras palabras, podemos plantear la hipótesis que frente a la depresión de *IRP* provocada por la estimulación y la consecuente exocitosis, se activa un proceso rápido de recuperación del *pool* cuyo paso inicial es la endocitosis que lleva a la internalización de la vesícula. Esta hipótesis además es coherente con que el aumento en la $[Ca^{2+}]$ citosólico a 500 nM inhibió la endocitosis y provocó simultáneamente la desaparición o disminución del componente rápido de recuperación. Nuestras estimaciones (Fig 4.10) indican que la concentración citosólica de Ca^{2+} a 0.5 y 4 mM de *BAPTA* se sitúa en 60 y 20 nM aproximadamente. Por lo tanto, podemos suponer que las alteraciones observadas en la endocitosis y en la velocidad de recuperación de *IRP* ocurren en un rango entre 20 y 500 nM de Ca^{2+} .

Otro resultado experimental que apoya la hipótesis de una vinculación entre la endocitosis rápida y la fase de recuperación rápida de *IRP* es el obtenido en los experimentos realizados con el anticuerpo monoclonal anti-dinamina (Figuras 4.8 y 4.9). La dinamina es una GTPasa involucrada en los pasos finales de varios tipos de procesos endocíticos (Ferguson y De Camilli, 2012; Gormal y col., 2015). Utilizando la condición de 4 mM *BAPTA*, por ser la que más favorece a estos procesos de endocitosis y recuperación rápidas, se observó que la diálisis intracelular de este anticuerpo enlentece significativamente ambos procesos. Es de remarcar que las constantes de tiempo de la endocitosis y de la recuperación resultaron similares, tanto en condición control como en presencia de *Anti-dyn*. Este resultado es también coherente con lo hallado previamente en nuestro laboratorio en relación a *ETAP* (Moya-Díaz y col, 2016).

5.3 La actina-F cortical favorece la endocitosis rápida y la recuperación de *IRP*

Los resultados de este trabajo de tesis muestran que el aumento del Ca^{2+} citosólico basal a 500 nM hace desaparecer la endocitosis rápida, mientras que la recuperación se aproxima a un único componente exponencial lento. En la misma línea, los resultados evidencian que el aumento en la concentración del *buffer* de Ca^{2+} *BAPTA* en el citosol (lo cual provoca una disminución significativa del Ca^{2+} citosólico basal) aumenta y acelera a la endocitosis rápida, y paralelamente también acelera a la fase rápida de recuperación de *IRP*. Dichos resultados sugieren que el Ca^{2+} citosólico basal sería un modulador tanto de la endocitosis como de la recuperación de *IRP*. Si bien, como fue expuesto previamente, el Ca^{2+} puede regular la endocitosis y la recuperación a través de diversos mecanismos, un factor común que afecta a ambos procesos y que es Ca^{2+} sensible es la polimerización/despolimerización de la red de actina cortical. Es sabido que dicha red interviene en distintas etapas del proceso secretorio, incluidas la translocación vesicular a la membrana plasmática, la exocitosis y la endocitosis (Trifaró y col., 2000; Doreian y col., 2008; Watanabe y col., 2013; Shin y col., 2018). Ya a fines del siglo XX se ha demostrado en células cromafines que la red cortical de filamentos de actina-F actúa como una barrera que impide que las vesículas secretorias lleguen a su sitio de liberación en la membrana plasmática, y que frente a la entrada de Ca^{2+} dicha red se digrega parcialmente permitiendo el paso de las mismas (Cheek y col., 1991; Vitale y col., 1995; Trifaró y col. 2000). Más recientemente se demostró que ante el aumento del Ca^{2+} citosólico ocurre además una remodelación dinámica de la actina-F cortical, con la formación “canales” y “jaulas” en esta malla por los que las vesículas se movilizarían, y además una polimerización focalizada de filamentos de actina que actuarían como rieles a través de los cuales las vesículas se transportarían con la asistencia de motores moleculares a los sitios de liberación de la membrana (Trifaró y col., 2008; Gutiérrez y Villanueva, 2018; Li y col, 2018). Respecto a la endocitosis, desde hace unos años se están acumulando evidencias de que la tensión generada por la actina-F puede suplementar a la promovida por otras

proteínas durante la invaginación de la membrana en procesos tales como la endocitosis mediada por clatrina y la *bulk* endocitosis, y resulta fundamental además en la *ultrafast endocytosis* (Daste y col., 2017; Gormal y col., 2015; Watanabe y col., 2013;). Finalmente, también hay claras evidencias de que el grado de polimerización de la actina cortical puede modular el modo de fusión durante la exocitosis. Particularmente la actina-F cortical favorece el tipo de fusión *kiss-and-run* por sobre la fusión completa debido a que estabilizaría el poro de fusión, permitiendo que la vesícula se recupere posteriormente de manera intacta (Doreian y col., 2008). Esto tendría claros efectos sobre la endocitosis, ya que se sabe que el *kiss and run* se asocia con una endocitosis rápida (Chan y col., 2001; Chan y Smith, 2003; Elhamdani y col., 2006). Por lo tanto, estímulos leves que no alteran significativamente el Ca^{2+} citosólico, y por ende están asociados a una alta densidad de actina-F cortical, favorecen el tipo de fusión transitoria *kiss-and-run* y una posterior endocitosis rápida (Artalejo y col., 2002; Chan y col., 2001; Elhamdani y col., 2001, 2006; Doreian, 2008). Sería lógico esperar que esto a su vez permita un reciclado vesicular rápido y localizado próximo a la membrana, ya que la vesícula recuperada intacta luego del *kiss-and-run* puede ser rellena nuevamente de adrenalina y puesta a disposición rápidamente para ser liberada nuevamente. Contrariamente, estímulos intensos que provocan un aumento mayor y sostenido de Ca^{2+} en el citosol y que inducen la despolimerización de la actina cortical favorecerían la fusión completa y una endocitosis más lenta clatrina dependiente (Chan y col., 2001; Elhamdani, 2006; Doreian, 2008). Esto implicaría en cambio un reciclado lento, ya que la fusión completa provoca la pérdida del núcleo proteico de la vesícula y la dilución de la membrana de la misma en la membrana plasmática, con lo cual la vesícula debe ser recuperada de *novo* desde Golgi y luego seguir el proceso completo de maduración y transporte hasta la membrana (Houy y col., 2013).

En la figura 4.11 se observa un claro efecto de la concentración citosólica de Ca^{2+} en el rango de 10 a 1000 nM sobre la densidad de actina-F cortical. Por lo tanto, se puede plantear la hipótesis de que al modificar la $[\text{Ca}^{2+}]$ entre 20 nM (valor estimado para *BAPTA* 4 mM a partir de nuestros experimentos con Fura-2) hasta 500 nM estaríamos modificando

significativamente el grado de polimerización de la actina cortical y esto podría ser un importante factor que regule la endocitosis y la posterior recuperación de *IRP*. Concretamente y apoyándonos también en antecedentes bibliográficos, al fijar la concentración citosólica de Ca^{2+} en 500 nM la densidad de actina-F cortical sería baja, lo cual estaría favoreciendo la fusión completa en desmedro del *kiss-and-run* (Rodríguez Del Castillo y col., 1990; Elhamdani y col, 2006; Doreian y col, 2008). Esto consecuentemente favorecería a la endocitosis clásica clatrina dependiente por encima de la endocitosis rápida (Chan y col, 2001; Elhamdani y col, 2006), por lo que se esperaría que el rellenado de *IRP* sea a través de un mecanismo desacoplado de la endocitosis. Por otro lado, al disminuir la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ citosólico a ~20 nM la actina se encontraría en un estado muy polimerizado, facilitando el *kiss and run*, la endocitosis rápida de la vesícula intacta y por lo tanto una recuperación rápida y localizada de *IRP*. Finalmente, en condiciones normales (para nuestros controles estimamos una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 60 nM, apenas más baja que los valores reportados por Alés y colaboradores (Ales y col., 2005) la actina estaría parcialmente polimerizada (Figura 4.11), por lo que se podría esperar una situación intermedia a las dos anteriores y que el *IRP* se recupere por medio de un proceso bifásico (Figura 4.1). Se debe mencionar que en los experimentos realizados en 500 nM de Ca^{2+} citosólico la constante temporal de recuperación de *IRP* es más rápida que la correspondiente al componente lento de los controles. Esto puede deberse al conocido efecto del Ca^{2+} basal en la movilización de gránulos desde el *pool* de reserva a *RRP* e *IRP* (Voets y col., 1999; Marengo y col., 2005)

El seccionamiento/despolimerización y reconstitución de la red cortical de actina-F es un proceso dinámico y cíclico que operaría durante la actividad secretoria (Trifaró y col. 2000), ya que es promovida por las elevaciones transitorias de Ca^{2+} que se producen durante el estímulo. Existen varias evidencias de que el aumento de Ca^{2+} citosólico durante la actividad reduce el grado de polimerización de la actina cortical en células cromafines (Vitale y col., 1995; Doreian y col., 2008; Trifaró y col., 2008). Esta acción del Ca^{2+} se efectiviza a través de la activación de ciertas enzimas capaces de escindir los filamentos de actina-F (Trifaró y col. 2000), entre las cuales se encuentran las proteínas de la superfamilia *villin* tales como *gelsolin*, *scinderin* y *villin*

propriadamente dicha (Kumar y col., 2004). Se demostró en células cromafines bovinas que *scinderin* presenta su mayor efecto despolimerizador de la actina en un rango de Ca^{2+} de 10 nM a 1000 nM (Rodríguez Del Castillo y col., 1990), el cual incluye las concentraciones estimadas o impuestas en los experimentos de esta tesis. Contrariamente, *gelsolin* y *villin* actúan en concentraciones mayores a 6 y 200 μM respectivamente. Además, se sabe que *gelsolín* se distribuye ampliamente en todo el citoplasma (Trifaró y col. 1985), mientras que *scinderin* se localiza específicamente en el área subplasmalemal o cortical (Vitale y col. 1991). Otras evidencias experimentales además sugieren que en células cromafines bovinas en reposo *scinderin* se une a los fosfolípidos de la membrana plasmática y que su distribución está determinada por los niveles intracelulares de Ca^{2+} y pH (Rodríguez Del Castillo y col. 1992). Una estimulación que evoca un influjo de Ca^{2+} induce la translocación y asociación de *scinderin* a los filamentos de actina, fragmentando los mismos (Rodríguez Del Castillo y col., 1992; Trifaró y col., 1993). Por lo tanto y de acuerdo con la bibliografía, podemos especular que la acción seccionadora de actina-F en el rango de Ca^{2+} citosólico utilizado en nuestros experimentos podría estar llevado adelante por *scinderin*.

Desde el punto de vista experimental, el grado de polimerización de la actina se puede afectar utilizando agentes que estabilicen o promuevan la forma de actina-F u otros que induzcan su despolimerización a monómeros de G-actina. En esta tesis decidimos utilizar un agente despolimerizador de actina-F, particularmente *Cyto D*. En la Figura 4.12 se puede observar como el tratamiento con esta droga altera drásticamente la distribución de la actina-F: mientras en el control se observa una actina-F cortical totalmente continua que bordea internamente la periferia celular, en las células tratadas se presentan claras e importantes interrupciones y una reducción en la densidad relativa de esta proteína. Este resultado es coincidente con lo reportado previamente por otros autores, como Doreian y col (2008) y por Berberian y col. (2009). Luego se aplicó este tratamiento sobre células dializadas con *BAPTA* 4 mM, una condición que establece una concentración baja de Ca^{2+} citosólico y promueve consecuentemente una actina altamente polimerizada. La intención fue ver si era posible revertir los efectos inducidos por *BAPTA* 4 mM sobre la velocidad

de la endocitosis y sobre la recuperación de *IRP*. En las Figuras 4.13 y 4.14 se muestra como de hecho el tratamiento con *Cyto D* enlentece significativamente en forma paralela la endocitosis y la recuperación de *IRP*. Los resultados indican por lo tanto que la aceleración de la endocitosis y la facilitación del componente rápido de recuperación de *IRP* que se observan en presencia de una capacidad *buffer* de Ca^{2+} citosólica alta pueden deberse en parte a la alta densidad de actina-F que se establece en estas condiciones. Esto se puede interpretar en los términos planteados previamente en esta tesis: concretamente la disminución del Ca^{2+} citosólico favorece una actina-F cortical más densa, lo cual a su vez promueve el *kiss and run*, lo cual trae como consecuencia una endocitosis y un ciclado vesicular rápidos, localizados y altamente acoplados (Chan y col., 2001; Fulop y col., 2005; Elhamedani y col., 2006; Doreian y col., 2008; Moya-Díaz y col., 2016).

Finalmente, y a modo de reevaluar en otra situación experimental la hipótesis planteada en el párrafo previo, utilizamos una condición ya bien caracterizada por nuestro laboratorio en una publicación anterior (Moya-Díaz y col, 2016). En ese trabajo demostramos que un estímulo con la duración y forma aproximada a un potencial de acción nativo promueve una exocitosis de una fracción de *IRP*, a la cual llamamos *ETAP*, que es inmediatamente seguida por una endocitosis rápida dinámica dependiente y que se recupera con una velocidad del orden de la observada en los experimentos con *BAPTA* 4 mM. Debido a esto decidimos evaluar los efectos de *Cyto D* sobre la endocitosis y la recuperación de *ETAP*. Como muestra las Figuras 4.15 y 4.16 *Cyto D* enlentece en forma paralela estos dos procesos, lo cual es similar a lo observado en los experimentos con *BAPTA* 4 mM y está de acuerdo con la mencionada hipótesis.

5.4 Posibles relevancias fisiológicas de los mecanismos discutidos en esta tesis.

La frecuencia de disparo de PAs de las células cromafines durante el reposo define el tono basal de adrenalina en sangre, el cual contribuye significativamente en varios parámetros homeostáticos fundamentales como son la presión sanguínea, la frecuencia cardíaca, la dilatación de las vías respiratorias, etc (Brandt y col., 1976; de Diego y col., 2008; Guyton y Hall, 2011). Si bien existen ciertas controversias en la bibliografía, resumidamente se puede decir que dicha frecuencia de disparo depende en buena medida de la actividad del nervio esplácnico que inerva a la médula adrenal, pero también de cierta actividad espontánea de las células cromafines y se ubicaría en un rango de 0.1-1 PAs por segundo (Brandt y col., 1976; de Diego y col., 2008; Marcantoni y col., 2010). A estas bajas frecuencias cada despolarización genera un aumento localizado de Ca^{2+} pero habría poca acumulación de Ca^{2+} residual, con lo cual la exocitosis quedaría limitada a las vesículas asociadas espacialmente a los canales de Ca^{2+} (Klingauf y Neher, 1997; Neher, 1998; Marengo y Monck, 2000). Debido a esto se propuso que la importancia de *IRP* sería justamente el mantenimiento de la exocitosis a frecuencias basales de PAs (Álvarez y col, 1998; Voets y col, 1999; Oré y Artalejo, 2005). Está aceptado que *IRP* es un grupo de vesículas totalmente maduras, y por lo tanto listas para liberarse, que están altamente acopladas funcional y espacialmente a los CCVD (Horrigan y Bookman, 1994), particularmente a los de tipo P/Q (Álvarez y col. 1998; Álvarez y col 2013). Sin embargo, para que *IRP* pueda contribuir significativamente a la secreción de adrenalina durante el reposo es fundamental que este *pool* sea capaz de recuperarse luego de ser deprimido en el tiempo que hay entre estímulos. En esta Tesis se muestra que a bajas concentraciones de Ca^{2+} citosólico, donde la densidad de actina-F cortical es alta, existe una fase rápida de recuperación de *IRP* que cumpliría con estas condiciones: una constante temporal de recuperación entre 0.5 y 1 s implicaría que *IRP* se recupere completamente en un tiempo de 1.5-3 s, compatible con frecuencias de 0.3-0.7 Hz de potenciales de acción en condiciones basales. Hay elementos en esta tesis y en publicaciones previas de nuestro grupo y de

otros investigadores que permiten especular que dicha recuperación podría efectuarse a través de un mecanismo de ciclado local, donde intervendría un mecanismo de tipo *kiss-and-run* que finalizaría con una internalización dinámica dependiente de las vesículas (Fulop y col, 2005, Elhamdani, 2006; Moya-Díaz y col, 2016). Este mecanismo no sólo permitiría una recuperación rápida de *IRP*, sino que sería muy eficiente energéticamente, ya que involucraría la recuperación intacta de la vesícula (Oré y Artalejo, 2004). Un mecanismo de este tipo a su vez sólo habilitaría la liberación de pequeñas moléculas contenidas en la vesícula, particularmente adrenalina o noradrenalina, debido a la restricción provocada por el pequeño tamaño del poro de fusión (Perrais y col., 2004; Fulop y col, 2005), las cuales podrían teóricamente ser recaptadas en las vesículas previamente a ser nuevamente liberadas. Contrariamente, el aumento de la frecuencia de potenciales de acción durante el estrés (hasta 15 Hz) provoca un incremento importante del Ca^{2+} citosólico que estaría asociado a la despolimerización y remodelación de la actina cortical. Esto favorecería la traslocación de vesículas hacia los sitios de exocitosis en la membrana promoviendo una exocitosis masiva, (Vitale y col., 1995; Trifaró y col., 2008; Gutiérrez y Villavueva, 2018; Li y col., 2018) el modo de fusión de tipo colapso completo que involucra la liberación de todos los contenidos vesiculares (Fulop y col, 2005; Doreian y col, 2008), lo cual es seguido de una endocitosis dependiente de clatrina (Chan y Smith, 2001; Engisch y Nowycky, 1998). Por lo tanto, la remodelación de la actina-F cortical en forma Ca^{2+} dependiente sería un elemento importante en la regulación de las características del ciclado de vesículas densas secretorias.

6. 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, 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.

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.

Alexander WM., Wiederhold K, Bruns D, Fasshauer D y Sørensen JD (2010). Synaptobrevin N-terminally bound to syntaxin–SNAP-25 defines the primed vesicle state in regulated exocytosis. *J. Cell Biol* 188, 401–413

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.

Álvarez 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.

Álvarez 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.

Álvarez YD, Belingheri AV, Perez Bay AE, Jarvis 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.

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.

Armbruster M, Messa M, Ferguson SM, De Camilli P y Ryan TA (2013). Dynamin phosphorylation controls optimization of endocytosis for brief action potential bursts. *Elife* 2, e00845.

Arroyo G, Aldea M, Fuentealba J, Albillos A y Garcia AG (2003). SNX482 selectively blocks P/Q Ca^{2+} channels and delays the inactivation of Na^{+} channels of chromaffin cells, *Eur. J. Pharmacol* 475, 11-18.

Artalejo CR, Henley JR, McNiven MA y Palfrey HC (1995). Rapid endocytosis coupled to exocytosis in adrenal chromaffin cells involves Ca^{2+} , GTP, and dynamin but not clathrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 8328-8332.

Artalejo CR, Elhamdani A y Palfrey HC (1996). Calmodulin is a divalent cation receptor for rapid endocytosis, but not exocytosis, in adrenal chromaffin cells. *Neuron* 16, 195-205.

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.

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.

Augustine GJ y Neher E (1991). Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *Journal of Physiology* 450, 274-271.

Aunis, D y Bader, MF (1988). The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells. *J. Exp.Biol.* 139, 253–266

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.

Barald KF (1982). **Monoclonal antibodies to embryonic neurons: cell-specific markers for chick ciliary ganglion.** *Neuronal Development*, 101–119. Plenum Press, New York.

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

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.

Belingheri AV (2016). Endocitosis rápida en células cromafines de ratón: mecanismos asociados, su regulación por Ca^{2+} y su participación en el reciclado vesicular. Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas. UBA.

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.

Bers DM, Patton CW y Nuccitelli R (2010). A Practical Guide to the Preparation of Ca^{2+} Buffers. *Methods in Cell Biology* 99, 1-26.

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.

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.

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.

Bödding M y Penner R (1999). Differential modulation of voltage-dependent Ca²⁺ currents by EGTA and BAPTA in bovine adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch* 439, 27-38.

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.

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.

Burgoyne RD y Morgan A (2003). Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev.* 83:581-632.

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, Giacippoli 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.

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

Cárdenas 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.

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.

Ceccarelli B, Hurlbut WP y Mauro A (1973). Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. The journal of cell biology 57, 499 -524.

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.

Chang CW, Chiang CW y Jackson MB (2017). Fusion pores and their control of neurotransmitter and hormone release. Journal of General Physiology, 149 (3), 301.

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

Chan SA, Polo-Parada L y Smith C (2005). 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, Doreian B y Smith C (2010). Dynamin and myosin regulate differential exocytosis from mouse adrenal chromaffin cells. *Cell Mol Neurobiol.* 30:1351-1357

Cheek, TR y Burgoyne, RD (1986). Nicotine-evoked disassembly of cortical actin filaments in adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett.* 207, 110–114.

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.

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.

Crivellato E, Nico B y Ribatti D (2008). The chromaffin vesicle: advances in understanding the composition of a versatile, multifunctional secretory organelle. *Anat Rec* 291(12):1587-1602,

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

Daste F, Walrant A, Holst MR, Gadsby JR, Mason J, Lee JE, Brook D, Mettlen M4, Larsson E, Lee SF, Lundmark R y Gallop JL (2017). Control of actin polymerization via the coincidence of phosphoinositides and high membrane curvature. *J Cell Biol* 216, 3745-3765.

de Diego AM, Tapia L, Alvarez RM, Mosquera M, Cortes L, Lopez I, Gutiérrez 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.

de Diego AMG (2009). Electrophysiological and morphological features underlying neurotransmission efficacy at the splanchnic nerve-chromaffin cell synapse of bovine adrenal medulla. *Am J Physiol Cell Physiol.* 298, 397-405.

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

de Wit H, Walter AM, Milosevic I, Gulyas-Kovacs A, Riedel D, Sorensen JB y Verhage M (2009). Synaptotagmin-1 docks secretory vesicles to syntaxin-1/SNAP-25 acceptor complexes. *Cell* 138, 935–946.

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

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.

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. *The Scientific World Journal* 6, 1114-1117.

Elhamdani A, Palfrey HC y Artalejo CR (2001). Quantal Size Is Dependent on Stimulation Frequency and Calcium Entry in Calf Chromaffin Cells. *Neuron*, Vol. 31, 819–830.

Elhamdani A, Azizi F y Artalejo CR (2006). 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.

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, 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.

Fan HY y Heerklotz H (2017). Digitonin does not flip across cholesterol-poor membranes. *J Colloid Interface Sci* 504, 283-293.

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.

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, 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.

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.

García 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.

Gerber SH y Südhof TC (2001). Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes* 51, 3-11.

Gillis KD (1995). Techniques for membrane capacitance measurements. In Single Channel Recording, Second Edition, B. Sakmann B y Neher E. eds. (New York, New York: Plenum Press), 155–198.

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, Díaz 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.

González-García 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.

González-Jamett AM, Baez-Matus X, Hevia MA, Guerra MJ, Olivares MJ, Martínez 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.

González-Jamett AM, Momboisse F, Guerra MJ, Ory S, Báez-Matus X, Barraza N, Calco V, Houy S, Couve E, Neely A, Martínez AD, Gasman S y Cárdenas AM (2013). Dynamin-2 regulates fusion pore expansion and quantal release through a mechanism that involves actin dynamics in neuroendocrine chromaffin cells. *PLoS One* 8, e70638.

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.

Gutiérrez LM y José Villanueva (2018). The role of F-actin in the transport and secretion of chromaffin granules: an historic perspective. *Eur J Physiol* 470, 181–186.

Gray H, Holmes T, Pickering Pick T, Howden R, Johnston TB, Willis J, Davies F, Davies DV, Warwick R y Williams PL (1998). *Anatomía de Gray* 38ª edición. Harcourt Brace, Madrid.

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.

Gulyás-Kovács A, de Wit H, Milosevic I, Kochubey O, Toonen R, Klingauf J, Verhage M y Sørensen JB (2007). Munc18-1: sequential interactions with the fusion machinery stimulate vesicle docking and priming. *J Neurosci* 27, 8676-86.

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

Guyton AC y Hall JE (2011). *The autonomic nervous system and the adrenal medulla. Textbook 4 of Medical Physiology*, 12th edition. Philadelphia: Elsevier-Saunders.

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, 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.

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.

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.

Heuser JE y Reese S (1973). Evidence for Recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *The Journal of Cell Biology* 57, 315-344.

Hille B (2001). Ion channels of excitable membranes. 3rd edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA.

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.

Hodel A, Schäfer T, Gerosa D y Burger MM (1994). In chromaffin cells, the mammalian Sec1p homologue is a syntaxin 1A-binding protein associated with chromaffin granules. *J Biol Chem.* 269:8623-8626.

Hodel A. Effects of glucocorticoids on adrenal chromaffin cells. *J Neuroendocrinol* 13:216-20, 2001.

Hodgkin AL y Huxley AF (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117, 500–544.

Holt M, Cooke A, Wu MM, y Lagnado L (2003). Bulk membrane retrieval in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *J Neurosci* 23, 1329–1339.

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.

Hsu SF y Jackson MB (1996). Rapid exocytosis and endocytosis in nerve terminals of the rat posterior pituitary. *J Physiol* 494, 539–553.

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.

Hull C y von Gersdorff H (2004). Fast Endocytosis Is Inhibited by GABA-Mediated Chloride Influx at a Presynaptic Terminal. *Neuron* 44, 469–482.

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

Houy S, Croisé P, Gubar O, Chasserot-Golaz S, Tryoen-Tóth P, Bailly Y, Ory S, Bader MF y Gasman S (2013). Exocytosis and endocytosis in neuroendocrine cells: inseparable membranes! *Front Endocrinol* 4, 135.

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.

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, 946-956.

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.

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

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.

Kataoka Y, Majane EA y Yang HY (1985). Release of NPY-like immunoreactive material from primary cultures of chromaffin cells prepared from bovine adrenal medulla. *Neuropharmacology* 24, 693-695.

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.

Kits, K S, de Vlieger T A, Kooi B W y Mansvelder H D (1999). Diffusion barriers limit the effect of mobile calcium buffer on exocytosis of large dense cored vesicles. *Biophys. J* 76, 1693–1705.

Klingauf J y Neher E (1997). Modeling buffered Ca²⁺ diffusion near the membrane; implications for secretion in neuroendocrine cells. *Biophys. J* 72, 674-690.

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.

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.

Kumar N, Tomar A, Parrill AL y Khurana S (2004). Functional dissection and molecular characterization of calcium-sensitive actin-capping and actin-depolymerizing sites in villin. *Biol Chem* 279, 45036-46.

Lang T, Wacker I, Wunderlich I, Rohrbach A, Giese G, Soldati T, Almers (2000). Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells. *Biophys. J* 78, 2863–2877.

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.

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.

Le Douarin NM, Giordano W, Calloni y Elisabeth Dupin (2008). The stem cells of the neural crest. *Cell Cycle* 7:8, 1013-1019.

Lee KS, Marban E y Tsien RW (1985). Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J Physiol.* 364, 395-411.

Lee A1, Wong ST, Gallagher D, Li B, Storm DR, Scheuer T y Catterall WA (1999). Ca²⁺/calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels. *Nature* 399, 155-9.

Leitz J y Kavalali ET (2011). Ca²⁺(+) influx slows single synaptic vesicle endocytosis. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 16318-16326.

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.

Li P, Bademosi AT, Luo J y Meunier FA (2018). Actin Remodeling in Regulated Exocytosis: Toward a Mesoscopic View. *Trends Cell Biol.* 28, 685-697.

Lin CG, Lin YC, Liu HW y Kao LS (1997). Characterization of Rab3A, Rab3B and Rab3C: different biochemical properties and intracellular localization in bovine chromaffin cells. *Biochem J* 324, 85-90.

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.

Marcantoni A, Vandael DH, Mahapatra S, Carabelli V, Sinnegger-Brauns MJ, Striessnig J y Carbone E (2010). Loss of Cav1.3 channels reveals the critical role of L-type and BK channel coupling in pacemaking mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci.* 30, 491-504.

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.

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

Marks B y McMahon HT (1998). Calcium triggers calcineurin-dependent synaptic vesicle recycling in mammalian nerve terminals. *Curr Biol* 8, 740-9.

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.

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.

Meunier FA y Gutiérrez LM (2016). Captivating New Roles of F-Actin Cortex in Exocytosis and Bulk Endocytosis in Neurosecretory Cells. *Trends in Neurosciences* 39, 605-613.

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.

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, 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.

Morgan A y Burgoyne RD (1995). A role for soluble NSF attachment proteins (SNAPs) in regulated exocytosis in adrenal chromaffin cells. *EMBO J.* 14:232-239.

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.

Moya-Diaz J, Alvarez YD, Montenegro M, Bayones L, Belingheri AV, González-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.

Naraghi M y Neher E (1997). Linearized Buffered Ca²⁺ Diffusion in Microdomains and Its Implications for Calculation of [Ca²⁺] at the Mouth of a Calcium Channel. *J Neurosci* 17, 6961-73.

Neco P, Gil A, Del Mar Frances M, Viniegra S, Gutierrez LM (2002). The role of myosin in vesicle transport during bovine chromaffin cell secretion. *J Biol Chem* 279, 27450-7.

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

Neher E y Marty A (1982). Discrete changes of cell membrane capacitance observe under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6712-6716.

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

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

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

Newcomb R, Szoke B, Palma A, Wang G, Chen X, Hopkins W, Cong R, Miller J, Urge L y Tarczy-Hornoch K. (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.

Nofal S, Becherer U, Hof D, Matti U y Rettig J (2007). Primed vesicles can be distinguished from docked vesicles by analysing their mobility. *The Journal of neuroscience* 27, 1386-1396.

Novara M, Baldelli P, Cavallari D, Carabelli V, Giacippoli 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.

Ñeco P, Giner D, del Mar Francés M, Viniestra S y Gutiérrez LM (2003). Differential participation of actin- and tubulin-based vesicle transport systems during secretion in bovine chromaffin cells. *Eur J Neurosci* 18, 733-42.

O'Connor DT y Frigon RP (1984). Chromogranin A, the major catecholamine storage vesicle soluble protein. Multiple size forms, subcellular storage, and regional distribution in chromaffin and nervous tissue elucidated by radioimmunoassay. *J Biol Chem* 10, 3237-3247.

Oheim, M y Stuhmer, W. (2000). Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex. *Eur. Biophys.J* 29, 67–89

Olivares MJ, Arlek M, González-Jamett AM, Guerra MJ, Baez-Matus X, Haro-Acuña V, Martínez-Quiles N y Cárdenas AM (2014). Src Kinases Regulate De Novo Actin Polymerization during Exocytosis in Neuroendocrine Chromaffin Cells. *PLoS One* 5, e99001.

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 Oré LO y Artalejo AR (2005). Intracellular Ca²⁺ microdomain-triggered exocytosis in neuroendocrine cells. *Trends Neurosci* 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.

O'Sullivan AJ, Cheek TR, Moreton RB, Berridge MJ y Burgoyne RD (1989). Localization and heterogeneity of agonist-induced changes in cytosolic calcium concentration in single bovine adrenal chromaffin cells from video imaging of fura-2. *The EMBO Journal* 8, 401-411.

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.

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

Parmer RJ, Mahata M, Mahata S, Sebald MT, O'Connor DT, Miles LA (1997). Tissue plasminogen activator (t-PA) is targeted to the regulated secretory pathway. Catecholamine storage vesicles as a reservoir for the rapid release of t-PA. *J Biol Chem* 272, 1976-1982.

Pasche M, Matti U, Hof D, Rettig J, Becherer U (2012). Docking of LDCVs is modulated by lower intracellular [Ca²⁺] than priming. *PLoS One* 7, e36416.

Papadopulos A, Tomatis VM, Kasula R y Meunier FA (2013). The cortical acto-Myosin network: from diffusion barrier to functional gateway in the transport of neurosecretory vesicles to the plasma membrane. *Frontiers in Endocrinology* 4, 1-11.

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, 1509-1522.

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.

Perrais D, Kleppe IC, Taraska JW, y Almers W (2004). Recapture after exocytosis causes differential retention of protein in granules of bovine chromaffin cells. *J Physiol* 560, 413–428.

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.

Porat-Shlioma N, Milberga O, Masedunskasa A y Weigerta R (2013). Multiple roles for the actin cytoskeleton during regulated exocytosis. *Cell Mol Life Sci* 70, 2099-2121.

Poulsen JC, Caspersen C, Mathiasen D, East JM, Tunwell RE, Lai FA, Maeda N, Mikoshiba K y Treiman M (1995). Thapsigargin-sensitive Ca²⁺-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.

Purves D., Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, McNamara JO y White LE (2004). *Neuroscience* 3ra edición. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts 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, 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.

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

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.

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.

Rodriguez Del Castillo A, Lemaire S, Tchakarov L, Jeyapragasan M, Doucet JP, Vitale ML y Trifaró JM (1990). Chromaffin cell scinderin, a novel calcium-dependent actin filament-severing protein. *EMBO J* 9, 43-52.

Rodríguez Del Castillo A, Vitale ML y Trifaró JM (1992). Ca²⁺ and pH determine the interaction of chromaffin cell scinderin with phosphatidylserine and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and its cellular distribution during nicotinic-receptor stimulation and protein kinase C activation. *J Cell Biol* 119, 797-810.

Rosa JM, Torregrosa-Hetland CJ, Colmena I, Gutiérrez 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, 86-98.

Roth D y Burgoyne RD (1994). SNAP-25 is present in a SNARE complex in adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett.* 351, 207-210.

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

Sakmann D y Neher E (1995). *Single Channel Recording.* Plenum Press 2nd ed. New York USA.

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.

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.

Schoenmakers T.J, Visser G.J, Flik G y Theuvenet A (1992). CHELATOR: an improved method for computing metal ion concentrations in physiological solutions, *Biotechniques* 12, 870– 879.

Schlüter OM, Khvotchev M, Jahn R y Südhof TC (2002). Localization versus function of Rab3 proteins. Evidence for a common regulatory role in controlling fusion. *J Biol Chem* 277, 40919-29.

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.

Seward EP, Chernevskaya NI y Nowycky MC (1995). Exocytosis in peptidergic nerve terminal exhibits two calcium phases during pulsatile calcium entry. *J. Neurosci.* 15 3390-3399.

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.

Shin W, Ge L, Arpino G, Villarreal SA, Hamid E, Liu H, Zhao WD, Wen P, Chiang HC y Wu LG (2018). Visualization of membrane pore in live cells reveals a dynamic-pore theory governing fusion and endocytosis. *Cell* 173, 934-945.

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.

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

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 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.

Sørensen 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.

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

Sørensen 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.

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.

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

Sun JY, Wu XS y Wu LG (2002). Single and multiple vesicle fusion induce different rates of endocytosis at a central synapse. *Nature* 417, 555-559.

Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R y Brunger AT (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å 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.

Trifaró JM, Bader MF y Doucet JP (1985). Chromaffin cell cytoskeleton: its possible role in secretion. *CAN. J. Biochem. Cell Biol.* 63BIOCHEM. CELL BIOL. VOL. 63, 661-79.

Trifaró JM y Vitlae ML (1993). Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *Trends Neurosci* 16, 466-72.

Trifaró JM, Rosé SD, Lejen T y Elzagallaai A (2000). Two pathways control chromaffin cell cortical F-actin dynamics during exocytosis. *Biochimie* 82, 339-352.

Trifaró J.M, Gasman S y Gutiérrez LM (2008). Cytoskeletal control of vesicle transport and exocytosis in chromaffin cells. *Acta Physiol. (Oxf.)* 192, 165-172.

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

Unsicker K y Krieglstein K (1996). Growth factors in chromaffin cells. *Progress in Neurobiology* 48, 307-324.

Usachev YM, Marchenko SM y Sage SO (1995). Cytosolic calcium concentration in resting and stimulated endothelium of excised intact rat aorta. *Journal of Physiology* 489, 309-317

van Weering JRT, Toonen RF y V Matthijs (2007). The Role of Rab3a in Secretory Vesicle Docking Requires Association/Dissociation of Guanidine Phosphates and Munc18-1. *PLoS One* 18, e616.

van der Blik 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, 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 (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, 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.

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.

Watanabe S, Benjamin R, Rost BR, Camacho-Pérez M, Davis MW, Söhl-Kielczynski B, Rosenmund C y Jorgensen E (2013). Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature* 12, 242–247.

Watanabe S, Trimbuch T, Camacho-Pérez M, Rost MB, Brokowski B, Söhl-Kielczynski B, Felies A, Davis MW, Rosenmund C y Jorgensen EM (2014). Clathrin regenerates synaptic vesicles from endosomes. *Nature* 13, 228–233.

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

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

Wightman RM, Jankowski JA, Kennedy RT, Kawagoe KT, Schroeder TJ, Leszczyszyn DJ, Near JA, Diliberto EJ, y Viveros OH (1991). Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10754-10758.

Wollman R y Meyer T (2012). Coordinated oscillations in cortical actin and Ca²⁺ correlate with cycles of vesicle secretion. *Nat Cell Biol* 14, 1261–1269.

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.

Yoo SH, You SH y Huh YH (2005). Presence of syntaxin 1A in secretory granules of chromaffin cells and interaction with chromogranins A and B. *FEBS Lett* 579, 222-228.

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

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-González 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.

Zhou Z y Mislser 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, Mislser S y Chow RH (1996). Rapid fluctuations in transmitter release from single vesicles in bovine adrenal chromaffin cells. *Biophysical journal* 70, 1543-1552.