



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

***Endocitosis dependiente e independiente
de dinamina asociadas a la exocitosis de
pool vesículas inmediatamente liberable en
células cromafines de la medula adrenal***

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

Lucas Bayonés

Director de Tesis: Dr. Fernando Diego Marengo

Co-Director de Tesis: Dra. Ana María Cárdenas

Consejero de Estudios: Dra. Lidia Szczupak

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

Buenos Aires, Marzo del 2021

Resumen

El IRP (por *Immediately Releasable Pool*), es un grupo de vesículas secretorias cuya exocitosis está altamente acoplada al estímulo debido a su estrecha asociación con canales de Ca^{2+} voltaje dependientes (CCVD). Sabemos por resultados previos, que entre un 40 y un 50% de IRP es excitado por la aplicación de un potencial de acción (PAs), y que dicha exocitosis es seguida por una endocitosis rápida dinamina-dependiente totalmente compensatoria, ligada a un proceso rápido de recuperación de este pool vesicular. Por otro lado, la exocitosis completa de IRP (inducida por un pulso cuadrado de voltaje de 50 ms), es seguida también por un proceso endocítico que solamente compensa un 50% de la exocitosis previa, pero no sabemos nada acerca del mecanismo subyacente. En una primera parte de este trabajo de tesis nos propusimos estudiar la participación de la GTPasa dinamina en la endocitosis, al liberar gradualmente IRP en células cromafines murinas. Para ello, estimulamos con un protocolo compuesto por pulsos despolarizantes de duración creciente: PAs (5 ms) y pulsos cuadrados (SQPs) de 5, 10, 25, y 50 ms (SQP5-50ms). Nuestros resultados mostraron que si bien la dinamina es esencial en la endocitosis evocada por PAs, a medida que la fracción excitada aumenta, este proceso se vuelve insensible a diferentes inhibidores de la actividad de esta proteína. Esto indica que al liberar completamente IRP se activa un proceso endocítico dinamina-independiente. Observamos, además, que la velocidad de esta endocitosis independiente de dinamina se correlaciona con la entrada de Ca^{2+} , estimada como la integral debajo de la curva de corriente de Ca^{2+} . Por otro lado, la aplicación de distintos inhibidores de la proteína quinasa C (PKC) disminuyeron la magnitud y la velocidad de la endocitosis dinamina-independiente, y el tratamiento con PMA (un activador de PKC) aumentó significativamente la amplitud de este proceso endocítico. Por lo tanto concluimos que dicha endocitosis dinamina-independiente es un proceso Ca^{2+} dependiente regulado por PKC.

En la segunda parte de la Tesis, evaluamos el efecto de dos mutaciones de la dinamina-2, A618T y S619L, relacionadas con el desarrollo de la miopatía centronuclear, cuyos efectos sobre la exocitosis y endocitosis en células cromafines son desconocidos. La expresión de estas mutantes no modificó la exocitosis de IRP para ninguno de los estímulos evaluados. Sin embargo, inhibió significativamente a

la endocitosis evocada por PAs, sin afectar a aquella provocada por SQP50ms, lo cual es coherente con la predominancia de la endocitosis dinámico-dependiente en el primer tipo de estímulo. Finalmente, estímulos más potentes, que excitan cantidades de vesículas marcadamente mayores que IRP, promueven una endocitosis lenta identificada previamente por otros autores como un mecanismo clatrina dependiente, que es a su vez dependiente de dinamina. Coherentemente, este proceso resultó muy sensible a ambas mutantes. Por otro lado, la exocitosis de cantidades grandes de vesículas, inducida por pulsos despolarizantes prolongados o la aplicación del agonista nicotínico DMPP por 10 s, resultó inhibida significativamente en presencia de A618T y S619L. Este resultado, sumado a la falta de efecto que se observó previamente para estímulos de corta duración, sugiere que estas mutantes podrían estar alterando la provisión de vesículas a la membrana. De hecho, al analizar la distribución de vesículas secretorias por medio de microscopía confocal, observamos que la recuperación de las vesículas en las proximidades de la membrana plasmática, luego de un estímulo que induce exocitosis, se vio afectada negativamente en presencia de A618T y S619L. Llamativamente, se observó una marcada disminución en la formación *de novo* de F-actina cortical en células expresando las mutaciones, pero no en la condición control. Es esperable que esta disrupción en la formación de F-actina cortical tenga un efecto directo en el tráfico de vesículas a la membrana y, por lo tanto, en la recuperación de la población vesicular liberable y en la exocitosis inducida por estímulos potentes. Por otro lado, está demostrado que la F-actina participa en prácticamente todos los mecanismos de endocitosis conocidos. Por lo tanto, la alteración de la dinámica del citoesqueleto de F-actina cortical puede ser un denominador común a todos los efectos causados por A618T y S619L. Sin embargo, el mecanismo por el cual A618T y S619L producen este efecto sobre la F-actina, aun es una interrogante que queda por ser elucidada.

Palabras claves: IRP, Dinamina, A618T, S619L, Exocitosis, Endocitosis, F-actina

Dynamin-dependent and -independent endocytosis associated with the exocytosis of an immediately releasable pool of vesicles in chromaffin cells of the adrenal medulla

Abstract

IRP (for *Immediately Releasable Pool*), is a group of secretory vesicles whose exocytosis is highly coupled to stimuli due to its tight association to voltage-dependent calcium channels (VDCC). Previous results from our lab showed that between 40 and 50% of IRP is exocytosed by the application of an action potential-like stimuli (PAs), and that exocytosis is followed by a fast dynamin-dependent fully compensatory endocytosis, linked to a fast replenishment process of this vesicular pool. On the other hand, the complete exocytosis of IRP (induced by a 50 ms voltage squared pulse), is also followed by an endocytotic process that compensates only 50% of the previous exocytosis, however we do not know anything about its underlying mechanism. In the first part of this Thesis work we set to study the involvement of dynamin GTPase in the endocytosis evoked, when IRP was gradually depleted, in mouse chromaffin cells. For this, we applied a stimulation protocol composed by depolarizing pulses of crescent duration: PAs (5 ms) and squared pulses (SQPs) of 5, 10, 25 and 50 ms (SQP5-50ms). Our results showed that although dynamin is essential in the endocytosis evoked by PAs, as the exocytosed fraction increases, the endocytotic process becomes insensitive to the application of different inhibitors of the activity of this GTPase. This indicates that, the full release of IRP, activates a dynamin-independent endocytotic process. We also observed that the rate of this dynamin-independent endocytosis correlates with the influx of Ca^{2+} , estimated as the integral of the values below the calcium current curves. On the other hand, the application of different inhibitors of the protein kinase C (PKC), diminished the magnitude and rate of the dynamin-independent endocytosis, and the treatment with PMA (a PKC activator), significantly increased the amplitude of this endocytotic process. We therefore conclude that this dynamin-independent endocytosis is a Ca^{2+} dependent process, which is regulated by PKC.

In the second part of this Thesis work, we evaluated the effect of two dynamin-2 mutations, A618T and S619L, related with the development of the

centronuclear myopathy disease, whose effects over the exocytosis and endocytosis in chromaffin cells are unknown. The expression of these mutations did not modify the IRP exocytosis, for any of the stimuli applied. However, A618T and S619L significantly inhibited the endocytosis evoked by PAs, but not for SQP50ms, which is coherent with the predominance of the dynamin-dependent endocytosis associated with the first stimulus. Finally, more potent stimuli, which exocytose larger amounts of vesicles than IRP, promote a slow endocytosis, previously identified by other authors as a clathrin-dependent mechanism, which is also dynamin-dependent. Coherently, this process resulted to be very sensitive to the expression of both mutations. On the other hand, the exocytosis of large amounts of vesicles, induced by prolonged depolarizing pulses or by the application of the nicotinic agonist DMPP for 10 s, was significantly inhibited in the presence of A618T and S619L. This result, in addition to the lack of effect observed previously when short stimuli duration was applied, suggest that these mutations could be altering the provision of vesicles to the plasma membrane. In fact, when we analyzed the distribution of secretory vesicles by confocal microscopy, we observed that the recovery of vesicles located nearby the plasma membrane, after a stimulation that induced exocytosis, was negatively affected in presence of A618T and S619L. Strikingly, a marked decrease in *the novo* formation of cortical F-actin was observed in cells expressing these mutations, but not in control cells. It is expected that this disruption, in the formation of cortical F-actin, has a direct effect on vesicle trafficking to the plasma membrane and, therefore, in the recovery of the releasable vesicle population and exocytosis, induced by potent stimulation. On the other hand, it has been demonstrated that F-actin participates in practically all known endocytotic mechanisms. Therefore, the alteration of the cortical actin cytoskeleton dynamics could be a common denominator for all of the effects caused by A618T and S619L. However, the underlying mechanism by which A618T and S619L produced this effect over F-actin is a question that remains to be elucidated.

Keywords: IRP, Dynamin, A618T, S619L, Exocytosis, Endocytosis, F-actin

*Dedicado a lo constantemente nuevo,
a la duda metódica,
a la timidez desafiante,
al siempre es ahora mal que le pese después,
a la complejidad,
en fin, dedicado a todas las personas queridas en las que vivo.*

Agradecimientos

Sin lugar a duda, con el paso del tiempo, diré que los años de doctorado fueron lo mas felices e intensos de mi vida académica y de seguro estarán entre los mejores de mi vida. Con el simple hecho de recordar todo lo vivido y compartido, más me convengo de eso. Creo que una frase que pueda resumir a las personas involucradas detrás de este trabajo de tesis proviene de Issac Newton, quien una vez dijo “Si he visto más lejos es porque estoy sentado en hombros de gigantes”. Con la debida humildad y el perdón de él, voy a parafrasearla diciendo que “Si he concluido esta tesis es porque me senté en hombros de gigantes”. Este trabajo esta dedicado a esos gigantes.

A Fernando, mi director, por darme la oportunidad para que pueda seguir creciendo como científico, por su dedicación y compromiso con mi formación, por el apoyo desinteresado, por la libertad para que pueda ser creativo, pero sobre todo por su calidez humana y los muchos consejos que ha compartido conmigo durante estos años, donde más de uno ha sido de carácter paternal. Gracias. A Ana María, mi co-directora, gracias por el apoyo incondicional, por tus consejos, por compartir tu inteligencia y por guiarme durante todos estos años, en este hermoso camino que es la ciencia. Pero sobre todo gracias por haberme recibido con los brazos abiertos y tratarme, más que como un colega, como si fuese familia. A mis compañeros y amigos de laboratorio del IFIByNE, Mauri, José, Sam, Lu, Celes, Sofi y Pau. Gracias por hacer de cada día algo único, por nuestro gusto por la ciencia, por las charlas, los consejos, las risas, las bromas y los miles y miles de mates compartidos. Si estos años de doctorado han sido los mejores de mi carrera, fueron gracias a ustedes. Los extrañaré todos los días. A los miembros de los laboratorios circundantes con quien tuve el privilegio de compartir espacio, Pepe, Gra, Nati, Lu, Noe, Nico, Cari y Carlota, gracias por la ayuda entregada, la amistad, las cervezas compartidas, los mates y las risas. A la memoria de Carlota. A mis compañeros del laboratorio del CINV, Coté, Xime, Nacho, Coni, Arlek, Hugo, Cindel y Jaime, gracias por el apoyo, por su amistad, por sus consejos, y sobre todo por haberme recibido con los brazos abiertos. Voy a extrañar nuestras charlas,

nuestras cervezas, y esas increíbles despedidas de Valpo con ese mágico Pulmay de la Xime.

A todos los miembros del IFIByNE y CINV que contribuyeron al desarrollo de esta tesis.

A la familia... la piedra angular de este trabajo. A mis viejos a TODOS ellos, que me alientan constantemente a perseguir mis sueños, porque sin ellos esto no hubiese sido posible. Gracias por la motivación, por el apoyo incondicional y por el cariño. A mis hermanos, por ser los mejores hermanos que uno podría perder, gracias por estar, por su cariño y por enseñarme a ser mejor persona día a día. A mis suegros Silvia y Luis, mis cuñas Estefi, Agus y Emma y por supuesto a mis sobrinos Feli y Sofi, gracias por estar, por ser mi familia, por hacerme sentir siempre parte de ustedes. A mis tíos (Jorge, Moni, Ricky, Ivo), mis primos (Pablito, Regi, Oti, Agus, Valen y Lolo) y mi abuela Gladys, gracias por el cariño, el aliento, y la incondicionalidad. Aunque no nos veamos tan seguido, siempre los llevo conmigo.

A mis amigos...la familia que uno elige. A todos ellos, Seba, Alfre, Marcos, Gaby, Oti, Fabo. Gracias por su amistad, por ser hermanos postizos, por estar siempre ahí, por las charlas, los asados y las cervezas. Por esa sana rivalidad de Gallinas y Bosteros, por el fútbol, por los sanguches de mortadela y el fernet, y por esos goles que rompen la garganta. Gracias.

A mi familia... la familia que tuve la suerte de formar. A mi esposa Pirri, a la persona que me acompañó día y noche en este largo camino, la coautora de este trabajo y de este hermoso proyecto que es la vida, gracias por tu incondicionalidad, tu aliento, y sobre todo por tu amor. A nuestra hermosa hija Camila, que desde que llegaste a este mundo sos mi luz e inspiración, gracias por tus sonrisas, tu amor y por ser el sol que alumbrá todos mis días.

Finalmente, quiero dedicar esta tesis a dos grandes personas, mi Tío Eduardo y mi profesora de la secundaria Beatriz. Ellos me inspiraron a seguir esta hermosa profesión que es la biología. Gracias.

Gracias a todos...

A mi esposa Pirri...

A mi hija Camila...

Abreviaturas

τ_{endo} : constante temporal de la endocitosis.

2-APB: *2-Aminoethoxy-di-Phenyl Borate*.

A618T: mutación de dinamina-2 A618T

Aga: ω -agatoxina IVA.

Anti-Dyn: anticuerpo monoclonal anti-dinamina 1 y 2.

AP180: *Assembly Protein 180*.

AP2: *Assembly Protein 2*.

ATP: *Adenosine Tri-Phosphate*.

BIS XI: bisindolilmaleimida XI.

BSE: *Bundle Signalling Element*.

Ca^{2+} : ion calcio.

CaM: calmodulina.

CAPS: *Calcium Activator Protein for Secretion*.

CCDV: Canales de Calcio Dependientes de Voltaje.

Chr: cromogranina

CMT: neuropatía de Charcot-Marie-Tooth

Cono: ω -conotoxina GVIA.

DCV: *Dense Core Vesicles*.

DMPP: *1,1-dimethyl-4-phenyl-piperazinium*.

Doc2b: *DOuble C2 domain Beta protein*.

DynI K44A: mutación de la dinamina-1 K44A.

$E_{\text{Ca}^{2+}}$: potencial de equilibrio del Ca^{2+} .

EGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein*.

endo/exo: cociente entre $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$ y $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$.

ETAP: *Exocytosis Triggered by an Action Potential.*

F-actina: actina filamentosa.

fF: femto-Faradios

GED: *GTPase Efector Domain.*

GST-Dyn: proteína de fusión unida a los aminoácidos 829-842 de la dinamina.

GTP: *Guanosine-Tri-Phosphate.*

GTP γ S: *Guanosine 5'-O-[gamma-thio]-Tri-Phosphate.*

HVA: *High voltage activated.*

I_{Ca}²⁺: amplitud de corriente de calcio.

IP₃R: receptores de IP₃.

IRP: *Immediately Releasable Pool.*

K⁺: ion potasio.

K_{act}: constante de activación.

K_{inh}: constante de inhibición.

KO: Knock Out

L-DOPA: Levo-DOPA o L-3,4 dihidroxifenilalanina.

LVA: *Low Voltage Activated.*

MCN: miopatía centronuclear.

Na⁺: ion sodio.

NCAM: Molécula de adhesión de células neuronales.

Ni²⁺: ion níquel.

Nitre: Nitrendipina.

NPY: neuropeptido Y

NSF: *N-ethylmaleimide-sensitive factor.*

PA_{nat}: potencial de acción nativo.

PAs: potencial de acción.

pA: pico-Ampere

pC: pico-Coulomb

PH: *Pleckstrin Homology domain*.

PI(4,5)P₂: fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato.

PKA: proteína kinasa A.

PKC: proteína kinasa C.

PMA: *Phorbol 12-myristate 13-acetate*.

PRD: *Proline Rich Domain*.

R369W: mutación de la dinamina-2 R369W.

R465W: mutación de la dinamina-2 R465W.

RE: Retículo Endoplasmático.

RP: *Reserve Pool*.

RRP: *Ready Releasable Pool*.

RT-PCR: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*.

RyR: Receptores de Rianodina.

S619L: mutación de la dinamina-2 S619L.

SERCA: *Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase*.

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

SNA: Sistema Nervioso Autónomo.

SNAP-25: *SyNaptosomal-Associated Protein of 25 kDa*.

SNARE: *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptors*.

SNC: Sistema Nervioso Central.

SNX-482: inhibidor de los canales de Ca²⁺ de tipo R.

SQP: *Squared Pulse* o pulso cuadrado de voltaje.

SRP: Slowly Releasable Pool.

STED: *STimulated Emission Depletion microscopy*.

Synprint: synaptic protein interaction site.

TIRFM: *Total Internal Reflection Fluorescent Microscopy*.

t-PA: activador tisular de plasminógeno.

t-SNARE: SNARE target.

UPP: *Unprimed Pool*.

VAMP: *Vesicle Associated Membrane Protein*.

V_m : voltaje de membrana.

VMAT1: *Vesicular Monoamine Transporter 1*.

VMAT2: *Vesicular Monoamine Transporter 2*.

v-SNARE: SNARE vesicular.

WT: *Wild Type*.

α -SNAP: *α -Sensitive factor-N-ethylmaleimide Attachment Protein*.

$\Delta C_{m_{\text{endo}}}$: cambio sincrónico de capacitancia de membrana celular debido a un proceso de endocitosis.

$\Delta C_{m_{\text{exo}}}$: cambio sincrónico de capacitancia de membrana celular debido a un proceso de exocitosis.

ΔC_m : cambio sincrónico de capacitancia de membrana celular.

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 MÉDULA ADRENAL Y CÉLULAS CROMAFINES	5
1.1.1 Generalidades	5
1.1.2 La médula adrenal es parte del sistema nervioso simpático y un componente importante de la respuesta al estrés.....	6
1.1.3 Potencial de acción, corrientes iónicas y exocitosis calcio dependiente.....	9
1.1.4 Vesículas secretorias y productos de secreción	11
1.1.5 Ventajas como modelo neurobiológico	13
1.2 MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN Y RECAPTACIÓN DE CALCIO.....	16
1.2.1 Fuentes de calcio.....	17
1.2.1.1 Canales de calcio voltaje dependientes	17
1.2.1.2 Fuentes intracelulares de calcio.....	21
1.2.2 Remoción y regulación del calcio citosólico	23
1.2.3 Características espaciales y temporales de las señales de calcio	23
1.3 EXOCITOSIS EN CÉLULAS CROMAFINES	25
1.4 LA CINÉTICA DE LA RESPUESTA SECRETORIA Y LOS <i>POOLS</i> VESICULARES.	30
1.5 ACOUPLE ENTRE CANALES DE CALCIO Y VESÍCULAS SECRETORIAS	34
1.6 <i>POOL</i> VESICULAR INMEDIATAMENTE LIBERABLE	36
1.6.1 Definición y cuantificación.....	36
1.6.2 El acople de IRP y CCDV tipo P/Q es dependiente de <i>synprint</i> ...	39
1.7 ENDOCITOSIS.....	40
1.7.1 Endocitosis dependiente de clatrina	41
1.7.2 Endocitosis en exceso y endocitosis tipo <i>bulk</i>	42
1.7.3 Endocitosis rápida asociada al <i>kiss and run</i>	43
1.7.4 Endocitosis asociada a un potencial de acción.....	45
1.7.5 Endocitosis Ultra-Rápida	45
1.7.6 Dinamina y endocitosis	46
1.7.6.1 Estructura y función de la dinamina	46
1.7.6.2 Importancia de la dinamina y patologías asociadas.....	52
1.7.7 Dependencia de la endocitosis con el calcio	55
1.8 RECICLADO Y RECUPERACIÓN DE LAS VESÍCULAS SECRETORIAS	57

1.8.1 Endocitosis y Cinética de recuperación asociadas a IRP	58
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	64
2.1 HIPÓTESIS	64
2.2 OBJETIVOS	64
Objetivo general.....	64
Objetivos particulares: parte I	65
Objetivos particulares: parte II	65
3. MATERIALES Y MÉTODOS	67
3.1 CULTIVOS CELULARES.....	67
3.1.1 Cultivo de células cromafines murinas.....	67
3.1.2 Cultivo de células cromafines bovinas	69
3.2 PROCEDIMIENTO DE TRANSFECCIÓN	71
3.3 TÉCNICAS ELECTROFISIOLÓGICAS	72
3.3.1 Generalidades	72
3.3.2 Circuito equivalente de la célula y medición de la capacitancia de la membrana celular.....	74
3.3.3 Dispositivo de patch clamp	78
3.3.4 Preparación de micropipetas	79
3.3.5 Soluciones para experimentos electrofisiológicos.....	80
3.3.6 Protocolos de estimulación utilizados	81
3.4 AMPEROMETRÍA	87
3.4.1 Fundamentos básicos.....	87
3.4.2 Preparación y selección de electrodos de carbono para experimentos de amperometría.....	91
3.4.3 Protocolo experimental y registros amperométricos	92
3.5 TÉCNICAS DE IMÁGENES.....	93
3.5.1 Cuantificación del grado de polimerización de F-actina.....	93
3.5.2 Cuantificación de los cúmulos de dinamina-2 A618T y S619L, y análisis de la distribución de gránulos secretorios	97
3.6 ESTADÍSTICA	102
3.7 REACTIVOS	102
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN I.....	104

4.1 DEPENDENCIA DE LA ENDOCITOSIS CON LA MAGNITUD DEL ESTÍMULO	104
4.1.1 Dependencia de la endocitosis con la duración del estímulo.....	104
4.1.2 Dependencia de la endocitosis con la estimulación repetitiva	112
4.2 DEPENDENCIA DE LA VELOCIDAD DE LA ENDOCITOSIS CON LA ENTRADA DE CA ²⁺	116
4.3 DEPENDENCIA DE LA ENDOCITOSIS CON LA GTPASA DINAMINA.	120
4.3.1 Inhibición de la actividad GTPasa con GTPγS	121
4.3.2 Inhibición de la acción de la dinamina con un anticuerpo monoclonal anti-dinamina.....	126
4.3.3 Inhibición de la acción de la dinamina por competencia con un péptido del dominio PRD de la dinamina	131
4.3.4 Inhibición de la actividad de la dinamina endógena por expresión del mutante DynI K44A	135
4.4 DEPENDENCIA DE LA ENDOCITOSIS DINAMINA-INDEPENDIENTE CON LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC).	141
4.4.1 Inhibición de la endocitosis dinamina-independiente con estaurosporina.....	142
4.4.2 Inhibición de la endocitosis dinamina-independiente con bisindolylmaleimida XI	146
4.4.3 El pre-tratamiento con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) modula la endocitosis dinamina-independiente.	150
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN II.....	157
4.5 EXOCITOSIS Y ENDOCITOSIS ASOCIADAS A IRP EN CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS. EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE LA DINAMINA.	157
4.5.1 Exocitosis y Endocitosis asociadas a IRP en condiciones controles en células cromafines bovinas	157
4.5.2 Inhibición de la acción de la dinamina con un anticuerpo monoclonal antidinamina en células cromafines bovinas.....	160
4.6 BREVE RESUMEN DE ANTECEDENTES DE A618T Y S619L.....	163
4.7 EFECTOS DE LAS MUTACIONES A618T Y S619L DE DINAMINA-2 SOBRE LA EXOCITOSIS DE IRP Y LA ENDOCITOSIS ASOCIADA EN CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS.	166

4.8 EFECTO DE A618T Y S619L SOBRE LA EXOCITOSIS Y LA ENDOCITOSIS DE POOLS GRANDES DE VESÍCULAS.	171
4.9 A618T Y S619L AFECTAN LA SECRECIÓN EN CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS.....	177
4.10 A618T Y S619L AFECTAN LA FORMACIÓN DE FILAMENTOS DE ACTINA.	187
4.11 A618T Y S619L PROMUEVEN LA FORMACIÓN DE AGREGADOS CITOPLASMÁTICOS DE DINAMINA Y DEPRIMEN LA RECUPERACIÓN DE VESÍCULAS SECRETORIAS EN LAS PROXIMIDADES DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA.	191
5. DISCUSIÓN GENERAL	200
6. BIBLIOGRAFÍA	203

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Médula Adrenal y Células Cromafines

1.1.1 Generalidades

Las glándulas suprarrenales son dos estructuras retroperitoneales con funcionalidad endocrina, situadas en la parte postero-superior del abdomen, por debajo y delante del diafragma, y sobre los polos superiores de los riñones. Se caracterizan por adoptar distinta forma una de otra, siendo la glándula izquierda de forma piramidal y la derecha de forma semilunar. 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 dos partes que difieren en su origen embriológico: la corteza suprarrenal, de origen mesodérmico, y la medula suprarrenal, de origen ectodérmico y ligada al desarrollo del sistema nervioso simpático. La corteza por fuera se encuentra rodeada por una lámina protectora denominada capsula, mientras que por dentro se compone de tres zonas celulares: glomerular, fasciculada y reticular, que sintetizan mineralocorticoides, glucocorticoides y hormonas sexuales, respectivamente, entre otras sustancias (Gray, 1998; Latarjet y Ruiz-Liard, 2011) (Figura 1.1). La médula por su parte es una estructura más pequeña que la corteza, dado que representa el 10% del peso y el volumen de las glándulas adrenales (Quinan y Berger, 1933). Está conformada principalmente por células cromafines, que se hallan invadas por terminales nerviosas de neuronas pre-ganglionares simpáticas, y a la vez se encuentran en contacto con capilares del sistema circulatorio en donde liberan sus productos secretorios (Figura 1.2.A). Estas células se encuentran dispuestas en cordones, lo cual favorece la relación de contacto con los capilares, permitiendo una liberación óptima del contenido secretorio (Díaz-Flores y col, 2008). Las células cromafines sintetizan y secretan a la sangre fundamentalmente adrenalina, en menor medida su precursor noradrenalina, y además varios péptidos activos, como el neuropéptido Y (NPY), el activador tisular de plasminógeno (t-PA), cromograninas (Chr), secretograninas y encefalinas.

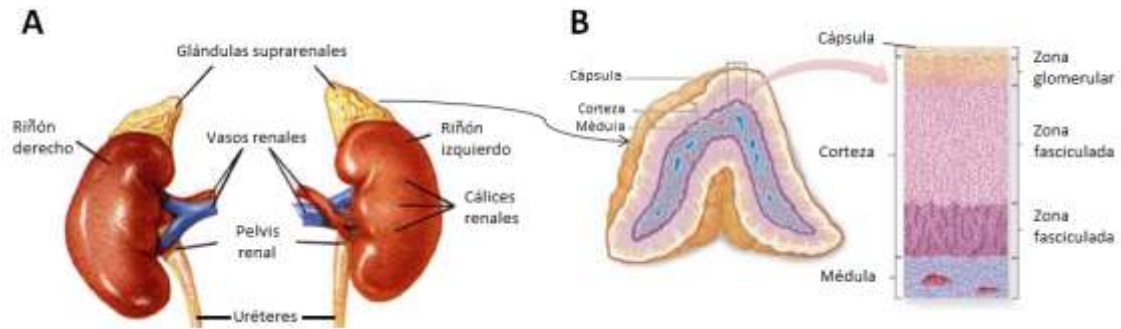


Figura 1.1 - (A) Localización de la glándula suprarrenal y sus relaciones anatómicas con el riñón. **(B)** El corte longitudinal en la glándula permite diferenciar las dos regiones principales: la corteza (por fuera) y la médula (en la zona interna). En el detalle de la derecha (recuadro) se observa la disposición de los tejidos que la constituyen.

1.1.2 La médula adrenal es parte del sistema nervioso simpático y un componente importante de la respuesta al estrés

El sistema nervioso autónomo (SNA) es un sistema eferente e involuntario que transmite señales desde el sistema nervioso central (SNC) hacia la periferia, donde se hallan las terminales nerviosas que regulan la función de órganos particulares. Entre las funciones que regula se encuentran: la frecuencia y fuerza de contracción cardíacas, contracción y dilatación de vasos sanguíneos, contracción y relajación del músculo liso (en varios órganos), acomodación visual y tamaño pupilar, secreción de glándulas exocrinas y endocrinas, y regulación de funciones vitales como la digestión, circulación sanguínea, respiración y metabolismo (Purves y col, 2004).

El SNA se divide funcionalmente en dos sistemas: simpático y parasimpático. El sistema simpático cumple con un rol clave 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 de esta forma la homeostasis del sistema. Debido a esto se lo considera el sistema de respuesta rápida al estrés por excelencia. Por el contrario, la acción del sistema parasimpático es opuesta a la del sistema simpático, y su función está orientada a la conservación de la energía del organismo (Purves y col, 2004).

En el sistema nervioso simpático tenemos axones pre-ganglionares que emergen desde la médula espinal y, viajando a través de ciertos nervios, hacen sinapsis con neuronas post-ganglionares en determinados ganglios intermedios. Desde aquí, tenemos axones post-ganglionares que se dirigen hacia distintos órganos efectores. El neurotransmisor por excelencia liberado en las pre-sinapsis ganglionares es la acetilcolina. A su vez, el neurotransmisor liberado por las terminales de las fibras post-ganglionares hacia el órgano efector es la noradrenalina (Purves y col, 2004).

La médula suprarrenal y el sistema nervioso simpático comparten su origen embriológico, dado que ambos provienen del neuroectodermo (Weston y col, 1970; Aloe y Levi-Montalcini, 1979; Tischler y col, 2002). Algunos de los progenitores neuronales provenientes de la cresta neural originan el sistema simpático, mientras que otros migran e invaden la corteza suprarrenal, dando lugar a la médula (Le Douarin y col, 2008). Posteriormente, y como consecuencia de la acción de diversos factores de crecimiento (Barald y col, 1982; Dutt y col, 2006), comienza la diferenciación celular y la inducción de la síntesis de catecolaminas (Bilodeau y col, 2000; Bilodeau y col, 2005). Al igual que en un ganglio simpático, las células cromafines son invadidas y estimuladas por terminales colinérgicas pre-ganglionares del sistema simpático (Figura 1.2.A) que llegan a ellas a través de axones 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). A su vez, las células cromafines que la componen se consideran neuronas post-ganglionares modificadas que no poseen axones y que liberan sus productos de secreción, principalmente adrenalina, aunque también noradrenalina y péptidos activos, directamente al torrente sanguíneo (Figura 1.2.A) (Donald y Sheperd, 1980).

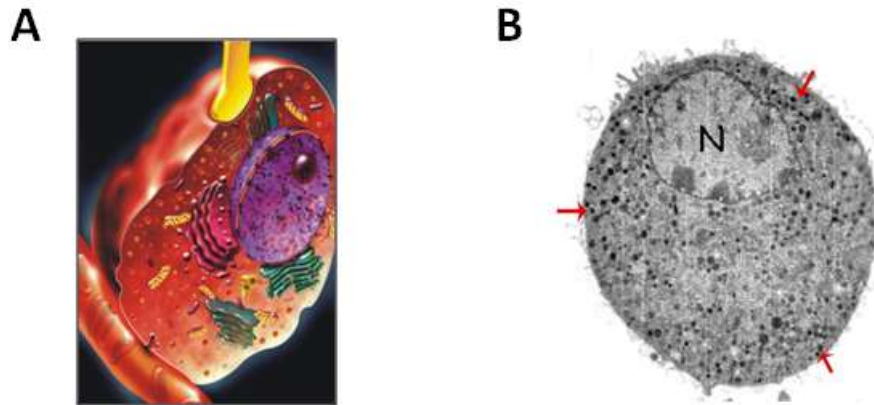


Figura 1.2 - (A) Representación de la innervación, la asociación con capilares y la ultraestructura de una célula cromafín. La terminal nerviosa, responsable de la estimulación colinérgica contacta directamente la célula, mientras que en el polo opuesto esta última mantiene un contacto directo con el capilar sanguíneo hacia donde se secretan las hormonas mediante exocitosis. **(B)** Imagen de microscopía electrónica de transmisión de una célula cromafín. Se observa el núcleo (indicado con una N) y un importante contenido de vesículas secretorias (algunas indicadas con flechas rojas a modo de ejemplo). Estas vesículas al visualizarse electrodensas al microscopio electrónico, se las denomina DCV (del inglés *Dense-Core Vesicles*). Figura extraída y modificada de Ashery y col, 2000.

Los terminales axónicos del nervio esplácnico liberan acetilcolina sobre las células cromafines, las cuales poseen receptores colinérgicos de membrana. La secreción en las células cromafines es disparada por la activación de receptores nicotínicos, de tipo ionotrópico. Sin embargo, también hay receptores muscarínicos de tipo metabotrópico y acoplados a proteína G, que tiene un papel modulador (Aguilar y col, 1992). Cuando el receptor nicotínico es activado por la acetilcolina, aumenta la probabilidad de apertura de un canal catiónico que forma parte de la estructura del receptor, activándose una corriente catiónica entrante asociada fundamentalmente a Na^+ . Esto genera un incremento del potencial de la membrana plasmática, lo cual desencadena el disparo de potenciales de acción (PAs). Como consecuencia de esto, se activan canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV), también localizados en la membrana plasmática de la célula cromafín, permitiendo la entrada de este ión. El Ca^{2+} finalmente, dispara la exocitosis de las vesículas secretorias (DCV, del inglés *Dense-Core Vesicles*, ver Figura 1.2.B), liberando

las catecolaminas y las otras sustancias activas contenidas en estas al torrente sanguíneo.

En condiciones basales, en las cuales el organismo no está sometido a estrés, la frecuencia de disparo de PAs en las células cromafines está dentro del orden de 0,1-1 Hz. A este estado fisiológico se lo conoce como “estado de reposo” (el termino comúnmente utilizado inglés es *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 comúnmente llamada de “lucha o huída” (*fight or flight*, en inglés), en la cual se produce un importante aumento de las frecuencias de PAs en las neuronas pre-ganglionares, lo cual aumenta la liberación de acetilcolina por parte de estas. Esto a su vez produce un aumento en la frecuencia de disparo de PAs de las células cromafines hasta valores 30 veces mayores que el reposo (~15 Hz) (Brandt y col, 1976), lo cual genera una liberación masiva de adrenalina (y también noradrenalina y péptidos activos) a la circulación general (Chan y Smith, 2003b; Perrais y col, 2004; Borges y col, 2018).

1.1.3 Potencial de acción, corrientes iónicas 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, $V_m = V_{intracelular} - V_{extracelular}$). En estudios realizados en los años 60 se estimó un valor de potencial de reposo en células cromafines de aproximadamente -30 mV (Douglas y col, 1967; Matthews y col, 1967). Sin embargo, en los años siguientes, con las mejoras en los métodos experimentales introducidos por la técnica de *patch clamp*, fue posible situar 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 de potencial de membrana entre -50 y -60 mV (Wallace y col, 2002; Orozco y col, 2006).

Cuando las células cromafines son excitadas, ya sea fisiológicamente por acetilcolina o por algún otro método, se disparan potenciales de acción (PAs) en la membrana plasmática (Figura 1.3.A). La fase de subida del PAs en algunos preparados (células cromafines humanas) es dependiente casi exclusivamente de la activación de canales de Na^+ voltaje-dependientes (Biales y col, 1976), mientras que en otros (células cromafines de rata) depende también de CCDV (Figura 1.3.B) (Brandt y col, 1976; Kidokoro y col, 1980). La fase de bajada del PAs en las células cromafines, depende conjuntamente de la inactivación de los canales de Na^+ y de la activación de canales de K^+ dependientes de voltaje, como así también de dos variantes de canales de K^+ activados por Ca^{2+} tipo BK (Neely y col, 1992; Gonzalez-García y col, 1993; Inoue y col, 1993; Lara y col, 1995; Solaro y col, 1995).

Las corrientes de Ca^{2+} voltaje dependientes son el disparador natural de la exocitosis en las células cromafines (Figura 1.3.B). Estas provocan que la concentración de Ca^{2+} citosólica se eleve desde ~ 100 nM en reposo (Meldolesi y col, 1998), hasta valores mayores a 10 μM en los sitios de exocitosis (Neher y col, 1992; Neher y col, 1998, Marengo y col, 2000; Voets, 2000). La eficiencia de estas corrientes para inducir la exocitosis depende del grado de acople de los CCVD con la maquinaria exocítica asociada a las vesículas secretorias. En particular, se ha visto que la exocitosis inducida por las corrientes de Ca^{2+} evocadas por un PAs varía según el tipo de preparado experimental. Se estimó que un PAs aplicado a una célula cromafín en *slices* de médula adrenal de ratón libera ~ 7 vesículas secretorias, mientras que en células cromafines bovinas y de rata en cultivo sólo liberaban ~ 2 vesículas por PAs (Moser y col, 1997; Zhou y col, 1995). En nuestro laboratorio, estimamos que un PAs aplicado a células de ratón en cultivo induce una exocitosis que corresponde a la liberación de ~ 8 vesículas secretorias (Moya-Díaz y col, 2016).

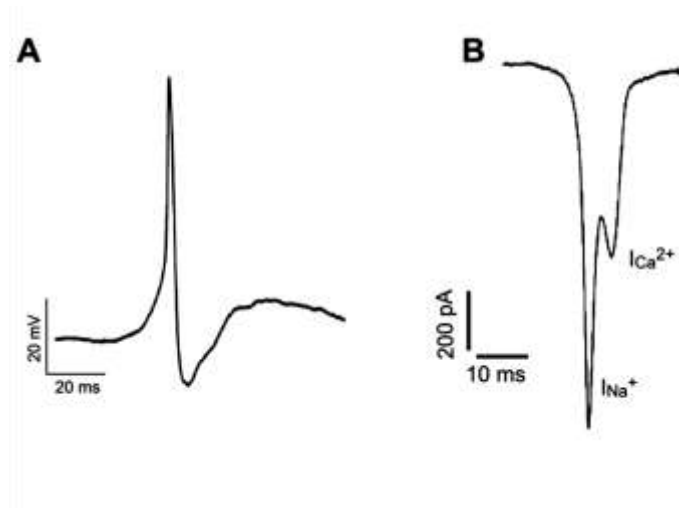


Figura 1.3 - Potencial de acción en células cromafines. (A) Ejemplo representativo de un PAs en una célula cromafin bovina, generado por la estimulación con un *puff* de 25 ms de acetilcolina. (B) Las corrientes catiónicas entrantes que subyacen al PAs son de Na⁺ y de Ca²⁺ (las corrientes salientes de K⁺ fueron bloqueadas en este registro). Debido a la rápida inactivación de las corrientes de Na⁺, las dos corrientes están separadas temporalmente. Figuras extraídas y modificadas de de Diego y col, 2008 y de Diego y col, 2009.

1.1.4 Vesículas secretorias y productos de secreción

En las células cromafines se han descrito fundamentalmente dos tipos de vesículas: las llamadas vesículas secretorias o gránulos secretorios, que tienen un diámetro promedio de ~200 nm y se visualizan oscuras (electrodensas) al microscopio electrónico (DCV), y las vesículas pequeñas, con un diámetro promedio de ~40 nm y claras al microscopio electrónico, las cuales son similares a las vesículas sinápticas (Annaert y col, 1993; Tanner y col, 1996; Koval y col, 2001). Los compuestos clásicos de secreción de las células cromafines son, en mayor proporción, la adrenalina, y luego en cantidades menores la noradrenalina y una variedad de péptidos activos. Todos estos compuestos son almacenados dentro de las vesículas secretorias. La propiedad electrodensa de estas vesículas se debe a la presencia de proteínas fuertemente empaquetadas, de las cuales la más concentrada es por lejos la cromogranina (Chr) (Banks y Helle, 1965; O'Connor y Frigon, 1984). Además de cromograninas, las vesículas secretorias cuando se excitan liberan otras proteínas y péptidos, dentro de los cuales podemos nombrar al neuropéptido Y (NPY), al activador tisular de plasminógeno (t-PA), a las

secretograninas, a las encefalinas, y a varios factores tróficos (Lewis y col, 1979; Viveros y col, 1979; Kataoka y col, 1985; Unsicker y Krieglstein, 1996; Parmer y col, 1997).

La adrenalina, como también, la noradrenalina, son sintetizados en el citosol, y luego transportados hacia el interior de las vesículas mediante los transportadores VMAT1 y VMAT2 (por *Vesicle Monoamine Transporter 1 & 2*) (Erickson y col, 1996). Estos transportadores utilizan el gradiente de H⁺ generado por una bomba H⁺-ATPasa de la membrana vesicular (Dean y col, 1986), que mantienen un pH de aproximadamente 5,5 en el interior vesicular. La concentración de catecolaminas libres en el interior vesicular no es muy alta, ya que la gran mayoría se encuentra unida a la matriz proteica densa de cromograninas, cuyas cargas negativas se encuentran neutralizadas por las catecolaminas y otros cationes (Banks y Helle, 1965; O'Connor y Frigon, 1984). El gran empaquetamiento de estas proteínas, confiere a las DCV su típica característica electrodensa (Figura 1.4).

La ruta biosintética de la adrenalina comienza con la formación de L-DOPA a partir del aminoácido tirosina, por acción de la enzima tirosina hidroxilasa. Este primer paso es el limitante en la síntesis de catecolaminas. Luego, la enzima dopa descarboxilasa cataliza la eliminación del grupo carboxilo de L-DOPA y la convierte en dopamina. A continuación, la dopamina es transformada en noradrenalina por la acción de la enzima dopamina-β-hidroxilasa, que utiliza como sustratos al ascorbato y el oxígeno. En las células cromafines que secretan noradrenalina la vía biosintética se frena en este punto. En cambio las células que secretan adrenalina, aproximadamente el 70% del total celular, expresan la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa, que cataliza la reacción de metilación que convierte la noradrenalina en adrenalina. Este último paso es regulado de manera positiva por la presencia de glucocorticoides provenientes de la corteza adrenal (Nagatsu y col, 1964; Hodel y col, 2001).

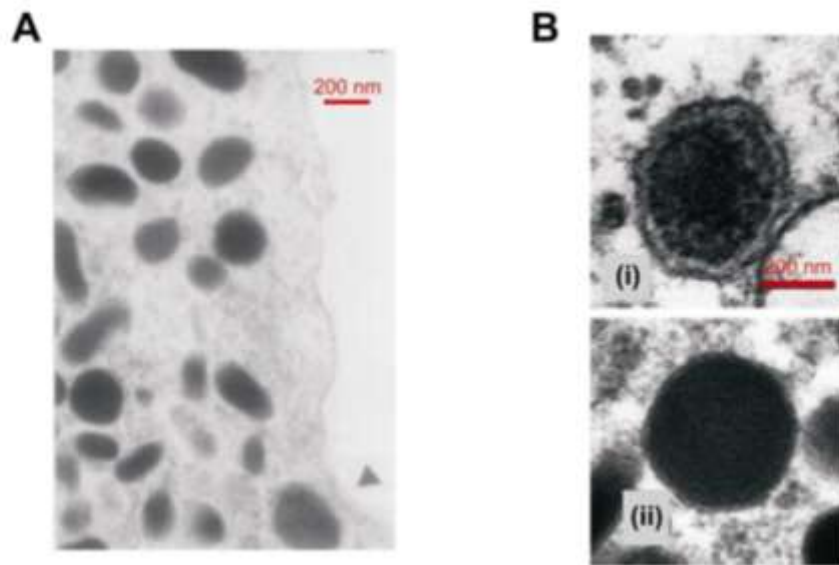


Figura 1.4 - Microscopia electrónica de la zona cortical de una célula cromafin bovina. (A) Posicionamiento de las vesículas secretorias con respecto a la membrana plasmática (imagen extraída de Vitale y col, 2005). **(B)** Se observan las diferencias entre las vesículas cargadas con adrenalina y las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

1.1.5 Ventajas como modelo neurobiológico

Las células cromafines suelen ser utilizadas como modelo neurosecretorio. 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, por lo que la liberación de neurotransmisores u hormonas se activa a partir del disparo de PAs y la consecuente activación de CCDV ubicados en la membrana plasmática, lo cual genera el aumento de Ca^{2+} citosólico y la posterior exocitosis y 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 (Roth y Burgoyne, 1994; Hodel y col, 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 el estímulo y la secreción. En las neuronas los canales de Ca^{2+} y las vesículas están fuertemente colocalizados en zonas activas, permitiendo una rápida y eficiente liberación de los neurotransmisores (Cohen y col, 1991). Por otro lado, en las células cromafines no hay zonas activas que se puedan observar al microscopio electrónico, y no existe una relación estructural y funcional entre la mayoría de las vesículas maduras, listas para excitarse, y los CCDV. Esto hace que la exocitosis sea más lenta y asincrónica respecto del estímulo en las células cromafines a comparación de las neuronas (Chow y col, 1992; Seward y col, 1995). Esto 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, por lo que no se requiere un mecanismo tan acoplado y rápido. Sin embargo, como se detallará más adelante en este trabajo de Tesis, las células cromafines también poseen un grupo vesicular pequeño que puede ser liberado en forma altamente acoplada con el estímulo en 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, formación y dinámica del poro de fusión vesicular, etc. En primer lugar, estas células son fácilmente cultivables (Livett y col, 1984). 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 . Dado que estas células se comportan eléctricamente como un compartimiento único (debido a su morfología esférica), resulta más precisa y segura la fijación del voltaje (o *voltage clamp*, en inglés) que en células con una geometría más compleja. Además, dado que los canales de Ca^{2+} , los sitios de exocitosis y las vesículas secretorias se encuentran dentro del mismo compartimiento, las corrientes de Ca^{2+} registradas son 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). Esta técnica será explicada con más detalle posteriormente (ver sección 3.3 en Materiales y Métodos), ya que se utilizó a lo largo de esta Tesis. La 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, 2000; Marengo y Monck., 2003).

Otra característica que hace a las células cromafines ventajosas como modelo experimental, es que pueden ser utilizadas para estudiar la secreción de adrenalina con alta resolución temporal mediante la técnica electroquímica de 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). Esta técnica puede ser aplicada conjuntamente 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 por la aplicación de la técnica de microscopia de reflexión total interna (TIRFM). Por medio de la técnica de TIRFM es posible visualizar y seguir el movimiento y destino 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 vesícula secretoria mediante ultra-centrifugación (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*, capacitancia en *patch* y STED más recientemente, estas células también han servido para poder demostrar de manera directa los distintos tipos de fusión de las vesículas (fusión transitoria (*kiss-and-run*) o colapso completo) (Alvarez de Toledo y col, 1993; Zhou y col, 1996; Albillos y col, 1997; Ales y col, 1999; 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* (como sólo algunos ejemplos de esto se puede citar a Sørensen y col, 2003; Sørensen y col, 2006; Waler 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 y recaptación de calcio

La secreción en células neuroendócrinas está mediada, al igual que la liberación de neurotransmisores desde las pre-sinapsis, por una entrada localizada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de los CCDV de la membrana plasmática (Neher y col, 1992). Además de esta vía, las células

cromafines poseen otros mecanismos capaces de aumentar los niveles de Ca^{2+} citosólico, tales como la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático (RE) a través de receptores de rianodina y/o de IP_3 , y la reversión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática (Villalobos y col, 2002; Verkhratsky, 2002; Inoue y col, 2003; Wu y col., 2010), aunque la real importancia de estas fuentes en la exocitosis vesicular es dudosa. Por otro lado, también tenemos mecanismos de recaptación de Ca^{2+} que permiten restablecer y/o mantener los niveles basales de este catión, como la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ actuando en modo directo, la Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplásmico y el uniporter mitocondrial (Herrington y col, 1996; Pan y col, 1997; Villalobos y col, 2002). Todos estos sistemas pueden potencialmente influir en la distribución espacio-temporal de las concentraciones de Ca^{2+} de estas células (Marengo y col, 2003).

1.2.1 Fuentes de calcio

1.2.1.1 *Canales de calcio voltaje dependientes*

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 col, 2000), mientras que las otras subunidades cumplen un papel regulatorio (Figura 1.5.A). 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 (Figura 1.5, paneles B y D). Cada uno de estos dominios, a su vez, está formado por 6 segmentos transmembrana en alfa hélice con 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 un canal está abierto, forma un poro que se extiende a través de todo el espesor de la membrana. El poro contiene un filtro que establece la selectividad iónica del canal, restringiendo el paso del ion de

acuerdo con el tamaño, carga y energía libre de hidratación del propio 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 1.5.C). El canal de Ca^{2+} además experimenta un proceso de inactivación que es dependiente de voltaje y del Ca^{2+} (Zhang y col, 1994). Este canal debe salir del estado de inactivación para poder volver a activarse ante un cambio de potencial.

Un canal abierto 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.

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

A nivel celular, la corriente de Ca^{2+} depende 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 función 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).

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

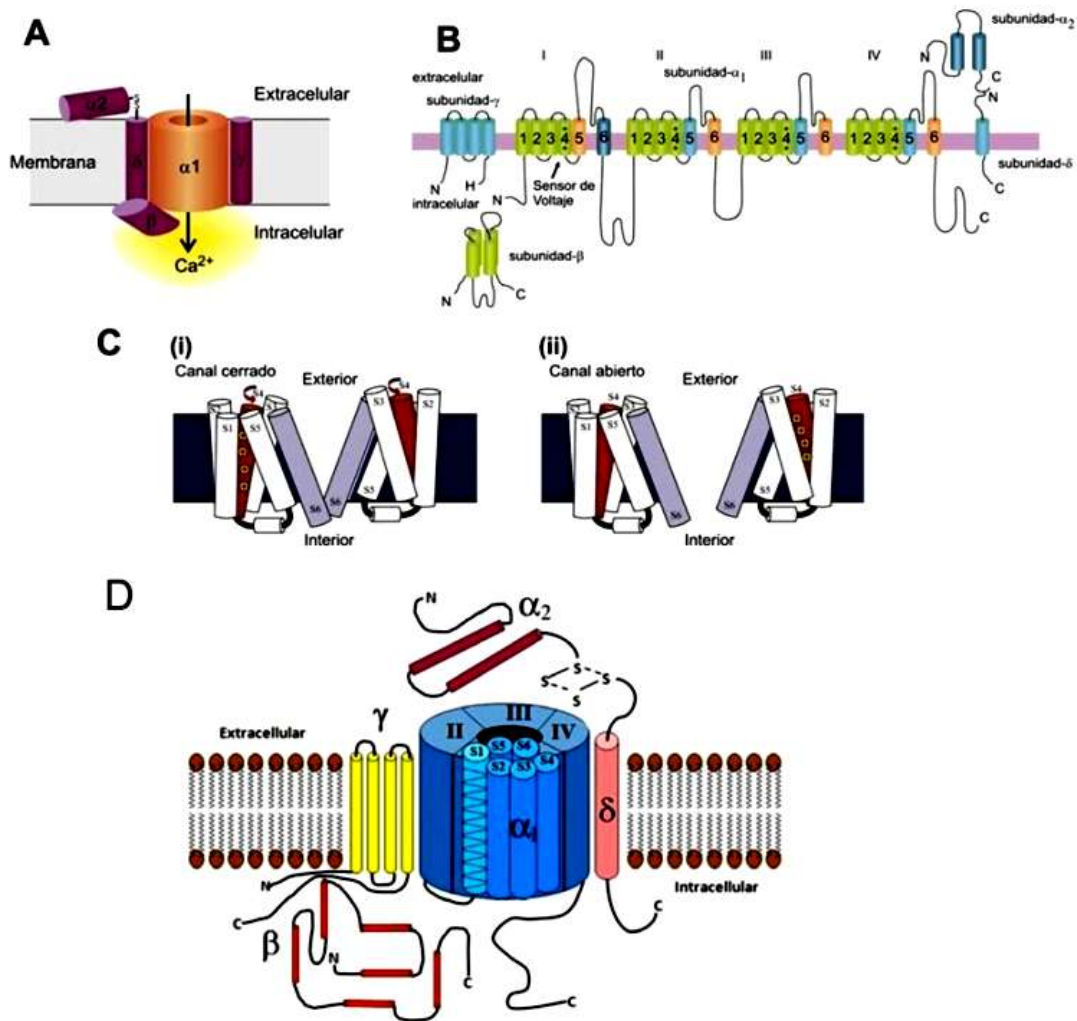


Figura 1.5 - (A) Diagrama de un canal de Ca^{2+} voltaje dependiente. La estructura molecular del canal de Ca^{2+} consta de cinco subunidades: α_1 , α_2 , δ , γ y β . La subunidad α_1 es la que distingue a los subtipos de canales y la que contiene al poro. **(B)** Representación extendida de los segmentos 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 Ca^{2+} , representando los estados cerrado (i) y abierto (ii). **(D)** Esquema de la estructura plegada de la subunidad α_1 y de las subunidades regulatorias.

En la Figura 1.6 se muestra una curva que representa la corriente en función del voltaje aplicado (curva I/V), obtenida experimentalmente en nuestro laboratorio, donde se observa que la corriente máxima se activa a un voltaje aproximado de +10 mV. El establecimiento de este máximo es consecuencia del aumento de la cantidad de canales abiertos y de la reducción de la fuerza

impulsora de los iones de Ca^{2+} a medida que nos acercamos al potencial de equilibrio del Ca^{2+} ($E_{\text{Ca}^{2+}}$) (Hille y col, 2001).

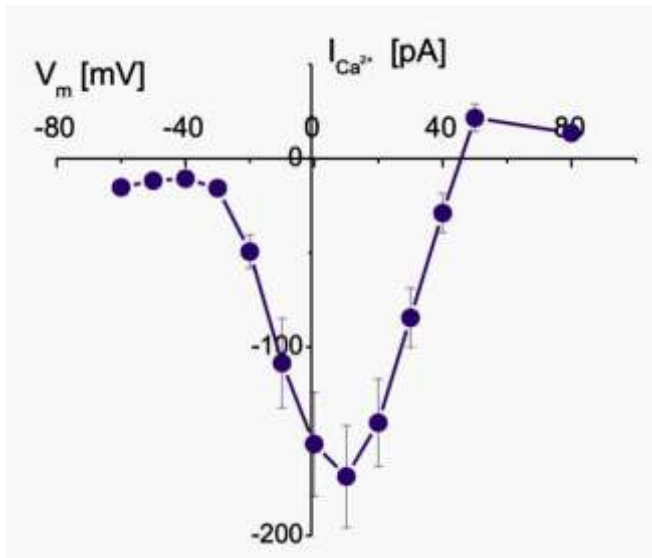


Figura 1.6 - Dependencia de la $I_{\text{Ca}^{2+}}$ con el V_m en células cromafines de ratón. En esta figura se muestra una curva de la corriente de Ca^{2+} máxima en función del potencial aplicado durante la despolarización. Esta curva se obtuvo experimentalmente mediante la aplicación de pulsos despolarizantes desde el valor del potencial mantenimiento 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 distinguen dos grupos: los activados por voltajes altos, denominados (HVA) (en inglés, *High Voltage Activated*), y los que se activan por voltajes bajos, denominados (LVA) (en inglés, *Low Voltage Activated*). El hallazgo de toxinas y/o fármacos específicos que bloquean los canales de Ca^{2+} permitió una mejor categorización de los mismos. Dentro de los canales HVA se pueden distinguir los subtipos: N, P/Q, R y L. La corriente tipo N es bloqueada irreversiblemente por el péptido llamado ω -conotoxina-GVIA, proveniente de la especie de caracol marino *Conus geographus* (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 la araña *Agelenopsis aperta*, conocido como 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). Se han identificado a todos los subtipos de HVA en células cromafines. Por otro lado, los canales LVA son los llamados de

tipo T. Si bien los canales de tipo T no se expresan normalmente en células cromafines en cultivo, si lo hacen 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). Los canales tipo T son sensibles al bloqueante inorgánico Ni^{2+} (Fox y col, 1987).

Tipo de Corriente	Subunidad	Activación	Distribución	Farmacología
L	$Ca_v1.1$	α_{1S}	Músculo esquelético	Dihidropiridinas
	$Ca_v1.2$	α_{1C}	Células cromafines, SNC, músculo cardíaco, células endócrinas	
	$Ca_v1.3$	α_{1D}	Células cromafines, SNC, páncreas, riñón, cóclea, oído	
	$Ca_v1.4$	α_{1F}	Retina	
P/Q	$Ca_v2.1$	α_{1A}	Células cromafines, dendritas, terminales nerviosas	ω -agatoxina-IVA
N	$Ca_v2.2$	α_{1B}	Células cromafines, dendritas, terminales nerviosas	ω -conotoxina-GIVA
R	$Ca_v2.3$	α_{1E}	Células cromafines, dendritas, terminales nerviosas, cuerpos celulares	SNX-482
T	$Ca_v3.1$	α_{1G}	SNC	Mibefradil
	$Ca_v3.2$	α_{1H}	Células cromafines*, neuronas, músculo cardíaco	
	$Ca_v3.3$	α_{1I}	SNC	

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

1.2.1.2 Fuentes intracelulares de calcio

Las células cromafines poseen varios compartimientos intracelulares capaces de acumular Ca^{2+} en su interior. Entre estos se encuentran las mitocondrias, el retículo endoplásmico (RE) y las vesículas secretorias. La mitocondria en condiciones fisiológicas no es capaz de acumular Ca^{2+} en forma significativa, por lo que esta organela tampoco funciona como fuente de liberación de Ca^{2+} (Gunter y col, 1994), y por ello en este capítulo no nos ocuparemos de ella.

El RE posee una alta capacidad de acumular Ca^{2+} gracias a la bomba 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 transporta Ca^{2+} desde el citosol hacia el lumen de dicha organela, en

contra el gradiente de concentración y con gasto de la energía de enlace del ATP. Esto permite la formación de un importante gradiente de Ca^{2+} entre ambos compartimentos, pudiendo alcanzar concentraciones de Ca^{2+} libre del orden de $\sim 500 \mu\text{M}$ dentro del lumen del RE (Montero y col, 1995). Esto habilita al RE a ser una fuente de este catión. El RE participa de las señales citosólicas de Ca^{2+} en innumerables tipos celulares (Fabiato y col, 1983; Rigual y col, 2002), gracias a la presencia en su membrana de dos tipos de canales de Ca^{2+} activables por ligando que permiten la liberación de Ca^{2+} al citosol (Berridge, 1993; Inoue y col, 2003): los canales activables por inositol 1,4,5-trifosfato (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, lo cual produce la salida de dicho catión desde el RE y contribuye 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. Sin embargo, la eficiencia de estos mecanismos para disparar exocitosis es muy baja (Neher y Augustine, 1992) y su real participación está en duda.

Otra posible fuente de Ca^{2+} son las vesículas secretorias. La concentración de Ca^{2+} total en estos compartimentos se ha estimado en valores tan altos como $\sim 40 \text{ mM}$ (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 SERCA (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). En base a esto, algunos investigadores sostienen la hipótesis de que la liberación del Ca^{2+} intravesicular pudiera contribuir a la movilización y posterior exocitosis de las mismas vesículas secretorias (Santodomingo y col, 2008; Borges y col, 2012).

1.2.2 Remoción y regulación del calcio citosólico

Frente a un aumento del Ca^{2+} citosólico, la célula debe recaptar a este catión para retornar su concentración a niveles basales. Para esto, las células en general, y las cromafines en particular, poseen diversos mecanismos.

La remoción de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática, y por lo tanto el mantenimiento del importante gradiente de 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; Park y col, 1996).

De las tres isoformas de SERCA que existen, en las células cromafines se detectaron dos: SERCA 2b y SERCA3 (Poulsen y col, 1995). Estas ATPasas poseen una estequiometría de 2 Ca^{2+} removidos por ATP hidrolizado (Villalobos y col, 2002).

Finalmente, es importante destacar que las células cromafines poseen *buffers* pasivos 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+} (Neher y col, 1992; Neher y col, 1998, Marengo y col, 2000).

1.2.3 Características espaciales y temporales de las señales de calcio

Todos los elementos descritos (canales, compartimientos intracelulares, *buffers*, sistemas de remoción) modulan espacial y temporalmente los cambios de concentración del Ca^{2+} citosólico, usualmente llamados señales de Ca^{2+} , 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 las vesículas maduras listas para liberarse, adheridas a la membrana plasmática, que se produce gracias a la activación de los CCDV. Los gradientes de Ca^{2+} que se desarrollan a partir de la activación de la corriente de Ca^{2+} son modulados inicialmente, en un rango temporal que va de los milisegundos a cientos de

milisegundos, por *buffers* pasivos (fundamentalmente proteínas, como la calbindina) presentes en el citosol (Monck y col, 1994; Marengo y Monck, 2000; Ales y col, 2005; Villalobos y col, 2002; Marengo y col, 2003). Seguidamente, en el proceso de recaptación del Ca^{2+} intervienen los mecanismos de transporte de la membrana plasmática y de organelas intracelulares mencionados previamente (Herrington y col, 1996; Pan y col, 1997; Villalobos y col, 2002; Marengo y col, 2003; Ales y col, 2005; Marengo, 2005).

La señal de Ca^{2+} , próxima a la membrana plasmática, que se genera por la apertura de CCDV, 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+} . Como consecuencia se piensa que se generan micro o nanodominios de concentración de Ca^{2+} . Estudios de modelado predijeron que dichos microdominios alcanzan concentraciones mayores a $10\ \mu\text{M}$ de Ca^{2+} (Simon y col, 1985), pero en contraposición, la concentración de Ca^{2+} decaería a niveles cercanos al reposo a $300\ \text{nm}$ 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. En células cromafines bovinas, combinando la técnica de imágenes por láser pulsado con amperometría, se logró mapear la coexistencia espacial de *hotspots* de Ca^{2+} con sitios de exocitosis rápida (Monck y col, 1994; Robinson y col, 1995), y usando microscopia de campo evanescente 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). Sin embargo, como veremos luego, las vesículas que se localizan próximas a los CCDV son sólo una pequeña proporción de las vesículas liberables totales, y explican una pequeña fracción de la exocitosis que pueden desarrollar las células comafines (Voets y col, 1999). La mayoría de las vesículas se encuentran alejadas de los CCDV, y se liberan frente a estimulaciones intensas, como ocurre en situaciones de stress, que generan aumentos globales de Ca^{2+} (Marengo y Cárdenas, 2018).

1.3 Exocitosis en células cromafines

La exocitosis es el proceso de fusión de la membrana de una vesícula intracelular a la membrana plasmática, con la consecuente 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 reciclado normal de lípidos y proteínas entre la membrana plasmática y organelas intracelulares, como del intercambio de productos de desecho metabólicos entre la célula y en medio extracelular. 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 pre-sinapsis, células endócrinas y neuroendócrinas 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 la exocitosis constitutiva y la regulada por Ca^{2+} cumplen funciones distintas, los mecanismos generales son similares, y lo que las diferencia principalmente es la intervención de proteínas sensibles a Ca^{2+} (Burgoyne y Clague, 2003).

Luego de ser transportada a las proximidades de la membrana plasmática, el primer paso que debe cumplir una vesícula es el anclado o *docking*, en el cual la vesícula establece un contacto físico con dicha membrana (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 apoyan 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 y col, 2008), según el autor. Sin embargo, dado que las células cromafines poseen una enorme cantidad de vesículas (varios miles), esta definición en este tipo celular es muy poco precisa e involucra a una población muy heterogénea de vesículas. Por otro lado, los autores que definen el *docking* a nivel molecular se basan en 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 proteína SNARE de membrana plasmática sintaxina en su forma plegada y la proteína sinaptotagmina de la membrana vesicular, estabilizada por la proteína Munc18-1, es determinante en el proceso de anclado (Pevsner y col, 1994; Voets y col, 2001b; Sørensen y col, 2003; Borisovska y col, 2005). Un modelo similar, un poco más complejo, propone que el anclado se establece entre el complejo aceptor t-SNARE sintaxina/SNAP25 de la membrana plasmática y la sinaptotagmina de la membrana vesicular (de Wit y col, 2009; Gulyás-Kovács A y col, 2007). Otras proteínas que también han sido propuestas como partícipes del anclado de vesículas a la membrana son Rab3A, Rab27, granofilina y exofilina/Slp2a, aunque su participación aún no ha sido demostrada en células cromafines (Ashery y col, 2000; van Weering y col, 2007).

Luego del anclado, las vesículas secretorias atraviesan un proceso complejo de activación (*o priming*), que requiere de Ca^{2+} y de varios factores proteicos como Munc18, Munc13 y complexina, y que lleva a la formación y maduración del complejo trans SNARE (Holz y col, 1989; Xu y col, 1998, Sørensen y col, 2003; Sørensen y col, 2004; Borisovska y col, 2005). La formación de este complejo se da por la interacción de las denominadas t-SNARE, que son las proteínas de la membrana plasmática SNAP-25 y sintaxina, con la v-SNARE sinaptobrevina (o VAMP) de la membrana vesicular (Chen y Scheller, 2001). En la exocitosis Ca^{2+} dependiente, finalmente el aumento del Ca^{2+} citosólico activa el proceso de “*zippering*” de las proteínas SNARE (ver más adelante) que promueve la fusión.

En el caso de la exocitosis regulada por Ca^{2+} , la fusión de las vesículas ocurrirá solamente cuando la concentración citosólica de Ca^{2+} supere cierto valor umbral (aproximadamente 1 μM) en la región próxima a las vesículas (Sugita y col, 2008). El sensor de Ca^{2+} que interviene en este proceso, tanto para las vesículas sinápticas como para las secretorias, 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+} . La

ocupación de estos sitios lleva a la activación de la proteína, favoreciendo la unión de ésta a la syntaxina (Bennett y col, 1992) y a ciertos lípidos de la cara interna de la membrana plasmática (Brose y col, 1992). Juntamente con esto, el complejo SNARE sufre el proceso llamado *zippering* (Sutton y col, 1998), que es fuertemente exergónico. El *zippering* conduce a la formación de una estructura *coil coiled* entre las distintas alfa hélice que forman el SNARE, empezando desde la región N terminal y terminando en la 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 de las mismas (Jahn y col, 2003). El primer evento que ocurre durante la fusión es la formación de un poro que se establece entre los medios extracelular e intracelular, el poro de fusión (Xue y col, 2004). Posteriormente ocurre la expansión de dicho poro (ver más adelante), con la consecuente liberación del contenido vesicular y la finalización del proceso de exocitosis (Alvarez de Toledo y col, 2018).

Finalmente, NSF, que es una chaperona, utiliza la energía de hidrólisis del ATP y a α -SNAP como cofactor, para promover el desensamblado de los complejos SNARE, que quedaron en conformación CIS en la membrana plasmática luego del proceso de exocitosis previo. Esto permite la reutilización de las proteínas SNARE (la v-SNARE sinaptobrevina es posteriormente endocitada y reciclada a nuevas vesículas) para un nuevo proceso de fusión (Sollner y col, 1993; Kibble y col, 1996; Burgoyne y Morgan, 2003).

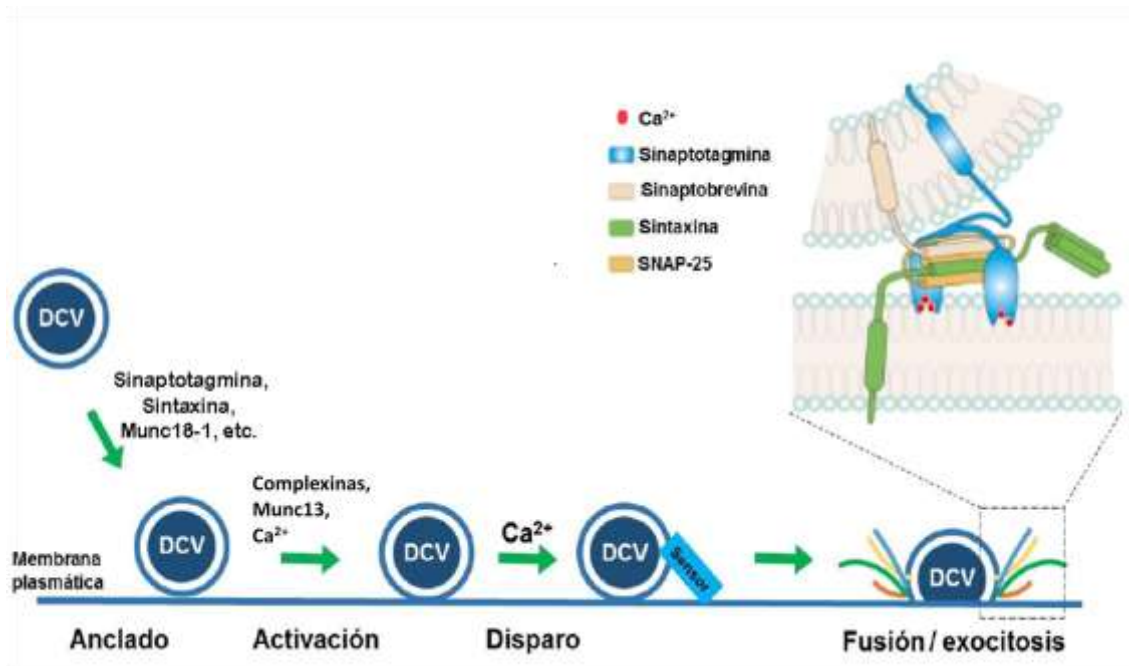


Figura 1.7 - Etapas del proceso de secreción. En la figura principal se representan las etapas de anclado, activación, disparo de la exocitosis por Ca^{2+} y fusión vesicular. En el detalle se muestra un esquema del complejo SNARE, formado por la proteína vesicular sinaptobrevina y por la sintaxina y SNAP-25 localizadas en la membrana plasmática. La sintaxina y la sinaptobrevina aportan sólo un α hélice, 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. Figura extraída y modificada de Sugita y col, 2008.

Una vez abierto el poro de fusión, la exocitosis puede seguir caminos diferentes. Estos pueden llevar a un proceso de fusión transitoria o al colapso completo de la vesícula con la membrana plasmática (Figura 1.8). En el primer caso, 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*. 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* (Cárdenas y Marengo, 2010; Cárdenas y Marengo 2016). En cambio, en el colapso completo, el poro de fusión se expande llevando a una integración total de la membrana vesicular con la membrana plasmática, con lo cual los componentes de la primera difunden y se

dispersan en la segunda. Ambos procesos (colapso completo o *kiss and run*) permiten la liberación del contenido vesicular (parcial en el caso del *kiss and run*), ya sea a la brecha sináptica (en el caso de neuronas) o a la circulación sanguínea (en el caso de las células neuroendocrinas).

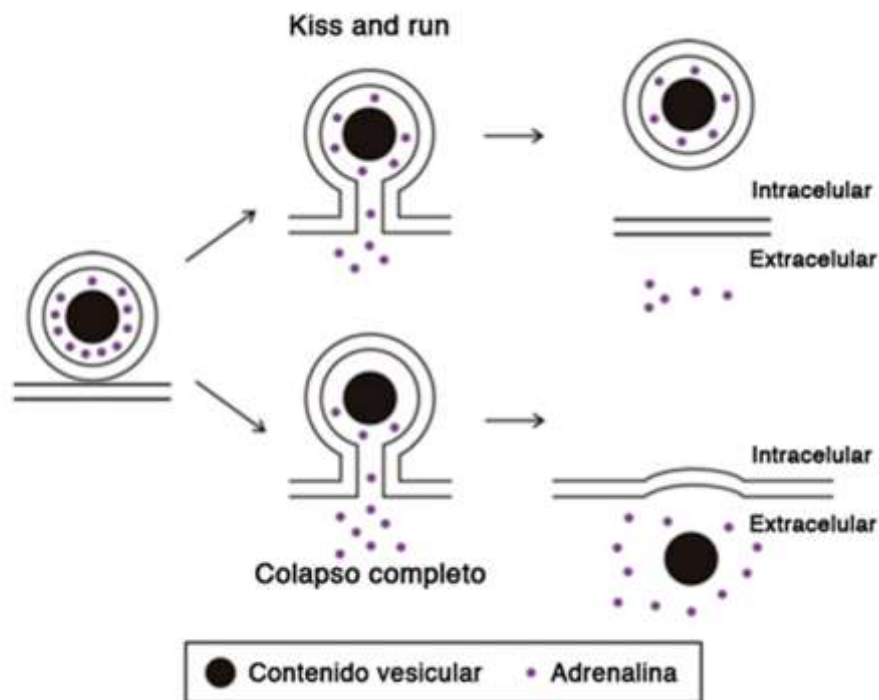


Figura 1.8 - Representación de la secuencia de eventos del mecanismo de *kiss and run* y del colapso completo. Luego de la formación del poro, la vesícula puede recuperarse sin haber perdido su identidad (*kiss and run*) o colapsarse completamente en la membrana plasmática. Figura tomada y modificada de Chan y col, 2010.

Estudios recientes aportados por el grupo de trabajo de Ling Gang Wu (Shin y col, 2018), indican que el modo de fusión de la vesícula secretoria a la membrana plasmática (colapso completo o *kiss and run*) estaría siendo regulado en forma opuesta por dos factores proteicos. Uno de ellos es la GTPasa dinamina (ver más adelante en esta Introducción). Brevemente, los monómeros de dinamina se polimerizan alrededor del cuello vesicular (formando un anillo o espiral de dinamina), evitando por un lado que el poro se expanda y por otro favoreciendo su cierre e internalización de la vesícula. El

segundo factor sería la F-actina cortical, la cual genera una tensión lateral en la membrana plasmática, contrapuesta a la fuerza de constricción efectuada por la dinamina. Esta tensión facilitaría la apertura del poro de fusión, y la liberación del contenido vesicular. De esta forma, y como resultado de la contribución de estos dos factores, el poro de fusión sería una estructura muy dinámica que podría adoptar diferentes radios de apertura según las condiciones (Figura 1.9).

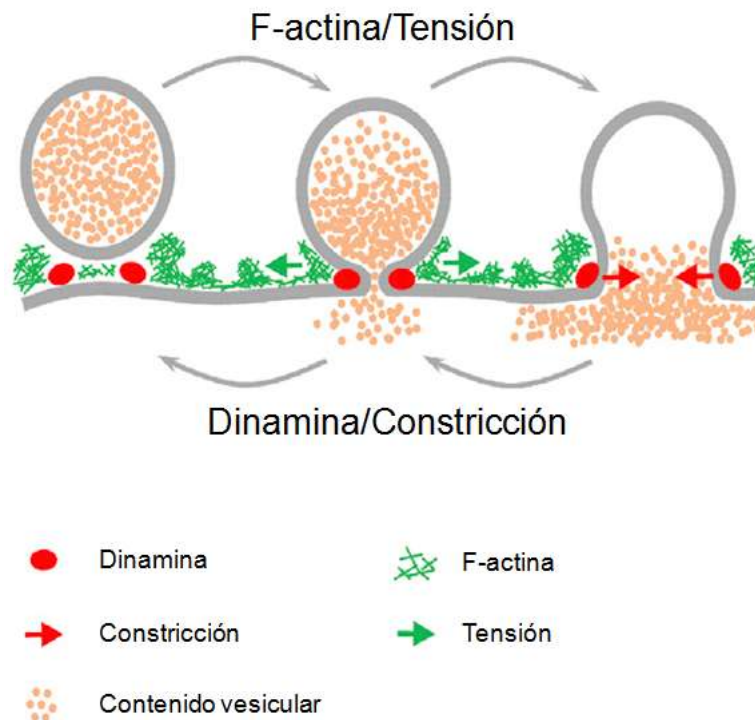


Figura 1.9- Representación esquemática de las proteínas y fuerzas involucradas en la fusión vesicular. La F-actina cortical polimerizada en la membrana plasmática alrededor de la vesícula secretora ejercería una fuerza de tensión que facilitaría la apertura del poro de fusión y liberación del contenido vesicular. Contrariamente, la dinamina polimerizada sobre el cuello vesicular, ejercería una fuerza de constricción, la cual favorecería el cierre del poro de fusión y posterior reinternalización de la vesícula. Figura tomada y modificada de Shin y col, 2018.

1.4 La cinética de la respuesta secretoria y los *pools* vesiculares

Desde su formación hasta su liberación, una vesícula secretoria debe pasar por muchas etapas. Comenzando con su biogénesis en el aparato de 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 de diferentes grados de maduración, que son cinéticamente diferenciables en cuanto a sus velocidades de liberación frente a un estímulo sostenido. 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 cinéticamente diferentes 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 anclado y la activación, el segundo es considerado como la manifestación cinética de un *pool* de reserva (RP) (en inglés, *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 de una mayoría de vesículas no ancladas a la membrana, y de una minoría de vesículas ancladas denominada UPP (del inglés, *unprime pool*, porque no ha experimentado aún *priming* o activación) (Ashery y col, 2000).

Mediciones de capacitancia con mayor resolución temporal permitieron luego 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) (en inglés, *ready releasable pool*), y otro más lento al que se denominó SRP (en inglés, *slowly releasable pool*), ambos con 120-150 vesículas aproximadamente (Voets y col, 1999; Becherer y col, 2006). Se planteó que estos dos *pools* podrían responder a diferentes sensores de Ca^{2+} (Voets y col, 2000; Voets y col, 2001a), aunque evidencias más recientes indican que en realidad SRP correspondería a un estado aún no liberable en forma directa, ya que debería completar una última etapa de activación, mientras que RRP sería el único grupo de vesículas totalmente maduro y listo para liberarse frente a la entrada de Ca^{2+} (Stevens y col, 2011). 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 1.10), donde las vesículas se movilizan desde *pools* río arriba hacia *pools* río abajo (Ashery y col, 2000).

La movilización vesicular desde RP hacia la membrana se encuentra íntimamente relacionada con la actividad del citoesqueleto (Trifaró y col, 2008). En particular, la red de F-actina cortical participa en una diversidad de acciones asociadas al proceso secretorio. En una primera instancia, a esta red se le atribuyó la función de barrera física entre las vesículas del RP y la membrana (Trifaro y col, 1985; Cheek y col, 1986; Aunis y col, 1988; Gutiérrez y Villanueva, 2018; Li y col, 2018). Estudios realizados en células cromafines mostraron que el aumento de Ca^{2+} citosólico (por ejemplo el inducido por un estímulo) activa la proteína de clivaje *scinderin* que desensambla la red de filamentos de F-actina, permitiendo que las vesículas secretorias alcancen la membrana plasmática (Trifaró y col, 2000; Dumitrescu-Pene y col, 2005; Wollman y Meyer, 2012; Olivares y col, 2014). Sin embargo, esta visión un tanto simplista se fue modificando a lo largo del tiempo, y hoy se sabe que la F-actina cortical no actúa solamente como una barrera, sino que también participa activamente en el tráfico de vesículas hasta la membrana plasmática, y como ya explicamos, de la expansión del poro de fusión (Gutierrez y

Villanueva, 2018; Li y col, 2018; Shin y col, 2018). Por lo tanto, la F-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). A su vez, la regulación de la translocación vesicular hacia RRP es regulada por varias proteínas, como la proteína quinasa C (PKC), (Gillis y col, 1996), la calmodulina (CaM) (Kibble y Burgoyne, 1996), Doc2b (Pinheiro y col, 2013), CAPS (Liu y col, 2008) y NCAM (Chan y col, 2005a). Respecto de PKC, trabajos realizados en cultivos de células cromafines bovinas aisladas revelaron que, la activación de esta quinasa, por medio del tratamiento con *phorbol-12-myristate-13-acetate* (PMA), promueve una disgregación reversible de los filamentos de actina cortical, lo cual favorece la translocación de vesículas desde *pools* de reserva hacia *pools* maduros, desde donde estas se liberan (Vitale y col, 1992a; Vitale y col, 1995).

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+} experimentan a tiempos cortos una concentración de Ca^{2+} mucho más alta que las vesículas distantes, cuando dichos canales son activados (Neher y col, 1998). Por lo tanto, las primeras se liberarían más rápidamente y eficientemente frente a un estímulo. 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 identifican dos componentes de exocitosis uno rápido y uno lento. La exocitosis del primero se completa en 25-100 ms, dependiendo del tipo de preparado. 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) (en inglés, *immediately releasable pool*) (Horrigan y Bookman, 1994; Voets y col, 1999). Este pequeño grupo, con aproximadamente 10-40 vesículas (hasta ~25% del RRP), posee una tasa de liberación 5 veces mayor que la del RRP (Voets y col,

1999) (Figura 1.10). Hoy en día existe un común acuerdo en que IRP es un grupo de vesículas molecularmente maduras y en condiciones de liberarse que se localizan en la proximidad de CCDVs. Estos conceptos se desarrollarán en los siguientes capítulos de esta Introducción.

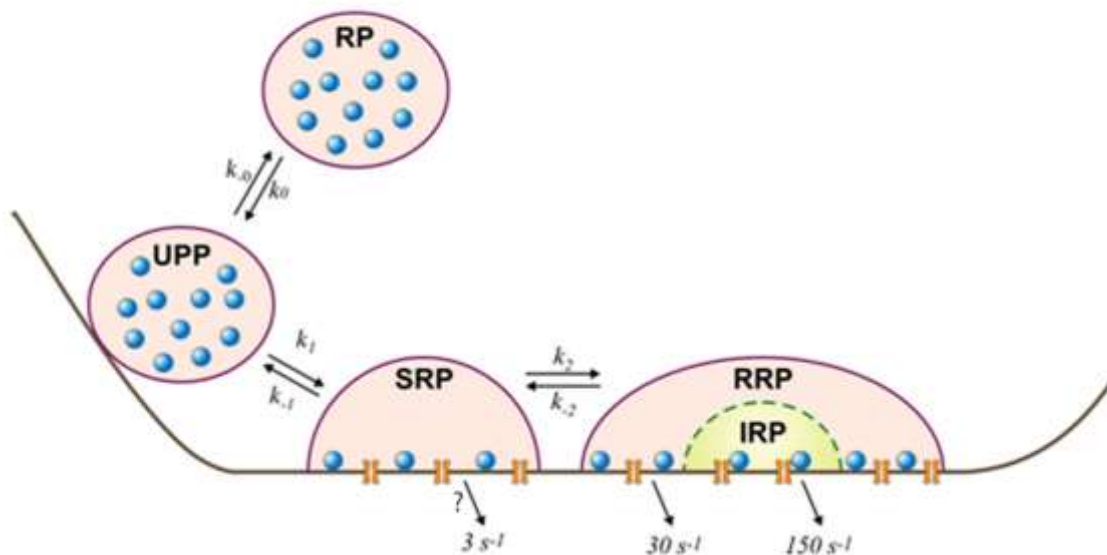


Figura 1.10 - Diagrama representativo de los diferentes *pools* de vesículas secretorias identificados en células cromafines. Estos *pools* se diferencian en su estado de maduración y/o su distribución espacial (ver texto). Graficado entre los diferentes *pools* vesiculares se muestran las constantes de velocidad teóricas (K_{-0} , K_0 , K_{-1} , K_1 , K_{-2} , K_2), por medio de las cuales se pueden estimar las velocidades de transición de las vesículas entre un *pool* y otro. Figura tomada y adaptada de Voets y col, 1999 y Ashery y col, 2000.

1.5 Acople entre canales de calcio y vesículas secretorias

Todos los subtipos de CCDV mencionados en la sub-subsección 1.2.1.1 pueden contribuir a la exocitosis de vesículas secretorias en células cromafines. Se demostró que frente a despolarizaciones largas (varios cientos de ms) 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+} globales 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), está 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 globales de Ca^{2+} celular (Monck y col, 1994; Neher y col, 1998). Por ejemplo, existen evidencias que sugieren que los canales de tipo R están altamente acoplados a la exocitosis en *slices* de médula adrenal en ratón (Albillos y col, 2000). Sin embargo, son más numerosos los antecedentes que muestran un alto acople entre los canales P/Q y la exocitosis en células cromafines (Lara y col, 1998; Aldea y col, 2002; Chan y col, 2005b). Esto es coherente con la colocalización observada entre la subunidad $\alpha 1A$ del canal de Ca^{2+} tipo P/Q y la proteína SNAP-25, y con la interacción, establecida por ensayos de co-inmunoprecipitación, de esta subunidad con los complejos SNARE (Andres-Mateos y col, 2005).

Distintos trabajos describen desde un punto de vista molecular la interacción entre tipos de canales y vesículas. En neuronas del sistema nervioso central se demostró que la subunidad $\alpha 1$ de los canales de calcio tipo N y P/Q posee una secuencia aminoacídica llamada *synprint* (del inglés, *synaptic protein interaction site*), que está ubicada en el *loop* intracelular entre los dominios II y III (Sheng y col, 1998) (Figura 1.11). 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).

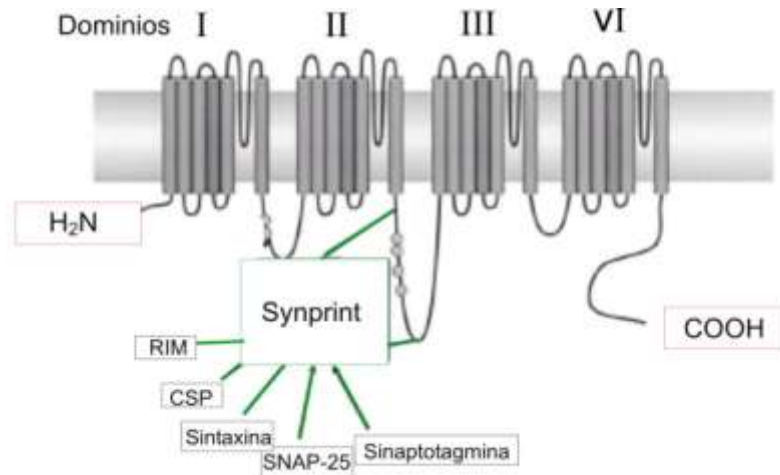


Figura 1.11- Sitio de interacción de proteínas sinápticas (*synprint*). Este sitio se ubica en el *loop* entre los dominios II – III de la subunidad α_{1A} del canal de Ca^{2+} de tipo P/Q o N. Se detallan las proteínas sinápticas que interactúan con *synprint*. Figura tomada y modificada de Zamponi, 2003.

Se postuló que la función de *synprint* es mantener una asociación física entre las vesículas sinápticas y los canales de Ca^{2+} , de modo de aumentar la eficiencia del proceso de acople estímulo-secreción en los terminales sinápticos. Por ejemplo, la ruptura de dicha asociación por 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

Frank Horrigan y Richard Bookman, trabajando en preparados de células cromafines aisladas de rata, propusieron por primera vez la existencia del IRP en células neuroendocrinas. Brevemente, la aplicación de despolarizaciones cortas reveló la existencia de un pequeño grupo de vesículas altamente acopladas al estímulo, que se excitaban 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 Bookman,

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 cultivos de células cromafines de ratón, se observó que la exocitosis de IRP se satura con pulsos de aproximadamente 50 ms, con una magnitud de exocitosis del rango de 20-35 fF y un valor de constante temporal de ~15 ms (Álvarez y col, 2008; Álvarez y col, 2013; Moya-Díaz y col, 2016). Dado que la capacitancia promedio de una vesícula secretoria en células cromafines de ratón es de 1,3 fF (Moser y col, 1997b), el tamaño de IRP sería aproximadamente de 15-27 vesículas secretorias.

Para explicar la alta eficiencia con que la corriente de Ca^{2+} dispara la exocitosis de IRP en comparación al resto de RRP, clásicamente se propuso que existe una colocación 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 estas vesículas se encontraba por azar cerca de estos canales. 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 abre la posibilidad de que un tipo particular de canal de Ca^{2+} se acople específicamente al IRP. En ese sentido, un trabajo publicado por nuestro laboratorio demostró, utilizando toxinas específicas de los diferentes tipos de canales y ratones KO de la subunidad $\alpha 1A$ del canal P/Q, un acople funcional entre el canal de Ca^{2+} tipo P/Q y el IRP (Álvarez y col, 2008, Álvarez y col, 2013, ver Figuras 1.12 y 1.13). Estos resultados muestran que la inhibición del canal P/Q por ω -agatoxina-IVA o su eliminación en el KO reducen fuertemente la exocitosis de IRP.

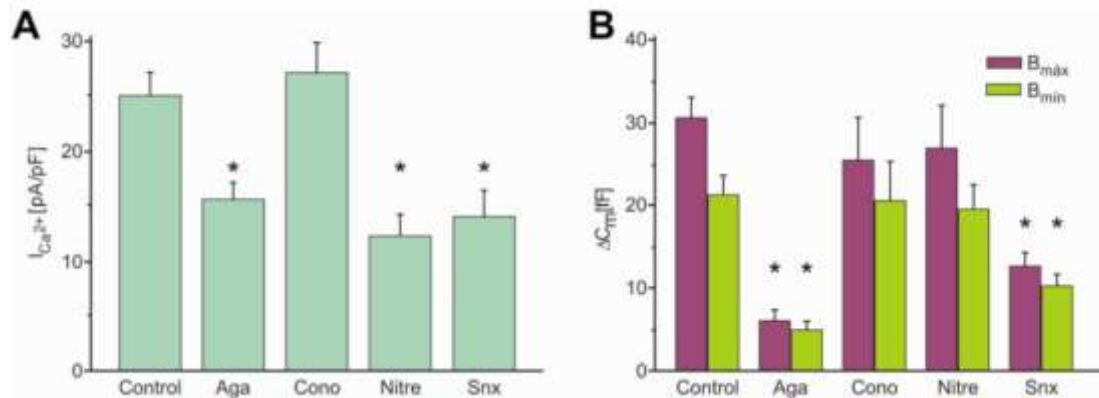


Figura 1.12 - Contribución de los distintos tipos de canales de Ca²⁺ a la liberación del IRP. Se muestran graficados los valores promedio (\pm ES) obtenidos de experimentos realizados en condiciones control y con bloqueantes de CCDV (L, P/Q, R y N). En **(A)** las barras representan las densidades de corriente de Ca²⁺ 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 GVIA, Cono), R (1 μ M de SNX-486, Snx) y P/Q (200 nM de ω -agatoxina-IVA, 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 un protocolo de pulsos pareados (2 despolarizaciones cuadradas de 10 ms separadas por 300 ms), que permite calcular una cota mínima (B_{\min}) y una máxima (B_{\max}) para el tamaño de IRP (Voets y col, 1999 y Álvarez y col, 2008). Mientras que con Nitre no se observaron cambios, y con Snx se inhibió moderadamente, en presencia de Aga el tamaño del IRP disminuyó dramáticamente respecto del control ($p < 0.002$). Datos de nuestro laboratorio y de otros autores sugieren que el efecto de SNX podría deberse a una acción cruzada de esta droga sobre los canales P/Q (Arroyo y col, 2003, Álvarez y col, 2008). Figura extraída y modificada de Álvarez y col, 2008.

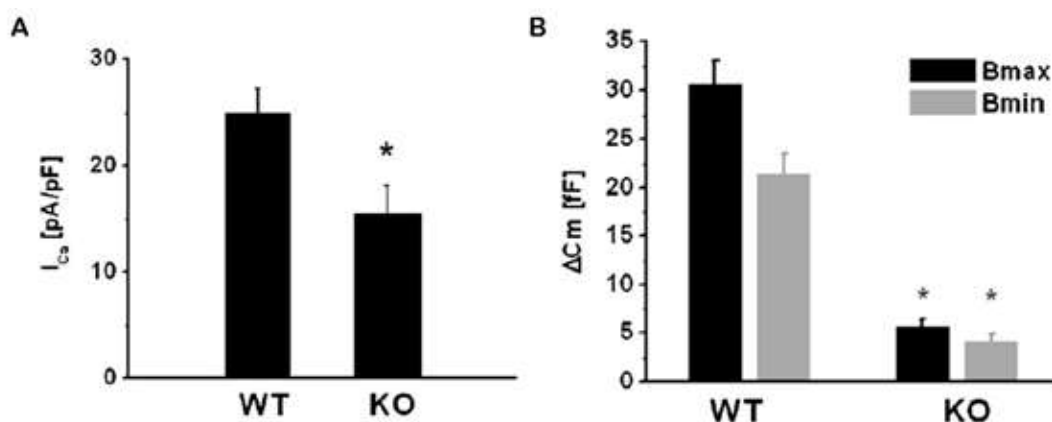


Figura 1.13 – Las vesículas de IRP se encuentran asociadas mayoritariamente a canales de tipo P/Q. Se muestran los valores promedio (\pm ES) obtenidos de experimentos realizados

en células cromafines de ratones KO para la subunidad α_{1A} y ratones WT. **(A)** Las barras representan las densidades de corriente. La densidad de las corrientes de Ca^{2+} fue levemente inferior en el modelo KO respecto del control ($p < 0.05$). **(B)** Las barras representan el tamaño del IRP estimado por el protocolo de pulsos pareados. La exocitosis del IRP resultó marcadamente inferior en los KO ($p < 0.001$). Figura extraída y modificada de Álvarez y col, 2008.

1.6.2 El acople de IRP y CCDV tipo P/Q es dependiente de *synprint*

Ha sido demostrado en neuronas, que la secuencia aminoacídica intracelular *synprint*, presente en las subunidades α_1 de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q y N, es fundamental para la interacción molecular entre estos canales con las proteínas de la maquinaria exocitótica (Catterall 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 1.14 A se muestran ejemplos representativos de mediciones de corrientes de Ca^{2+} y capacitancia 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 1.14 B se muestra un resumen de estos experimentos, donde se representan los resultados obtenidos en Syn^- , en controles transfectadas con *enhanced green fluorescence protein* (EGFP), en Syn^+ , y en Syn^+ con 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 exocitosis de 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^+ . 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.

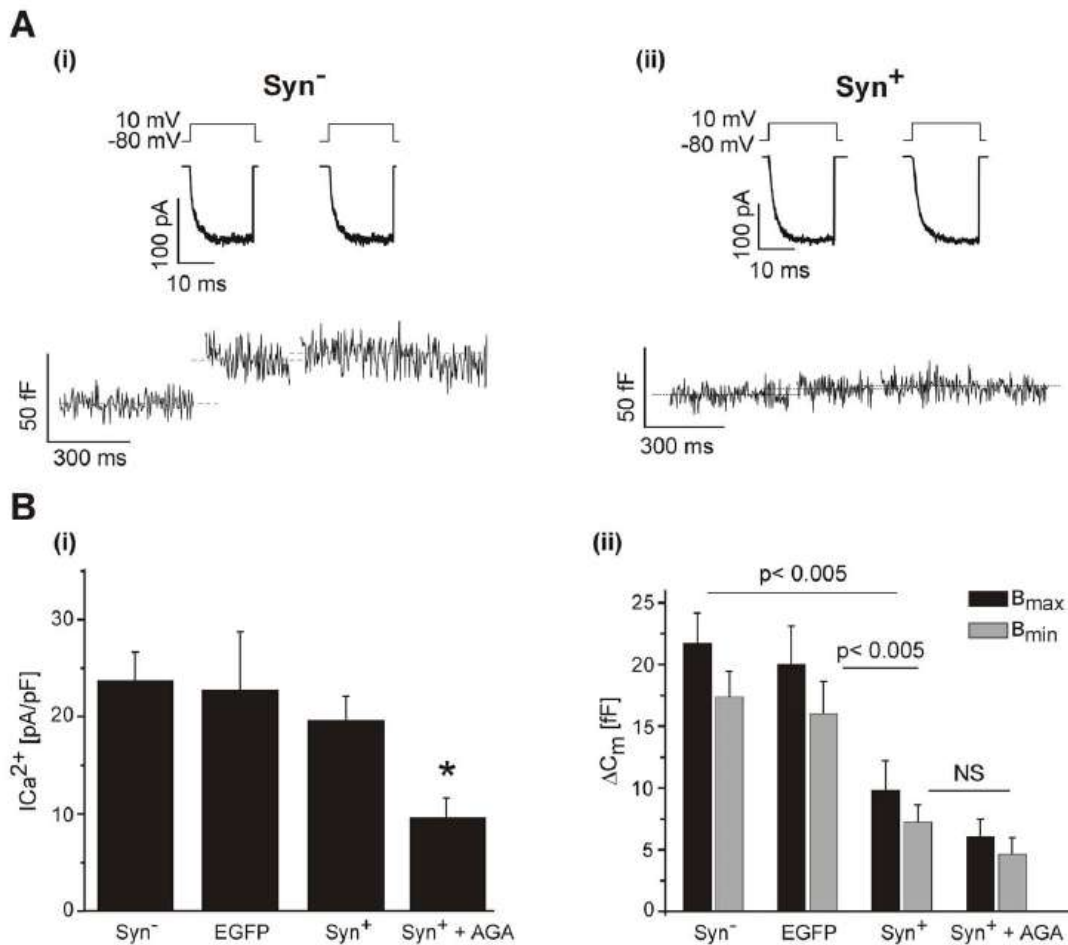


Figura 1.14 - Efecto de péptido *synprint* exógeno sobre la liberación del IRP. (A) Ejemplos de trazados de capacitancia y corrientes de Ca^{2+} frente al protocolo de doble pulso de 10 ms (300 ms de intervalo) en (i) Syn^{-} y (ii) Syn^{+} . (B) (i) Densidades de corrientes de Ca^{2+} obtenidas en tratamientos 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 corrientes de Ca^{2+} similares, la exocitosis del IRP en Syn^{+} disminuyó drásticamente respecto a los dos grupos controles. Figura extraída y modificada de Álvarez y col, 2013.

1.7 Endocitosis

La exocitosis de vesículas secretorias y sinápticas genera un aumento de superficie y una alteración en la composición lipoproteica de la membrana plasmática, y una depresión de los *pools* vesiculares. En consecuencia, es

fundamental que intervengan procesos que mantengan la homeostasis de estas variables y 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 la membrana plasmática es invaginada y, mediante la fisión de dichas invaginaciones, internalizada, formando vesículas, cisternas o vacuolas intracelulares (Royle y col, 2003; Wu y col, 2014a). Este proceso tiende a compensar a la membrana agregada por la exocitosis, retornando la superficie de membrana plasmática a sus niveles originales. La endocitosis también contribuye a mantener los niveles estacionarios de los *pools* de vesículas deprimidos durante la exocitosis, y también a restaurar la distribución de componentes lipoproteicos de las fracciones de membrana plasmática e intracelular. La endocitosis se ha clasificado de acuerdo a criterios mecanísticos, como también de acuerdo a un criterio cinético en endocitosis lenta y rápida (Cardenas y Marengo, 2016).

1.7.1 Endocitosis dependiente de clatrina

Inmediatamente después del colapso completo de la vesículas sinápticas o secretorias con la membrana plasmática, éstas se recuperan en otra región de la membrana por invaginación de vesículas recubiertas de clatrina (Smith y col, 2008). En el comienzo de este proceso intervienen distintas proteínas adaptadoras, entre ellas AP2, AP180 y *epsin* (Ferguson y De Camilli, 2012). El reclutamiento de estas proteínas en sitios de la membrana plasmática ricos en fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PI(4,5)P₂) favorece la curvatura de la membrana (Ferguson y De Camilli, 2012). Posteriormente, los monómeros de clatrina son reclutados, uniéndose a estas proteínas adaptadoras, y son luego ensamblados formando una cubierta fibrosa, promoviendo aún más la curvatura de membrana y su invaginación (Slepnev y col, 2000). Finalmente, el ensamblamiento de dímeros de dinamina, formando un collar o espiral alrededor del cuello de la vesícula en formación, termina por mediar la fisión (Takei y col, 2005). Las características estructurales y funcionales de la dinamina se detallarán más en profundidad en la subsección 1.7.6.

En general, se define a la endocitosis mediada por clatrina como un mecanismo compensatorio, es decir, que internaliza una cantidad de membrana equivalente a la previamente liberada (Smith y Neher, 1997; Engisch y Nowycky, 1998). Por medio de registros de capacitancia, estos autores demostraron en células cromafines bovinas que este proceso evoluciona monoexponencialmente con una constante de tiempo que se reduce con la entrada de Ca^{2+} , en un rango entre 20 y 5 segundos. Dicha aceleración sería preferentemente inducida por la entrada de Ca^{2+} por canales de tipo L (Rosa y col, 2011). Cinéticas similares para la endocitosis dependiente de clatrina fueron confirmadas en nuestro laboratorio en células cromafines de ratón (Tesis doctoral de Ana Verónica Belingheri, 2016), y en células β del páncreas y en neuronas por otros autores (He y col, 2008; Royle y col, 2010).

Es importante tener en cuenta que la regeneración de vesículas secretorias implica la reconstitución del núcleo proteico electrodenso formado por cromogranina y otras proteínas. Por lo tanto, en general se considera que luego de la endocitosis mediada por clatrina la recuperación de las vesículas secretorias es un proceso complejo y prolongado, que involucra su síntesis *de novo* en el sistema de Golgi (Maxfield y col, 2004; Houy y col, 2013).

1.7.2 Endocitosis en exceso y endocitosis tipo *bulk*

Luego de una estimulación muy fuerte, que genera exocitosis masiva, se dispara a menudo un proceso denominado endocitosis en exceso que internaliza una cantidad de membrana mayor a la adicionada por la exocitosis previa (Neher y col, 1993; Artalejo y col, 1995; Smith y col, 1997; Engisch y col, 1998). Este proceso, a diferencia de la endocitosis compensatoria, no sigue una relación continua con la entrada de Ca^{2+} , y por el contrario ocurre de una manera “todo o nada” luego de superar un umbral, que en nuestro laboratorio estimamos en 70 pC (Tesis doctoral de Ana Verónica Belingheri, 2016). Este modo de endocitosis evoluciona con un componente inicial mucho más rápido que el observado para la endocitosis compensatoria, y un segundo componente que es cinéticamente similar a la endocitosis compensatoria ($\tau_1 =$

300-700 ms; $\tau_2 = 5-7$ s) (Artalejo y col, 1995; Tesis doctoral de Ana Verónica Belingheri, 2016).

Respecto al reciclado de membrana post-endocítico, en nuestro laboratorio determinamos que la endocitosis en exceso es un fenómeno complejo, compuesto por un componente que recicla vesículas secretorias en un tiempo < 2 minutos, y otro componente asociado a la formación de lisosomas y que responde a las características de la llamada endocitosis de tipo *bulk* (Perez Bay y col, 2007; Perez Bay y col, 2012). La endocitosis de tipo *bulk* es un proceso por el cual se invaginan grandes porciones de membrana que forman vacuolas o cisternas, y que se dispara en respuesta a exocitosis muy masivas que pueden poner en riesgo la viabilidad celular (Betz y col, 1992). Sería un mecanismo de control homeostático que intenta mantener la superficie 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).

1.7.3 Endocitosis rápida asociada al *kiss and run*

Tal como se describió en la sección 1.3, el proceso de *kiss and run* consiste en la formación del poro de fusión, la liberación parcial del contenido vesicular y el posterior cierre del poro y re-internalización de la vesícula intacta *in situ*. Este proceso fue propuesto por primera vez en 1973 por el grupo de Bruno 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 peroxidasa de rabanita, 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 fracciones segundo) y predomina a bajas concentraciones de Ca^{2+} y/o bajo la aplicación de potenciales de acción a bajas frecuencias (Chan y Smith, 2001; Elhamdani y col, 2006a; Wu y col, 2016). En la Figura 1.15 se esquematizan todos los tipos de endocitosis tratados hasta el momento, donde también se detalla los tipos de reciclados vesiculares y los movimientos que sufren dichas vesículas post-internalización.

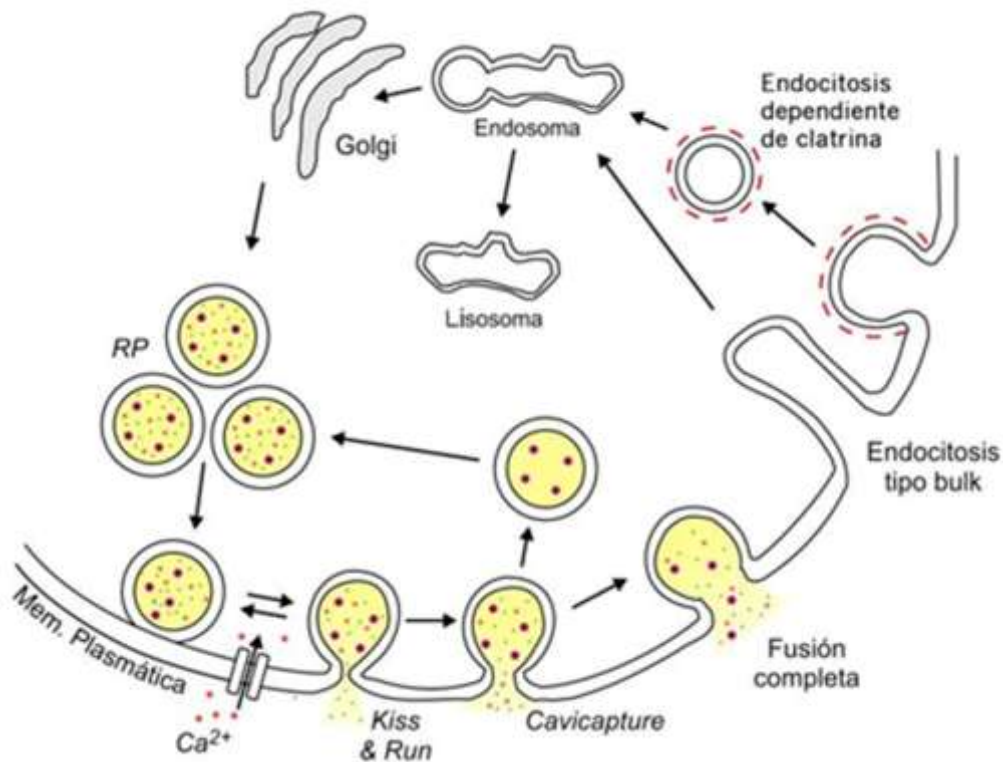


Figura 1.15 - Tipos de endocitosis y ciclado vesicular. Las vesículas del *pool* de reserva (RP) son translocadas a la membrana, activadas y fusionadas en respuesta a la entrada de Ca^{2+} , en modo *kiss and run* (o *cavcapture*) o fusión completa. La *cavcapture* sería un mecanismo similar al *kiss and run*, pero que implica un poro más grande y con mayor permeabilidad, que permite la liberación de compuestos de mayor tamaño, como péptidos (Perrais y col, 2004). En el primer caso, la vesícula se recupera intacta in situ. En el último caso, la membrana se re-internaliza por la vía dependiente de clatrina o 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 conjuntamente con las cisternas producidas por endocitosis tipo *bulk* son movilizadas hacia endosomas y luego al Golgi. La endocitosis de tipo *bulk* está también asociada a la formación de lisosomas. Imagen extraída y modificada de Cárdenas y Marengo, 2010.

1.7.4 Endocitosis asociada a un potencial de acción

En nuestro y otros laboratorios (Chan y col, 2001; Moya-Díaz y col, 2016; Montenegro y col, 2020) se ha descrito una endocitosis muy rápida (constantes temporales < 1 s) que se desarrolla en respuesta a potenciales de acción individuales o aplicados a bajas frecuencias. En base a sus características cinéticas y a los estímulos que la disparan, sería posible asociarla al mecanismo de ***kiss and run***. Sin embargo, su mecanismo no está aún establecido. Esta endocitosis, que será descrita en mayor detalle en la sección 1.8 de esta Introducción (subsección 1.8.1, endocitosis y cinética de recuperación asociadas a IRP), está fuertemente ligada a un proceso de recuperación muy rápido de vesículas secretorias (Moya-Díaz y col, 2016).

1.7.5 Endocitosis Ultra-Rápida

Se ha descrito en terminales nerviosas de hipocampo un mecanismo muy rápido de endocitosis (comúnmente llamada *Ultra-Fast endocytosis*, en inglés), 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 1.16) (Watanabe y col, 2013). Este mecanismo es dependiente de F-actina 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).

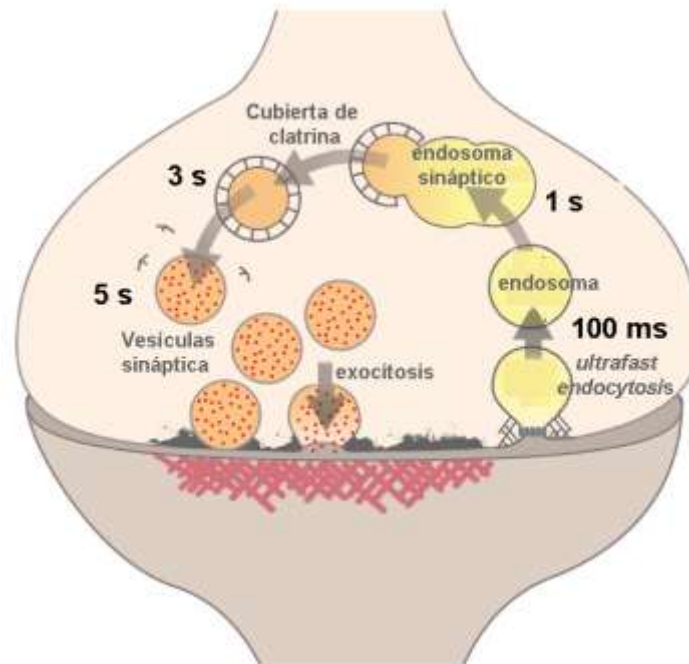


Figura 1.16 – La endocitosis ultra-rápida (*ultrafast endocytosis*) permite la regeneración de vesículas sinápticas en un proceso de dos pasos. Primero, la membrana añadida por fusión en la zona activa, se re-internaliza en el borde lateral de dicha zona a través de la endocitosis ultra-rápida formando endosomas. Luego, los endosomas forman vesículas sinápticas mediante un proceso dependiente de clatrina. Las vesículas sinápticas recién formadas pueden ser reclutadas de vuelta a la zona activa. Imagen extraída y modificada de Watanabe y col, 2014.

1.7.6 Dinamina y endocitosis

1.7.6.1 Estructura y función de la dinamina

Está sólidamente establecido que el desprendimiento de las vesículas recubiertas de clatrina de la membrana plasmática requiere de la GTPasa dinamina. El análisis del mutante de *Drosophila shibire*, que codifica un alelo de dinamina sensible a la temperatura, proporcionó la primera evidencia de la importancia central de la dinamina en la endocitosis. A temperaturas de 20°C las moscas mutantes son normales, pero a T° de 30°C se paralizan (*shibire*, significa paralizado en japonés), debido a que se bloquea la internalización de las invaginaciones cubiertas de clatrina, y se interrumpe el reciclado de vesículas sinápticas (Van der Bliet y col, 1991). Estudios subsecuentes, revelaron la formación de invaginaciones estables en las terminales pre-

sinápticas de la membrana luego de la exposición de las células a GTP γ S, un análogo no hidrolizable de GTP (Takei y col, 1995). Investigaciones posteriores en células no-neuronales mostraron que la dinamina es un componente normal de las invaginaciones que se encuentran revestidas por clatrina, y que su actividad GTPasa es importante para la endocitosis: experimentos en donde se expresaron mutantes de dinamina con un sitio de unión a GTP alterado (comúnmente conocido como el mutante K44A) presentaron efectos negativos sobre la endocitosis (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 clatrina-dependiente. La dinamina se polimeriza alrededor del cuello vesicular, y provee la energía mecánica necesaria para completar la fisión. Además, hay fuertes indicios de que la dinamina, también polimerizada alrededor del cuello, estabiliza el poro de fusión durante el *kiss and run*, y completa luego la fisión en este mecanismo exo-endocítico (González-Jamett y col, 2010). Finalmente, la información respecto a la participación de dinamina en la endocitosis tipo *bulk* es contradictoria, mientras algunos autores han encontrado evidencias sobre su participación (Gormal y col, 2015), otros han propuesto lo contrario (Hayashi y col, 2008).

En mamíferos se han identificado tres isoformas de dinamina. La dinamina-1, que se localiza específicamente en el tejido neuronal, la dinamina-2, que se expresa ubicuamente y la dinamina-3, que se expresa en el tejido testicular (Arriagada-Díaz y col, 2020). En células cromafines se describió la expresión de las isoformas 1 y 2, y se asoció a cada una de ellas con la regulación de diferentes tipos de endocitosis. Cristina Artalejo y colaboradores reportaron que la isoforma-1 de la dinamina se asociaba a un tipo de endocitosis rápida, mientras que la isoforma-2 se asociaba a endocitosis clatrina dependiente con cinética más lenta (Artalejo y col, 2002). Sin embargo, posteriormente González-Jamett y colaboradores (González-Jamett y col, 2013a) han descrito en cromafines bovinas, mediante experimentos de RT-PCR y *western blot*, que la isoforma 2 es mucho más predominante en estos preparados que la isoforma 1.

La dinamina es una proteína compuesta por 5 dominios: un dominio GTPasa N-terminal, un dominio intermedio, un dominio homólogo a plectrinas (PH), un dominio efector de la GTPasa (GED) y un dominio C-terminal (PRD) rico en prolinas y argininas (Ramachandran y col, 2007; Ferguson y De Camilli, 2012) (Figura 1.17). A continuación se expondrán las principales características y/o funciones asociadas a cada uno de estos dominios.

Dominio GTPasa: el dominio GTPasa o “dominio G” es el dominio más conservado de la dinamina. Estructuralmente se compone de 8 motivos hojas- β , unidas 9 motivos α -hélices, que rodean a las primeras. A grandes rasgos se pueden identificar tres grandes regiones en este dominio, la primera comprende la primera región “BSE” (del inglés *bundle signalling element*) que es la encargada de la unión a nucleótidos, luego se encuentra la región efectora de la actividad GTPasa, y finalmente otra región BSE que junto a un tercer BSE, en el dominio medio, forman un cuello flexible encargado de transmitir cambios conformacionales entre el dominio G y el resto de la proteína (ver Figura 1.17.a) (Chappie y col, 2009). En relación con otras proteínas GTPasas monoméricas, la dinamina presenta una alta actividad GTPasa ($1-20 \text{ min}^{-1}$) y una baja afinidad por el GTP ($10-100 \mu\text{M}$) (Warnock y Schmid, 1996). Sin embargo, en circunstancias que favorezcan la formación de oligómeros de dinamina, la actividad GTPasa puede aumentar hasta 15 veces sobre su valor basal (Tuma y Collins 1994; Warnock y col, 1995). La activación de este dominio ocurre cuando el dominio C-terminal, o mejor conocido como el dominio rico en prolinas (PRD), se une a los dominios SH₃ de distintos componentes celulares, tales como microtubulos, factores de crecimiento y proteínas de la maquinaria endocitótica (Warnock y Schmid, 1996). Por ello, se cree que el dominio PRD es un regulador positivo de la polimerización de la dinamina. Finalmente, es importante destacar que la actividad GTPasa de este dominio varía entre las isoformas 1 y 2 de esta proteína, siendo la dinamina 2 con mayor actividad intrínseca de la dos (3 a 10 veces mayor) (Warnock y col, 1997).

Dominio Medio: el dominio intermedio de la dinamina se divide en dos mitades bien diferenciadas, la mitad N-terminal y la mitad C-terminal (Warnock y col, 1996). La mitad N-terminal de este dominio se conoce comúnmente

como “tallos” (o en inglés, *stalk*), estructuralmente compuestos por 3 motivos *coiled-coil* bien definidos, y el cual está asociado al ensamblaje de monómeros de dinamina (ver Figura 1.17.a) (Smirnova y col, 1999). En cambio de la mitad C-terminal no se ha identificado aun su función biológica precisa, sin embargo, se cree que por su proximidad al dominio PH esta función podría estar relacionada con la formación del bolsillo de unión a lípidos. El dominio medio cumple una función vital en la polimerización de la dinamina en el proceso de fisión de membrana. La polimerización comienza por la interacción lado a lado de los tallos de cada monómero (interacción conocida como “Interfase 2”), lo cual permite la formación de dímeros de dinamina. Luego la interacción lado a lado de estos dímeros (interacción conocida como “Interfase 1 y 3”), permite la elongación temprana del polímero de dinamina alrededor de la membrana. Cuando los dominios G de los dímeros ubicados en distintos peldaños de este polímero interactúan entre sí, se produce lo que comúnmente se denomina auto-ensamblado de la dinamina dependiente de la actividad GTPasa. Este fenómeno, el cual es dependiente de GTP, acelera la elongación del polímero de dinamina y provee la fuerza mecánica para la constricción de la membrana y posterior escisión (ver Figura 1.17, paneles b, c y d). Un ejemplo tal de estos polímeros es la característica hélice de dinamina formada alrededor del cuello vesicular.

Dominio homólogo a plectrinas (PH): el dominio PH se compone estructuralmente de 8 motivos hojas- β unidas entre sí, en una disposición de “sándwich”. Además posee 3 *loops* variables cargados positivamente y una región C-terminal, cargada negativamente, compuesta por un motivo α -hélice (Ferguson y col, 1994). Este dominio tiene como función la unión de la dinamina a fosfatidilinosítoles, específicamente a PI(4,5)P₂, lo cual permite la inserción de la dinamina en la membrana de la vesícula en formación, la activación de la actividad GTPasa, y la finalización de la endocitosis (Ferguson y De Camilli, 2012).

Dominio efector de la GTPasa (GED): el dominio GED compuesto principalmente por motivos *coiled-coil* (Lupas y col, 1991; Okamoto y col, 1999b), es el encargado de promover la actividad GTPasa al interactuar con el dominio GTPasa N-terminal. Esta interacción, se realiza a través del tallo del

GED (tallo diferente al del dominio medio), y es necesaria para que el dominio GTPasa sea activo (ver Figura 1.17.a) (Muhlberg y col, 1997; Smirnova y col, 1999). La necesidad de esta interacción se ha demostrado en experimentos donde el agregado aislado del dominio GED a monómeros de dinamina (con su GED mutado), estimularon la actividad GTPasa de estos monómeros casi 50 veces por sobre su tasa basal (Sever y col, 1999).

Dominio rico en prolinas (PRD): el dominio PRD o C-terminal de la dinamina está compuesto principalmente por aminoácidos prolina y residuos básicos, y se caracteriza por su capacidad de unión a proteínas que contienen el dominio SH₃, entre ellas la anfifisina (Hinshaw, 2000). Esta interacción es necesaria para que la dinamina se reclute a la membrana de la vesícula en formación, y por lo tanto se complete la endocitosis mediada por clatrina. La microinyección del dominio SH₃ de anfifisina, o de péptidos de dinamina que contenían el dominio de unión a SH₃, bloquearon la endocitosis e incrementaron la densidad de *coated pits* revestidos de clatrina en las terminales sinápticas (David y col, 1996). Por otra parte, estudios desarrollados en células cromafines demostraron que la unión del dominio PRD de dinamina a los dominios SH₃ de las proteínas anfifisina, encefalina, intersectina y α -adaptina estaban asociados a procesos endocíticos lentos dependientes de dinamina-2 y clatrina (Elhamdani y col, 2006b).

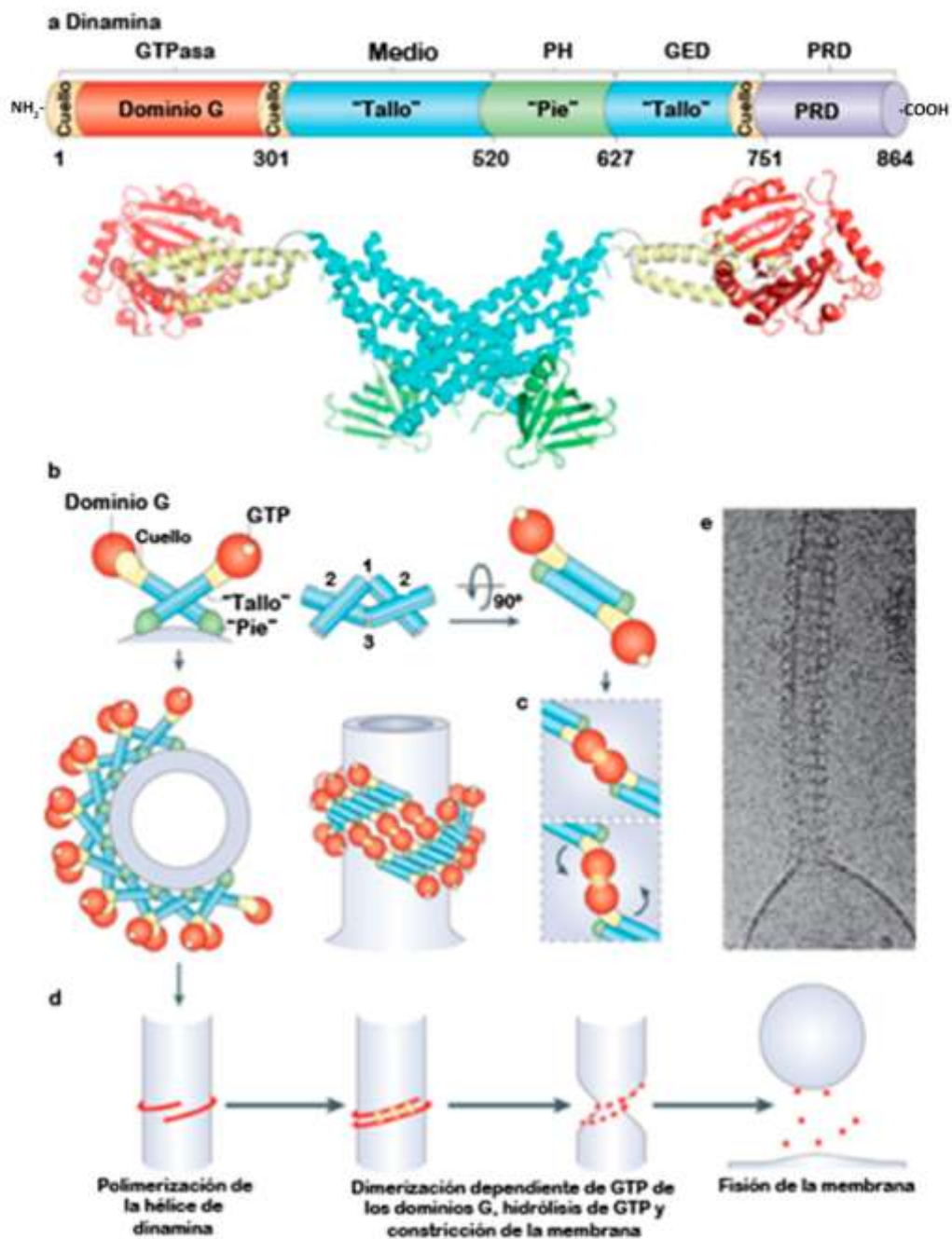


Figura 1.17 - Estructura molecular de la dinamina y mecanismo de fisión de membrana.

(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 dinamina). 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 remarcada en amarillo. La polimerización de la dinamina ocurre

como resultado de la interacción entre los “tallos” de monómeros de dinamina (interfase 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. Imagen extraída y modificada de Ferguson y De Camilli, 2012.

1.7.6.2 Importancia de la dinamina y patologías asociadas

Como hemos visto en la sub-subsección anterior (1.7.6.1), de las tres isoformas de la GTPasa dinamina, las isoformas 1 y 2 se encuentran expresadas en el sistema nervioso y de forma ubicua, respectivamente. Estas dos variantes de dinamina han sido descritas clásicamente en el rol de fisión de membranas durante la endocitosis mediada por clatrina de vesículas sinápticas y secretorias. Adicionalmente a este rol, las funciones de la dinamina se han extendido a otros procesos celulares tales como, la internalización dependiente de caveolina (Henley y col, 1998), formación de vesículas en membranas del Golgi (Jones y col, 1998) y de endosomas (Nicoziani y col, 2000), regulación de la estabilidad en microtúbulos (Thompson y col, 2004), dinámica del citoesqueleto de actina (Mooren y col, 2009; Gu y col, 2010) y regulación del poro de fusión (De la Vega y col, 2011; Reid y col, 2012).

Es interesante que a diferencia de la dinamina-1, la cual se localiza preferentemente en terminales pre-sinápticas (Powell y Robinson, 1995), la dinamina-2 se expresa tanto en terminales pre-sinápticas como post-sinápticas (Okamoto y col, 2001; Tanifuji y col, 2013), participando activamente del reciclado vesicular como de la internalización de receptores de membrana (Carroll y col, 1999; Kabbani y col, 2004). Estas y otras evidencias, apoyan la idea de que la dinamina-2 juega un rol más abarcativo que la dinamina-1 en el proceso de transmisión sináptica. Dentro de la misma lógica, se ha observado que mutaciones puntuales de la dinamina-2 están asociadas a importantes alteraciones de la función del músculo esquelético (Chin y col, 2015; Muñoz y

col, 2020). Respecto a esto, durante la última década se han descrito más de 20 mutaciones en el gen que codifica para la isoforma de dinamina-2, ligadas a dos desordenes hereditarios autosómicos dominantes: la neuropatía de Charcot-Marie-Tooth (CMT) y la miopatía centronuclear (MCN). Ambos trastornos se caracterizan por mostrar un cuadro clínico compatible con una debilidad progresiva y atrofia en los músculos esqueléticos, pero al mismo tiempo difieren en los patrones histológicos y electromiográficos. Mientras CMT es una enfermedad demielinizante que afecta los nervios periféricos (Tanabe y Takei, 2012), MCN afecta directamente a los músculos esqueléticos, y se caracteriza por una localización anormal del núcleo celular en las fibras musculares (Jeannet y col, 2004).

La mayoría de las mutaciones en la dinamina-2, que están asociadas a un cuadro de CMT, se localizan en la región denominada “bolsillo de unión a lípidos” ubicada en el dominio PH (Bohm y col, 2012) (ver Figura 1.18), el cual está involucrado en la unión de la dinamina a lípidos de membrana (Ramachandran y col, 2009; Bethoney y col, 2009). Congruentemente, estas proteínas mutantes se unen deficientemente a membranas (Kenniston y Lemmon, 2010), y afectan críticamente al proceso de endocitosis mediado por clatrina (Sidiropulos y col, 2012). Por otro lado, las mutaciones de dinamina-2 que se asocian con la MCN toman lugar en varias regiones de la dinamina (dominios PH, Medio, GED, y el cuello de unión entre PH y GED) (Bohm y col, 2012) (ver Figura 1.18). Se ha visto que estas alteraciones confieren a estas mutantes actividades GTPasa y de fisión muy aumentadas respecto de la isoforma de dinamina-2 *wild type* (Kenniston y Lemmon, 2010; Wang y col, 2010). En particular, este aumento en la actividad GTPasa, sería consecuencia de la facilidad que tienen estas mutaciones en formar grandes agregados proteicos. Por ejemplo, experimentos *in vitro* revelaron que las mutantes A618T y S619L forman grandes oligómeros en solución cuando se las incubaba en presencia de lípidos o a temperaturas fisiológicas, respectivamente (Kenniston y Lemmon, 2010; Wang y col, 2010). Por otro lado, se ha visto que las mutantes R369W y R465W forman grandes agregados citoplasmáticos en líneas celulares musculares y de riñón de primates no humanos, respectivamente (James y col, 2014; Gonzalez-Jamett y col, 2017).

Estudios realizados en ratones, donde se indujo a la mutante R465W, mostraron anomalías histológicas en las fibras constituyentes de los tejidos musculares, así como también una atrofia generalizada que impedía a los animales ejercer sus actividades motoras con normalidad (Durieux y col, 2010). Complementariamente, otros autores han visto que la presencia de las mutantes A618T y S619L en células musculares, desencadenaría una fragmentación del Túbulo T ubicado en el sarcolema, lo cual impediría la correcta contracción y relajación del músculo esquelético (Chin y col, 2015). Trabajos posteriores mostraron que estos efectos podrían estar relacionados con un desequilibrio en la dinámica del citoesqueleto de actina producto de la hiperactividad de estas mutaciones (Gonzalez-Jamett y col, 2017; Lin y col, 2020). Sin embargo, a pesar de estas evidencias, y a diferencia del cuadro CMT, aun no se ha elucidado de manera convincente cual es el efecto a nivel celular que provoca el cuadro patológico asociado a la MCN.

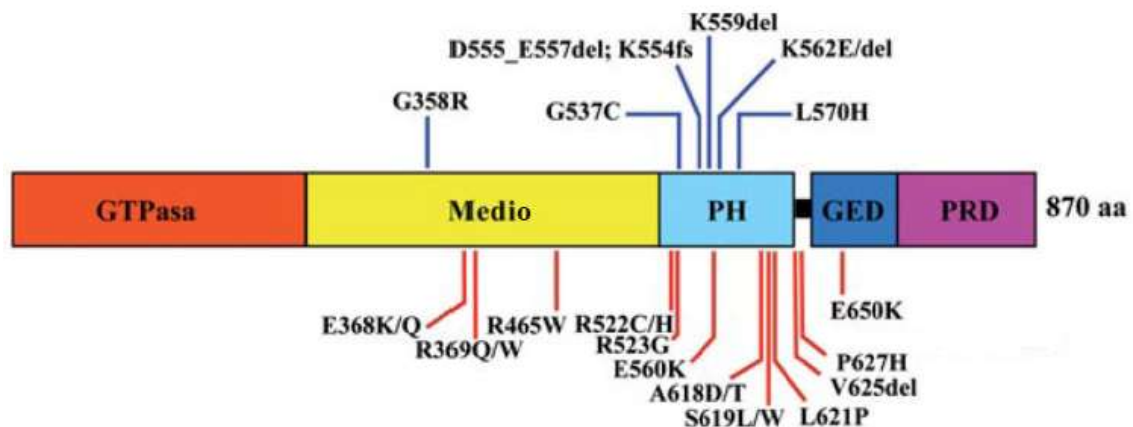


Figura 1.18- Esquema de la estructura de la GTPasa dinamina donde se indican los potenciales sitios mutagénicos que pueden desarrollar CMT o MCN. Las mutaciones indicadas con flechas azules son aquellas asociadas con un cuadro clínico de Charcot-Marie-Tooth. Notar que la gran mayoría se centra sobre el dominio PH de la dinamina. Por otro lado, aquellas mutaciones señaladas con flechas rojas son las relacionadas con el desarrollo de la miopatía centronuclear. Estas últimas son más abundantes que las primeras y pueden localizarse en los dominios Medio, PH y GED, así como también en la unión entre PH y GED. Figura tomada y adaptada de Bohm y col, 2012.

1.7.7 Dependencia de la endocitosis con el calcio

Uno de los principales factores que regula la endocitosis es el Ca^{2+} , aunque su rol es muy controvertido. En general, podemos decir que la mayor parte de la literatura sostiene que el Ca^{2+} citosólico acelera la endocitosis. Estudios desarrollados en células cromafines demostraron que la endocitosis 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 potenciales de acción 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). La endocitosis mediada por clatrina es acelerada por Ca^{2+} (Wu y col, 2016) por medio de la activación de la fosfatasa calcineurina, la cual a su vez se encarga de la activación de la dinamina citoplasmática (Marks y McMahon, 1998). La dinamina, al ser desfosforilada por la calcineurina, migra a membrana para participar del paso final de este tipo de endocitosis (McMahon y Boucrot, 2011).

Sin embargo, existen varias evidencias que indican que la presencia de Ca^{2+} puede retardar ciertos tipos de endocitosis. 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 en estas observaciones aparentemente contradictorias, describió que bajo ciertas circunstancias el Ca^{2+} puede resultar excitatorio para la endocitosis y bajo otras circunstancias, 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 col., 2014b).

En células cromafines se describió un comportamiento bifásico de la endocitosis dependiente de la frecuencia de potenciales de acción (PAs) aplicada. Se ha demostrado que en respuesta a la aplicación de PAs se pueden activar dos mecanismos de endocitosis independientes, y que la manifestación de uno u otro depende de la frecuencia de PAs aplicados. En ese sentido, se reportó que la estimulación con PAs aislados o a frecuencias próximas a la actividad basal (entre 0,2 y 0,5 Hz) induce una rápida y robusta internalización de la membrana plasmática, la cual es clatrina independiente, dinamina dependiente, y posee constantes de tiempo menores a 1 s (Chan y col, 2001; Chan y col, 2003b; Moya-Díaz y col, 2016). 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 ($K_{act} = 1,46 \mu\text{M}$), y está asociado a la acción de la fosfatasa calcineurina (Chan y col, 2001; Chan y col, 2003b). 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 más lentas, asociadas a fusiones vesiculares completas, y supuestamente clatrina dependientes (Elhamdani y col., 2006b).

1.8 Reciclado y recuperación de las vesículas secretorias

La exocitosis provoca la depresión de los *pools* vesiculares, secuencialmente y en un orden acorde a su grado de maduración y probabilidad de liberación. En las células cromafines, a medida que aumenta la magnitud del estímulo, y por lo tanto de la exocitosis, se deprime primero el IRP, luego el RRP, el SRP y finalmente el RP (Voets y col, 1999; Marengo, 2005; Moya-Díaz y col, 2016). El mantenimiento de la secreción a lo largo del tiempo depende de varios procesos asociados al reciclado y la consecuente recuperación de estos *pools* vesiculares. Entre estos procesos intervienen diferentes formas de endocitosis, el reciclado *in situ* al estilo el *kiss and run*, el tráfico post-endocítico a través de endosomas, la generación de las vesículas secretorias en el aparato de Golgi, y varias etapas de maduración vesicular tales como el tráfico de vesículas a través del citoesqueleto, el *docking* a la membrana y las distintas etapas de *priming* (ver secciones 1.3 y 1.4 de esta Introducción).

Cuando se deprimen grandes *pools* vesiculares, e incluso el RRP, predominan mecanismos de traslocación vesicular desde el RP (Voets y col, 1999), lo cual implica también la regeneración de vesículas desde Golgi (Maxfield y col, 2004). Sin embargo, una estimulación de baja intensidad puede promover el *kiss and run*, y por lo tanto el reciclado de vesículas *in situ*. 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 esta dirección. La aplicación de frecuencias basales de potenciales de acción (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).

A continuación nos concentraremos en los mecanismos de recuperación asociados al *pool* vesicular que más nos atañe en esta Tesis, el IRP.

1.8.1 Endocitosis y Cinética de recuperación asociadas a IRP

Debido a que IRP es un grupo de vesículas altamente acoplado a CCDVs y capaz de exocitarse en respuesta a estímulos breves aplicados en forma aislada, se postuló que podría ser el responsable de mantener la exocitosis a frecuencias basales de potenciales de acción (Olivos-Oré y Artalejo, 2004; Cárdenas y Marengo, 2016; Moya-Díaz y col, 2016). En el reposo, las células cromafines disparan potenciales de acción a frecuencias muy bajas (0,2-1 Hz), por lo que 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 serían exocitadas las vesículas próximas a estos, la cual es justamente la característica que define a IRP. Sin embargo, para que IRP sea capaz de participar de manera sostenible en el reposo debería poder recuperarse, luego de ser deprimido, a una velocidad compatible con las frecuencias basales de las células cromafines.

Para responder a esta pregunta, en nuestro laboratorio se estudió la cinética de recuperación del IRP luego de su depresión. Se utilizó 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 de voltaje de 50 ms, y luego de un período de 2-40 s, se aplicó un segundo pulso idéntico para evaluar la recuperación de este *pool* (Figura 1.19.Ai). Para entender esto es importante recordar que un pulso cuadrado de 50 ms excita IRP en forma aproximadamente completa (ver sección 1.6 de esta Introducción). Luego de un intervalo de 5 segundos, sólo una pequeña fracción de IRP fue recuperado, mientras que 20 segundos fueron suficientes para recuperar casi completamente la exocitosis de este *pool* de vesículas (paneles Aii y Aiii). La Figura 1.19.B muestra los promedios del parámetro de recuperación R en función del tiempo entre pulsos, los cuales se ajustaron a una función de crecimiento monoexponencial, obteniendo una constante de tiempo τ de $7,5 \pm 1,1$ s. 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, 1997a; 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.

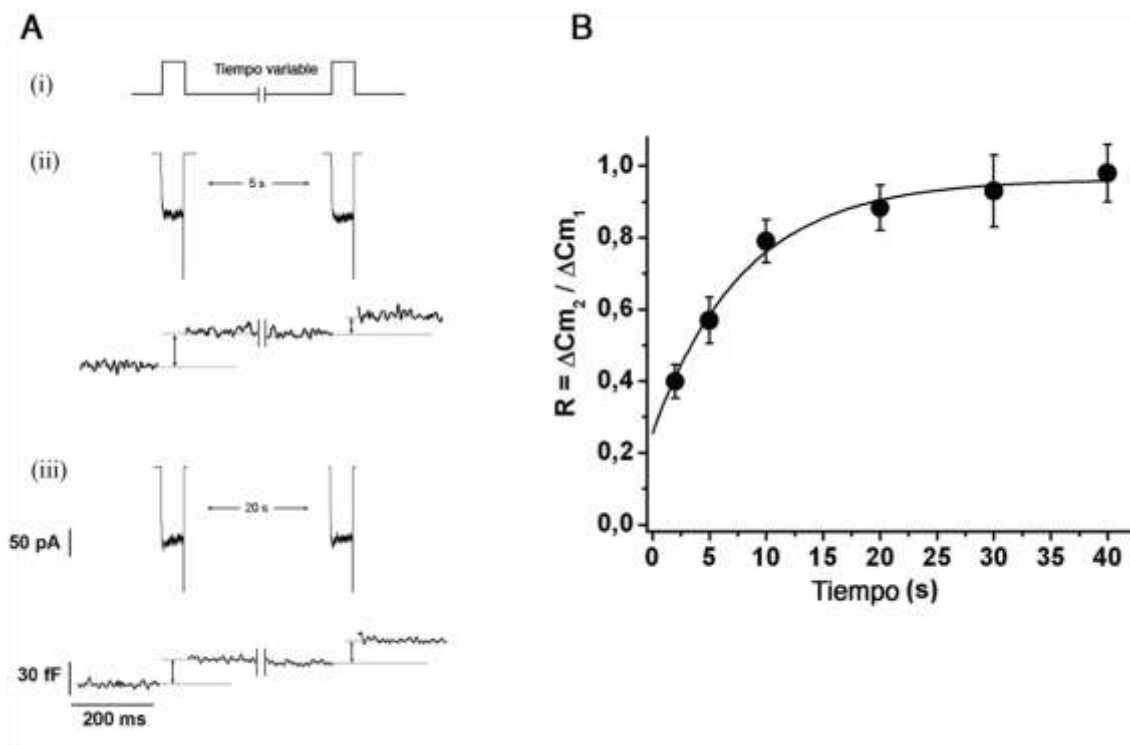


Figura 1.19 - Recuperación del IRP luego de su depresión. (A) (i) Esquema del protocolo de estimulación. Con el objetivo de determinar la cinética de recuperación del IRP, se aplicó un protocolo de pulsos de voltaje cuadrados de 50 ms (-80 mV a 10 mV) en forma pareada, con intervalos de tiempo variable entre ellos. **(ii y iii)** Corrientes de Ca²⁺ (arriba) y cambios de capacitancia celular (abajo) obtenidos en experimentos típicos con intervalos de tiempo de 5 y 20 segundos entre pulsos, respectivamente. **(B)** La recuperación relativa de IRP luego de su depresión (expresada como $R = \Delta C_{m2} / \Delta C_{m1}$) donde ΔC_{m1} y ΔC_{m2} representan los cambios de capacitancia inducidos por el primer y el segundo pulso despolarizante, respectivamente. Los puntos representan los promedios obtenidos de varios experimentos, y se ajustaron a una función de la forma $R = R_0 + A(1 - e^{-t/\tau})$. Los datos están expresados como valores promedios \pm ES. Figura tomada y modificada de Moya-Díaz y col, 2016.

Si consideramos que la frecuencia basal de potenciales de acción en la célula cromafín 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. Esto plantea la paradoja de que IRP sería un grupo de vesículas asociado a una exocitosis altamente eficiente y veloz, pero que no sería capaz de participar en la secreción a frecuencias fisiológicas, ya que estaría permanentemente deprimido.

Sin embargo, debemos tener en cuenta que los estímulos naturales de las células cromafines son los potenciales de acción. Por lo tanto, en nuestro laboratorio se estudió la exocitosis disparada por una despolarización de duración y forma similar a un potencial de acción nativo, al que llamamos potencial de acción simulado (PAs). Este tipo de estímulos generó valores de amplitud ($I_{Ca^{2+}}$) e integral ($\int I_{Ca^{2+}}$) de corrientes de Ca^{2+} y de exocitosis (ΔC_m) similares a los obtenidos en respuesta a un potencial de acción nativo (PA_{nat}) (Moya-Díaz y col., 2016). En ese mismo trabajo se demostró que la exocitosis disparada por un PAs libera un grupo de vesículas que forma parte de IRP, al que se denominó ETAP, por *Exocytosis Triggered by Action Potential like stimulus*, con un valor de 11 fF (8 vesículas) que representan aproximadamente un 40% de IRP. Inmediatamente luego de ETAP se activa un proceso de endocitosis muy rápido (Figura 1.20, panel A) con constantes temporales menores al segundo (Moya-Díaz y col, 2016; Montenegro y col, 2020), totalmente compensatorio, dinamina dependiente (Moya-Díaz y col, 2016) y clatrina independiente (Tesis doctoral de Ana Verónica Belingheri, 2016).

El proceso de recuperación de ETAP se estudió en nuestro laboratorio por medio de un protocolo similar al aplicado para IRP total, pero reemplazando las depolarizaciones cuadradas de 50 ms por PAs. A partir de dichos experimentos se obtuvo la curva promedio de la Figura 1.20.B (Moya-Díaz y col, 2016), que muestra una recuperación 10 veces más rápida que IRP, con una constante de tiempo de $\sim 0,7$ 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 PAs, 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.

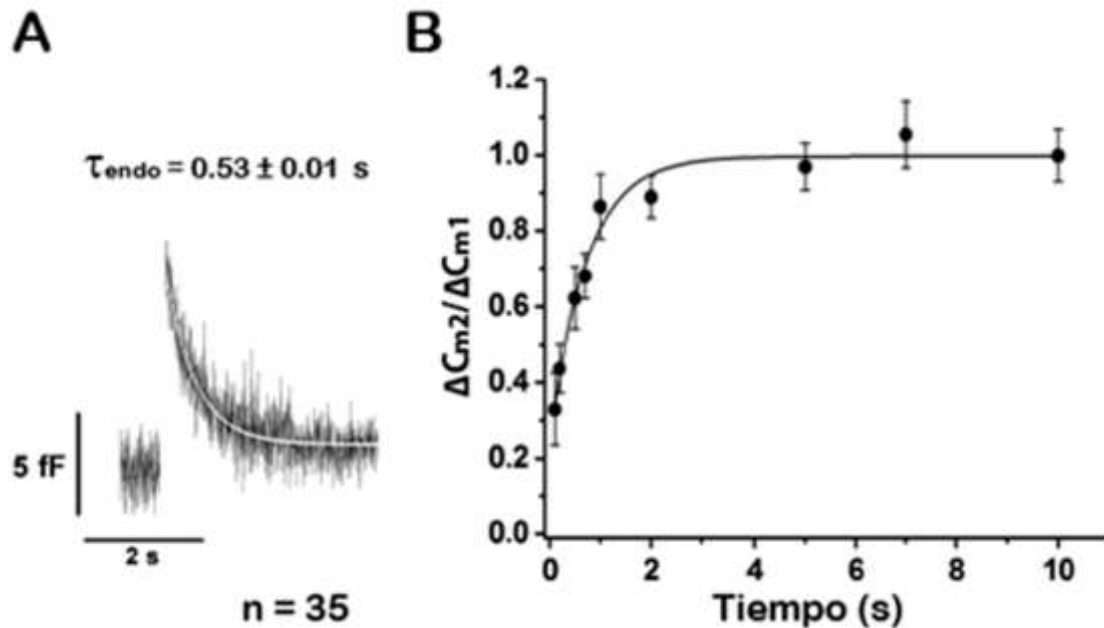


Figura 1.20 – (A) Luego de ETAP, la membrana es internalizada por una endocitosis rápida. La figura representa el promedio de los registros obtenidos en 35 células independientes. El decaimiento de la capacitancia de membrana fue ajustada a una ecuación monoexponencial decreciente ($\tau = 0,53 \pm 0,01 \text{ s}$; $R > 0.9446$). **(B)** La recuperación relativa de ETAP (expresada como $\Delta C_{m2}/\Delta C_{m1}$; donde ΔC_{m1} y ΔC_{m2} representan los cambios de capacitancia inducidos por el primer y segundo PAs, respectivamente) fueron graficados en relación al intervalo de tiempo entre los PAs. Cada punto representa el promedio de las mediciones obtenidas en al menos 11 células independientes. Los valores promedios fueron ajustados a una función de crecimiento monoexponencial de la forma $Y = A e^{-t/\tau} + Y_0$, obteniendo un valor Y_0 a tiempo cero de $0,24 \pm 0,05$, una asíntota A de $0,75 \pm 0,05$, una constante temporal de $0,73 \pm 0,11$ segundos, y un coeficiente de correlación $R > 0.9886$. Los datos están expresados como valores promedios \pm ES. Figura tomada y modificada de Moya-Díaz y col, 2016.

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 dinamina (como un anticuerpo monoclonal o un péptido que compite con la dinamina en su reclutamiento al cuello vesicular) se retarda significativamente la recuperación de ETAP (Moya-Díaz y col, 2016). ETAP es una fracción de IRP que se libera de manera sostenida ante la aplicación de potenciales de acción a frecuencias fisiológicas basales, gracias a un proceso de recuperación rápida fuertemente ligado a una endocitosis rápida dinamina dependiente.

En un trabajo posterior (Montenegro y col, 2020), utilizando tiempos más breves entre estímulos que aumentaban la resolución temporal del protocolo de recuperación de la Figura 1.19, se demostró que en realidad IRP se recuperaba con dos procesos exponenciales, uno rápido ($\tau_{R1}=1$ s) y uno lento ($\tau_{R2}=10$ s) (Figura 1.21), de los cuales el primero correspondería a la fracción ETAP de IRP.

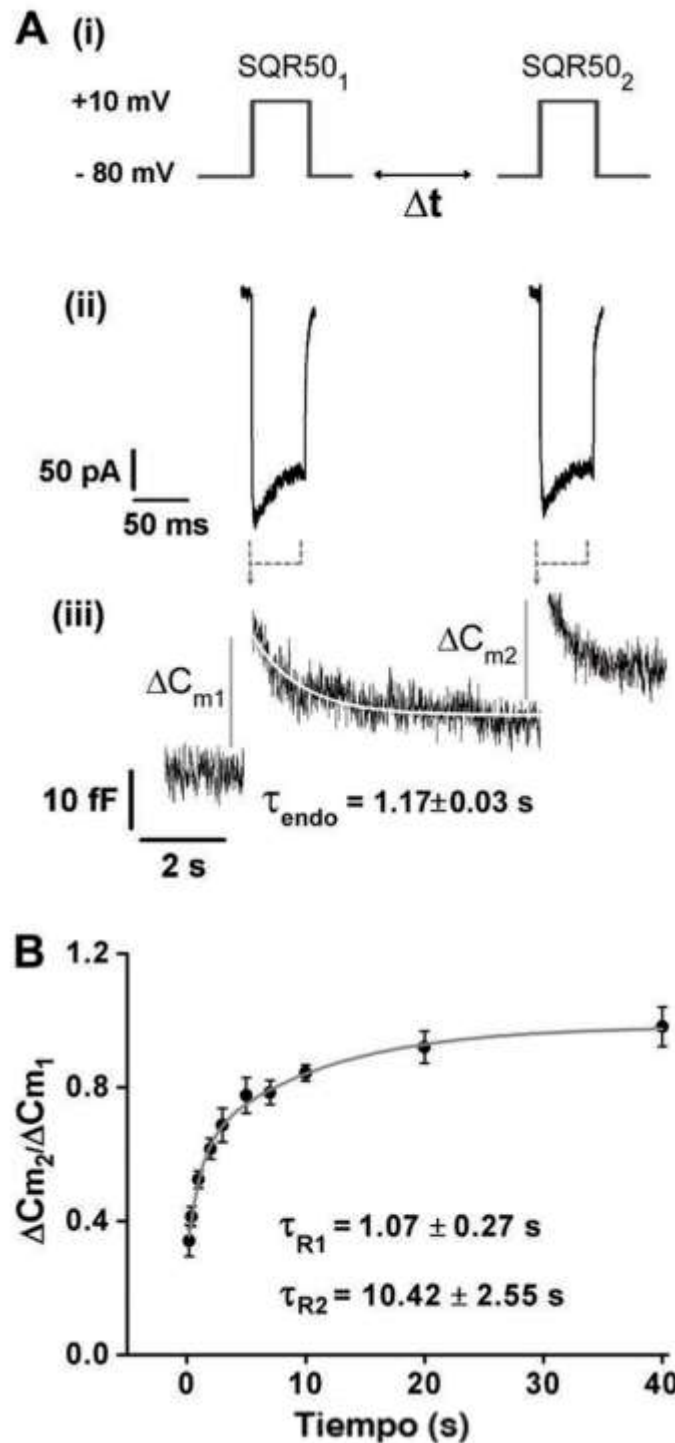


Figura 1.21 – La recuperación de IRP involucra dos componentes cinéticos. (A) En (i) se muestra un esquema del protocolo de estimulación. Para determinar la cinética de recuperación de IRP, se aplicaron un par de despolarizaciones cuadradas de 50 ms de duración (SQR50₁ y SQR50₂) (desde -80 a +10 mV), con un intervalo de tiempo variable entre cada uno de los pulsos. En (ii) y (iii) se muestran las corrientes de Ca²⁺ y su correspondiente registro de capacitancia, obtenidos de un experimento donde se aplicó un estímulo de dos pulsos SQR50 con un intervalo de tiempo de 5 s. La línea blanca en (iii) representa el ajuste de la caída de la señal de capacitancia a una función monoexponencial decreciente del tipo ($\Delta C_m = Y_0 + A \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{\text{endo}}}}$), donde $Y_0=9,8\pm 0,1$ fF, $A=14\pm 0,2$ fF, y $\tau_{\text{endo}}=1,17\pm 0,03$ s, $R>0,837$. **(B)** La recuperación relativa de IRP luego de la liberación (expresada como el promedio \pm ES del cociente $\Delta C_{m2}/\Delta C_{m1}$ para cada tiempo de intervalo, donde ΔC_{m1} y ΔC_{m2} representan los cambios de capacitancia inducidos por el primer y segundo SQR50, respectivamente) fue graficada vs los intervalos de tiempo entre los SQR50 y ajustada a una función biexponencial creciente del tipo $\frac{\Delta C_{m2}}{\Delta C_{m1}} = Y_0 + A_1 \cdot \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{R1}}}\right) + A_2 \cdot \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{R2}}}\right)$, donde $Y_0= 0,30\pm 0,02$, $A_1=0,32\pm 0,04$, $\tau_{R1}=1,07\pm 0,27$ s, $A_2=0,37\pm 0,04$, y $\tau_{R2}=10,42\pm 2,55$ s, $R>0,998$. Los puntos representados en el gráfico son los promedios de todas las mediciones obtenidas en 15 células individuales.

2. Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

En nuestro laboratorio hemos determinado en células cromafines murinas, que, luego de la exocitosis de aproximadamente un 50% del pool vesicular inmediatamente liberable (IRP), se activa de manera prácticamente instantánea un proceso de endocitosis rápida dinamina dependiente. Sin embargo, es sabido que variaciones en la magnitud de la exocitosis llevan asociadas transiciones entre mecanismos endocíticos diferentes (Chan y Smith, 2001; Wu y Wu, 2014b). *Planteamos como hipótesis para la presente Tesis que la exocitosis de fracciones crecientes de IRP conduce a la activación de mecanismos diferentes de endocitosis.*

En segundo lugar, es sabido que la GTPasa dinamina participa de manera crítica en la etapa final de la mayoría de los mecanismos de endocitosis conocidos. Las mutaciones A618T y S619L presentes la GTPasa dinamina-2 son responsables de la enfermedad miopatía centronuclear (MCN), que provoca la atrofia del músculo esquelético, sin embargo sus posibles efectos sobre la endocitosis en células neuroendócrinas son desconocidos. *Proponemos la hipótesis que dichas mutaciones afectan a la endocitosis asociada a IRP.*

2.2 Objetivos

Objetivo general

Este proyecto se propone analizar, en primer lugar, la participación de la GTPasa dinamina en los mecanismos de endocitosis que ocurren luego de la exocitosis de IRP en células cromafines. En segundo lugar, se estudiará el efecto de mutaciones puntuales de la dinamina, asociadas a MCN, sobre estos procesos endocíticos, y se analizarán los posibles mecanismos intervinientes.

Objetivos particulares: parte I

- Evaluar la magnitud y la cinética de la endocitosis ante la liberación de fracciones crecientes de IRP. Para esto se aplicarán, en modo de fijación de voltaje, diferentes estímulos que provoquen entradas de Ca^{2+} variables a la célula, de modo de lograr deprimir gradualmente el IRP.
- Analizar el efecto de diferentes tratamientos que inhiban a la GTPasa dinamina para evaluar la participación de esta proteína en la endocitosis que se desencadena ante la liberación de fracciones crecientes de IRP.
- Estudiar la participación de mecanismos alternativos a los dinamina dependientes que puedan contribuir a la endocitosis que se activa ante la liberación de fracciones crecientes de IRP.

Objetivos particulares: parte II

Las mutaciones A618T y S619L en la GTPasa dinamina-2 son responsables de la enfermedad MCN, que provoca la atrofia del músculo esquelético. Sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado si estas mutaciones afectan a los procesos asociados a la secreción de hormonas y neurotransmisores. Por ello, en esta segunda parte de la Tesis nos proponemos estudiar los efectos de la expresión de estas mutaciones sobre la exocitosis y la endocitosis en células cromafines.

- Estudiar el efecto de las mutaciones A618T y S619L sobre la exocitosis y la endocitosis al liberar gradualmente IRP.
- Para profundizar sobre los posibles efectos de estas mutaciones en los procesos asociados a la secreción en las células cromafines, se

evaluará el efecto de A618T y S619L sobre la exocitosis y endocitosis de *pools* vesiculares mayores a IRP.

- De modo de tener una segunda medida de la exocitosis, y evaluar posibles efectos de A618T y S619L sobre la fusión vesicular en sí misma, se realizarán registros de amperometría en células que expresen dichas mutantes.
- Se ha reportado que la dinamina posee un rol activo en la polimerización y despolimerización de la F-actina, y a su vez es bien sabido que dicho componente del citoesqueleto participa de manera crítica en los mecanismos de tráfico de vesículas a la membrana, exocitosis y endocitosis. Por lo tanto, nos proponemos estudiar si A618T y S619L afectan el estado de agregación de la F-actina en células cromafines bovinas.
- Estudiar el efecto de A618T y S619L sobre la distribución espacial de vesículas secretorias identificadas con un marcador fluorescente por medio de microscopía confocal.

3. Materiales y Métodos

3.1 Cultivos celulares

3.1.1 Cultivo de células cromafines murinas

Para la preparación de cada cultivo primario de células cromafines murinas se extrajeron las glándulas adrenales de 1-2 ratones de cepa sv129 de edades entre 13 y 21 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.

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 y 1 µl/ml de citosina-1-β-D-arabinofuranósido.

Procedimiento para el cultivo

Los animales fueron anestesiados con una sobredosis de avertina (2% m/v) administrada en forma intraperitoneal. Una vez que se accedió a las cavidades peritoneal y torácica utilizando material quirúrgico adecuado, se realizó un corte en la vena cava inferior y se perfundió al animal lentamente desde el ventrículo izquierdo con 10 ml de solución de Hanks previamente oxigenada. Luego, se extrajeron las glándulas adrenales, ya limpias de sangre, y se las colocaron en una caja de petri estéril sobre una lupa para su disección. Primero se removió la grasa circundante y luego la corteza adrenal, para finalmente quedarnos con la médula adrenal en la que se encuentran las células cromafines. La disección es un paso crítico en el resultado del cultivo ya que, si la remoción de la corteza no es total, se observa una disminución en la

proporción de células cromafines en relación a otros tipos celulares como fibroblastos. Una vez disecadas, las médulas fueron colocadas en un tubo tipo eppendorf de 1,5 ml y digeridas en solución de Hanks conteniendo 0,11 mg/ml de papaína durante 20 minutos a 37°C.

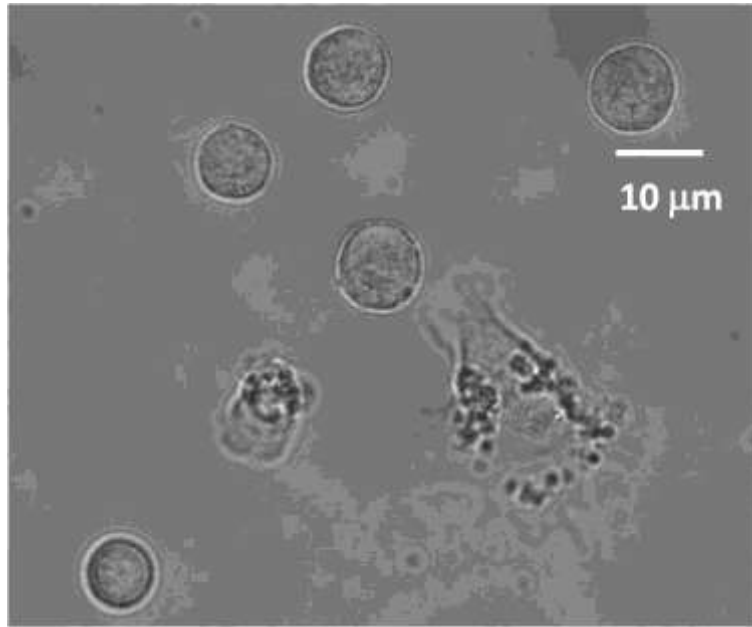


Figura 3.1- Imagen DIC de células cromafines en cultivo tomadas con un objetivo 40X. Las células cromafines pueden distinguirse fácilmente de los fibroblastos, eventualmente presentes en el cultivo, debido a su forma esférica, a su tamaño, a la presencia de un núcleo que ocupa un volumen importante de 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 300 μl de medio de cultivo DMEM suplementado, las médulas fueron disgregadas mecánicamente, se las dejó decantar, y se las resuspendió 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 polilisinados (aproximadamente 40 μl de suspensión celular por cuarto de cubreobjeto) y colocados en cajas de petri de 35 mm (cinco cuartos de cubreobjetos por caja). Posteriormente, las células fueron incubadas por 40 minutos en estufa a 37 °C con una atmósfera de 95% O_2 - 5% CO_2 para que

decanten y comiencen su adhesión al cubreobjeto. Luego de transcurrido este tiempo, 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.

3.1.2 Cultivo de células cromafines bovinas

La preparación de cada cultivo primario de células cromafines bovinas se realizó empleando glándulas adrenales de ternero obtenidas directamente del matadero local. En cada cultivo, se seleccionaron y utilizaron 2 glándulas de las 15 a 20 provistas por el matadero. Esta selección se realiza para chequear que las glándulas a utilizar no presenten cortes, laceraciones, hemorragias, quistes de sangre, tumores o alguna otra alteración morfológica.

Soluciones de cultivo

Medio de cultivo DMEM suplementado: medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) baja glucosa suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2,5 $\mu\text{l/ml}$ de penicilina/estreptomicina, 10 $\mu\text{l/ml}$ de Fungizona, 5 $\mu\text{l/ml}$ de gentamicina, y 20 $\mu\text{l/ml}$ de citosina-1- β -D-arabinofuranósido.

Buffer 0 Ca^{2+} (cero calcio) (en mM): 5 KCl, 145 NaCl, 1,3 MgCl_2 , 1,2 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 Glucosa, 20 Hepes. Lleva a pH= 7,4 con NaOH.

Buffer proteasa 2% (para una glándula): 40 mg proteasa de *Streptomyces Greiseus* + 20 ml de buffer 0 Ca^{2+} .

Buffer Ca^{2+} /BSA (para una glándula): 0,5% BSA y 2,2 mM MgCl_2 en volumen final de 15 ml de Buffer 0 Ca^{2+} .

Buffer colagenasa (para una glándula): 15 mg de colagenasa de *Clostridium Histolyticum* en 1,5 ml de solución de BSA (1,5 gr BSA + 10 ml buffer 0 Ca^{2+}) y 13,5 ml buffer 0 Ca^{2+} .

Procedimiento para el cultivo

En primer lugar, a cada glándula se le removió la grasa adherida al tejido externo. Luego se las lavó por perfusión con 10 ml de buffer 0 Ca^{2+} a través de la vena adrenal, introduciendo una cánula de plástico ajustada a una jeringa. Se repitió este paso 5 veces hasta lograr que la solución de perfusión saliese limpia del interior de cada glándula (sin vestigios de sangre). A continuación, se perfundió cada glándula con 10 ml de buffer proteasa 2% y se las colocó en un vaso de precipitado junto con este mismo buffer, para luego llevarlas a *shaker* con agitación de 120 rpm a 37°C durante 15 min. Durante todo el tiempo de agitación se procuró oxigenar bien el ambiente del vaso de precipitados. Transcurrido el tiempo, se volvió a perfundir a ambas glándulas con otros 10 ml del buffer de proteasa 2%, para luego llevarlas al shaker durante 15 min más. Una vez transcurrida esa etapa, a cada glándula se le realizó un corte circunferencial comenzando en la vena adrenal y usando el lado más fino de la tijera para cortar la parte interna de la corteza. Al quedar descubierta las médulas (color beige claro), las cuales se diferencian bien de la corteza (color marrón), se utilizaron pinzas para retirar con suavidad las médulas y colocarlas en una placa de petri limpia. Se procedió a disgregar a ambas medulas utilizando una tijera para microcirugía. Una vez disgregadas, se las colocó en un vaso de precipitado con 15 ml de buffer de colagenasa, para luego llevarlas a agitación en el *shaker* por 30 min (ambiente oxigenado).

Transcurrido el tiempo de agitación se agregó al vaso de precipitados con las medulas disgregadas, 20 ml de buffer 0 Ca^{2+} y se las procedió a disgregar mas finamente por resuspensión con una pipeta Pasteur, tratando de lograr una solución lo más homogénea posible. Esta solución se filtró a través de una membrana de 200 μm de poro y se la recogió en tubo falcón estéril de 50 ml.

En el cuarto de cultivo, se procedió a centrifugar dicha solución por 10 min a 1100 rpm (168 g) para precipitar los cuerpos celulares. Luego se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 30 ml de buffer 0 Ca^{2+} . Se centrifugó nuevamente por 10 min a 450 rpm (28 g), se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 25 ml de buffer 0 Ca^{2+} , donde además se agregó 5 ml de buffer Ca^{2+} /BSA en forma de gradiente, es decir,

llevando la solución de Ca^{2+} /BSA al fondo del tubo (se formaron dos fases, una clara abajo que corresponde al buffer Ca^{2+} /BSA y una turbia arriba que es la mezcla de células y buffer 0Ca^{2+}). Se volvió a centrifugar por 10 min a 450 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 ml de buffer Ca^{2+} /BSA. La suspensión celular se filtró con una membrana estéril de 50 μm de poro, para luego volver a centrifugar la solución recolectada por otros 10 min a 450 rpm. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se agregó 5 ml de medio DMEM suplementado al pellet celular.

Las células resuspendidas en DMEM suplementado fueron plaqueadas sobre cubreobjetos cortados en cuartos polilisinados (aproximadamente 40 μl de suspensión celular por cuarto de cubreobjeto) y colocados en cajas de petri de 35 mm (cinco cuartos de cubreobjetos por caja). Posteriormente, las células plaqueadas fueron incubadas por 40 minutos en estufa a 37 °C con una atmósfera de 95% O_2 - 5% CO_2 para que decanten y comiencen su adhesión al cubreobjeto. Luego de transcurrido este tiempo 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.

3.2 Procedimiento de transfección

Para la transfección de células cromafines (murinas o bovinas) con los plásmidos DynIK44A-EGFP, vEGFP, DynIIWT-EGFP o DynIIWT-mCherry, DynIIA618T-EGFP o DynIIA618T-mCherry, DynIIS619L-EGFP o DynIIS619L-mCherry, se utilizó el sistema de electroporación Nucleofector 4D (Lonza™). Las construcciones plasmídicas fueron generosamente provistas por la Dra. Ana María Cárdenas del Centro Interdisciplinario de Neurociencias de Valparaíso (CINV). El procedimiento de transfección sobre células cromafines se realizó en la instancia previa al plaqueo final del cultivo. De las células en suspensión en medio DMEM suplementado, se contabilizaron aproximadamente entre 100 mil y 150 mil células (1 ml de suspensión celular) por cuarto de vidrio de cubreobjeto a plaquear, utilizando una cámara de Neubauer. El volumen de suspensión celular a transfectar (1 ml) se colocó en

un tubo eppendorf, y se centrifugó con el objetivo de separar las células del medio de cultivo DMEM suplementado. Se descartó el sobrenadante, y el pellet celular se resuspendió con una mezcla de las soluciones de transfección patentadas por Lonza™, *Nucleofector solution*™ y *Supplement 1 solution*™, siendo la proporción de volumen de esta mezcla de 5:1, respectivamente (Volumen final = 320 µl). Esta suspensión celular (células + soluciones Lonza™) se distribuyó equitativamente en nuevos tubos eppendorf conteniendo 0,5 µg (0,4 µl volumen ADN en agua) de cada ADN a transfectar. El volumen total de células, ADN y soluciones de transfección de cada eppendorf se distribuyó en alícuotas de 20 µl en una placa *multiwell* de 16 pocillos (20 µl por pocillo) original del sistema Nucleofector 4D (Lonza™). Una vez realizada la electroporación, las células de cada pocillo fueron resuspendidas con 100 µl de solución OPTIMEM y plaqueadas en cuartos de cubre objetos previamente polilisinados contenidos en placas de petri de 35 mm de diámetro. Luego de incubar por 40 minutos en una estufa a 37 °C con una atmósfera de 95% O₂ - 5% CO₂, se agregó 2 ml de medio DMEM a cada placa, las cuales se mantuvieron en estufa hasta su uso. En la Figura 3.2 se muestran ejemplos representativos de células transfectadas con el plásmido DynIIWT-GFP.

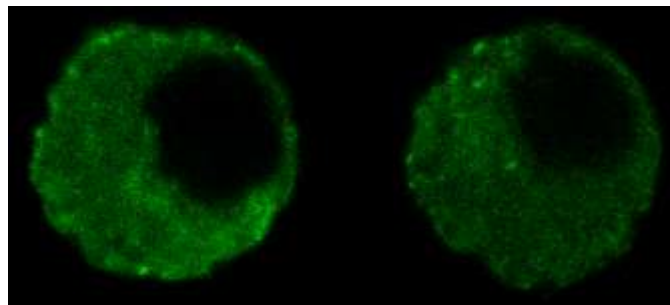


Figura 3.2- Imágenes de células cromafines en cultivo transfectadas con el plásmido DynIIWT-GFP. La imagen fue tomada con un objetivo 60X en un microscopio confocal FLUOVIEW-300.

3.3 Técnicas electrofisiológicas

3.3.1 Generalidades

El método de *voltage clamp* fue desarrollado para fijar el potencial de membrana y medir las corrientes que pasan por los canales iónicos de la

membrana celular (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, conectado a tierra, 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 utilizada (especialmente con células pequeñas). El microelectrodo de *patch clamp* está conformado por el conjunto de una micropipeta, que se llena con una solución electrolítica, y un alambre de plata clorurado. Si bien existen distintas configuraciones de la técnica de *patch clamp*, el punto común a todas ellas es la formación de un sello de alta resistencia ($>1 \text{ G}\Omega$, llamado gigasello) entre la micropipeta de vidrio, de alrededor de $1 \mu\text{m}$ de diámetro en su punta, y la membrana celular. La alta resistencia del sello es de crítica importancia, ya que reduce marcadamente en las fugas de corriente.

La primera configuración obtenida una vez formado el gigasello entre la pipeta y la membrana es la denominada *cell attached* (Figura 3.3.A), que es útil para medir la corriente a través de un canal único y manteniendo a la célula intacta. También existen otras configuraciones (*inside out* y *outside out*) para el registro de canales únicos, en las cuales se separa la pequeña porción de membrana contenida dentro de la punta del microelectrodo del resto de la cánula. Pero la configuración aplicada a lo largo de este trabajo de tesis es la llamada *whole cell*. Para lograrla, 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 aplica una presión negativa hasta romper la sección de membrana dentro de la pipeta (Figura 3.3.B). De este modo, el electrodo queda en contacto directo con el citosol celular, estableciéndose un circuito continuo con el electrodo de referencia, cuyo punto de mayor resistencia está establecido por la membrana plasmática (Figura 3.4.A). 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 se prepara intentando simular al medio intracelular difusible, pero introduciendo las modificaciones que sean convenientes a cada serie experimental. Esta

configuración puede utilizarse para medir los cambios del potencial de membrana (modo *current clamp*) o de las corrientes (modo *voltage clamp*), como también los cambios de capacitancia de la membrana celular (modo *voltage clamp*). En esta tesis se utiliza exclusivamente el modo *voltage clamp*.

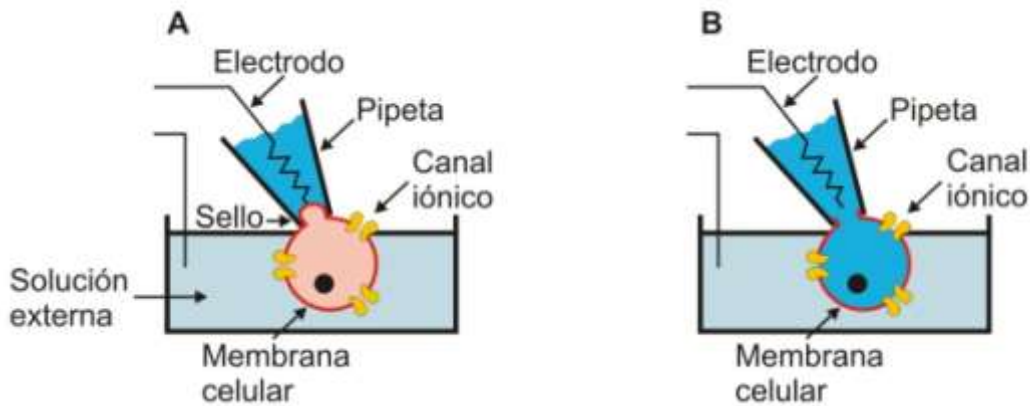


Figura 3.3 - Esquema de la formación del gigasello y del establecimiento del modo *whole cell*. (A) La pipeta se apoya sobre la superficie de la membrana y con presión negativa se forma el gigasello (configuración *cell attached*). (B) Una vez que se rompe la pequeña sección de la membrana contenida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

Si se fija una diferencia de potencial suficientemente negativa (en este trabajo, -80 mV) entre los medios extracelulares e intracelulares ($V_{\text{intra}} - V_{\text{extra}}$), la membrana estará en condiciones similares al reposo, donde los canales iónicos dependientes de voltaje no están activos. Esta es la condición de potencial de mantenimiento o *holding*. Pero si se imponen potenciales más positivos, que superen los valores umbrales, se activarán canales dependientes del voltaje, y se medirá una corriente neta a través de la membrana.

3.3.2 Circuito equivalente de la célula y medición de la capacitancia de la membrana celular

La técnica de *patch clamp* en configuración *whole cell* y modo *voltage clamp* permite medir, además de las corrientes iónicas, otros parámetros eléctricos de membrana, 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 de esta técnica permite registrar cambios inferiores a 10 femtofaradios ($1 \text{ fF} = 10^{-15} \text{ F}$), lo cual implica detectar la fusión de unas pocas vesículas (1 vesícula $\sim 1,3 \text{ fF}$). 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 la resultante de ambos combinados, si ocurriesen simultáneamente. Sin embargo, la endocitosis suele ser mucho más lenta ($> 1 \text{ s}$) que la exocitosis (pocos milisegundos), con lo cual para estímulos breves la exocitosis y la endocitosis pueden ser separadas cinéticamente (Sakmann, 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 eléctrico equivalente 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 3.4). 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 $1 \text{ G}\Omega$. La capacitancia específica de la membrana plasmática, C_m , es aproximadamente $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, 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 $4\text{-}10 \text{ pF}$ (valores experimentales de nuestro laboratorio). 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 $\leq 10 \text{ M}\Omega$. Bajo este modelo, la corriente de membrana (I_m) tiene una parte iónica ($I_{\text{ión}}$) y una capacitiva (Ecuación 3.1).

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

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, " I_{ion} " es la corriente iónica y " t " es el tiempo.

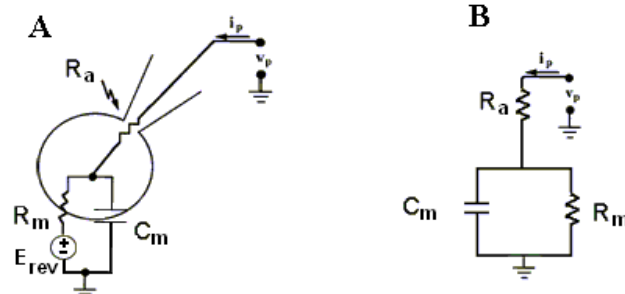


Figura 3.4 - (A) Circuito equivalente para una célula de forma esférica bajo configuración *whole cell*. Este modelo tiene en cuenta la capacitancia celular de la membrana C_m , la resistencia de membrana al paso de los iones R_m , y la resistencia de acceso R_a . V_p es el voltaje aplicado a la pipeta, que establece una diferencia de potencial con 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 aplicado generan corrientes capacitivas continuas ($I = C_m \frac{dV}{dt}$) que son función de la capacitancia de la membrana, la cual es a su vez proporcional a la superficie de la membrana celular. Por medio de un amplificador de tipo *lock-in* o un

software que cumple esa función, se pueden separar los componentes capacitivos de los iónicos en la admitancia de la membrana, a partir de lo cual puede calcularse la capacitancia. 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, 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. Si se estimula a la célula con pulsos despolarizantes que provocan la activación de corrientes de Ca^{2+} , estas inducirán la fusión de vesículas con la membrana plasmática, con los consecuentes aumentos de la capacitancia de la membrana celular (Figura 3.5) (Neher y Marty, 1982). Conociendo el valor promedio de capacitancia de una vesícula única, aproximadamente 1,3 fF (Moser y Neher, 1997b), se puede estimar el número de vesículas fusionadas.

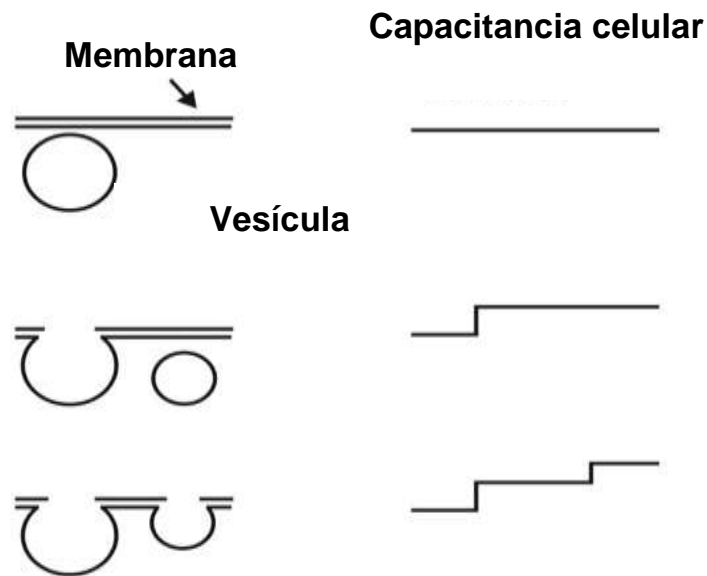


Figura 3.5 - Un modo de cuantificar la exocitosis es a través de la medición de la capacitancia celular. A medida que se estimula a la célula con pulsos despolarizantes se observa un aumento en la capacitancia celular como consecuencia de la fusión de las vesículas con la membrana plasmática. En las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

3.3.3 Dispositivo de patch clamp

El dispositivo experimental utilizado (Figura 3.6), está conformado 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.

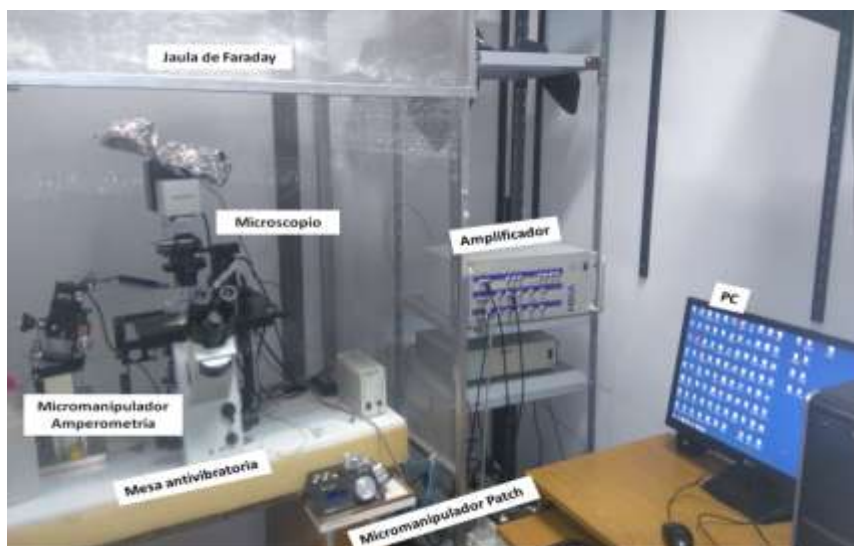


Figura 3.6 – Dispositivo de *patch clamp* utilizado para realizar registros de capacitancia.

3.3.4 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 Instruments). 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 seis 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 (modelo FM-900, NARISHIGE), sometiéndolas al calor de una resistencia durante unos segundos. Esta acción permitió la obtención de sellos de muy buena calidad, con valores del rango de 3 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 la solución interna, las paredes del electrodo y la solución externa (la cual se adsorbe y “trepa” por las paredes del electrodo). Este efecto, puede ser reducido aumentando el ancho de la pared de la pipeta y a la vez “repeliendo” a la solución externa. Para ello cubrimos la punta de las micropipetas con cera odontológica dura, un material hidrofóbico que reduce la adsorción agua-vidrio, desde unos 10-20 μm del extremo por una longitud aproximada de 0,5 cm.

3.3.5 Soluciones para experimentos electrofisiológicos

Una vez establecida la configuración *whole cell*, la solución introducida en la micropipeta (llamada normalmente solución interna) difundirá al citosol. Como ya se dijo, 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 no 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).

Compuestos solución interna	Concentración (mM)	Compuestos solución externa	Concentración (mM)
HEPES, pH 7.2	23	Hepes, pH 7.2	20
Cs-Glutamato	95	Glucosa	30
CsCl	30	CaCl_2	5
NaCl	8	NaCl	120
MgCl_2	1	MgCl_2	4
Cs-EGTA	0,5	TTX	0,001
Mg-ATP	2		
Li-GTP	0,3		

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. 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 las corrientes de Ca^{2+} , para todos los experimentos realizados en modo *voltage clamp* se debió bloquear las corrientes voltaje dependientes de K^+ y Na^+ . Para

eliminar la corriente de K^+ se reemplazó el K^+ por Cs^+ en la solución intracelular, y se lo excluyó de la extracelular, 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.

Los componentes presentados en la tabla 3.1, se utilizaron en la mayoría de los experimentos electrofisiológicos presentados en esta tesis, salvo pequeñas modificaciones que se mencionarán oportunamente, por lo que llamaremos a estas soluciones como soluciones estándar. Vale la pena mencionar que una serie experimental fue realizada modificando la concentración de Ca^{2+} en el baño extracelular $[Ca^{2+}]_e$. En este escenario experimental particular, la $[Ca^{2+}]_e$ se redujo y se aumentó, desde su valor control que es 5 mM, a 1 mM y 10 mM respectivamente, sin modificar las concentraciones de los otros iones.

3.3.6 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 senoide (ver más adelante). Las mediciones se iniciaron aproximadamente 30 segundos después de haber alcanzado esta configuración (a menos que se indique otro tiempo). La medición de la capacitancia celular (C_m) se realiza durante la aplicación del potencial de *holding*, al cual se le suma una sinusoidal de frecuencia 800 Hz y amplitud ± 30 mV. Esta frecuencia permite, dado que por cada ciclo de la senoide se obtiene una estimación de la capacitancia, una resolución de un punto cada 1,25 milisegundos en el registro. Sobre este patrón, se agrega una cierta secuencia de pulsos que alcanzan valores de voltaje positivos, para activar a los canales de Ca^{2+} , y en consecuencia disparar la excitación. En todos los protocolos, la senoide se suspendió desde 10 ms antes hasta 10 ms después de la aplicación de dichos pulsos, para facilitar la definición de la línea de base de las corrientes iónicas.

En esta tesis se aplicaron protocolos de estimulación que consistieron en diferentes tipos de estímulos que inducen corrientes de Ca^{2+} y,

consecuentemente exocitosis: (i) pulsos de voltaje que simulan potenciales de acción (PAs, Figura 3.7). (ii) Pulsos cuadrados (SQPs, Figura 3.8) individuales de 5, 10, 25, 50 y 500 ms de duración (definidos como SQP5ms, SQP10ms, SQP25ms, SQP50ms y SQP500ms. (iii) Estímulos compuestos de pulsos SQP25ms pareados (2SQP25ms) y triples (3SQP25ms) (Figura 3.9). Dentro de un mismo estímulo, los SQP25ms son espaciados por intervalos de 50 ms (frecuencia de 13 Hz). Para todos los estímulos mencionados se aplicó la sinusoidal (centrada en el potencial de holding) durante 3 s previos, de modo de definir una línea de base de capacitancia.

Dado que sobre una misma célula se aplicaron varios tipos de estímulo, los mismos fueron administrados de forma aleatoria con un intervalo de 30 segundos entre uno y otro. Para lograr una buena aleatoriedad, se detalló en una planilla de Microsoft Excel el nombre de todos los estímulos a aplicar en la serie experimental y se utilizó la función aleatoria del mismo *software* para generar listas en donde el nombre de cada estímulo estuviese en orden distinto al anterior.

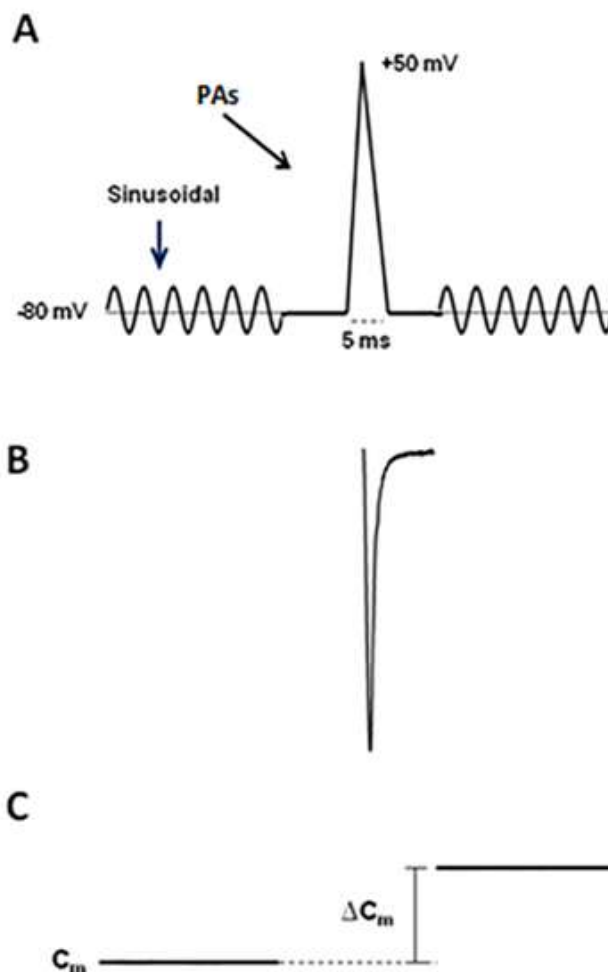


Figura 3.7 - Estimulación con potenciales de acción simulados (PAs). (A) El PAs está formado por una rampa que parte del potencial de holding de -80 mV hasta un potencial de +50 mV en 2,5 milisegundos y luego vuelve al potencial de holding en el mismo tiempo. En (B) se representa una corriente de Ca^{2+} característica en respuesta a PAs. En (C) se esquematiza el incremento de capacitancia (ΔC_m) provocado por el aplicado de PAs.

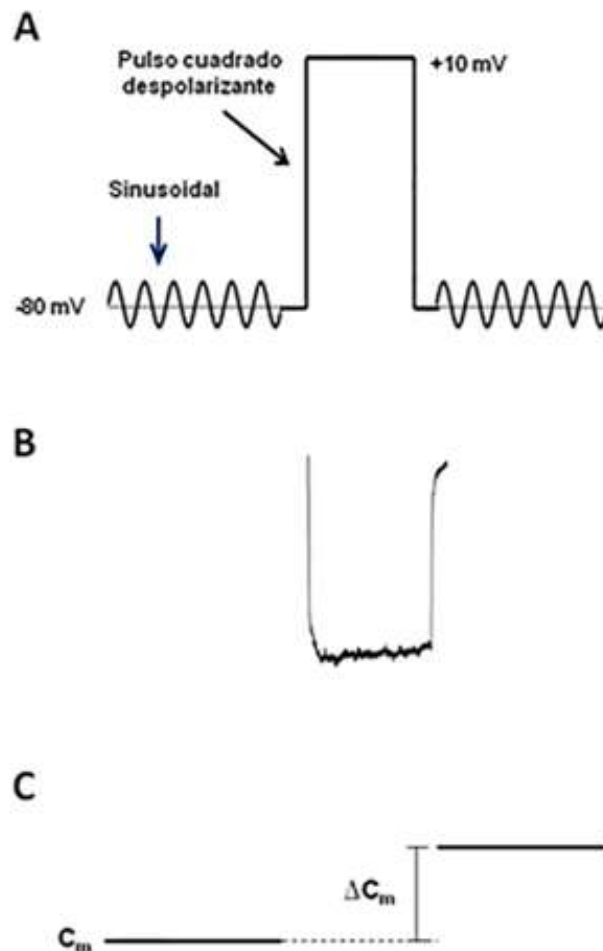


Figura 3.8 - Estimulación con pulsos cuadrados (SQP). (A) Los SQP constan de un incremento instantáneo del voltaje hasta +10 mV durante 5, 10, 25, 50 o 500 ms, seguido por un descenso instantáneo hasta alcanzar nuevamente el potencial de *holding*. En (B) se representa un ejemplo característico de corriente de Ca^{2+} registrada en respuesta a un SQP50ms. En (C) se esquematiza el incremento de capacitancia (ΔC_m) provocado por un SQP.

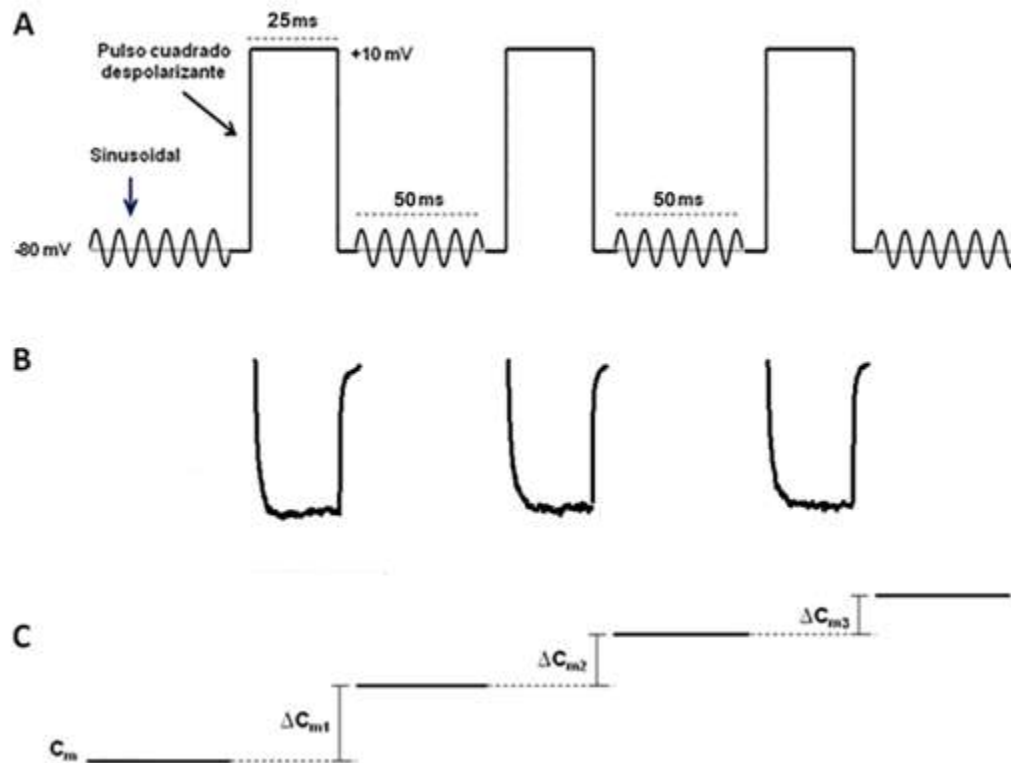


Figura 3.9 - Estimulación con pulsos triples. (A) El estímulo 3SQP25ms está compuesto por tres pulsos SQP25ms, respectivamente, separados por un intervalo fijo de tiempo de 50 ms (frecuencia 13 Hz). Cada pulso SQP25ms consta de un incremento instantáneo desde el potencial de *holding* (-80 mV) hasta +10 mV durante 25 ms, seguido por un descenso instantáneo hasta nuevamente el potencial de *holding*. En (B) se representan ejemplos característicos de corrientes de Ca^{2+} registradas en respuesta a un estímulo 3SQP25ms. En (C) se esquematiza el incremento de capacitancia (ΔC_m) provocado por un 3SQP25ms.

De los experimentos empleando estímulos del tipo PAs, SQP5-500ms y 2SQP25ms o 3SQP25ms, se obtuvieron las corrientes de Ca^{2+} (ver Figuras 3.7.B, 3.8.B y 3.9.B), a las cuales se les midió la amplitud ($I_{\text{Ca}^{2+}}$) y la integral ($\int I_{\text{Ca}^{2+}}$). La $I_{\text{Ca}^{2+}}$ fue medida desde la línea de base del trazado hasta el pico de corriente, mientras que la integral fue calculada como el área delimitada bajo la curva de $I_{\text{Ca}^{2+}}$ (Figura 3.10.A).

Es importante mencionar que en algunas células, inmediatamente después de finalizado el pulso de voltaje, 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 Bookman, 1994). Este transitorio se extingue completamente en menos de 50 ms. 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 eliminar los primeros 60 ms de registro luego de finalizada la despolarización.

En todos los casos se estimó la exocitosis sincrónica a cada estímulo ($\Delta C_{m_{exo}}$), definida como la diferencia entre el promedio de los primeros 100 valores registrados de capacitancia posteriores al estímulo (C_{mp}) (luego de eliminar los 60 ms mencionados en el párrafo anterior) y el promedio de los últimos 100 valores de capacitancia anteriores al estímulo (C_{ma}). Entonces la exocitosis se calcula como $\Delta C_{m_{exo}} = C_{mp} - C_{ma}$ (Figura 3.10.B).

En los experimentos que evidenciaron endocitosis (caída en la señal de capacitancia post-estímulo), se estimó el valor absoluto de la misma ($\Delta C_{m_{endo}}$) como la diferencia entre el promedio de los 100 valores registrados de capacitancia posteriores al estímulo (C_{mp}) (luego de eliminar los 60 ms mencionados previamente) y el promedio de los 100 valores de capacitancia finales (C_{mf}) cuando la endocitosis se completa, es decir, cuando llega a su *plateau* (Figura 3.10.B). En los experimentos de pulsos de corta duración como PAs y SQP5-50ms, observamos tanto en este trabajo de Tesis como en trabajos previos del laboratorio (Moya-Díaz y col, 2016; Montenegro y col, 2020), que el *plateau* de la endocitosis ocurre a un tiempo de ~5 segundos luego del final del estímulo, por lo que C_{mf} fue determinado al final de ese período. En cambio, para los pulsos SQP500ms, el C_{mf} fue obtenido al momento de establecerse el *plateau* de la endocitosis, determinado a simple vista. Finalmente, para estudiar la cinética del proceso endocítico, se ajustó la caída de la capacitancia luego del estímulo, a una función monoexponencial decreciente de la forma $Y = A e^{-t/\tau} + Y_0$. De este ajuste, se estimó el valor de la variable τ , que representa a la constante temporal de la endocitosis (τ_{endo}). Este parámetro es un indicador confiable de la velocidad de la endocitosis (Figura 3.10.B).

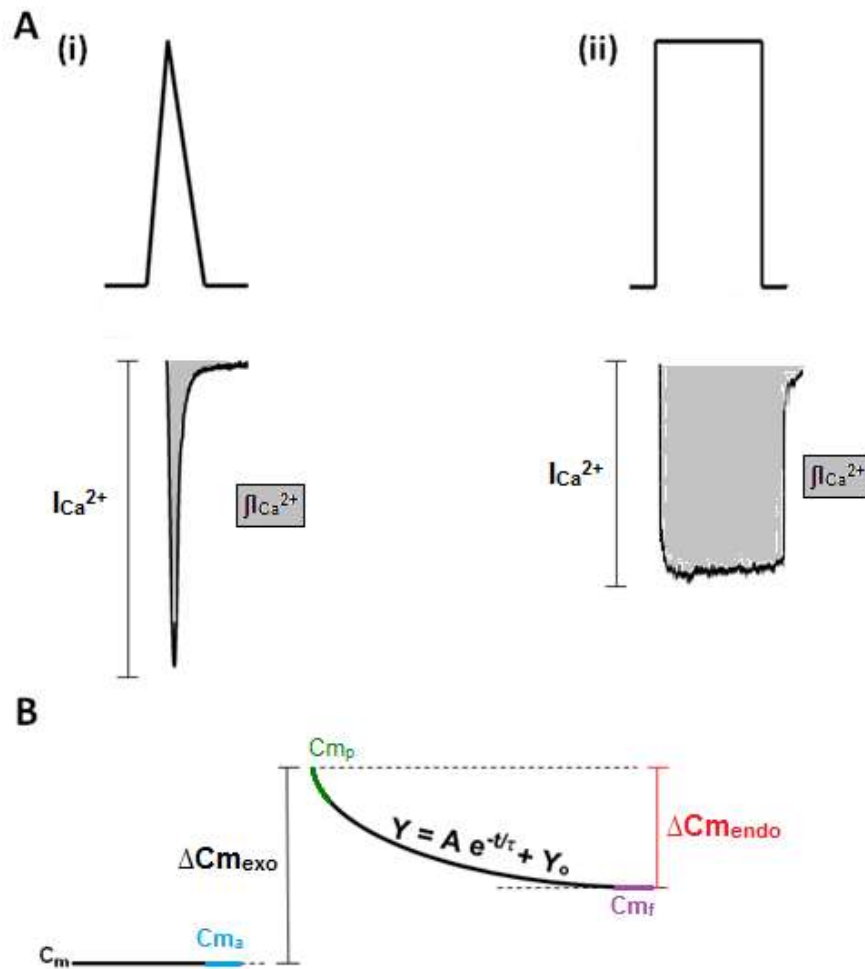


Figura 3.10 - Análisis de $I_{Ca^{2+}}$, $\int I_{Ca^{2+}}$, excitosis y endocitosis. (A) Se muestran esquematizados pulsos de voltaje con forma de PAs (i) y SQP (ii), con ejemplos típicos de corrientes de Ca^{2+} (la correspondiente a SQP es una obtenida con un SQP50ms). La amplitud de la corriente de Ca^{2+} ($I_{Ca^{2+}}$) fue medida desde la línea de base previa hasta el pico del trazado de corriente, mientras que la integral ($\int I_{Ca^{2+}}$) fue calculada como el área bajo la curva del mismo trazado (área sombreada gris). (B) $\Delta C_{m_{exo}}$ fue calculado como la diferencia entre la capacitancia posterior al estímulo (C_{m_p} , en verde) menos la capacitancia pre-estímulo (C_{m_a} , en celeste). $\Delta C_{m_{endo}}$ se midió como la diferencia entre C_{m_p} (en verde) menos C_{m_f} (en violeta). Para estudiar la cinética del proceso endocítico, se ajustó la caída de la capacitancia que se produce luego de la excitosis (representada por el trazado de C_m posterior a $\Delta C_{m_{exo}}$) a una función de la forma $Y = A e^{-t/\tau} + Y_0$, donde τ representa a la constante temporal de la endocitosis (τ_{endo}). Para más detalles de todas estas mediciones ver el texto principal.

3.4 Amperometría

Estos experimentos fueron realizados en el laboratorio de la Dra. Ana María Cárdenas, en la Universidad de Valparaíso, Chile.

3.4.1 Fundamentos básicos

La amperometría es una técnica electroquímica de gran sensibilidad y resolución temporal, que permite visualizar en tiempo real la liberación de moléculas en eventos exocíticos individuales. La posibilidad de realizar dichos registros se limita a situaciones en que los compuestos liberados sean oxidables o reducibles. Dado que la adrenalina (y también la noradrenalina) es susceptible de ser oxidada (Figura 3.11.A), esta técnica es aplicada normalmente en células cromafines. Debido a que la adrenalina posee un potencial redox de aproximadamente 570 mV (pH 7.2, temperatura ambiente), para lograr su oxidación es necesario aplicar potenciales mayores a este valor.

Para aplicar estos potenciales, y también para registrar las corrientes de electrones resultantes del proceso redox, se suele utilizar un electrodo de fibra de carbono (Figura 3.11.B) conectado al cabezal del amplificador, que es apoyado sobre la superficie celular (Figura 3.11.C). En nuestros experimentos utilizamos fibras de carbono de 12 μm de diámetro, a las que le aplicamos un potencial de 650 mV. La aplicación de este potencial fue adecuado para lograr la oxidación de las catecolaminas liberadas en nuestras condiciones experimentales. Para movilizar a estos electrodos (ver explicación más abajo) hacia la célula, se utilizó un micromanipulador mecánico manual (Figura 3.6, micromanipulador amperometría).

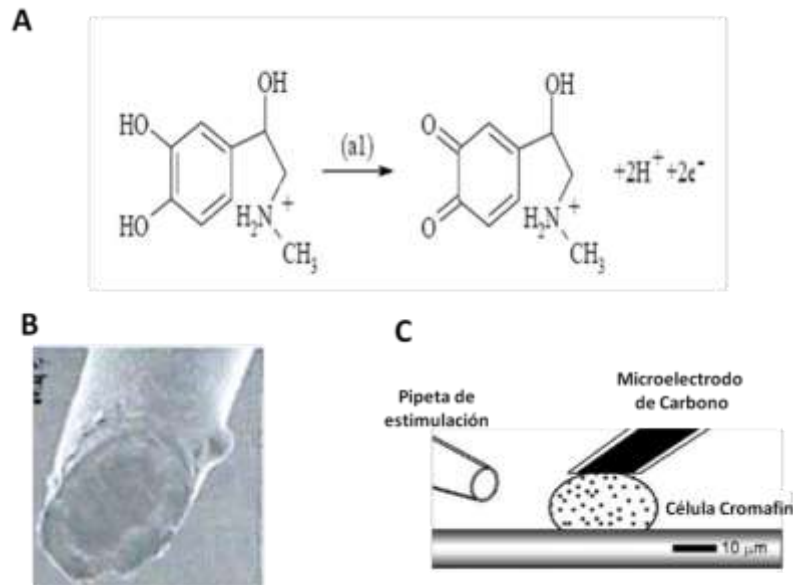


Figura 3.11- Fundamentos básicos de la técnica de amperometría. (A) Esquema representativo que ilustra la reacción química que ocurre durante la oxidación de la adrenalina. **(B)** Detalle del extremo de una fibra de carbono cortada a 45° obtenida mediante microscopía electrónica. **(C)** Representación esquemática de la técnica de amperometría. Un microelectrodo de carbono se posiciona justo por sobre la célula. En este caso particular, la aplicación de una solución de estimulación (por ejemplo, un “puff” de un agonista nicotínico o una solución de alto KCl) induce la liberación de vesículas secretoras.

La actividad exocítica es registrada como espigas amperométricas (Figura 3.12), que aparecen a una determinada frecuencia. Cada una de estas espigas representa la liberación de catecolaminas desde una vesícula individual, las cuales al ser oxidadas generan una corriente debido a la transferencia de electrones hacia el electrodo (Figura 3.12.A) (Mosharov y col, 2005). De las espigas amperométricas se puede extraer una serie de parámetros que entregan información sobre las características de los diferentes estadios de la exocitosis (Figura 3.12.B).

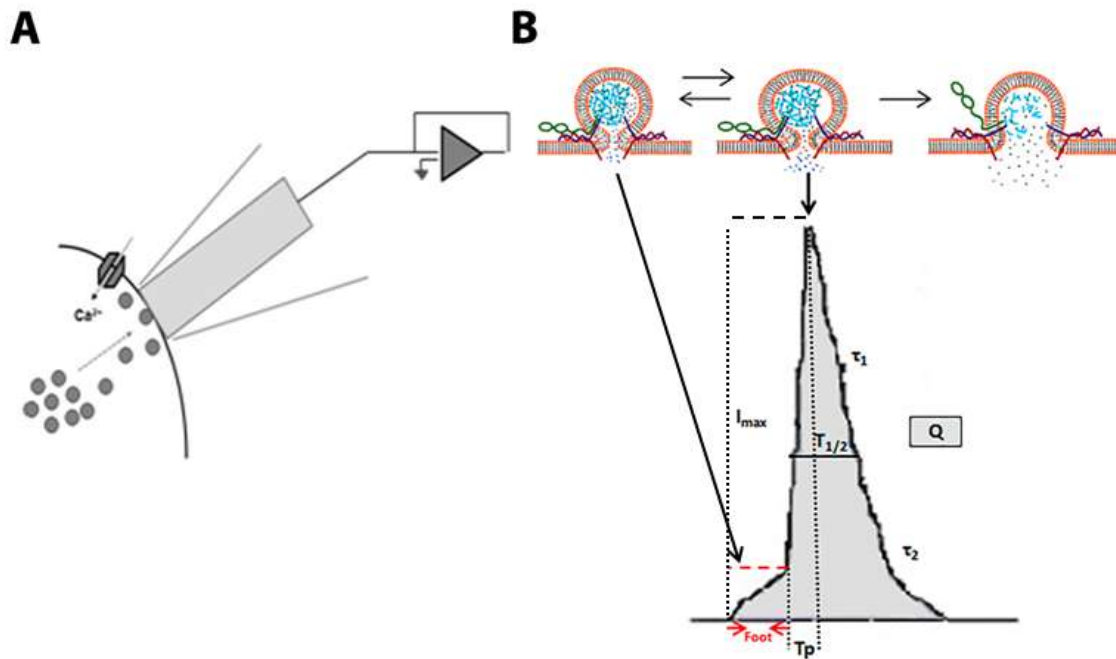


Figura 3.12- Registro de la exocitosis por amperometría. (A) Representación esquemática de la configuración experimental que se utiliza para obtener registros amperométricos. Un electrodo de carbono se pone sobre la superficie de las células cromafines, y se lleva a un potencial que esté por arriba del potencial redox necesario para oxidar las moléculas transmisoras liberadas. (B) Cada evento exocítico individual es registrado como una espiga amperométrica, de la cual se pueden extraer parámetros asociados a diferentes etapas de la exocitosis (ver texto principal). I_{max} : amplitud de corriente máxima; $T_{1/2}$: tiempo transcurrido a la mitad de la amplitud máxima alcanzada; T_p : tiempo transcurrido desde el comienzo de la espiga (desde el final del *foot* cuando este es registrado) hasta la I_{max} ; τ_1 y τ_2 : constantes cinéticas de decaimiento del evento exocítico que son obtenidas por medio de un ajuste biexponencial $Y = Y_0 + A_1 (1 - e^{-t/\tau_1}) + A_2 (1 - e^{-t/\tau_2})$; Q: contenido cuántico obtenido de la integral de la espiga.

La corriente pequeña que precede a la espiga amperométrica, denominado "pie" (o *foot*, en inglés), brinda información sobre la estabilidad y conductancia del poro de fusión, el cual es un conducto hidrofílico formado entre las membranas vesicular y plasmática (Lindau y Alvarez de Toledo, 2003). La amplitud máxima de la espiga (I_{max}) corresponde a la corriente máxima causada por la liberación de catecolaminas durante la expansión del poro de fusión, y es una medida (aunque menos exacta que Q, ver más adelante) de la cantidad de catecolaminas liberadas. El tiempo medio ($T_{1/2}$) es una medida de la duración de la espiga amperométrica a la mitad de la

amplitud máxima alcanzada o I_{\max} , y tiene que ver con la duración del proceso de liberación de catecolaminas desde la vesícula. El tiempo al pico (T_p) corresponde al tiempo transcurrido desde que comienza el evento (sin contar el *foot*) hasta alcanzar I_{\max} , y otorga información sobre la cinética de expansión del poro de fusión. Las constantes cinéticas medidas durante la fase de decaimiento de la espiga amperométrica (τ_1 y τ_2) se asocian con la cinética de disociación de las catecolaminas de la matriz proteica vesicular. Finalmente, el área bajo la espiga es una medida del contenido cuántico (Q) o cantidad de transmisor liberado por evento individual. En la Ecuación 3.2 se muestra el cálculo de este parámetro como la integral de la corriente (I) en un intervalo de tiempo (dt); Q se puede calcular también como el producto entre el número de moléculas que reaccionan con la superficie del electrodo (M), el número de electrones donado por cada molécula oxidada (z) y la constante de Faraday ($F = 96.485 \text{ C/mol}$) (Zhou y col, 1996).

$$Q = \int I dt = zFM \quad (3.2)$$

La amperometría es una técnica menos invasiva que la electrofisiología con una elevada sensibilidad y gran resolución temporal. Sin embargo, posee ciertas limitaciones. (i) A diferencia de las técnicas electrofisiológicas que pueden registrar exocitosis y endocitosis, la amperometría sólo permite registrar la exocitosis. (ii) Sólo se pueden detectar aquellos productos de secreción susceptibles de sufrir oxidación o reducción en el electrodo de carbono. Esto limita su uso solamente a células que liberan adrenalina, noradrenalina, dopamina o serotonina, aunque es posible lograr introducir compuestos oxidables/reducibles en vesículas de células que naturalmente no los secretan. (iii) Finalmente, debemos considerar que la amperometría sólo registra los compuestos liberados en un área limitada de la superficie de la membrana. Esto implica que esta técnica permite la detección de cierto porcentaje de los eventos exocíticos que ocurren en la célula, a diferencia de las mediciones de capacitancia en célula completa que registran la totalidad de la exocitosis que ocurre en la superficie de la célula. De acuerdo a las

estimaciones realizadas bajo nuestras condiciones experimentales, la fibra de carbono utilizada en esta tesis abarcó aproximadamente el 25% de la superficie celular.

3.4.2 Preparación y selección de electrodos de carbono para experimentos de amperometría

Para la construcción de electrodos de amperometría se aislaron fibras únicas de carbono de 12 μm de diámetro a partir de un haz de fibras (generosamente obsequiado por el Dr. Guillermo Álvarez de Toledo, Universidad de Sevilla, España). Cada fibra aislada se introdujo posteriormente en capilares de borosilicato de 100 mm de largo y 1,5 mm de diámetro externo (B150F-4, World Precision Instruments). El conjunto del capilar con la fibra se llevó a un *puller* horizontal (SUTTER P-97), en donde se aplicó un protocolo de seis pulsos de calor y estiramientos sucesivos, obteniendo dos electrodos por capilar, donde una porción de fibra de carbono emerge de la punta de la micropipeta de vidrio resultante. Posteriormente, las puntas de los microelectrodos se sumergieron cuidadosamente en una resina aislante por aproximadamente dos segundos, la cual se encontraba a una temperatura de aproximadamente 95°C. Finalmente, los electrodos se llevaron a un horno a 180°C por 3 horas, y se dejaron secar por 24 horas a temperatura ambiente. Este tratamiento fija a la fibra de carbono a la punta de la micropipeta, y además sirve de aislante eléctrico de la estructura. Luego con un bisturí se corta una pequeña porción de la punta de la fibra de carbono expuesta y cubierta por la resina en 45°, obteniendo de esta manera una sección expuesta de la fibra de carbono (ver Figura 3.11.B)

Antes de ser utilizados, se les agrega al interior de los electrodos una solución conductora de KCl 3M para que estos puedan establecer continuidad eléctrica con el *holder* conectado al pre-amplificador o *headstage*, fijado al micromanipulador, y conectado con el amplificador principal (EPC-10, Heka Elektronik). Previamente a su uso en los experimentos, se evaluó la respuesta de los microelectrodos con el objetivo de comprobar su funcionalidad. Para esto, los electrodos se sumergieron en una solución de NaCl (145 mM), se

llevaron a un potencial de +650 mV, y se expusieron a adrenalina 10 mM. Si los electrodos eran funcionales, se obtenía el disparo abrupto de una señal de corriente amperométrica inmediatamente después del agregado de adrenalina, tal como se representa en la Figura 3.13. Con el transcurso del tiempo, esta señal se estabilizaba, y se mantenía hasta que el electrodo era retirado de dicha solución. Aquellos electrodos que no respondían al agregado de adrenalina, o que presentaban ruidos basales superiores a 10 pA se descartaron.

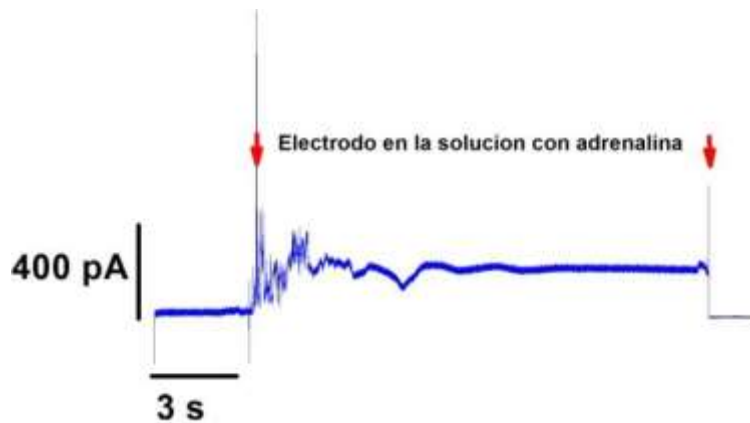


Figura 3.13- Trazado representativo de la respuesta de los electrodos de amperometría al agregado de adrenalina. La señal de corriente amperométrica (línea azul), registrada por el microelectrodo, muestra un claro aumento en respuesta al agregado de adrenalina 10 mM (entre flechas rojas).

3.4.3 Protocolo experimental y registros amperométricos

En todos los experimentos de amperometría mostrados en esta Tesis, el protocolo experimental se realizó de una misma manera. El mismo consistió en un registro de la corriente amperométrica sobre la célula seleccionada por un periodo de 120 segundos totales, donde en los primeros 20 segundos se registró la corriente basal y la aparición de posibles eventos exocíticos espontáneos. Luego (exactamente a los 20 s) se estimuló por 10 segundos con un *puff* del agonista nicotínico *1,1-dimethyl-4-phenyl-piperazinium* (DMPP, 50 μ M diluido en medio extracelular, ver Tabla 3.1), el cual fue administrado a través de una micropipeta de borosilicado posicionada aproximadamente a tres diámetros celulares ($\sim 30 \mu$ m) de la célula a registrar (ver Figura 3.11.C). El *puff* de DMPP fue impulsado por un microinyector neumático modelo PV820 (World

Precision Instruments) conectado a un tanque de N₂. Luego de la estimulación se continuó registrando la señal de corriente amperométrica por 90 segundos, hasta completar los 120 segundos totales de registro. Si bien la estimulación se realizó sobre células aisladas, teniendo en cuenta que el DMPP difunde fácilmente en medio acuoso, se procuró registrar células que estuviesen separadas como mínimo por una distancia de 15 diámetros celulares (~150 μm).

Para la adquisición de la señal amperométrica, se utilizó un amplificador de doble *patch clamp* con sistema conversor A/D-D/A integrado EPC10 *double-patch* (Heka Elektronik). Se empleó el *software patchmaster* (Heka Elektronik), que controla al amplificador, para diseñar el protocolo de registro, visualizar y analizar *a priori* los registros amperométricos. El análisis final de los registros de amperometría se realizó utilizando *macros* caseros generosamente provistos por la Dra. Ana María Cárdenas del Centro Interdisciplinario de Neurociencias de Valparaíso (CINV), los cuales fueron corridos en el *software* IGOR (Wavemetrics Inc.). De este análisis, se determinó el número de espigas obtenidas por célula y también los valores de los parámetros I_{\max} , $T_{1/2}$, T_p , τ_1 , τ_2 y Q para cada espiga individual. Finalmente, para estimar la cantidad de *foot*, cuantificamos la presencia de estas estructuras calculando el “porcentaje de *foot*”. Este parámetro nos permite tener una idea de la cantidad de eventos de tipo *foot* independientemente del número de espigas en cada registro, y se calcula como el cociente entre el número de *foot* y el número de espigas obtenidos dentro de cada célula, multiplicado por 100 ($(\frac{\text{Número de Foot}}{\text{Número de espigas}}) \times 100$). Además se determinó manualmente la duración y amplitud de cada *foot* individual (ver líneas y flechas rojas en el esquema del panel B de la Figura 3.12).

3.5 Técnicas de imágenes

3.5.1 Cuantificación del grado de polimerización de F-actina

Estos experimentos fueron realizados en el laboratorio de la Dra. Ana María Cárdenas, en la Universidad de Valparaíso, Chile.

Protocolo para fijar y marcar células

Las células ya expresando por separado los plásmidos DynIIWT-mCherry, DynIIA618T-mCherry, y DynIIS619L-mCherry, fueron lavadas por triplicado con la solución *buffer* KGEP (Glutamato-K⁺ 139 mM, PIPES 20 mM, EGTA 5 mM, ATP-Mg²⁺ 2 mM, 5 mM CaCl₂, pH: 6,6), para eliminar los remanentes del medio de cultivo DMEM. Con el objetivo de evaluar la formación *de novo* de F-actina, estas mismas células fueron permeabilizadas e incubadas por 20 min con una solución de digitonina 20 μM en conjunto con el conjugado fluorescente G-actina Alexa Fluor 488 0,3 μM en *buffer* KGEP. Luego las células fueron fijadas con una solución 4% de paraformaldehído (PFA) en *buffer* PBS por 15 min a una temperatura de 4°C. Una vez transcurrido ese tiempo, se lavaron los preparados por triplicado con *buffer* PBS para remover el exceso de PFA (cada lavado duró entre 5 a 10 min). Posteriormente para poder obtener una buena marca del núcleo celular, los preparados fueron incubados por 15 min con la sonda fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) en dilución 1/1000 con agua estéril. Finalmente, se realizó un nuevo lavado por triplicado con *buffer* PBS para eliminar el exceso de DAPI y se montaron a las células sobre portaobjetos estériles aplicando el medio de montaje DAKO[®], el cual se endurece a temperatura ambiente luego de 10 horas en oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo, los preparados fueron almacenados a una temperatura de 4°C hasta su uso.

Obtención de imágenes por microscopía confocal

La adquisición de imágenes se realizó con un microscopio confocal *laser scanning* C1 plus (NIKON), equipado con un objetivo 100x/1.49 Oil (Nikon). Para la observación de la expresión de DynIIWT-mCherry, DynIIA618T-mCherry, y DynIIS619L-mCherry la excitación se realizó a 543 nm y la emisión fue registrada a 600-620 nm; para la observación de la marca de F-actina, consecuencia de la polimerización del conjugado G-actina Alexa Fluor 488, la excitación se realizó a 488 nm y la emisión fue registrada a 500-520 nm; y para la observación de DAPI la excitación se realizó a 405 nm y la emisión se

registró a 430-470 nm. Las imágenes fueron adquiridas en los tres canales en el plano del ecuador celular.

Análisis de imágenes y cuantificación del grado de polimerización de F-actina

El análisis de las imágenes obtenidas por microscopía confocal se realizó con el programa *Image J* (NIH, USA). El objetivo era cuantificar el grado de polimerización de F-actina en células expresando las variantes de dinamina-2 WT, A618T y S619L (todas fusionadas al marcador fluorescente mCherry) (Figura 3.14.A). Para esto se utilizó un *macro* compatible con el programa mencionado arriba, el cual fue generosamente provisto por la Dra. Luciana Gallo del Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIByNE-UBA-CONICET). Este *macro* utiliza algoritmos que segmentan de forma automática la señal fluorescente en cada canal, generan a partir de esta segmentación, máscaras correspondientes en la imagen a analizar y, a partir de las máscaras se estima el área ocupada por la señal fluorescente correspondiente (mCherry, Alexa Fluor 488 y DAPI). En primer lugar, se substrajo la señal de *background* por medio del análisis con el algoritmo *Rolling Ball* (predeterminado en ImageJ), fijando un radio circular de 50 píxeles. El algoritmo determina un valor de *background* local para cada píxel, calculando un valor promedio para cada píxel con los valores de intensidades vecinos según el radio fijado. Este valor lo substraerá al valor de intensidad del píxel en la imagen original, removiendo así variaciones de intensidades generadas por un *background* o señal de fondo no deseada. Luego el *macro* aplicó una máscara que segmenta la señal roja fluorescente de mCherry (utilizando el algoritmo *Otsu*) y estimó el área total ocupada por mCherry. Teniendo en cuenta que esta sonda fluorescente se encuentra unida a la dinamina-2, y sabiendo que esta proteína se distribuye en todo el citosol, tomamos el valor de área ocupada por la señal mCherry como el valor del área total celular (Figura 3.14, paneles B y C). Simultáneamente, se aplicó una segunda máscara que aísla la señal fluorescente verde emitida por el conjugado G-actina Alexa Fluor 488 (utilizando el algoritmo *Renyi's Entropy*). Este algoritmo aísla la señal del fondo y 'binariza' la imagen otorgando un valor de 0 al fondo y un valor de 1 a los

objetos que poseen una señal mayor a un cierto umbral. En particular este algoritmo considera señal a todos los píxeles que posean un valor de intensidad mayor a 67 en la escala de grises (que va de 0 a 255). Dado que esta sonda fluorescente emite señal solamente donde se forman polímeros de G-actina, es decir donde hay formación de F-actina, consideramos el área ocupada por esta señal como el área celular donde se formaron filamentos de F-actina (Figura 3.14, paneles D y E). Finalmente, el *macro* aplicó una tercera máscara que permite segmentar, junto con el algoritmo *Otsu*, la señal emitida por la sonda azul fluorescente DAPI, la cual es específica de la región nuclear. Como en este estudio solamente nos interesa obtener información de la formación de F-actina que tiene lugar en el citosol, la marca de DAPI nos permitió estimar el área del núcleo celular, substrair este dato del valor del área total celular y obtener un valor más confiable del área del citosol (Figura 3.14, paneles F y G). Entonces la cuantificación del grado de polimerización de F-actina en células cromafines bovinas (representado como el porcentaje del área citosólica que presenta formación de F-actina), se calculó como:

$$\left(\frac{\text{Área formación de F-actina}}{\text{Área total celular} - \text{Área del núcleo}} \right) \times 100.$$

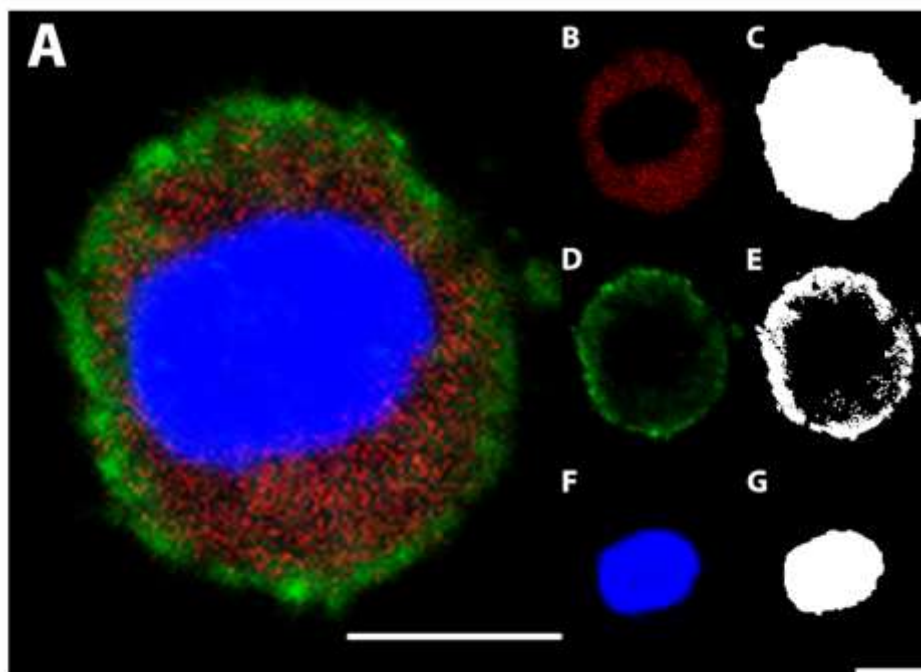


Figura 3.14- Imágenes representativas del análisis para evaluar el grado de polimerización de F-actina. **(A)** Se muestra una célula cromafín bovina típica expresando los tres canales fluorescentes a analizar: el canal rojo pertenece a la expresión de la variante de

dinamina-2 WT unida a la sonda mCherry; el canal verde que indica la formación de F-actina producto de la polimerización del conjugado G-actina Alexa Fluor 488; y por último el canal azul, que nos muestra la tinción con la sonda DAPI, la cual marca específicamente el núcleo celular. En **(B)**, **(D)** y **(F)** se muestran las señales de mCherry, Alexa Fluor 488 y DAPI, respectivamente, con sus correspondiente máscaras en **(C)**, **(E)** y **(G)**. Barra de escala (en blanco) = 5 μm .

3.5.2 Cuantificación de los cúmulos de dinamina-2 A618T y S619L, y análisis de la distribución de gránulos secretorios

Protocolo de estimulación y fijación células

Las células co-expresando las variantes de dinamina-2 WT, A618T y S619L (unidas a EGFP) y el marcador de gránulos secretorios NPY (neuropéptido Y, unido a mCherry), fueron lavadas por triplicado con *buffer* PBS para eliminar el remanente de medio de cultivo DMEM. En la condición experimental con estimulación, luego del lavado inicial con PBS, las células fueron incubadas por 10 s con una solución del agonista nicotínico DMPP 50 μM (*1,1-dimethyl-4-phenyl-piperazinium*) en una solución idéntica a la utilizada en el baño de los experimentos electrofisiológicos (ver sección 3.3, Tabla 3.1). Luego las células fueron fijadas con una solución PFA 4% y sacarosa 4% en *buffer* PBS. Posteriormente se les realizó un lavado con PBS y fueron incubadas durante 10 minutos con TRIS 10 mM (*trisaminometane*) en PBS, para desactivar la fluorescencia del PFA. Finalmente, se les realizó un último lavado por quintuplicado con PBS para luego aplicarles el medio de montaje Mowiol®, el cual se endurece a temperatura ambiente luego de 16 horas en oscuridad. Luego de ese período de tiempo, las células fueron almacenadas a una temperatura de 4°C hasta su uso.

Obtención de imágenes por microscopía confocal

La adquisición de imágenes se realizó con un microscopio confocal FV300 (OLYMPUS), empleando el objetivo Plan-Apochomat 60X/1.4 Oil DIC (OLYMPUS). Para la observación del marcador verde fluorescente EGFP la excitación se realizó a 488 nm y la emisión fue registrada a 500-520 nm; para

la observación del marcador rojo fluorescente mCherry la excitación se realizó a 543 nm y la emisión fue registrada a 600-620 nm. La adquisición de las imágenes en los dos canales se realizó en las dimensiones X, Y y Z. En esta última se utilizó la función *Z-stacks*, la cual obtiene planos confocales separados por una distancia de 0,35 μm a lo largo del eje Z.

Cuantificación de los cúmulos de dinamina-2 WT, A618T y S619L, y análisis de la dinámica y distribución de los gránulos secretorios

Utilizando el programa *Image J* (NIH, USA) se realizó el análisis de las imágenes obtenidas por microscopía confocal de células cromafines bovinas co-expresando las variantes de dinamina-2 WT, A618T y S619L (todas unidas a EGFP) (Figura 3.15.A), por separado, y el marcador de gránulos secretorios NPY-mCherry. Los objetivos de este análisis fueron cuantificar la formación de cúmulos de dinamina-2 y analizar la cantidad y distribución de gránulos secretorios en presencia de las diferentes variantes de dinamina, en células con y sin estímulo. Para estudiar la formación de los cúmulos, en cada imagen adquirida tridimensionalmente se substrajo la señal de *Background* (Figura 3.15.B) por medio del análisis con el algoritmo *Rolling Ball* (radio circular de 20 píxeles) (ver *Análisis de imágenes y cuantificación del grado de polimerización de F-actina* en la sección 3.5.1 de Materiales y Métodos). Luego se segmentó de forma automática la señal verde fluorescente de EGFP (unido a la dinamina) utilizando otros dos algoritmos predeterminados del *Image J* (*Intermodes* y *Watershed*) (Figura 3.15.C). *Intermodes* aísla la señal del fondo y ‘binariza’ la imagen otorgando un valor de 0 al fondo y un valor de 1 a los objetos que poseen una señal mayor a un cierto umbral (determinado automáticamente). Luego, el algoritmo *Watershed* separa las estructuras pegadas para que puedan ser contabilizadas como objetos individuales. Con la imagen segmentada empleamos el *plugin* 3DOC (en inglés, *3D Object Counter*), el cual identifica estructuras conectadas en los distintos planos Z. Este *plugin* permite la reconstrucción en tres dimensiones de cada cúmulo formado y el cálculo de su superficie externa, como valor de área en μm^2 (Figura 3.15.D). El cálculo del área se inicia con la esquematización de un anillo (con una profundidad de 0,35 μm) alrededor de cada cúmulo en cada plano Z, para luego realizar una

sumatoria del área externa de todos los anillos en todos los planos de esa dimensión. Adicionalmente, empleando el algoritmo *Surface Map* (Figura 3.15.E), podemos visualizar el esquema de cada uno estos anillos alrededor de cada agregados de dinamina en cada plano XY. Finalmente, utilizando el *plugin 3D Viewer* logramos obtener una imagen de la reconstrucción tridimensional de cada agregado (Figura 3.15.F).

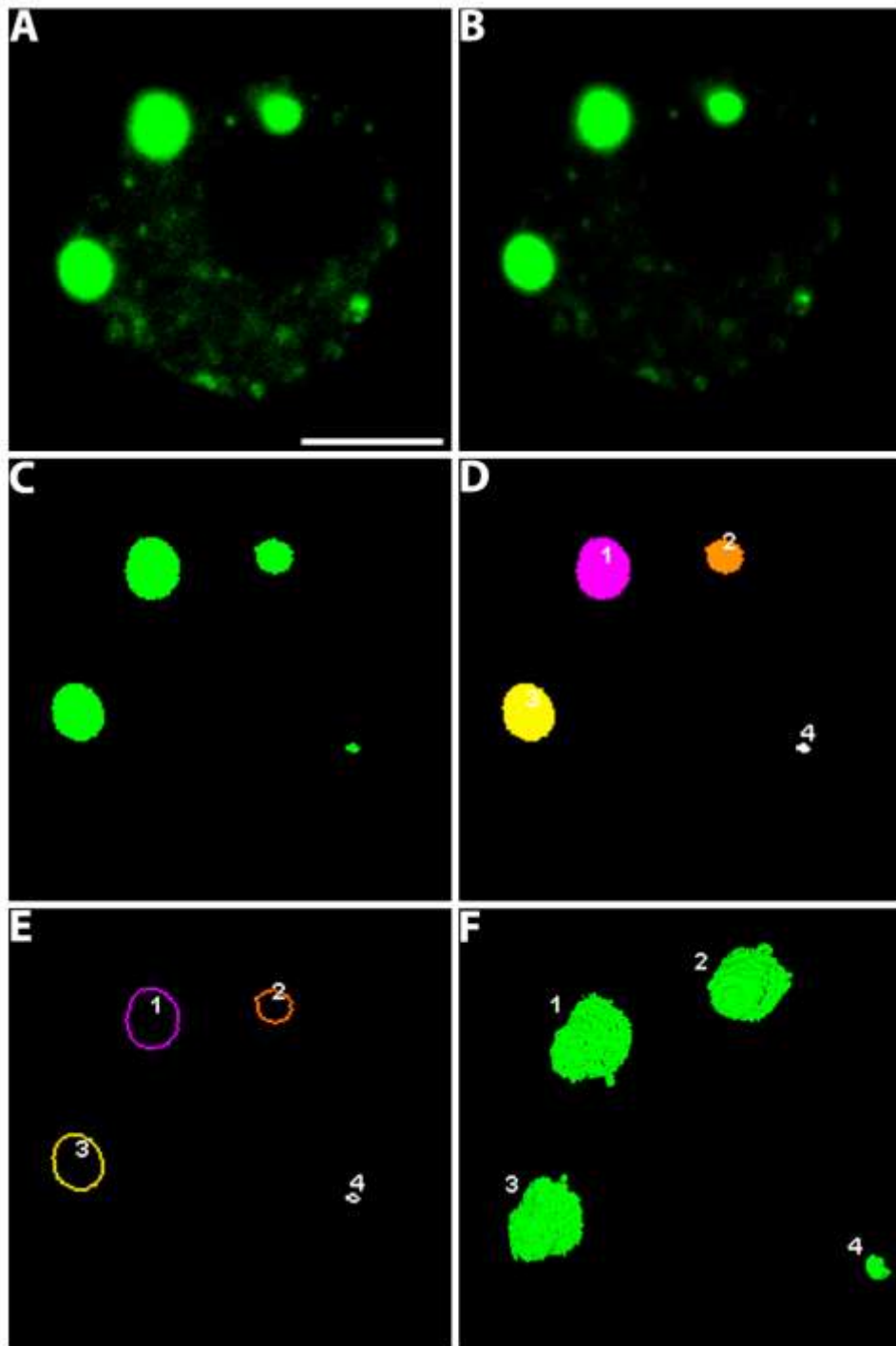


Figura 3.15- Imágenes representativas que ilustran el análisis de los agregados formados en células expresando las distintas variantes de dinamina-2. (A) Se muestra la imagen de fluorescencia de EGFP, previa a la extracción del *background*, de una célula cromafin bovina típica expresando la mutante de dinamina-2 S619L. Es notable la tendencia que posee esta mutante a formar grandes agregados citoplasmáticos. **(B)** Misma imagen que en (A) pero con la señal de *background* substraída por el algoritmo *Rolling Ball* **(C)** Los algoritmos predeterminados del programa Image J, *Intermodes* y *Watershed*, permiten segmentar a estos agregados de dinamina-2 en los planos X, Y y Z. Aquí se muestra a modo representativo un solo plano XY del análisis realizado en 3D. **(D)** El *plugin 3D Object Count* permite aislar los cúmulos tridimensionalmente y catalogarlos numéricamente como entidades individuales (Cúmulos 1, 2, 3 y 4). Además este *plugin* permite una estimación del área externa de cada uno de estos agregados (en μm^2), por medio de la sumatoria de las áreas externas de los anillos esquematizados alrededor de cada uno de estos cúmulos en cada plano XY (ver texto principal). **(E)** Al emplear el algoritmo *Surface Map* podemos visualizar los anillos formados alrededor de cada cúmulo en cada plano XY. **(F)** Empleando el *plugin 3D Viewer* podemos observar en detalle cómo se reconstruye tridimensionalmente los cúmulos 1, 2, 3 y 4. Barra de escala (en blanco) = 5 μm .

El análisis de la cantidad y distribución de los gránulos secretorios marcados con la expresión de NPY-mCherry en células cromafines con y sin estímulo, se realizó para cada condición experimental (WT, A618T y S619L) sobre las imágenes adquiridas en el plano ecuatorial celular. Procedimos de esta forma, dado que en este plano específico teníamos la posibilidad de obtener una estimación más precisa, en cuanto a cantidad y ubicación, de las vesículas secretorias próximas a la membrana plasmática. Además, tomar el plano ecuatorial es una forma simple de estandarizar nuestras mediciones, ya que es un plano fácilmente identificable al microscopio. El análisis fue realizado con un *macro* casero generosamente provisto por la Dra. Luciana Gallo, el cual se ejecutó a través del programa Image J (NIH, USA). En el plano Z ecuatorial de cada célula, el *macro* aplicó diferentes algoritmos, donde cada uno de ellos ejecutó una máscara para reconocer la señal fluorescente de los marcadores EGFP (dinamina) y mCherry (NPY en gránulos secretorios) (Figura 3.16.A). Dada la distribución de la dinamina en el citosol, la primera máscara aplicada, la cual empleó el algoritmo de segmentación automática *Huang*, segmentó la señal verde fluorescente del EGFP para estimar el área total celular (Figura 3.16, paneles B y C). Posteriormente, una segunda máscara, que utilizó el

algoritmo de segmentación automática *MaxEntropy*, fue aplicada para reconocer y estimar el área abarcada por la señal roja fluorescente mCherry. Esto último sirvió para tener una estimación del área ocupada por los gránulos secretorios en todo el citoplasma (Figura 3.16, paneles D y E). Seguidamente con este último algoritmo, se ejecutó una máscara adicional, la cual estimó el área de la señal mCherry dentro de un anillo de 1 μm de espesor (en el plano X e Y) alineado circunferencialmente con los límites del área total (determinada por la marca de EGFP). Esto nos permitió obtener una apreciación de la proximidad de la marca de NPY, que identifica a los gránulos secretorios, con la membrana plasmática (Figura 3.16, paneles F y G). Estos datos nos permitieron calcular el porcentaje de NPY total en el plano ecuatorial de la célula, como el porcentaje del cociente entre el área ocupada por la marca de NPY-mCherry y el área total celular ($(\frac{\text{Área NPY ecuador celular}}{\text{Área total celular}}) \times 100$), también el porcentaje de NPY en la periferia, calculado como el porcentaje del cociente entre el área ocupada por la marca de NPY-mCherry dentro del anillo y el área total del anillo ($(\frac{\text{Área NPY dentro del anillo}}{\text{Área total del anillo}}) \times 100$), y finalmente, el porcentaje del cociente entre la marca de NPY en la periferia y la marca de NPY total ($(\frac{\text{Área NPY dentro del anillo}}{\text{Área NPY ecuador celular}}) \times 100$), el cual nos da información del porcentaje de marca NPY en el plano ecuatorial (NPY total) que se localiza en la periferia (NPY periferia).

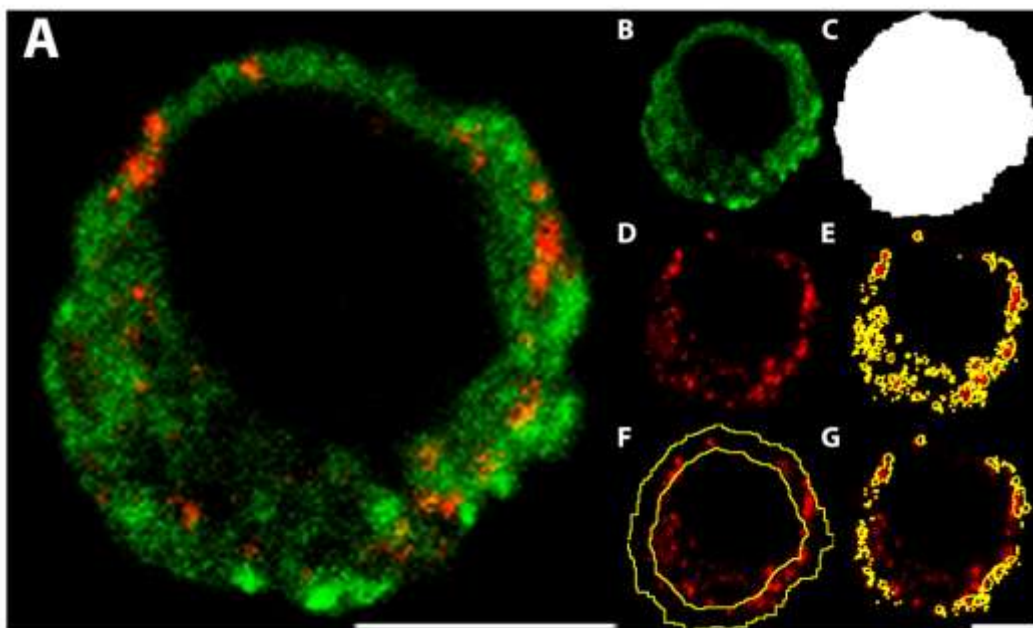


Figura 3.16- Imágenes representativas que ilustran el análisis de la cantidad y distribución de gránulos secretorios en células expresando las distintas variantes de dinamina-2. (A) Se muestra el plano ecuatorial de una célula cromafin bovina típica co-expresando la isoforma de dinamina-2 WT (EGFP) y el marcador de gránulos secretorios NPY (mCherry). (B) y (D) Se muestran las marcas de EGFP y mCherry en el plano ecuatorial, respectivamente, con sus correspondientes máscaras en (C) y (E). En (F) se muestra la máscara del anillo de 1 μm de espesor (línea amarilla), alineado circunferencialmente con el límite celular, superpuesta con la marca de mCherry total en el plano del ecuador celular. En (G) se observa la máscara, que cuantifica el área ocupada por mCherry dentro del anillo mostrado en (F), superpuesta con la marca de mCherry total en el plano ecuatorial. Barra de escala (en blanco) = 5 μm .

3.6 Estadística

La comparación entre dos grupos experimentales con datos que siguen una distribución normal se realizó aplicando el test de *Student* para dos muestras independientes. De la misma forma, para comparar dos grupos experimentales con datos que no siguieron una distribución normal, se aplicó el test de *Mann-Whitney* para dos muestras independientes. La comparación de más de dos muestras independientes con distribuciones normales en los datos se realizó mediante un análisis de varianza (*ANOVA*) y contrastes a posteriori de *Bonferroni*. Por lo contrario, para aquellas muestras experimentales que presentaban datos con una distribución no normal, se utilizó un test *ANOVA* no paramétrico (test de *Kruskal-Wallis* con contraste de *Dunn's*). La comparación estadística entre muestras experimentales que fueron representadas como histogramas de frecuencias acumuladas, se realizó por el test de *Kolgomorov-Srminov* para dos muestras independientes. Todos estos test se realizaron mediante los *softwares* Origin Pro 8.0 (Microcal Software, Northhampton, MA) y SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Germany).

3.7 Reactivos

Los reactivos poli-L-lisina, citosina-1- β -arabinofuranósido, papaína, albúmina sérica bovina, Mg^{2+} -ATP, Li^{+} -GTP, $\text{GTP}\gamma\text{S}$, *Bisindolylmaleimide XI* (BIS XI), *Phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA) y DAPI, se compraron en

Sigma Aldrich (St Louis, MO, EEUU); el medio de cultivo Dulbecco (DMEM), el suero fetal bovino, la gentamicina y la penicilina/estreptomicina, son de GIBCO (Carlsbad, CA, EEUU). La tetratoxina (TTX) y la estaurosporina son de Alomone Laboratories (Har Hotzvim Hi-Tech Park, Jerusalem, Israel). El anticuerpo monoclonal contra dinamina (1&2) se adquirió BD Biosciences (San Jose, CA, EEUU). El conjugado de G-actina Alexa Fluor 488 se compró en Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA).

4. Resultados y Discusión I

4.1 Dependencia de la endocitosis con la magnitud del estímulo

4.1.1 Dependencia de la endocitosis con la duración del estímulo

Como mencionamos en la introducción de esta Tesis, en nuestro laboratorio se demostró en células cromafines de ratón que el pool vesicular IRP se encuentra altamente acoplado a CCVD del tipo P/Q, gracias en parte a una interacción molecular en la que interviene la secuencia synprint de dicho canal (Alvarez y col, 2008; Alvarez y col, 2013). Esta íntima interacción entre vesículas y canales permite que IRP sea liberado completamente por pulsos despolarizantes relativamente cortos, particularmente por una despolarización cuadrada (SQP) de 50 ms de duración en nuestras condiciones experimentales (Alvarez y col, 2013). Por otro lado, también encontramos que dentro de IRP existe un subconjunto de vesículas secretorias que es excitado por un estímulo con forma de potencial de acción (PAs), al cual se lo llamó ETAP por sus siglas en inglés (*Exocytosis Triggered by Action Potential*, Moya-Díaz y col, 2016). En dicho trabajo observamos que la exocitosis de ETAP es seguida en forma prácticamente inmediata por una endocitosis rápida, dinamina dependiente, que re-internaliza la totalidad de la membrana previamente excitada. Por lo tanto decimos que dicha endocitosis es totalmente compensatoria (veremos a lo largo de esta Tesis que la compensación de la exocitosis por la endocitosis puede ser total o parcial). Además encontramos que dicha endocitosis es un paso fundamental en el proceso de recuperación rápida de las vesículas secretorias asociadas a ETAP. Sin embargo, previamente a esta Tesis no se estudió en forma sistemática las características de la endocitosis inducida en respuesta a la liberación de fracciones de IRP mayores a ETAP. Esto es importante, ya que puede tener implicancias en el ciclado de IRP, y por lo tanto en la contribución de este *pool* vesicular a la

secreción de las células cromafines cuando estas son estimuladas de manera sostenida.

Por lo tanto, en este trabajo de Tesis Doctoral nos propusimos estudiar las características cinéticas, la eficiencia compensatoria y los posibles mecanismos asociados a la endocitosis activada luego de la liberación de fracciones crecientes de IRP, particularmente desde la liberación de ETAP hasta la liberación completa de IRP. Para esto se utilizó un protocolo experimental que consistió en un conjunto de despolarizaciones de duración variable, separadas entre sí por intervalos de 30 segundos: PAs (5 ms) y SQPs de 5, 10, 25 y 50 ms (definidos de acá en más como SQP5ms, SQP10ms, SQP25ms y SQP50ms, respectivamente, ver sección 3.3 en Materiales y Métodos, para más detalles). Dicho conjunto de estímulos se aplicó sobre cada célula individual en orden aleatorio. Realizamos nuestros experimentos a una concentración de Ca^{2+} externo de 5 mM por ser la condición control utilizada clásicamente en nuestro laboratorio, y en la que se favorece la exocitosis de IRP (Álvarez y col, 2013; Moya-Díaz y col, 2016; Montenegro y col, 2020).

En el panel A de la Figura 4.1 se representan los estímulos PAs, SQP5ms y SPQ50ms (i), como así también trazados representativos de las corrientes de Ca^{2+} correspondientes (ii). Por otro lado, el diagrama del panel B resume la cuantificación de dichas corrientes (las barras representan los promedios, mientras los círculos abiertos representan los valores experimentales individuales), donde se puede observar que la amplitud de las corrientes ($I_{\text{Ca}^{2+}}$) es significativamente menor para todos los SQPS empleados respecto PAs. Esto último es debido a que la despolarización con un PAs alcanza un mayor potencial de membrana que cuando se aplican SQPs, lo cual permite la activación de una mayor población de CCVD en un corto tiempo (Moya-Díaz y col, 2016). Sin embargo la integral de las corrientes de Ca^{2+} ($\int I_{\text{Ca}^{2+}}$) respecto al tiempo, una variable asociada a la cantidad total de calcio que entra al citosol durante todo el período de activación de la corriente, muestra una clara tendencia a aumentar entre PAs y la serie de pulsos cuadrados, y se hace significativa más grande para los pulsos despolarizantes SQP25ms y SQP50ms respecto PAs y SQP5ms (Figura 4.1.C).

En la Figura 4.2.A se muestran trazados representativos de los cambios de capacitancia de membrana inducidos por PAs, SQP5ms y SQP50ms,

respectivamente. Se observa un lógico aumento de la exocitosis para el estímulo más prolongado respecto de los más cortos.

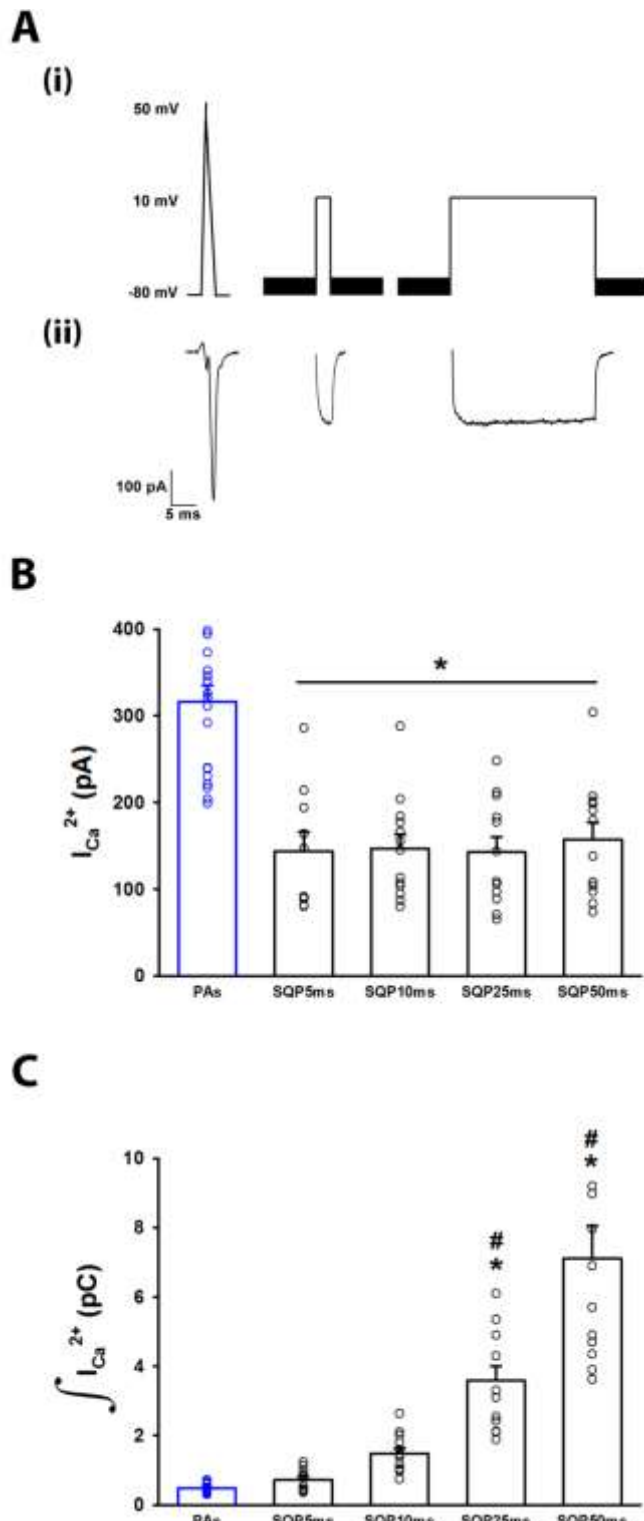


Figura 4.1 – Corrientes y entradas de calcio inducidas por los distintos estímulos aplicados. (A)

(i) Esquema de estímulos aplicados. Los PAs se componen de una rampa ascendente de 2,5 ms de duración que crece desde el potencial de *holding* (-80mV) hasta +50 mV, y una rampa descendente de la misma duración que retorna al potencial de *holding*. También se utilizaron SQPs de diferentes duraciones (5, 10, 25 y 50 ms), que consisten en una despolarización instantánea desde -80 mV a +10 mV, para luego retornar instantáneamente al potencial de *holding*. Aquí se representan solamente SQP5ms y SQP50ms. (ii) Ejemplos representativos de corrientes de Ca^{2+} para los estímulos graficados en (i). **(B)** El gráfico muestra el promedio de los valores de $I_{Ca^{2+}}$ (\pm ES) y los valores experimentales individuales (una medición por célula) para PAs (barra azul vacía y círculos azules vacíos, respectivamente) y para SQP5-50ms (barras negras vacías y círculos negros vacíos, respectivamente). Las $I_{Ca^{2+}}$ correspondientes a todos los SQPs son significativamente menores que la obtenida para PAs. **(C)** Se grafican los promedios y los valores experimentales individuales de $\int I_{Ca^{2+}}$ (\pm ES) para PAs y para todos los SQPs empleados, siguiendo el mismo código de colores que en (B). Los valores de SQP25ms y SQP50ms resultaron significativamente mayores que PAs (*) y que SQP5ms (#). El número de células registradas para PAs (n=21) y

de $\int I_{Ca^{2+}}$ (\pm ES) para PAs y para todos los SQPs empleados, siguiendo el mismo código de colores que en (B). Los valores de SQP25ms y SQP50ms resultaron significativamente mayores que PAs (*) y que SQP5ms (#). El número de células registradas para PAs (n=21) y

SQP5-50ms (n=10, 14, 12, 12, respectivamente) es el mismo para los dos parámetros graficados. Análisis de varianza (ANOVA) - Test de *Bonferroni*, *p<0,001; # p<0,001.

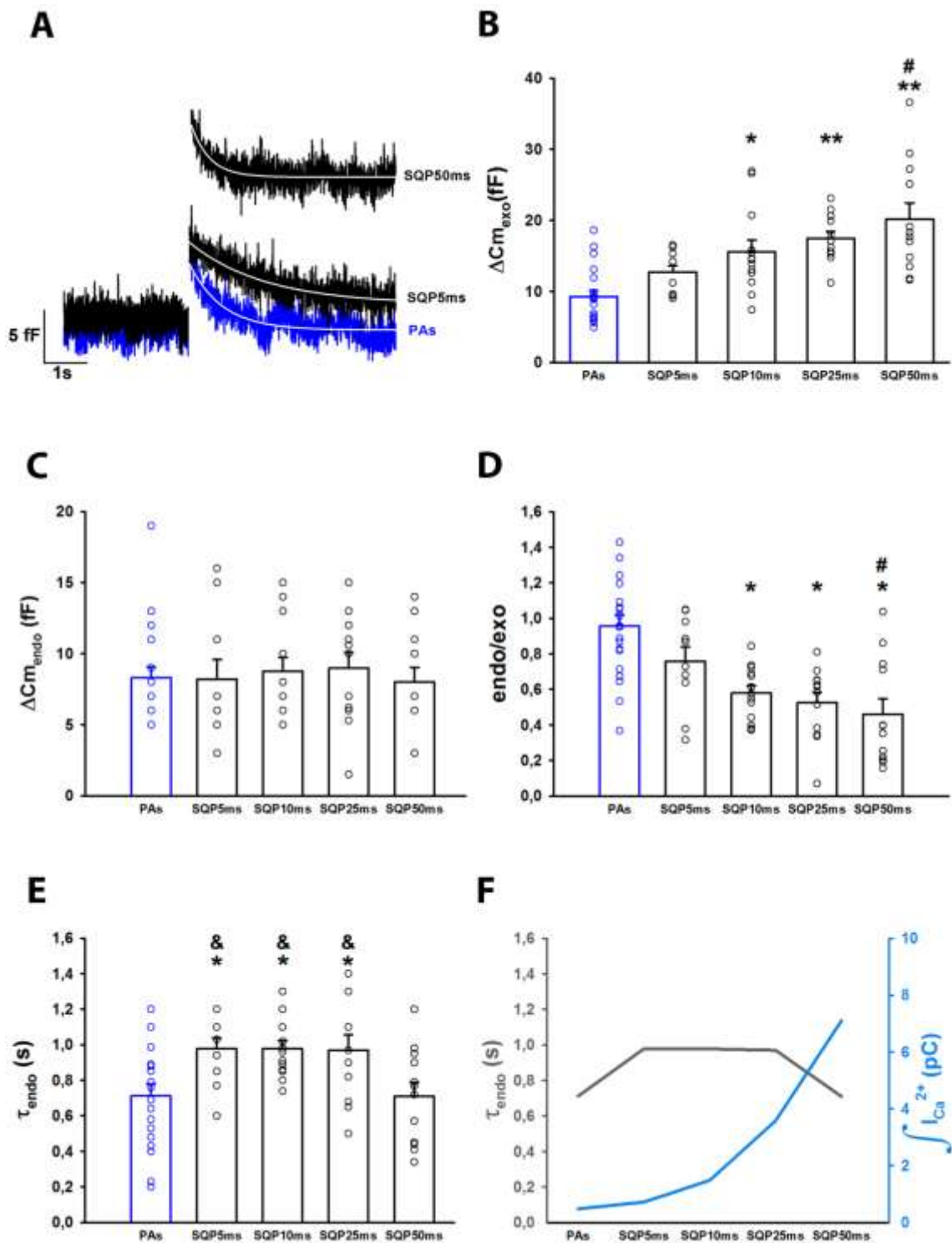


Figura 4.2 – Exocitosis y endocitosis inducidas por los distintos estímulos aplicados. (A) Trazados de capacitancia representativos para los estímulos PAs (trazado azul), y para SQP5 y SQP50ms (trazados negros). Las líneas blancas superpuestas a las caídas de los registros representan el ajuste de las mismas a una función monoexponencial decreciente de la forma Y

$= A e^{-t/\tau_{\text{endo}}} + Y_0$ ($\tau_{\text{endo PAs}}$: 0,74 s, $R>0,8693$; $\tau_{\text{endo SQP5ms}}$: 0,98 s, $R>0,8538$; $\tau_{\text{endo SQP50ms}}$: 0,6 s, $R>0,8399$). Los valores de τ_{endo} informados de aquí en adelante en esta Tesis se obtuvieron siempre por medio de este mismo tipo de ecuación de ajuste. **(B), (C), (D) y (E)** Los gráficos muestran los promedios (barras) (\pm ES) y los valores experimentales individuales (círculos, una medición por célula) de $\Delta C_{m_{\text{exo}}}$, $\Delta C_{m_{\text{endo}}}$, endo/exo y τ_{endo} , respectivamente, para PAs (en azul) y para SQP5-50ms (en negro). Se puede observar que $\Delta C_{m_{\text{exo}}}$ aumenta significativamente para los SQP10ms, SQP25ms y SQP50ms respecto PAs (* y **), y para SQP50ms respecto de SQP5ms (#), mientras que $\Delta C_{m_{\text{endo}}}$ se mantiene constante para todos los estímulos empleados. Consecuentemente, la relación endo/exo se hace estadísticamente diferente para los estímulos SQP10-50ms respecto de PAs (*) y para SQP50ms respecto de SQP5ms (#). Por otro lado, τ_{endo} se comporta de manera bifásica, desacelerándose significativamente para los SQP5-25 ms respecto de PAs (*), para luego acelerarse de forma significativa para SQP50ms en comparación con los otros SQPs (&). **(F)** Esquema comparativo del comportamiento de τ_{endo} y de $\int I_{\text{Ca}}^{2+}$ respecto de los pulsos utilizados. Notar que el aumento $\int I_{\text{Ca}}^{2+}$ entre SQP25ms y SQP50ms coincide con la aceleración de la endocitosis (disminuye τ_{endo}). El número de células promediadas fue el mismo para PAs (n=21) y para SQPs de 5, 10, 25 y 50 ms (n=10, 14, 12, 12, respectivamente) en todos los parámetros graficados. Análisis de varianza (ANOVA) - Test de *Bonferroni* (*p<0,005; **p<0,001; # p<0,001; & p<0,025). Se realizaron comparaciones post-ANOVA de SQP5-50ms vs PAs (signos inferiores por arriba de las barras) y de SQP10-50ms vs SQP5ms (signos superiores por arriba de las barras), para todos los parámetros estudiados excepto para τ_{endo} vs estímulos, donde la comparación se realizó de la siguiente forma: entre SQP5-50ms vs PAs (*) y entre PAs y SQP5-25ms vs SQP50ms (&).

Sin embargo lo más interesante es que mientras para PAs la endocitosis compensa completamente el cambio de capacitancia provocado por la exocitosis anterior, esto no es así para las despolarizaciones SQP50ms. En el panel B se representan los promedios y los valores individuales de la amplitud de la exocitosis registrada ($\Delta C_{m_{\text{exo}}}$) para los distintos estímulos aplicados. $\Delta C_{m_{\text{exo}}}$ se estimó obteniendo la diferencia entre el promedio de los últimos valores de capacitancia correspondientes a la línea de base previa al estímulo y el promedio de los primeros valores de capacitancia luego de la estimulación (ver Figura 3.10 y sección 3.3 en Materiales y Métodos). Se puede ver que a medida que se aumentó la duración del pulso despolarizante desde PAs hasta SQP50ms, se incrementaron gradualmente los valores de $\Delta C_{m_{\text{exo}}}$, por resultado de la liberación progresiva del IRP (Álvarez y col, 2013). Este comportamiento de $\Delta C_{m_{\text{exo}}}$ acompaña la variación de $\int I_{\text{Ca}}^{2+}$, lo cual es esperable dada la dependencia directa entre la entrada de Ca^{2+} y la exocitosis

(Dodge y Rahamimoff, 1967b). Por otro lado, en el panel C se muestran graficados los promedios de los valores absolutos de endocitosis ($\Delta C_{m_{\text{endo}}}$), la cual se calculó como la diferencia entre el promedio de los primeros valores de capacitancia post-estímulo y los valores de capacitancia obtenidos 5 s luego del estímulo (ver Figura 3.10 y sección 3.3 en Materiales y Métodos).

Es llamativo que $\Delta C_{m_{\text{endo}}}$ se mantiene constante para todos los estímulos aplicados. Se debe notar que esto ocurre pese al ya mencionado aumento de $\Delta C_{m_{\text{exo}}}$ con la duración del estímulo. Nos preguntamos cuál sería la razón para este comportamiento de la endocitosis. Una posibilidad sería la hipótesis planteada por los grupos de Timothy Ryan y Lin Gang Wu, que basándose en resultados obtenidos en neuronas hipocampales y cálix de Held, respectivamente, sostuvieron que la maquinaria asociada a la endocitosis rápida se saturaría y por lo tanto no podría hacer frente a demandas mayores (Sankaranarayanan y Ryan, 2000; Wu y Wu, 2014b). Otra posibilidad es que esto sea el resultado de un estadio de transición entre dos procesos. Es decir, que la endocitosis rápida que se produce en respuesta a PAs (Moya-Díaz y col, 2016) se inhiba con el incremento de la estimulación, pero que su caída sea compensada por la aparición de otro mecanismo endocítico. Esta última hipótesis es más compleja y poco intuitiva, pero es coherente con observaciones realizadas por diferentes autores, que reportaron mecanismos endocíticos que son inhibibles y otros que son activables por Ca^{2+} (Von Gersdorff y Matthews, 1994; Chan y Smith, 2001; Chan y Smith, 2003a; Leitz y Kavalali, 2011; Armbruster y col, 2013). Finalmente, en la Figura 4.2.D se muestran los valores de la relación endo/exo, la cual denota la eficiencia de la endocitosis para compensar a la exocitosis previa. Este parámetro se calcula como el cociente entre el valor $\Delta C_{m_{\text{endo}}}$ y el valor $\Delta C_{m_{\text{exo}}}$ obtenidos de una misma medición (ver Figura 3.10 y sección 3.3 en Materiales y Métodos). Dado que los valores de $\Delta C_{m_{\text{endo}}}$ se mantienen constantes y los de $\Delta C_{m_{\text{exo}}}$ son crecientes dentro del rango de estimulación utilizado, lógicamente la relación endo/exo mostró una clara tendencia decreciente, que se hace significativa a partir de despolarizaciones SQP10ms cuando se compara con PAs, y a SQP50ms si comparamos con SQP5ms. Además la Figura 4.2.D confirma la apreciación previa realizada a partir de la simple observación de los trazados de capacitancia de la Figura 4.2.A, respecto a que la endocitosis evocada en

respuesta a PAs es completamente compensatoria de la exocitosis previa (endo/exo \approx 1), mientras que para pulsos que promueven mayor $\int I_{Ca^{2+}}$ y mayor $\Delta C_{m_{exo}}$, esta se va volviendo progresivamente sólo parcialmente compensatoria (endo/exo $<$ 1). Continuando con la idea de estudiar las características de la endocitosis a medida que liberamos fracciones crecientes de IRP, evaluamos el comportamiento cinético de la misma por medio de la estimación de la constante temporal τ_{endo} . Esta constante se obtiene de ajustar la caída de capacitancia que se manifiesta luego de finalizada la exocitosis a una ecuación monoexponencial decreciente del tipo $Y = A e^{-t/\tau_{endo}} + Y_0$ (ver Figura 3.10 y sección 3.3 en Materiales y Métodos). En la Figura 4.2.A se muestran los ajustes (líneas blancas) realizados sobre los trazados experimentales originales obtenidos en respuesta a estímulos PAs, SQP5ms y SQP50ms, mientras que en la Figura 4.2.E se representan los promedios y los valores individuales de τ_{endo} obtenidos para todos los estímulos empleados.

Es interesante que mientras que para PAs obtuvimos un valor de $\tau_{endo} \approx 0,75$ s, muy similar al previamente reportado por nuestro laboratorio (Moya-Díaz y col, 2016), para SQP5ms, SQP10ms y SQP25ms la endocitosis se desaceleró significativamente alcanzando valores de τ_{endo} próximos a 1 s. Sin embargo, para SQP50ms la endocitosis se volvió a acelerar adquiriendo un valor de $\tau_{endo} \approx 0,7$ s, el cual es estadísticamente menor que los correspondientes a los otros SQPs, pero similar al de PAs. Esto denota un comportamiento bifásico en la velocidad de la endocitosis en relación al tipo de estímulo aplicado, y que se desarrolla a medida que la entrada de Ca^{2+} crece gradualmente (esto se esquematiza en la Figura 4.2.F). De hecho, es sabido que el Ca^{2+} citosólico es un factor que puede afectar a la endocitosis de manera bifásica (Chan y Smith, 2001; Fulop y Smith, 2006). Por lo tanto, regraficamos los parámetros representados en la Figura 4.2 ($\Delta C_{m_{exo}}$, $\Delta C_{m_{endo}}$, endo/exo y τ_{endo}) versus los promedios de $\int I_{Ca^{2+}}$ obtenidos para cada uno de los diferentes tipos de estímulos (Figura 4.3, paneles A, B, C y D, respectivamente). Mientras que $\Delta C_{m_{exo}}$ sigue, de acuerdo a lo esperado, un comportamiento creciente y saturable (Dodge y Rahamimoff, 1967b), y endo/exo se comporta como una curva decreciente opuesta a $\Delta C_{m_{exo}}$ debido a

que $\Delta C m_{\text{endo}}$ se mantiene constante, τ_{endo} se comporta de manera claramente bifásica con el aumento de la $\int I_{Ca^{2+}}$.

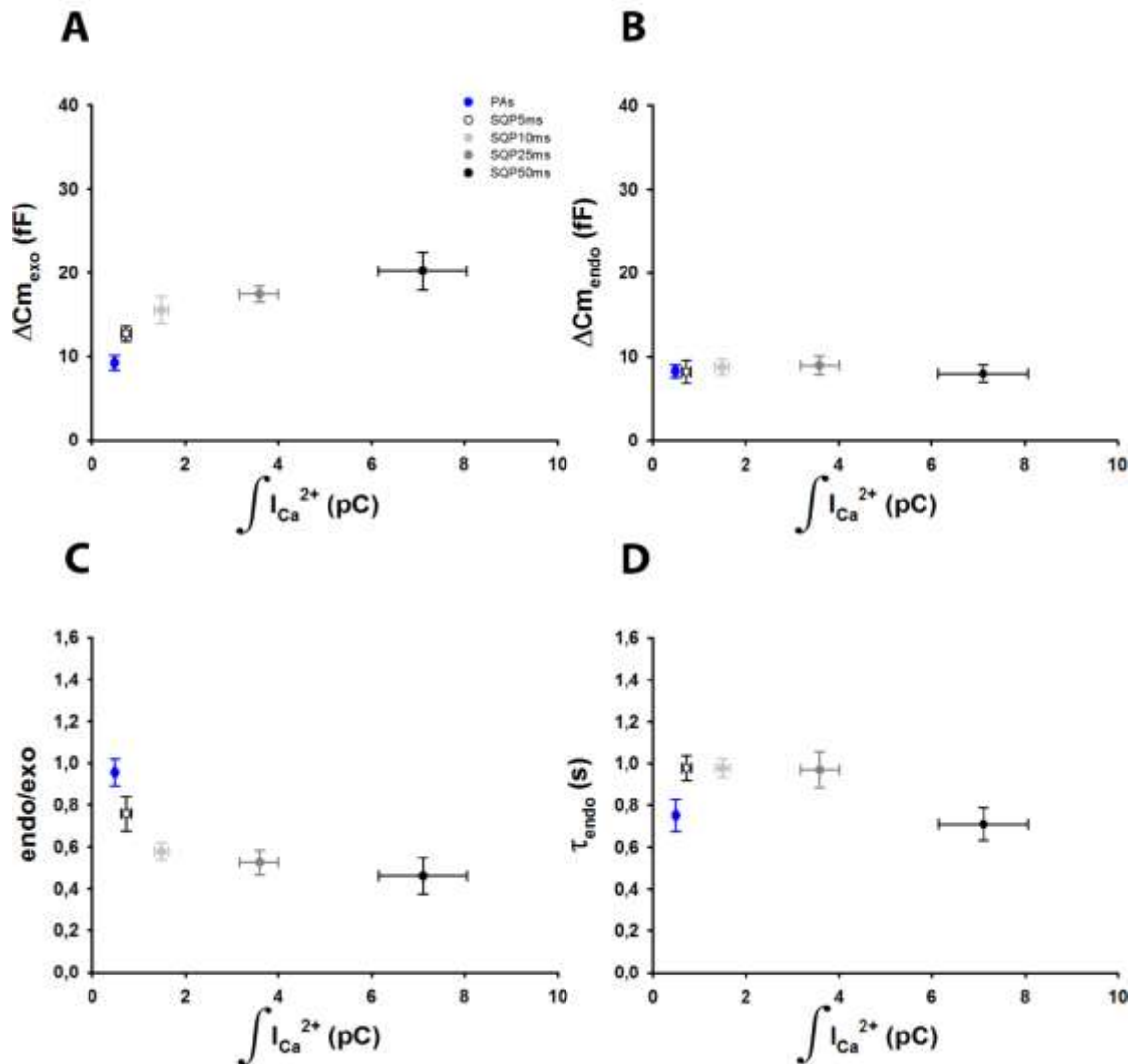


Figura 4.3- Relación de la exocitosis y de los distintos parámetros asociados a la endocitosis con la entrada de Ca^{2+} . La velocidad de la endocitosis muestra un comportamiento bifásico. En (A), (B), (C) y (D) se grafican los promedios (\pm ES) de $\Delta C m_{\text{exo}}$, $\Delta C m_{\text{endo}}$, endo/exo y τ_{endo} en función de los promedios de $\int I_{Ca^{2+}}$ (\pm ES) obtenidos para cada tipo de estímulo (PAs y SQP5-50ms respectivamente). Mientras que $\Delta C m_{\text{exo}}$ muestra un comportamiento creciente y saturable, y la relación endo/exo exhibe una tendencia decreciente consecuencia de la invariabilidad de $\Delta C m_{\text{endo}}$, τ_{endo} muestra un comportamiento bifásico.

El comportamiento bifásico de τ_{endo} podría deberse hipotéticamente a una inicial desaceleración y una posterior aceleración promovidas por el aumento de Ca^{2+} del mismo mecanismo de endocitosis rápida dinamina dependiente descrito previamente por nosotros (Moya-Díaz y col, 2016). Es

decir que este mecanismo tenga en sí mismo una dependencia bifásica con el Ca^{2+} . Esto en principio sería posible, ya que la inactivación/activación de la dinamina depende de la fosforilación/defosforilación de esta proteína respectivamente. Se ha demostrado que la dinamina puede ser fosforilada e inactivada *in vitro* por la proteína quinasa C (Robinson y col, 1993), una quinasa Ca^{2+} dependiente, aunque la importancia fisiológica de esto ha sido posteriormente puesta en duda (Chan y Smith, 2003b). Por otro lado, es sabido y aceptado por la mayoría de la comunidad científica que la dinamina es desfosforilada y activada por un mecanismo que implica al sensor de Ca^{2+} calmodulina y la posterior activación por parte de este de la fosfatasa calcineurina (Artalejo y col, 1996; Marks y McMahon, 1998). Sin embargo, otra posibilidad es que estemos frente a dos procesos mecanísticamente diferentes, uno que se inhibe cuando la entrada de Ca^{2+} aumenta, y otro que presente un umbral de activación a una cierta concentración de Ca^{2+} , la cual se alcanza recién con pulsos mayores a SQP25ms. En otras palabras, cuando aumenta la entrada de Ca^{2+} este segundo mecanismo estaría “reemplazando” a la endocitosis rápida dinamino-dependiente (Moya-Díaz, 2016) para mantener los valores de $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$ constantes para todos los estímulos aplicados.

4.1.2 Dependencia de la endocitosis con la estimulación repetitiva

En la sub-sección previa de resultados observamos que pese a que el parámetro $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$ se mantiene constante a medida que aumenta $\int\text{I}_{\text{Ca}^{2+}}$, la velocidad de la endocitosis (evaluada como τ_{endo}) presenta un comportamiento bifásico, desacelerándose inicialmente entre PAs y SQP5-25ms, para luego acelerarse significativamente en SQP50ms. Para poner a prueba la consistencia de esta última observación, respecto a la aceleración de la endocitosis a estímulos más prolongados, se utilizó otro protocolo experimental que consistió en aplicar tres tipos de estímulos: un SQP25ms individual, un par de SQP25ms (2SQP25ms), y finalmente un triplete de SQP25ms (3SQP25ms) (ver sección 3.3 en Materiales y Métodos). Los pulsos individuales que forman los pares y los tripletes fueron separados entre sí por intervalos de 50 ms (frecuencia de 13 Hz), y a su vez estos tres tipos de estímulos se aplicaron

durante cada experimento a intervalos de 30 s y en orden aleatorio. Elegimos estos estímulos para provocar aumentos de la $\int I_{Ca^{2+}}$ acumulada que son aproximadamente múltiplos del número de pulsos cuadrados aplicados (ver párrafo siguiente). Por otro lado, la frecuencia elegida está dentro del rango de frecuencias máximas a las que pueden disparar potenciales de acción estas células. De esta forma, esperábamos observar una disminución en los valores de τ_{endo} (aceleración de la endocitosis) con el aumento de la $\int I_{Ca^{2+}}$ acumulada.

En el panel A de la Figura 4.4 se muestra un esquema del protocolo de estimulación utilizado (i), conjuntamente con trazados representativos de las corrientes de Ca^{2+} (ii) para un SQP25ms y para 3SQP25ms. Nótese en dicho ejemplo que para 3SQP25ms la corriente de Ca^{2+} no se atenuó entre los respectivos pulsos despolarizantes. Esta observación se ve confirmada en el panel B, donde se graficaron los promedios y valores individuales de $I_{Ca^{2+}}$ para el pulso SQP25ms, para el segundo pulso dentro del estímulo pareado (2SQP25ms) y para el 3er pulso dentro 3SQP25ms. Este resultado indica que la corriente de Ca^{2+} registrada no está siendo afectada por la inactivación de los CCVD (que podría ser causada por la estimulación repetitiva a alta frecuencia). Debido a esto, la $\int I_{Ca^{2+}}$ aumenta en forma prácticamente proporcional al agregado de los sucesivos pulsos, como puede verse reflejado en la Figura 4.4.C.

En el panel A de la Figura 4.5 se muestran trazados representativos de capacitancia para SQP25ms, 2SQP25ms y 3SQP25ms. Se observa un esperable aunque moderado aumento de la exocitosis a medida que se incrementa la magnitud de los estímulos. Por otro lado, y en forma similar a lo observado en la Figura 4.2.A, se puede ver que mientras para SQP25ms la endocitosis compensa parcialmente a la exocitosis previa, el grado de compensación disminuye gradualmente con el aumento de la estimulación. A partir de la cuantificación de los trazados de capacitancia observamos que los valores promedio de $\Delta C_{m_{exo}}$ muestran en efecto una cierta tendencia creciente pero que no alcanza significancia estadística (Figura 4.5.B), probablemente porque nos encontramos ya en la saturación de la liberación de IRP (Álvarez y col, 2013). Mientras que para $\Delta C_{m_{endo}}$ no se observan cambios con el aumento de la intensidad del estímulo (Figura 4.5.C), el cociente endo/exo muestra una tendencia decreciente que se hace significativa para 3SQP25ms respecto de

SQP25ms (Figura 4.5.D). Finalmente, cuando evaluamos el comportamiento cinético de la endocitosis, notamos que el valor de la constante temporal τ_{endo} disminuye (se acelera la endocitosis) significativamente para 2SQP25ms respecto de SQP25ms, y esta tendencia se hace aún más evidente para 3SQP25ms (Figura 4.5.E). Al igual que en la sub-sección anterior se regraficó τ_{endo} en función de $\int I_{\text{Ca}^{2+}}$ (Figura 4.5.F), mostrando un claro decrecimiento de la 1^{ra} variable respecto de la 2^{da}, lo cual en principio sería coherente con una aceleración de esta endocitosis con el aumento del Ca^{2+} como planteamos previamente.

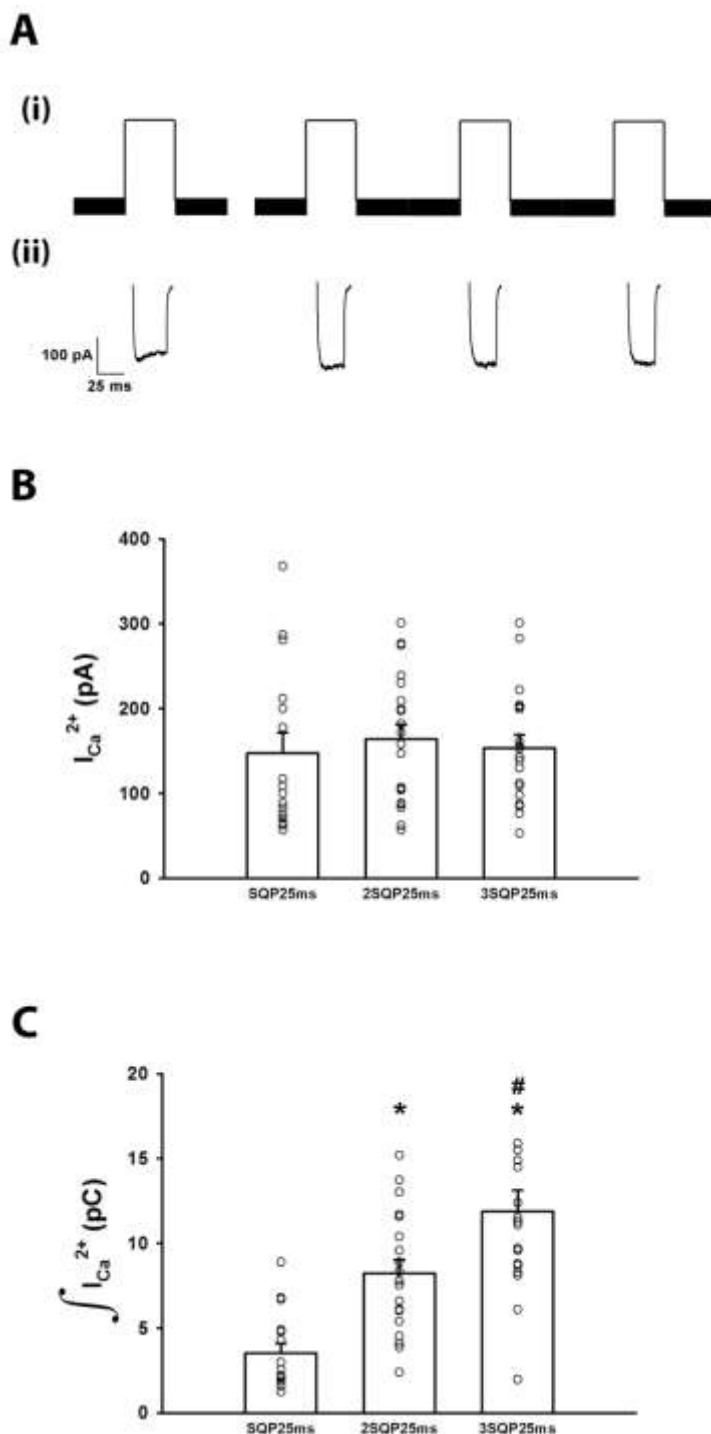


Figura 4.4- Corrientes y entradas de calcio inducidas por estimulación repetitiva.

(A) El protocolo de estimulación se compone de pulsos SQP25ms simples, pareados (2SQP25ms) y triples (3SQP25ms). Dentro de los estímulos 2SQP25ms y 3SQP25ms los pulsos fueron separados por intervalos de 50 ms (13 Hz). En el esquema se representan solamente los SQP25ms y 3SQP25ms (i) con los correspondientes trazados de corrientes de Ca^{2+} (ii). (B) El gráfico muestra el promedio (\pm ES) de los valores de $I_{\text{Ca}^{2+}}$ (barras) y los valores experimentales individuales (círculos vacíos, una medición por célula) para el estímulo SQP25ms, el 2^{do} pulso dentro del 2SQP25ms y el 3^{er} pulso dentro del 3SQP25ms. No se observaron diferencias entre las $I_{\text{Ca}^{2+}}$. (C) Se grafican los promedios (\pm ES) y valores experimentales individuales

(círculos vacíos) de $\int I_{Ca^{2+}}$ total para todos los estímulos empleados. La entrada de Ca^{2+} es significativamente mayor para 2SQP25ms y 3SQP25ms respecto SQP25ms (*), y para 3SQP25ms respecto de 2SQP25ms (#). El número de células registradas es el mismo en ambos gráficos ($n_{SQP25ms}=15$; $n_{2SQP25ms}=20$; $n_{3SQP25ms}=19$). Análisis de varianza (ANOVA) - Test de *Bonferroni*, * $p<0,001$. Test de *Student* para dos muestras independientes, # $p<0,02$.

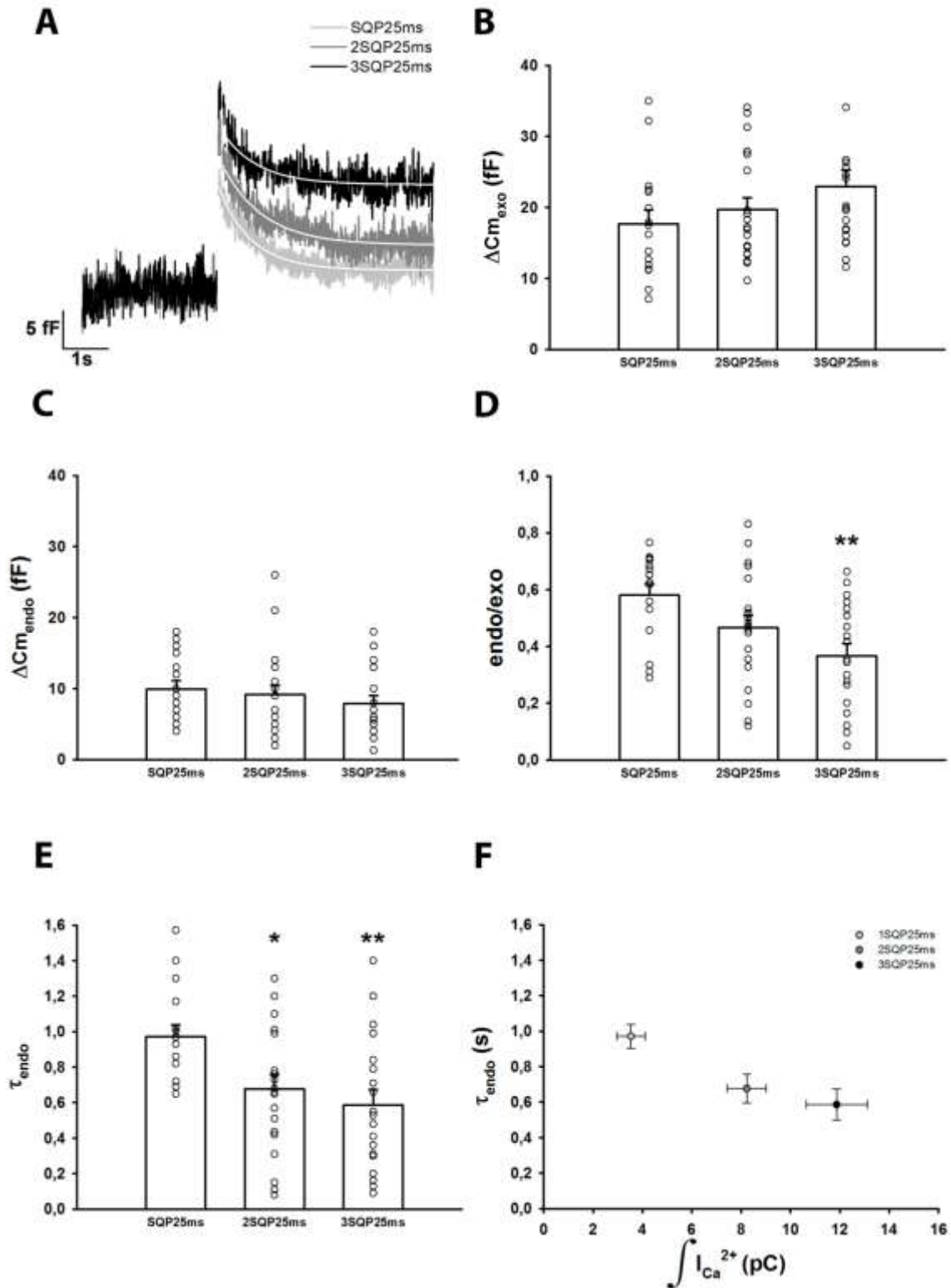


Figura 4.5 – Exocitosis y endocitosis inducidas por estimulación repetitiva. (A) Trazados representativos de capacitancia para SQP25ms (trazado gris), 2SQP25ms (trazado gris oscuro) y 3SQP25ms (trazado negro). Las líneas blancas superpuestas a las caídas de los registros representan el ajuste de las mismas a una función monoexponencial decreciente ($\tau_{\text{endo SQP25ms}}$: 0,92 s, $R>0,9053$; $\tau_{\text{endo 2SQP25ms}}$: 0,79 s, $R>0,9372$; $\tau_{\text{endo 3SQP25ms}}$: 0,59 s, $R>0,7056$). **(B), (C), (D)** y **(E)** Los gráficos muestran los promedios (barras) (\pm ES) y los valores experimentales individuales (una medición por célula, círculos negros vacíos) de $\Delta C_{m_{\text{exo}}}$, $\Delta C_{m_{\text{endo}}}$, endo/exo y τ_{endo} para SQP25ms, 2SQP25ms y 3SQP25ms, respectivamente. La relación endo/exo decrece de forma significativa para los 3SQP25ms respecto de los SQP25ms. Finalmente, notar que τ_{endo} se acelera significativamente para 2SQP25ms y 3SQP25ms respecto de SQP25ms. **(F)** Se grafican los promedios (\pm ES) de τ_{endo} en función de los valores promedios (\pm ES) de $\int I_{\text{Ca}^{2+}}$ para todos los estímulos empleados. Observamos que τ_{endo} decae de forma monotonica a medida que aumenta la $\int I_{\text{Ca}^{2+}}$. El número de células registradas es el mismo para todos los gráficos ($n_{\text{SQP25ms}}=15$; $n_{\text{2SQP25ms}}=20$; $n_{\text{3SQP25ms}}=19$). Análisis de varianza (ANOVA) - Test de *Bonferroni*, * $p<0,028$; ** $p<0,001$.

Estos resultados apoyan las conclusiones de la sub-sección anterior. Al aumentar la magnitud del estímulo aplicado, el aumento en la entrada de Ca^{2+} al interior celular a partir de cierto punto (SQP25ms) potenciaría la velocidad de la endocitosis. De esta forma podemos plantear que el mecanismo endocítico que opera en estas condiciones experimentales sería acelerado por la entrada de Ca^{2+} .

4.2 Dependencia de la velocidad de la endocitosis con la entrada de Ca^{2+} .

En los resultados descritos en la sección previa (4.1) mostramos que a medida que aumenta la entrada de Ca^{2+} por aplicación de despolarizaciones más prolongadas o repetitivas, y como consecuencia se libera gradualmente el *pool* vesicular IRP, se manifiesta un comportamiento bifásico en la velocidad de la endocitosis. Concretamente, τ_{endo} aumenta (se desacelera) inicialmente para luego volver a acelerarse cuando aplicamos SQP (únicos o repetitivos) que suman al menos 50 ms de duración. Con el objetivo de hallar evidencias que soporten o descarten la hipótesis de que el Ca^{2+} es el responsable de los cambios en la velocidad de la endocitosis, decidimos utilizar un protocolo experimental donde se aplica el estímulo SQP50ms pero variando la

concentración de Ca^{2+} externo ($[\text{Ca}^{2+}]_e$). Se eligió SQP50ms porque fue con este estímulo donde vimos el cambio de tendencia en τ_{endo} en los protocolos previos. Se realizaron experimentos en células independientes a 5 mM, 1 mM y 10 mM de $[\text{Ca}^{2+}]_e$, tomando como control a $[\text{Ca}^{2+}]_e = 5$ mM, por ser la condición utilizada previamente. En el panel A de la Figura 4.6 se muestran ejemplos representativos de corrientes de Ca^{2+} para las tres concentraciones de Ca^{2+} externo (1, 5 y 10 mM, respectivamente). En el panel B, se grafica la cuantificación de las $I_{\text{Ca}^{2+}}$ de las corrientes evocadas por los SQP50ms para cada condición de $[\text{Ca}^{2+}]_e$ (1, 5 y 10 mM). Se puede observar que los valores promedio de la $I_{\text{Ca}^{2+}}$ para las condiciones 1 mM y 10 mM de Ca^{2+} externo difieren significativamente del control. Por otro lado, cuando cuantificamos $\int I_{\text{Ca}^{2+}}$ (Figura 4.6.C), observamos que ambas condiciones, 1 mM y 10 mM, también difieren significativamente del control de 5 mM. El hecho de que la $\int I_{\text{Ca}^{2+}}$ se vea afectada por la modificación en la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ nos plantea un escenario favorable para poner a prueba nuestra hipótesis, que justamente propone que τ_{endo} es dependiente de la entrada de calcio.

En la Figura 4.7, panel A, se muestran trazados representativos de capacitancia de células independientes estimuladas con SQP50ms a las distintas $[\text{Ca}^{2+}]_e$. Observamos que el trazado en la condición de 10 mM de Ca^{2+} se encuentra moderadamente desplazado hacia arriba respecto de 1 y 5 mM. Dicha tendencia era esperable, dado el incremento en $\int I_{\text{Ca}^{2+}}$ observado en la Figura 4.6. Sin embargo no se observaron diferencias estadísticamente significativas en $\Delta C_{m_{\text{exo}}}$ entre las tres condiciones experimentales (Figura 4.7.B). En los paneles C y D se muestran graficados los parámetros $\Delta C_{m_{\text{endo}}}$ y endo/exo para las tres $[\text{Ca}^{2+}]_e$, donde al igual que para $\Delta C_{m_{\text{exo}}}$ no observamos cambios significativos entre las distintas $[\text{Ca}^{2+}]_e$. En el panel E de la Figura 4.7 vemos graficados los valores promedio para τ_{endo} para las tres $[\text{Ca}^{2+}]_e$. Observamos que los valores de τ_{endo} sí varían significativamente entre las tres condiciones experimentales. Al disminuir el Ca^{2+} en el baño extracelular respecto del control (5 mM), se reduce la velocidad de la endocitosis (aumenta τ_{endo}), ocurriendo lo contrario en la condición 10 mM, donde vemos que la endocitosis es significativamente más rápida que en la condición control (τ_{endo} disminuye). Finalmente, este mismo comportamiento en τ_{endo} lo vemos en el

panel F de la Figura 4.7, donde se puede observar un claro aumento en la velocidad de la endocitosis (reducción de τ_{endo}) a medida que el influjo de Ca^{2+} al citosol es mayor.

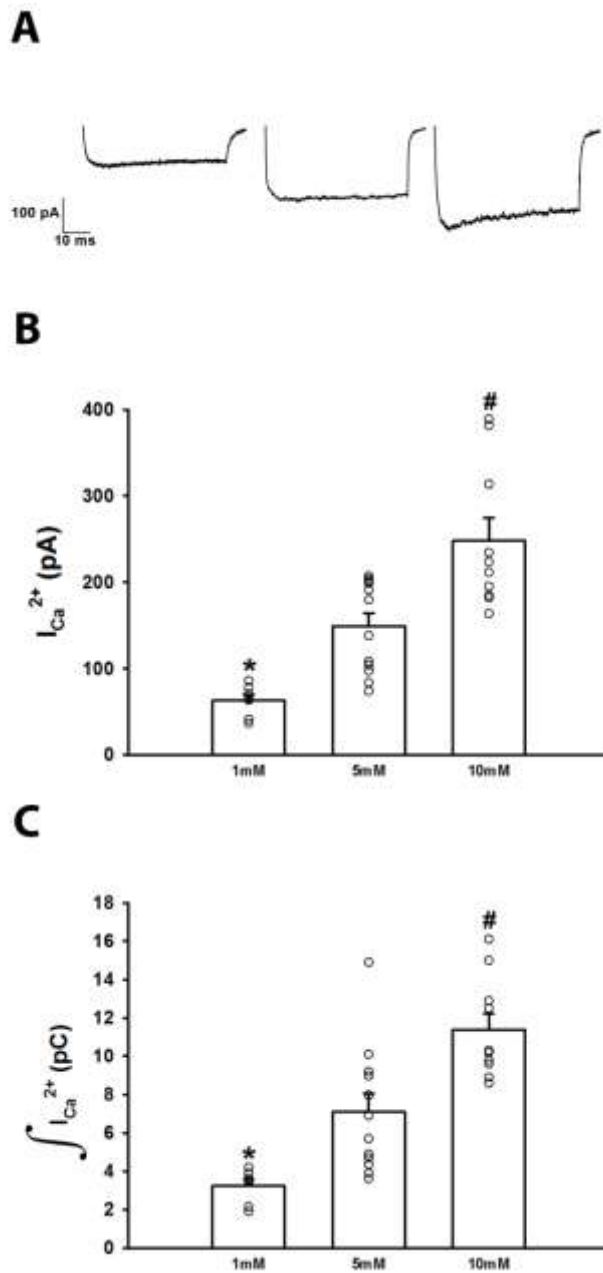


Figura 4.6- Corrientes y entradas de calcio a distintas concentraciones de calcio externo.

(A) Ejemplos representativos de corrientes de Ca^{2+} evocadas por SQP50ms en las $[\text{Ca}^{2+}]_e$ de 1, 5 y 10 mM (de izquierda a derecha), respectivamente. **(B)** El gráfico muestra los promedios (\pm ES) (barras) de $I_{\text{Ca}^{2+}}$ y los valores experimentales individuales (una medición por célula, círculos vacíos) para SQP50ms en las tres $[\text{Ca}^{2+}]_e$. En las comparaciones se tomó como control a la condición 5 mM, y se las comparó vs las otras dos condiciones. Se observa que la $I_{\text{Ca}^{2+}}$ a 1 mM disminuye significativamente respecto de 5 mM. Sin embargo, en la condición 10 mM, este parámetro se hace estadísticamente más grande que el control. **(C)** Se grafican los promedios (\pm ES) (barras) y los valores experimentales individuales (una medición por célula, círculos vacíos) de $\int I_{\text{Ca}^{2+}}$ para SQP50ms en las tres condiciones de $[\text{Ca}^{2+}]_e$. Mientras que $\int I_{\text{Ca}^{2+}}$ a 1 mM disminuyó,

este mismo parámetro aumentó significativamente para 10 mM, respecto a 5 mM de $[\text{Ca}^{2+}]_e$. El número de células individuales para las condiciones de 1, 5 y 10 mM fue de $n=10$, 12 y 10, respectivamente. Análisis de varianza (ANOVA) - Test de *Bonferroni*, * $p<0,005$, # $p<0,03$.

Estos resultados refuerzan la idea de que la endocitosis que se manifiesta durante los SQP50ms en la condición control de 5 mM de Ca^{2+} es modulada positivamente por la entrada de Ca^{2+} . Esta condición de estimulación coincide con la liberación completa del pool vesicular IRP.

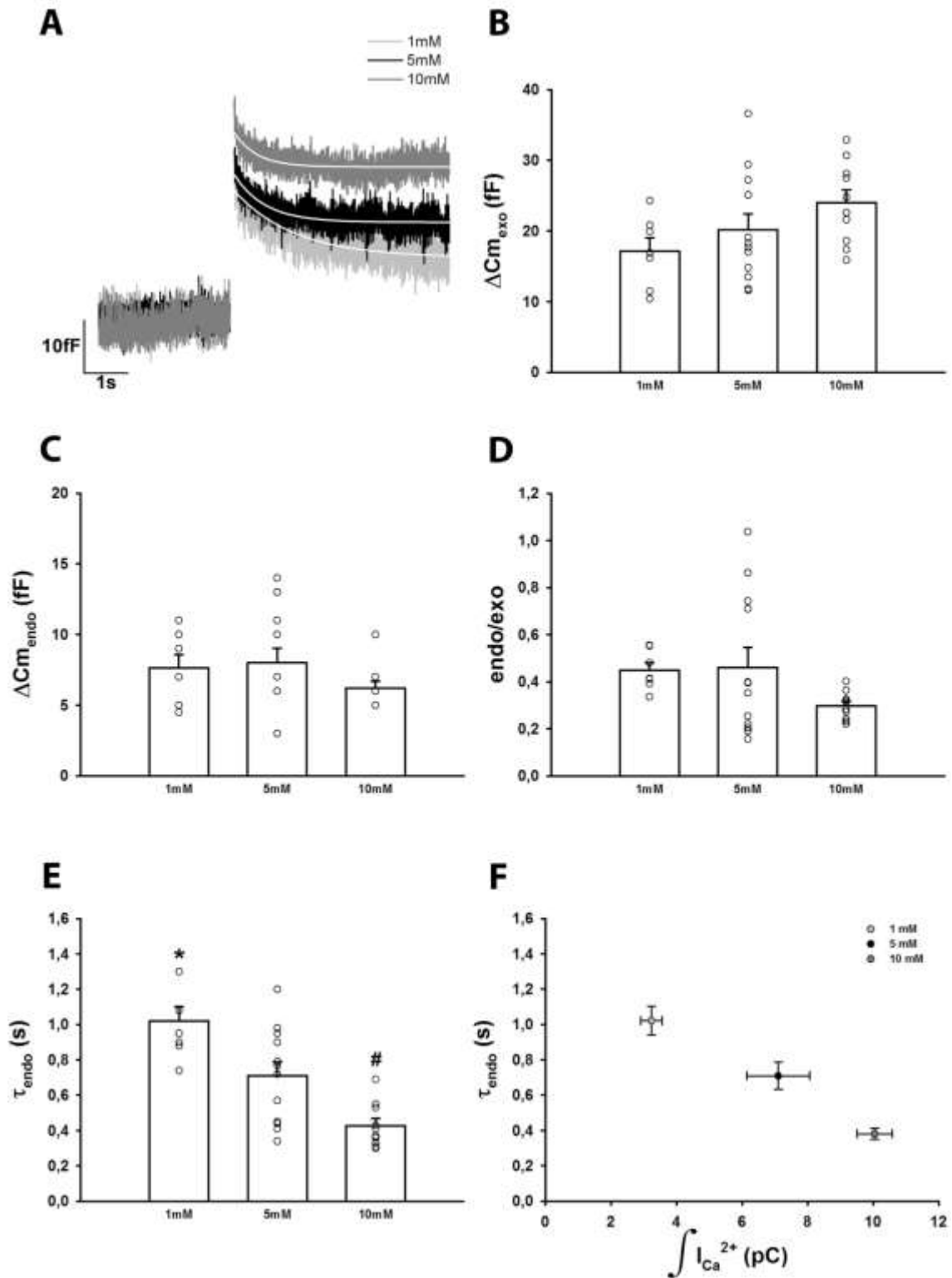


Figura 4.7 – Exocitosis y endocitosis a distintas concentraciones de calcio externo. (A) Trazados representativos de capacitancia en las condiciones de 1 mM (trazado gris), 5 mM (trazado negro) y 10 mM (trazado gris oscuro) de $[Ca^{2+}]_e$. El estímulo aplicado fue en todos los casos SQP50ms. Las líneas blancas superpuestas a las caídas de los registros representan el ajuste de las mismas a una función monoexponencial decreciente ($\tau_{endo\ 1mM}$: 1,38 s, $R>0,8284$; $\tau_{endo\ 5mM}$: 0,69 s, $R>0,7637$; $\tau_{endo\ 10mM}$: 0,52 s, $R>0,6183$). (B), (C), (D) y (E) Los gráficos muestran los promedios (barras) (\pm ES) y los valores experimentales individuales (círculos

vacíos, una medición por célula) de $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$, $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$, endo/exo y τ_{endo} en las tres condiciones de $[\text{Ca}^{2+}]_e$. Observamos que para $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$, $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$, endo/exo no se vieron diferencias estadísticas entre condiciones experimentales. Sin embargo, τ_{endo} aumenta (se desacelera) para 1mM y disminuye (se acelera) para 10 mM significativamente respecto al control de 5 mM. **(F)** Se grafican los promedios ($\pm\text{ES}$) de τ_{endo} en función de los valores promedios ($\pm\text{ES}$) de $\int\text{Ca}^{2+}$ obtenidos en las tres condiciones de $[\text{Ca}^{2+}]_e$. Observamos que τ_{endo} decae monotónicamente (se acelera) a medida que aumenta la $\int\text{Ca}^{2+}$. El número de células registradas es el mismo para todos los gráficos ($n_{1\text{mM}}=10$; $n_{5\text{mM}}=12$; $n_{10\text{mM}}=10$). Análisis de varianza (ANOVA) - Test de *Bonferroni*, * $p<0,01$; # $p<0,01$.

Es paradójico, sin embargo, que este efecto se vea solamente sobre la velocidad de la endocitosis y no sobre la magnitud de la misma. También llama la atención que la magnitud de la endocitosis es pequeña en relación con la exocitosis cuando se libera totalmente IRP. ¿Tiene este mecanismo una capacidad de acción tan limitada? Por otro lado, con los experimentos presentados hasta el momento no podemos determinar si el mecanismo endocítico que participa en la re-internalización de membrana luego de la exocitosis de distintas fracciones de IRP es único (es decir, la endocitosis rápida dependiente de dinamina que se manifiesta luego de un PAs (Moya-Díaz y col, 2016)), o existe algún otro mecanismo endocítico que se active cuando aumenta la entrada de Ca^{2+} . Estos interrogantes serán abordados en las secciones siguientes de esta Tesis.

4.3 Dependencia de la endocitosis con la GTPasa Dinamina.

Varios de los mecanismos endocíticos descritos son dependientes de la dinamina. En particular, en nuestro laboratorio hemos reportado previamente que la endocitosis rápida que se desarrolla en forma inmediatamente posterior a la exocitosis disparada por un potencial de acción es dinamina dependiente (Moya-Díaz, 2016). Por el contrario, nada sabemos acerca de los mecanismos endocíticos que operan frente a estímulos que liberan fracciones mayores de IRP. En las sub-secciones siguientes presentamos experimentos diseñados para inhibir a la GTPasa dinamina por diferentes estrategias, analizando la

respuesta endocítica ante la misma batería de estímulos aplicados en las secciones anteriores.

4.3.1 Inhibición de la actividad GTPasa con GTPγS

Los resultados de las secciones anteriores muestran que la velocidad de la endocitosis se comporta de manera bifásica cuando liberamos progresivamente IRP, acelerándose en forma paralela al aumento de $\int I_{Ca^{2+}}$ durante la transición entre SQP25ms y SQP50ms. En base a estas evidencias experimentales proponemos dos posibles hipótesis alternativas: (1) que la endocitosis rápida dependiente de dinamina, ya previamente descrita para PAs (Moya-Díaz y col, 2016), presenta en sí misma un comportamiento bifásico respecto de la entrada de Ca^{2+} , o que (2) para los pulsos más prolongados se dispare un mecanismo endocítico diferente que es activado con el aumento del Ca^{2+} citosólico. Tomando en cuenta estos posibles escenarios, decidimos evaluar la participación de la dinamina en la endocitosis rápida desarrollada en las diferentes instancias de nuestro paradigma experimental, con el propósito de estudiar si la acción de esta GTPasa es relevante en todo el rango de estimulación aplicado, o por el contrario se encuentra actuando conjuntamente con algún otro mecanismo. Es sabido que el proceso de escisión vesicular en los mecanismos endocíticos que involucran a la dinamina es dependiente de la hidrólisis de GTP por parte de esta proteína (Takei y col, 1995; Warnock y col, 1996; Marks y col, 2001; Danino y col, 2004). La oligomerización de la dinamina en solución es favorecida por la unión a análogos no hidrolizables de GTP, tales como GMPPCP, GTPγS (Warnock y col, 1996) o GDP•AlF₄ (Carr y Hinshaw, 1997). Pero al no poder producirse la desfosforilación de estos nucleótidos, queda inhibida la consiguiente acción constrictora de esta proteína sobre el cuello que une la vesícula a la membrana y que resulta en la finalización de la endocitosis (Hinshaw, 2000; Ferguson y De Camilli, 2012; Antony y col, 2016; Ramachandran y Schmid, 2018). Por ello, comenzamos por bloquear la actividad GTPasa por medio del agregado de GTPγS (0,3 mM), una isoforma análoga a GTP pero que no es hidrolizable, a través de la pipeta de *patch*.

En la Figura 4.8 paneles A y B, se muestra la cuantificación de $I_{Ca^{2+}}$ y $\int I_{Ca^{2+}}$ para las condiciones control y GTP γ S. Observamos que, para cada tipo de pulso despolarizante, estas dos variables no difieren estadísticamente entre ambas condiciones.

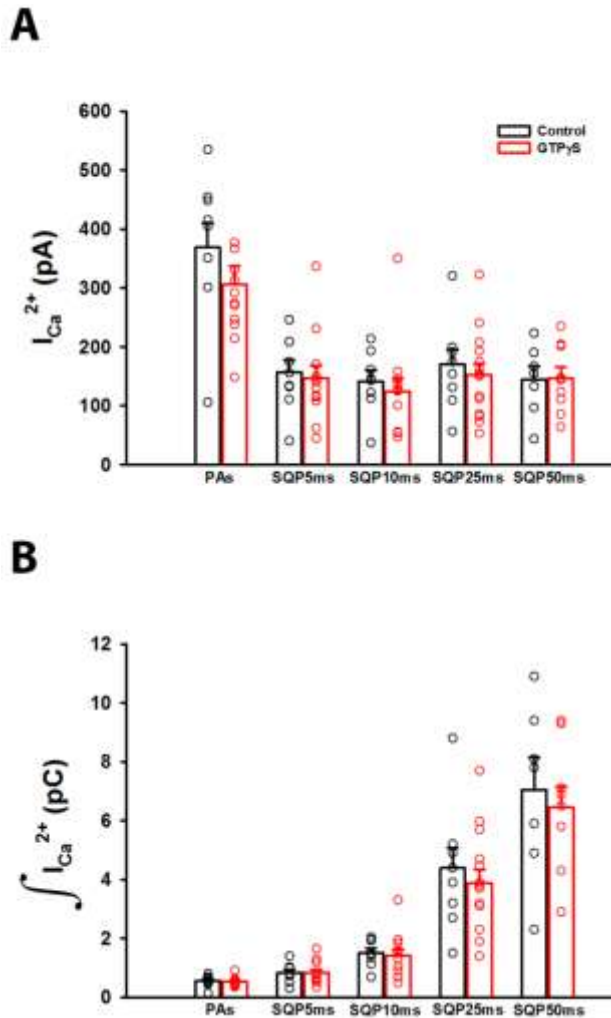


Figura 4.8- Corrientes y entradas de calcio bajo tratamiento con GTP γ S.

Los gráficos muestran los promedios (barras vacías) (\pm ES) y los valores experimentales individuales (una medición por célula, círculos vacíos) de $I_{Ca^{2+}}$ (**A**) y $\int I_{Ca^{2+}}$ (**B**), en las condiciones control (en negro) y GTP γ S (en rojo), para PAs y SQP5-50ms respectivamente. El GTP γ S (0,3 mM) fue dializado través de la pipeta de *patch clamp*. No se observaron diferencias entre tratamientos para cada estímulo empleado en ninguna de las dos variables representadas. El número de células registradas en las condiciones control y GTP γ S para PAs y SQP5-50 ms fue $n_{control}=9, 9, 8, 9, 8$ y $n_{GTP\gamma S}=15, 12, 13, 14, 9$, respectivamente.

Por otro lado, los trazados representativos de capacitancia que se muestran en la Figura 4.9.Ai denotan un marcado efecto inhibitorio de GTP γ S sobre la endocitosis para los pulsos PAs. Esto era esperado, dado que sabíamos que la endocitosis rápida responsable de la recuperación de la membrana luego de la exocitosis inducida por un potencial de acción es dependiente de dinamina (Moya y Col, 2016). Sin embargo, curiosamente no vemos el mismo efecto inhibitorio de GTP γ S sobre la endocitosis cuando se estimuló con SQP50ms (Figura 4.9.Aii). En los trazados también se puede ver que GTP γ S no produjo modificaciones obvias en la exocitosis. Estos resultados

se confirman en el diagrama de barras representado la Figura 4.9.B, donde vemos que $\Delta C_{m_{exo}}$ no fue alterado significativamente por GTP γ S para ningún pulso. Contrariamente, $\Delta C_{m_{endo}}$ se redujo significativamente un $\sim 40\%$ en presencia de GTP γ S para PAs, y un $\sim 35\%$ para SQP5ms (Figura 4.9.C).

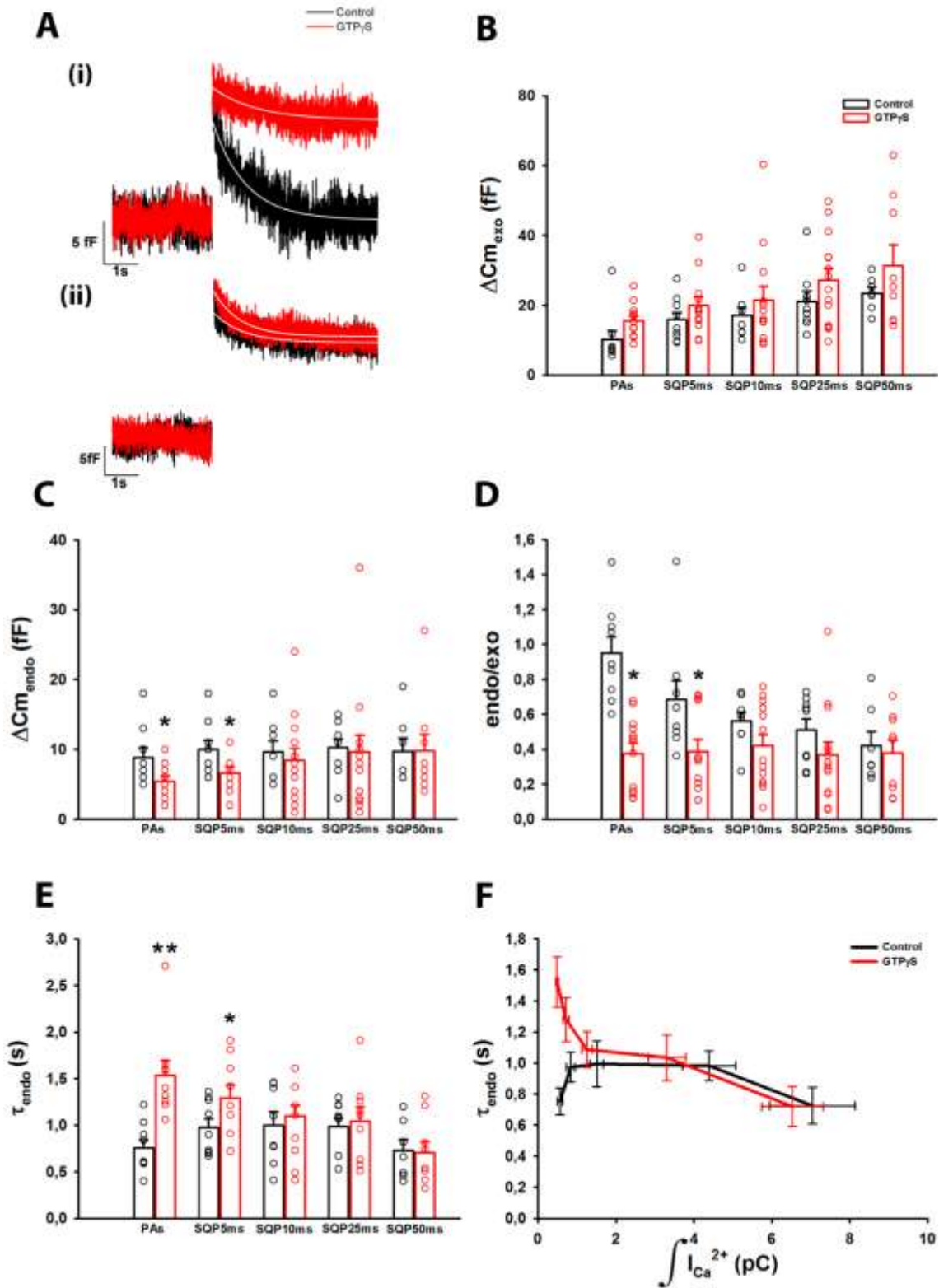


Figura 4.9 – Exocitosis y endocitosis bajo tratamiento con GTP γ S. (A) Trazados representativos de capacitancia para PAs (i) y SQP50ms (ii) en las condiciones control (negro) y GTP γ S (rojo). El GTP γ S (0,3 mM) fue dializado a través de la pipeta de *patch clamp*. Las líneas blancas superpuestas a las caídas de los registros representan el ajuste de las mismas a una función monoexponencial decreciente para PAs ($\tau_{\text{endo Control}}$: 0,78 s, $R>0,8614$; $\tau_{\text{endo GTP}\gamma\text{S}}$: 1,33 s, $R>0,6481$) y SQP50ms ($\tau_{\text{endo Control}}$: 0,79 s, $R>0,7014$; $\tau_{\text{endo GTP}\gamma\text{S}}$: 0,68 s, $R>0,8304$). **(B), (C), (D) y (E)** Los gráficos muestran el promedio (\pm ES) (barras) y los valores experimentales individuales (círculos vacíos, una medición por célula) de $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$, $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$, endo/exo y τ_{endo} , en las condiciones control (en negro) y GTP γ S (en rojo), respectivamente, para PAs y SQP5-50ms. $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$ no muestra diferencias entre ambas condiciones experimentales para ninguno de los estímulos aplicados, pero $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$ y endo/exo disminuyen significativamente para PAs y SQP5ms en células tratadas con GTP γ S respecto del control. Finalmente, observamos que τ_{endo} aumenta (se desacelera) significativamente para PAs y SQP5ms en células tratadas con GTP γ S respecto del control. **(F)** Se grafican los promedios (\pm ES) de τ_{endo} en función de los valores promedios (\pm ES) de $[\text{Ca}^{2+}]$ de todos los estímulos empleados, en las condiciones control (línea negra) y GTP γ S (línea roja). Observamos que τ_{endo} decae en forma monótonica cuando se aplica GTP γ S, perdiendo el comportamiento bifásico observado en la curva control. El número de células registradas en la condición control ($n_{\text{PAs}}=9$; $n_{\text{SQP5ms}}=8$; $n_{\text{SQP10ms}}=9$; $n_{\text{SQP25ms}}=8$; $n_{\text{SQP50ms}}=9$) y con GTP γ S ($n_{\text{PAs}}=15$; $n_{\text{SQP5ms}}=12$; $n_{\text{SQP10ms}}=13$; $n_{\text{SQP25ms}}=14$; $n_{\text{SQP50ms}}=9$), es la misma para todos los paneles a excepción del (E) y (F), donde para PAs y SQP5ms es $n=9$ y $n=8$, respectivamente. Test de *Student* para dos muestras independientes, * $p<0,025$ y ** $p<0,001$.

Resultados similares han sido reportados por el grupo de investigación de Ling Gang Wu en Calyx de Held, donde se vio que el tratamiento con GTP γ S inhibió los componentes rápido y lento de la endocitosis, pero no alteró la magnitud de la exocitosis respecto al control (Xu y col, 2008). Este efecto de GTP γ S sobre la endocitosis se ve aún más magnificado en la relación endo/exo, donde la eficiencia compensatoria de la endocitosis es reducida significativamente por este tratamiento en porcentajes de 60% y 45% para PAs y SQP5ms, respectivamente (Figura 4.9.D). Es importante destacar que la inhibición de la endocitosis como consecuencia de la aplicación de GTP γ S desaparece cuando aumenta la duración de los pulsos empleados (SQP10-50ms). Por último, en la Figura 4.9.E, se grafica τ_{endo} para todos los tipos de estímulos utilizados, tanto en células tratadas como en controles. Resulta claro que la velocidad de la endocitosis para los pulsos cortos (PAs y SQP5ms) es considerablemente más lenta (es decir, se observa un aumento de τ_{endo}) en las

células tratadas con GTP γ S en comparación con sus respectivos controles. En cambio, y al igual que para $\Delta C m_{\text{endo}}$ y endo/exo, los valores de τ_{endo} medidos para los SQP10-50ms en células con GTP γ S son similares a aquellos estimados en la condición control. Es importante mencionar que de todos los experimentos realizados con GTP γ S aplicando los estímulos PAs y SQP5ms, solamente una fracción del 60% y 65% (respectivamente) pudo ser ajustado a una curva de decaimiento mono-exponencial para calcular el valor de τ_{endo} , dado que la fracción restante no mostraba un decaimiento en la señal capacitiva como evidencia de endocitosis o el ruido del registro impedía que este pudiese ser ajustado confiablemente a dicha función (la indeterminación de los parámetros de ajuste, incluido τ_{endo} , era muy alta). Finalmente, en el panel F de la Figura 4.9 se grafica τ_{endo} en función de $\int I_{\text{Ca}^{2+}}$ para ambas condiciones experimentales. Es posible notar como en las células tratadas con GTP γ S se pierde el característico comportamiento bifásico de τ_{endo} observado en las mediciones controles a medida que aumenta la entrada de Ca^{2+} . Es más, vemos una disminución de τ_{endo} a lo largo de todo el rango de $\int I_{\text{Ca}^{2+}}$ registrada, lo cual implica una aceleración de la velocidad de la endocitosis con el aumento de la entrada de Ca^{2+} .

Estos resultados confirman que la dinamina participa activamente en la endocitosis rápida para estímulos que se aproximan a potenciales de acción fisiológicos como son los PAs aplicados de manera aislada (Moya-Diaz, y col 2016), y además sugieren que el mismo mecanismo se activaría a consecuencia de la aplicación de SQP5ms. Sin embargo, lo más importante que muestran estos experimentos es que la endocitosis rápida dinámico-dependiente no sería el único mecanismo endocítico activo en la recuperación de membrana que ocurre luego de la exocitosis de IRP, ya que de ser así GTP γ S debería inhibir $\Delta C m_{\text{endo}}$ en todo el rango de estímulos, incluyendo los SQPs de mayor duración (SQP10-50ms). También indican que este segundo e hipotético mecanismo no sería dependiente de una GTPasa en términos generales, ya que al tratar las células con GTP γ S se inhibe no solo la actividad de la dinamina sino de cualquier otra GTPasa que estuviese presente. Por ello, para evaluar si el efecto de GTP γ S evidenciado en estos experimentos se debe exclusivamente a la inhibición de la dinamina deberíamos inhibir la acción de

esta proteína por un método más específico. Las próximas subsecciones intentan dar respuesta a esto.

4.3.2 Inhibición de la acción de la dinamina con un anticuerpo monoclonal anti-dinamina

Los resultados obtenidos con GTP γ S sugieren que la endocitosis rápida dinamino-dependiente es predominante para los pulsos cortos, pero no para SQP10-50ms. Sin embargo, como mencionamos más arriba, el GTP γ S no solamente inhibe a la dinamina, sino que frena el ciclado de todas las GTPasas celulares. Debido a esto, a fin de evaluar específicamente la participación del mecanismo dinamina-dependiente de endocitosis (Moya-Díaz y col, 2016; Moya Díaz y col, 2019) para todo el rango de estímulos aplicados, realizamos experimentos donde dializamos (por 5 min previos al comienzo de la mediciones) a través de la pipeta de *patch* un anticuerpo monoclonal antidinamina (Anti-Dyn). Este anticuerpo reconoce a las isoformas de dinamina 1 y 2 de la dinamina (Gonzalez-Jamett y col, 2010), siendo la 1 la predominante en nuestros preparados (Scaife y col, 1990; Cook y col, 1994). La eficiencia de Anti-Dyn para inhibir la endocitosis fue demostrada previamente por varios autores (Artalejo y col, 2002; Gonzalez-Jamett y col, 2010; Moya-Díaz y col, 2016; Moya Díaz y col, 2019).

En la Figura 4.10, paneles A y B, se muestran graficados los parámetros $I_{Ca^{2+}}$ y $fI_{Ca^{2+}}$ respectivamente. Notamos que la aplicación de Anti-Dyn (7 nM) no afectó a ninguno de los dos parámetros respecto de la condición control para ninguno de los estímulos aplicados. Además, tampoco vemos diferencias significativas entre Anti-Dyn y los respectivos controles del tiempo de diálisis (DIAL5m, diálisis por 5 minutos previos al comienzo de las mediciones pero sin Anti-Dyn) y de posibles efectos inespecíficos del agregado del anticuerpo (HI Anti-Dyn, diálisis con Anti-Dyn desnaturalizado a 95 °C).

En la Figura 4.11.A se representan trazados representativos de capacitancia para los estímulos PAs (i) y SQP50ms (ii) en todas las condiciones experimentales mencionadas anteriormente. Para PAs, el tratamiento con Anti-Dyn provoca una clara atenuación de la caída de la capacitancia, representativa de la endocitosis, respecto de las condiciones

control, DIAL5m y HI Anti-Dyn (Figura 4.11.Ai). A su vez, cuando se estimuló con SQP50ms no se observaron cambios notorios en la señal capacitiva entre ninguna de las condiciones experimentales. Estos resultados son similares a los obtenidos con GTP γ S.

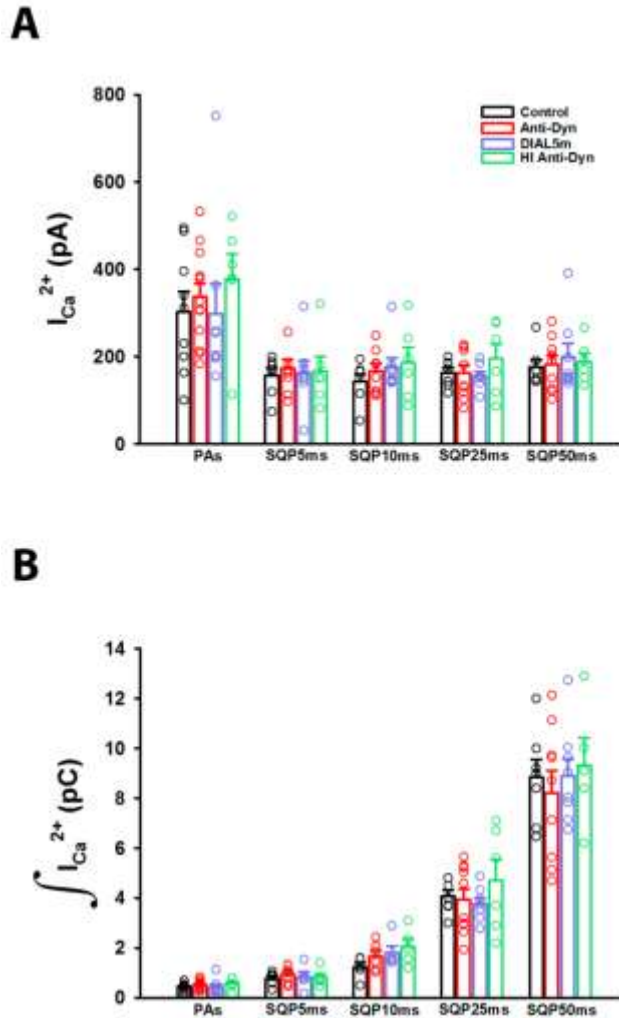


Figura 4.10- Corrientes y entradas de calcio bajo tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-dinamina (Anti-Dyn). (A) El gráfico muestra los promedios (barras vacías) (\pm ES) de los valores de $I_{Ca^{2+}}$ (A) y $\int I_{Ca^{2+}}$ (B), y los valores experimentales individuales (una medición por célula, círculos vacíos) en las condiciones control (negro), Anti-Dyn (rojo), DIAL5m (azul) y HI Anti-Dyn (verde) para PAs y SQP5-50ms respectivamente. Anti-Dyn y HI Anti-Dyn, 7 nM ambos, fueron dializados a través de la pipeta de *patch clamp*. No se observaron diferencias entre tratamientos para cada estímulo empleado en ninguna de las dos variables representadas. El número de células registradas para los pulsos en cada condición experimental se muestran en la Tabla 4.1.

Tratamiento	n				
	PAs	SQP5ms	SQP10ms	SQP25ms	SQP50ms
Control	9	7	7	7	7
Anti-Dyn	13	8	8	10	9
DIAL5m	8	8	8	8	8
HI Anti-Dyn	6	6	6	6	6

Tabla 4.1 – Número de células individuales medidas para cada tratamiento. Se detalla el “n” para cada condición experimental correspondiente a las Figuras 4.10 y 4.11.

En los paneles B, C y D de la Figura 4.11 se grafican $\Delta C_{m_{exo}}$, $\Delta C_{m_{endo}}$ y endo/exo para los experimentos controles, Anti-Dyn, DIAL5m y HI-Anti-Dyn, respectivamente. La amplitud de la exocitosis evocada por los diferentes tipos

de estímulo no se vio afectada por Anti-Dyn respecto a ninguno de los controles realizados. Por otro lado, Anti-Dyn provocó una reducción de más de un 40% en $\Delta C_{m_{\text{endo}}}$ con respecto al control, DIAL5m y HI Anti-Dyn para los pulsos de menor duración PAs y SQP5ms, pero no afectó la respuesta en los SQP10-50ms.

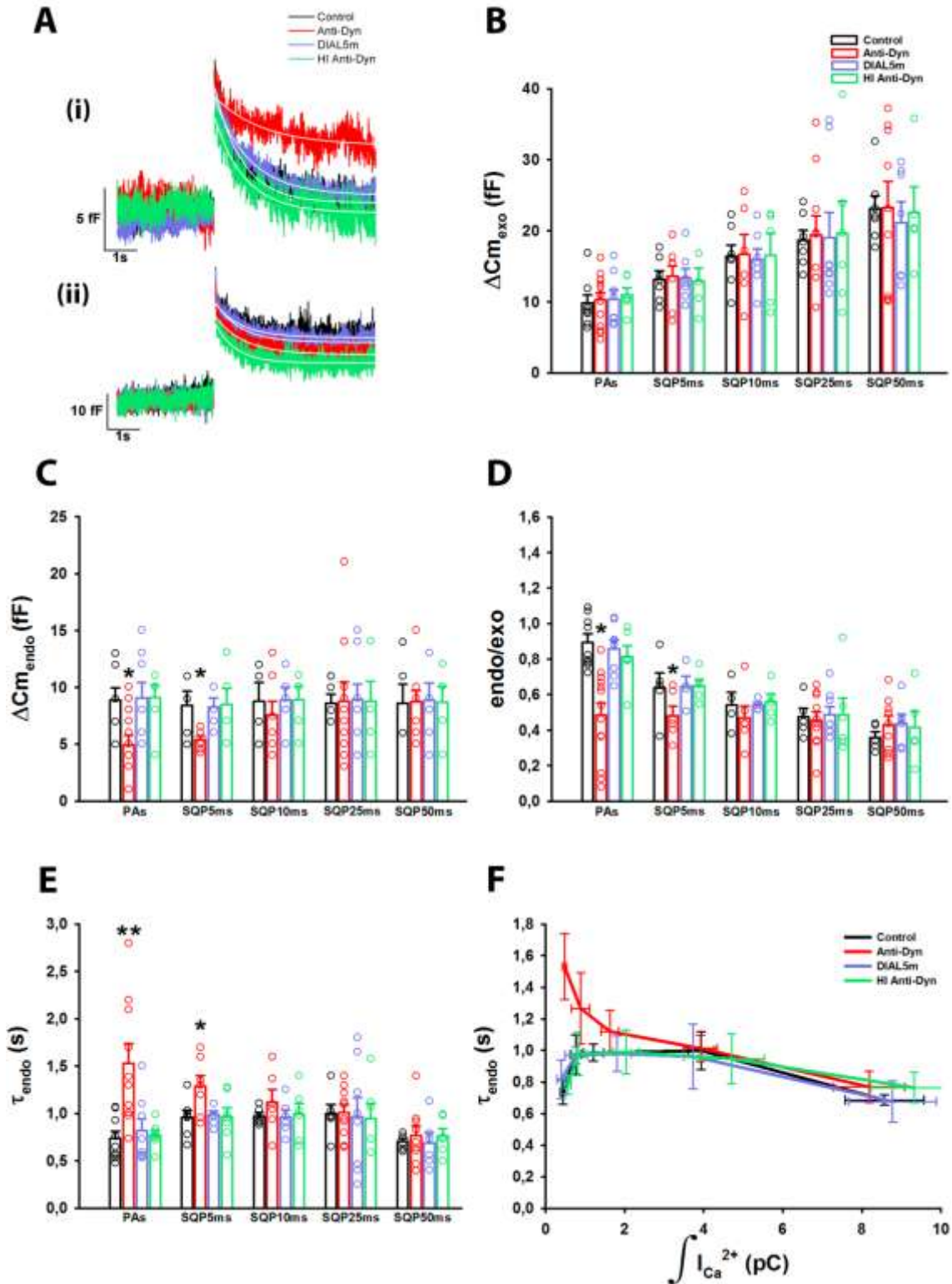


Figura 4.11 – Exocitosis y endocitosis bajo tratamiento con Anti-Dyn. (A) Registros representativos de capacitancia para estímulos PAs (i) y SQP50ms (ii) en las condiciones control (negro), Anti-Dyn (rojo), DIAL5m (azul) y HI Anti-Dyn (verde). Anti-Dyn y HI Anti-Dyn, 7 nM ambos, fueron dializados a través de la pipeta de *patch clamp*. Las líneas blancas superpuestas a las caídas de los registros representan el ajuste de las mismas a una función monoexponencial decreciente para PAs ($\tau_{\text{endo Control}}: 0,75 \text{ s}$, $R>0,9547$; $\tau_{\text{endo Anti-Dyn}}: 1,49 \text{ s}$, $R>0,7861$; $\tau_{\text{endo DIAL5m}}: 0,82 \text{ s}$, $R>0,9737$; $\tau_{\text{endo HI Anti-Dyn}}: 0,78 \text{ s}$, $R>0,9091$) y SQP50ms ($\tau_{\text{endo Control}}: 0,81 \text{ s}$, $R>0,7653$; $\tau_{\text{endo Anti-Dyn}}: 0,79 \text{ s}$, $R>0,8984$; $\tau_{\text{endo DIAL5m}}: 0,78 \text{ s}$, $R>0,8615$; $\tau_{\text{endo HI Anti-Dyn}}: 0,64 \text{ s}$, $R>0,8233$). **(B), (C), (D) y (E)** Los gráficos muestran los promedios (\pm ES) (barras) y los valores experimentales individuales (círculos vacíos, una medición por célula) de $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$, $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$, endo/exo y τ_{endo} en las condiciones control (en negro), Anti-Dyn (en rojo), DIAL5m (en azul) y HI Anti-Dyn (en verde), respectivamente, para PAs y SQP5-50ms. Mientras que $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$ no muestra diferencias entre tratamientos, $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$ y endo/exo disminuyen significativamente para PAs y SQP5ms en células tratadas con Anti-Dyn respecto del control. Finalmente, τ_{endo} aumenta significativamente (se desacelera) en células tratadas con Anti-Dyn respecto del control para PAs y SQP5ms. **(F)** Se grafican los promedios (\pm ES) de τ_{endo} en función de los valores promedios (\pm ES) de $[\text{I}_{\text{Ca}}^{2+}]$ de todos los estímulos empleados, en las condiciones control (línea negra), Anti-Dyn (línea roja), DIAL5m (línea azul) y HI Anti-Dyn (línea verde) para PAs y SQP5-50ms. Bajo el tratamiento con Anti-Dyn, el parámetro τ_{endo} pierde el comportamiento bifásico característico del control, decayendo monótonicamente. El número de células registradas para cada condición experimental se muestran en la Tabla 4.1, a excepción de los valores de τ_{endo} (paneles (E) y (F)) donde en la condición Anti-Dyn $n_{\text{PAs}}=9$ y $n_{\text{SQP5ms}}=6$. Análisis de varianza (ANOVA) - Test de *Bonferroni*, * $p<0,02$; ** $p<0,001$.

Consecuentemente, también el cociente endo/exo se vio significativamente disminuido para PAs y SQP5ms, pero no para estímulos de mayor duración. Por último, el tratamiento con Anti-Dyn aumentó significativamente τ_{endo} en comparación al control, a DIAL5m y a HI Anti-Dyn para PAs (aumento de ~100%) y para SQP5ms, pero no para el resto de los estímulos (Figura 4.11.E). Dicho de otra manera, Anti-Dyn provoca una significativa reducción en la velocidad de la endocitosis rápida que se genera en respuesta a PAs y SQP5ms. En general, vemos que Anti-Dyn provoca efectos similares a los obtenidos para GTP γ S. Es importante mencionar que una pequeña fracción de los registros de capacitancia para PAs y SQP5ms en la condición Anti-Dyn no mostraron caída en la señal de capacitancia (evidencia de endocitosis), por ello solamente el 70% y 75 %, respectivamente, de estos registros pudieron ser ajustados para estimar el valor de τ_{endo} .

Finalmente, se grafica la variación τ_{endo} en función de $\int \text{Ca}^{2+}$ para todas las condiciones experimentales evaluadas en esta sección (Figura 4.11.F). Al igual que el tratamiento con GTP γ S, es posible observar cómo en presencia de Anti-Dyn desaparece completamente la fase de subida de τ_{endo} observada en la condición control para bajas $\int \text{Ca}^{2+}$. Por el contrario, se observa una caída monotónica de τ_{endo} , es decir un aumento de la velocidad de la endocitosis, a medida que aumenta la entrada de Ca^{2+} .

La marcada reducción de la endocitosis rápida que se desarrolla luego de la exocitosis asociada a PAs como consecuencia de la inhibición de la dinamina con Anti-Dyn reafirman resultados previos de nuestro laboratorio (Moya-Díaz y col, 2016). Los resultados de estas dos subsecciones permiten también extender la participación de un mecanismo de endocitosis rápida dinamina-dependiente a las respuestas obtenidas para pulsos del tipo SQP5ms. Más aún, dado que los resultados obtenidos con Anti-Dyn son similares a los obtenidos con GTP γ S, podemos deducir que muy probablemente el blanco de acción de este nucleótido no hidrolizable en nuestros experimentos sea la dinamina y no otras GTPasas. También es importante resaltar el hecho de que las curvas control, DIAL5m y HI Anti-Dyn prácticamente se superponen en todo el rango de $\int \text{Ca}^{2+}$ (Figura 4.11.F). Esto indica que no habría factores solubles importantes asociados a los mecanismos endocíticos bajo estudio que se pierdan por difusión durante nuestras mediciones, como fue mencionado por otros autores para ciertos tipos de endocitosis (Smith y Neher, 1997). Es altamente conocido que la técnica de *whole-cell* no evita que se pierdan por difusión hacia la micropipeta ciertos factores (a menudo proteínas solubles) críticos para ciertos procesos celulares (Pusch y Neher, 1988), por lo cual ciertas variables van decayendo durante el tiempo del experimento, fenómeno conocido como *rundown*. Si esto ocurriese para factores limitantes involucrados en las endocitosis registradas, los valores de $\Delta \text{Cm}_{\text{endo}}$, y endo/exo deberían caer (τ_{endo} debería aumentar) en DIAL5m y HI Anti-Dyn respecto al grupo control, ya que las dos primeras fueron sometidas a 5 minutos adicionales de diálisis al comienzo del experimento. Este dato nos permite confiar en que los cambios que estamos viendo sobre $\Delta \text{Cm}_{\text{endo}}$ en el grupo experimental Anti-Dyn se deben específicamente a la inactivación de la

acción de la dinamina. Sin embargo, la conclusión más novedosa que podemos extraer de los resultados de las dos últimas subsecciones es que cuando la entrada de Ca^{2+} a la célula supera cierto umbral, es decir a partir de los SQP10ms, prevalecería un mecanismo de endocitosis dinamina-independiente, insensible a las aplicaciones de GTP γ S y Anti-Dyn. Esto descartaría la posibilidad de que la endocitosis rápida dinamina-dependiente domine el proceso de endocitosis en todo el rango de estímulos aplicados como nos habíamos preguntado previamente, sino que aparentemente algún otro mecanismo endocítico se estaría activando cuando empleamos despolarizaciones más prolongadas.

4.3.3 Inhibición de la acción de la dinamina por competencia con un péptido del dominio PRD de la dinamina

Los resultados de las dos sub-secciones previas muestran una significativa disminución de $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$ y endo/exo, como también un marcado aumento en τ_{endo} , cuando se estimula con PAs y SQP5ms en presencia de agentes que inhiben a la GTPasa dinamina. Por el contrario, al aumentar $\int\text{I}_{\text{Ca}^{2+}}$ como consecuencia de estímulos más prolongados, estos mismos parámetros se hacen insensibles a dichos tratamientos. Si bien existen ciertos datos en la bibliografía acerca de la existencia de mecanismos de endocitosis dinamina-independientes (Zhang y col, 2004; Xu y col, 2008; Van Hook y Thoreson, 2012), estos son escasos. La dinamina por lo general es considerada la proteína por excelencia que interviene en el corte del fino cuello que une la vesícula endocitada a la membrana plasmática para finalizar la endocitosis (Takei y col, 2005). Por lo tanto es necesario recabar más evidencias que confirmen la existencia de este hipotético mecanismo dinamina-independiente. Para esto decidimos dializar a través de la pipeta de *patch* la proteína de fusión GST-Dyn829-842 (GST-Dyn), la cual contiene una *Glutathione S-transferasa* (GST) unida a un péptido que es parte de un dominio de la dinamina rico en prolinas y argininas (PRD), el cual reconoce y se une a otras proteínas de la maquinaria endocítica que contengan dominios SH3. Se ha demostrado que este péptido inhibe efectivamente el reclutamiento de la dinamina a los sitios endocíticos en terminales neuronales (Shupliakov y col, 1997), como también la

endocitosis en células cromafines murinas (Fulop y col, 2008; Moya-Diaz y col, 2016). Una ventaja de utilizar este péptido respecto de Anti-Dyn, es que GST-Dyn al ser más pequeño tendría una velocidad de difusión desde la pipeta de *patch* hacia el citosol más alta que el anticuerpo, y por lo tanto alcanzaría un título más alto dentro de la célula en el tiempo de diálisis utilizado en los experimentos (Pusch y Neher, 1988). La aplicación de GST-Dyn por 5 minutos (30 μ M) no generó cambios en $I_{Ca^{2+}}$ ni en $\int I_{Ca^{2+}}$ respecto de las condiciones control y GST (diálisis de la proteína de fusión sin el dominio PRD, control negativo) (Figura 4.12 paneles A y B).

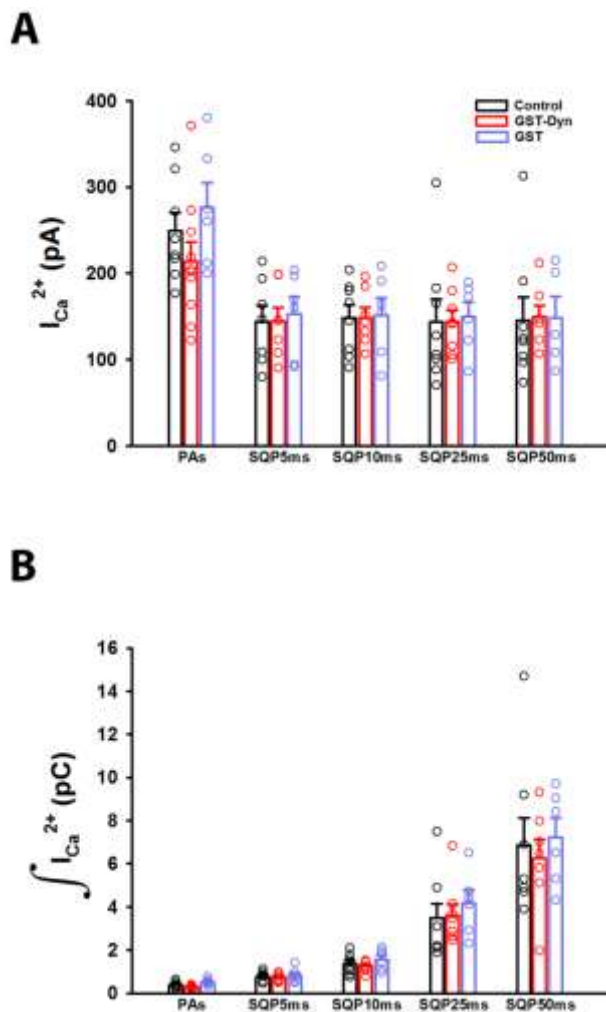


Figura 4.12- Corrientes y entradas de calcio bajo tratamiento con GST-Dyn.

(A) El gráfico muestra los promedios (barras vacías) (\pm ES) de los valores de $I_{Ca^{2+}}$ (A) y $\int I_{Ca^{2+}}$ (B), y los valores experimentales individuales (una medición por célula, círculos vacíos) en las condiciones control (negro), GST-Dyn (rojo) y GST (azul) para PAs y SQP5-50ms respectivamente. GST-Dyn y GST, 30 μ M ambos, fueron dializados a través de la pipeta de *patch clamp*. No se observaron diferencias entre tratamientos para cada estímulo empleado en ninguna de las dos variables representadas. El número de células registradas para los pulsos en cada condición experimental se muestra en la Tabla 4.2.

Tratamiento	n				
	PAs	SQP5ms	SQP10ms	SQP25ms	SQP50ms
Control	8	8	7	8	8
GST-Dyn	10	9	9	10	9
GST	6	6	6	6	5

Tabla 4.2 – Número de células individuales medidas correspondientes a cada tratamiento. Se detalla el “n” (número de mediciones individuales) para cada condición experimental correspondiente a las Figuras 4.12 y 4.13.

En el panel A de la Figura 4.13 se muestran trazados de capacitancia representativos correspondientes a PAs (i) y SQP50ms (ii) para las condiciones control, GST y GST-Dyn.

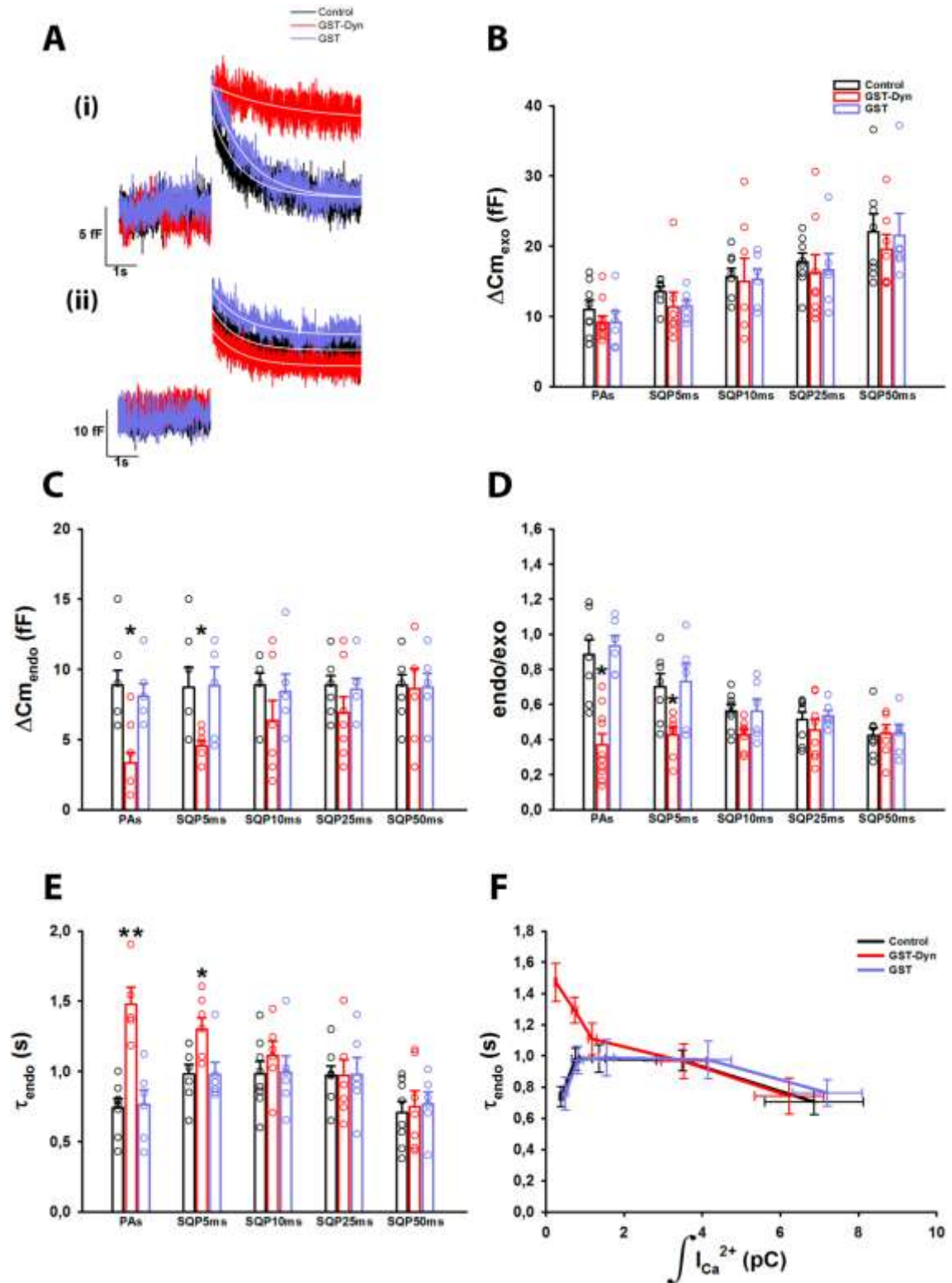


Figura 4.13 – Exocitosis y endocitosis bajo tratamiento con GST-Dyn. (A) Registros representativos de capacitancia para estímulos PAs (i) y SQP50ms (ii) en las condiciones control (negro), GST-Dyn (rojo) y GST (azul). GST-Dyn y GST, 30 μ M ambos, fueron dializados

a través de la pipeta de *patch clamp*. Las líneas blancas superpuestas a las caídas de los registros representan el ajuste de las mismas a una función monoexponencial decreciente para PAs ($\tau_{\text{endo Control}}$: 0,76 s, $R > 0,8979$; $\tau_{\text{endo GST-Dyn}}$: 1,89 s, $R > 0,6187$; $\tau_{\text{endo GST}}$: 0,85 s, $R > 0,9441$) y SQP50ms ($\tau_{\text{endo Control}}$: 0,79 s, $R > 0,7929$; $\tau_{\text{endo GST-Dyn}}$: 0,89 s, $R > 0,7974$; $\tau_{\text{endo GST}}$: 0,92 s, $R > 0,8276$). **(B), (C), (D) y (E)** Los gráficos muestran los promedios (\pm ES) (barras) y los valores experimentales individuales (círculos vacíos, una medición por célula) de $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$, $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$, endo/exo y τ_{endo} en las condiciones control (en negro), GST-Dyn (en rojo) y GST (en azul), respectivamente, para PAs y SQP5-50 ms. $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$ no muestra diferencias entre tratamientos, pero $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$ y endo/exo disminuyen significativamente para PAs y SQP5ms en células tratadas con GST-Dyn respecto del control. Por último, τ_{endo} con GST-Dyn aumenta significativamente (se desacelera) respecto del control para los estímulos PAs y SQP5ms. **(F)** Se grafican los promedios (\pm ES) de τ_{endo} en función de los valores promedios (\pm ES) de $\int\text{I}_{\text{Ca}}^{2+}$ de todos los estímulos empleados, en las condiciones control (línea negra), GST-Dyn (línea roja) y GST (línea azul) para PAs y SQP5-50ms. Observamos que τ_{endo} con GST-Dyn decae monotónicamente, perdiendo el comportamiento bifásico descrito para la condición control. El número de células registradas para cada condición se muestran en la Tabla 4.2. La cantidad de células individuales correspondientes a GST-Dyn es la misma en todos los paneles (Tabla 4.2), con excepción de τ_{endo} (paneles (E) y (F)) donde para PAs y SQP5ms fueron $n=5$ y $n=6$ respectivamente. Análisis de varianza (ANOVA) - Test de *Bonferroni*, * $p < 0,015$; ** $p < 0,001$.

Es posible observar que GST-Dyn produce un efecto similar a GTP γ S y Anti-Dyn, es decir no afecta la amplitud de la exocitosis para ninguno de los dos tipos de estímulos, pero provoca una clara reducción de la endocitosis en PAs. La cuantificación de los parámetros $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$, $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$ y endo/exo, que se grafican en los paneles A, B y C de la Figura 4.13, también reflejan resultados similares a los observados con GTP γ S y Anti-Dyn. Básicamente, $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$ no cambia entre las distintas condiciones experimentales, $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$ es reducida por GST-Dyn en aproximadamente un 60% respecto del control y un 50% respecto GST, para PAs y SQP5ms, y congruentemente el parámetro endo/exo también es reducido significativamente por GST-Dyn para los mismos tipos de estímulos. Este efecto es congruente con los resultados obtenidos por el grupo de Corey Smith y por nuestro grupo en forma previa, donde se observó que la endocitosis generada por la estimulación con PAs aislados o con trenes de PAs a bajas frecuencias (0,5 Hz) en células cromafines, en presencia de este mismo péptido, fue disminuida significativamente respecto de la condición control (Fulop y col, 2008, Moya-Díaz y col, 2016). Finalmente, τ_{endo} también

fue afectado por GST-Dyn de manera similar a lo observado con GTP γ S y Anti-Dyn, aumentando significativamente para los pulsos cortos (PAs y SQP5ms) respecto del control y del grupo GST, y perdiendo consecutivamente su comportamiento bifásico cuando se graficó en función de $\int I_{Ca^{2+}}$ (Figura 4.13, paneles E y F). Es importante mencionar que solamente un 50% de los experimentos obtenidos por estimulación con PAs y SQP5ms pudieron ser ajustados en la condición GST-Dyn, dado que una cierta fracción de los registros capacitivos para estos pulsos no presentaban endocitosis y/o la caída de la señal de capacitancia era tan sutil que el ajuste arrojaba un valor de τ_{endo} muy indeterminado.

Tomando en cuenta todos los experimentos realizados hasta el momento donde se inhibió a la GTPasa dinamina, comienza a sedimentarse la idea de la presencia de un mecanismo de endocitosis rápida dinamina-independiente que podría estar cooperando con el dependiente de dinamina en la re-internalización de membrana asociada a la exocitosis de IRP.

4.3.4 Inhibición de la actividad de la dinamina endógena por expresión del mutante DynI K44A

En las sub-secciones anteriores hemos aplicado diferentes tratamientos para inhibir la acción de la GTPasa dinamina en forma aguda, ya sea impidiendo la hidrólisis de GTP (GTP γ S), evitando la oligomerización de monómeros de dinamina (Anti-Dyn), o compitiendo por los sitios de unión de la dinamina en la maquinaria endocítica (GST-Dyn). En esta parte realizamos experimentos en células transfectadas con el mutante de dinamina DynI K44A (unida a EGFP), el cual tiene el sitio de unión a GTP alterado de modo que no pueda unir a este nucleótido (McMahon y Boucrot, 2011), con el objetivo de inhibir la actividad de la dinamina en forma constitutiva. En el panel A y B de la Figura 4.14 se muestra la cuantificación de $I_{Ca^{2+}}$ y $\int I_{Ca^{2+}}$ para la condición control (células que pasaron por el proceso de transfección sin incluir un vector plasmídico), EGFP (células expresando solamente el vector EGFP) y DynI K44A, para los diferentes estímulos empleados. No existen diferencias entre las tres condiciones, aunque sí se observa una cierta tendencia a disminuir en $I_{Ca^{2+}}$ y $\int I_{Ca^{2+}}$ en las células transfectadas respecto del control. Esto ya lo

observamos previamente para diferentes péptidos transfectados, y parece ser un efecto inespecífico asociado al proceso de transfección.

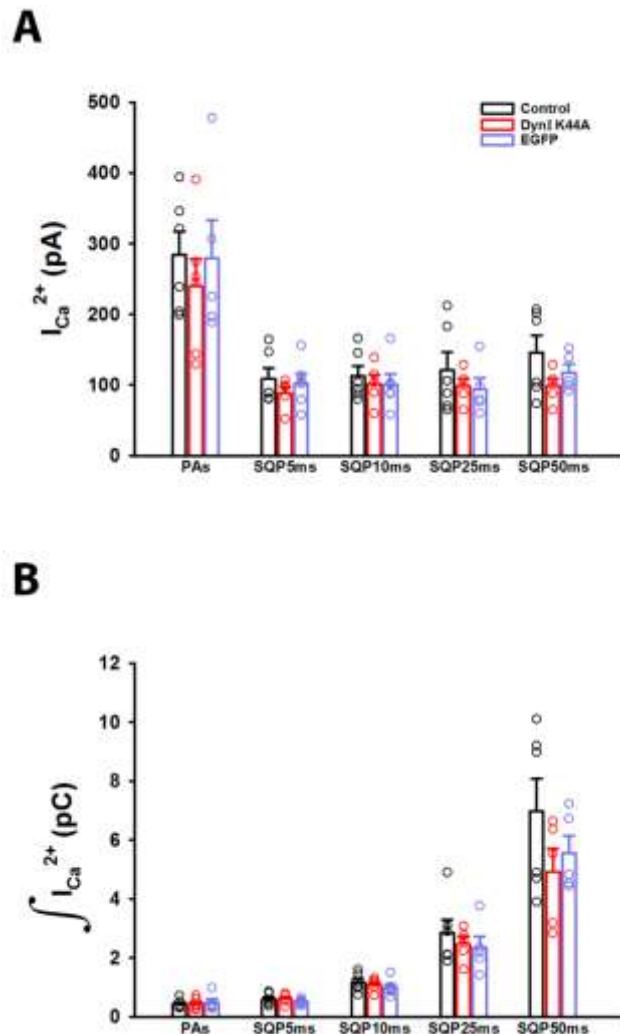


Figura 4.14- Corrientes y entradas de calcio en células que expresan el mutante dominante negativo de la dinamina DynI K44A. (A) El gráfico muestra los promedios (barras vacías) (\pm ES) de los valores de $I_{Ca^{2+}}$ **(A)** y $\int I_{Ca^{2+}}$ **(B)**, y los valores experimentales individuales (una medición por célula, círculos vacíos) en las condiciones control (negro), DynI K44A (rojo) y EGFP (azul) para PAs y SQP5-50ms. No se observan diferencias entre condiciones experimentales para cada estímulo empleado en ninguna de las dos variables representadas. El número de células registradas para cada condición experimental se muestra en la Tabla 4.3.

Tratamiento	n				
	PAs	SQP5ms	SQP10ms	SQP25ms	SQP50ms
Control	7	8	7	7	8
DynI K44A	10	8	7	7	8
EGFP	5	5	5	5	5

Tabla 4.3 – Células individuales medidas para cada tratamiento. El número de mediciones individuales para cada condición experimental que se corresponde con las Figuras 4.14 y 4.15.

La Figura 4.15.Ai exhibe trazados típicos de capacitancia en respuesta a PAs en las tres condiciones experimentales, mostrando al igual que en los tratamientos previos una clara inhibición de la endocitosis para la condición DynI K44A respecto del control y de EGFP. Contrariamente, y también en

forma similar a los tratamientos previos, los trazados para SQP50ms no mostraron cambios evidentes entre células transfectadas y controles (Figura 4.15.Aii).

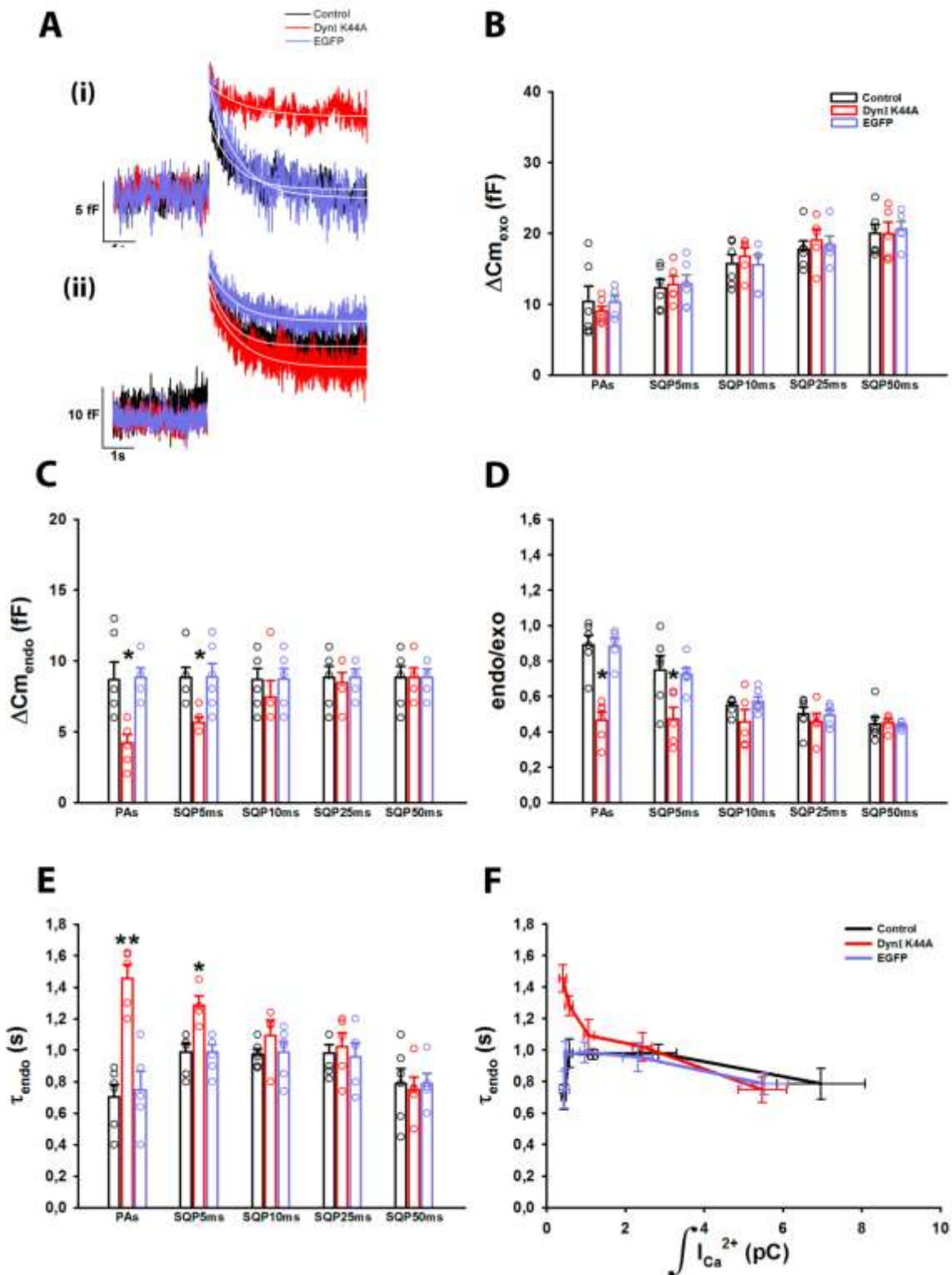


Figura 4.15 – Exocitosis y endocitosis en células que expresan el mutante dominante negativo de la dinamina DynI K44A. (A) Registros representativos de capacitancia para estímulos PAs (i) y SQP50ms (ii) en las condiciones control (negro), DynI K44A (rojo) y EGFP

(azul). Las líneas blancas superpuestas a las caídas de los registros representan el ajuste de las mismas a una función monoexponencial decreciente para PAs ($\tau_{\text{endo Control}}$: 0,76 s, $R > 0,8371$; $\tau_{\text{endo DynIK44A}}$: 1,29 s, $R > 0,7061$; $\tau_{\text{endo EGFP}}$: 0,86 s, $R > 0,8807$) y SQP50ms ($\tau_{\text{endo Control}}$: 0,64 s, $R > 0,8207$; $\tau_{\text{endo DynIK44A}}$: 0,81 s, $R > 0,8715$; $\tau_{\text{endo EGFP}}$: 0,74 s, $R > 0,8778$). **(B), (C), (D) y (E)** Los gráficos muestran los promedios (\pm ES) (barras) y los valores experimentales individuales (círculos vacíos, una medición por célula) de $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$, $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$, endo/exo y τ_{endo} en las condiciones control (negro), DynIK44A (rojo) y EGFP (azul), respectivamente, para PAs y SQP5-50 ms. $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$ no muestra diferencias entre tratamientos, pero $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$ y endo/exo disminuyen significativamente para PAs y SQP5ms en células tratadas con DynIK44A respecto del control. Por último, τ_{endo} con DynIK44A aumenta significativamente (se desacelera) respecto del control para los estímulos PAs y SQP5ms. **(F)** Se grafican los promedios (\pm ES) de τ_{endo} en función de los valores promedios (\pm ES) de $\text{I}_{\text{Ca}}^{2+}$ de todos los estímulos empleados, en las condiciones control (línea negra), DynIK44A (línea roja) y EGFP (línea azul) para PAs y SQP5-50ms. Observamos que τ_{endo} con DynIK44A decae monotónicamente, perdiendo el comportamiento bifásico descrito para la condición control. El número de células registradas para cada condición se muestra en la Tabla 4.3. La cantidad de células individuales correspondientes a DynIK44A es la misma en todos los paneles, con excepción de τ_{endo} (paneles (E) y (F)) donde para PAs y SQP5ms fueron $n=5$ y $n=4$ respectivamente. Análisis de varianza (ANOVA) - Test de *Bonferroni*, * $p < 0,025$; ** $p < 0,001$.

Los parámetros $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$, $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$ y endo/exo obtenidos de esta serie experimental se grafican en los paneles B, C y D de la Figura 4.15. Nuevamente, vemos que $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$ no cambia entre condiciones experimentales para cada estímulo empleado, pero si se observa una significativa reducción de $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$ para PAs y SQP5ms en aproximadamente un 50% y un 40% respectivamente (valores muy similares a los obtenidos con los tratamientos previos). También en forma similar a los tratamientos previos, endo/exo siguió el mismo comportamiento que $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$, siendo inhibida marcadamente por DynI K44A para PAs y SQP5ms.

DynI K44A, al igual que los otros inhibidores de la actividad de dinamina utilizados, indujo un aumento significativo de τ_{endo} (se desaceleró la endocitosis) para PAs y SQP5ms, pero no afectó los valores de esta variable para los estímulos más prolongados (Figura 4.15.E). Solamente el 50% de los registros capacitivos correspondientes a PAs y SQP5ms, respectivamente, pudieron ser ajustados a una curva de caída mono-exponencial para obtener el valor de τ_{endo} . Esto se debe a que no todos los trazados exhibieron endocitosis, y/o

presentaban demasiado ruido en la señal de capacitancia, lo que impedía un ajuste fiable y una estimación precisa de τ_{endo} . Por último, el gráfico de τ_{endo} en función de $\int \text{Ca}^{2+}$ (Figura 4.15.F) muestra el mismo comportamiento de las otras condiciones experimentales donde la dinamina fue inhibida. Se observa cómo en presencia de DynI K44A desaparece completamente la fase de subida de τ_{endo} típica de la condición control para bajas $\int \text{Ca}^{2+}$, y por el contrario hay una monotónica caída de τ_{endo} , es decir un aumento de la velocidad de la endocitosis, a medida que aumenta la entrada de Ca^{2+} . Esto sugiere la presencia de un mecanismo endocítico dinamina-independiente que estaría siendo modulado positivamente por Ca^{2+} (Figura 4.15.F).

Cada tratamiento experimental realizado para inhibir la acción de la dinamina tiene sus limitaciones y sus ventajas. La aplicación de GTP γ S no es específica para esta proteína, ya que afecta a todas las GTPasas. La transfección con DynI K44A tiene la ventaja de que la expresión de una dinamina mutante no funcional por varias horas permitiría que se alcance un estado estacionario de inhibición de dicha proteína, pero a su vez existe el problema de que puedan aparecer procesos compensatorios. Finalmente, los tratamientos agudos con Anti-Dyn o GST-Dyn evitan este último problema, pero debemos tener en cuenta que la difusión de los compuestos a través de la pipeta de *patch* depende del peso molecular (Pusch y Neher, 1988), por lo que para las proteínas esto toma varios minutos. Esto último provoca que proteínas de alto peso molecular como el anticuerpo puedan no llegar a un estado de equilibrio de concentraciones entre la pipeta y el citosol en los tiempos de incubación previos a las mediciones. Por lo tanto no podemos asegurar que en los 5 minutos de diálisis que establecimos en nuestro protocolo se haya completado la inhibición de toda la dinamina endógena. Sin embargo, el hecho de que las cuatro estrategias experimentales utilizadas hayan dado resultados tan similares fortalece en mucho nuestras conclusiones. Esta alta similitud entre las cuatro series experimentales nos permite afirmar que a consecuencia de la exocitosis de IRP se activan al menos dos mecanismos endocíticos compensatorios, uno dinamina-dependiente y otro dinamina-independiente. La

prevalencia de uno u otro mecanismo parecería depender de la magnitud de la entrada de Ca^{2+} al citosol, y por lo tanto de la duración del estímulo aplicado.

En general se considera a la dinamina como el actor fundamental que cataliza la liberación de la vesícula durante la etapa final de los mecanismos endocíticos más estudiados. Por lo tanto, ¿qué asidero tiene la presencia de una endocitosis independiente de dinamina? Otros autores han reportado evidencias en varios modelos experimentales sobre la existencia de procesos endocíticos dinamina-independientes. El grupo de Ling Gang Wu, por ejemplo, estudió en cáliz de Held el efecto de GTP γ S y Anti-Dyn sobre la endocitosis producida por dos estímulos de muy diferente intensidad. Reportaron que si bien dichos tratamientos inhibieron a la endocitosis inducida por una única depolarización cuadrada de 10 ms, los mismos no resultaron efectivos sobre la endocitosis promovida por un tren de estímulos a alta frecuencia (10 ms, 10Hz) (Xu y col, 2008). En células fotorreceptoras de tipo cono de retina de salamandra, la endocitosis desarrollada luego de la aplicación de depolarizaciones cuadradas individuales de 25 ms no resultó afectada por inhibidores de la dinamina como Dynasore o Dyngo-4a (Van Hook y Thoreson, 2012). Finalmente, en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) de rata, la estimulación con trenes de depolarizaciones cuadradas de 10 ms a frecuencias altas (40 Hz) provocó una endocitosis rápida que no pudo ser inhibida ni por la transfección con la dinamina mutante K44A, ni con la diálisis del péptido GST-Dyn (Zhang y col, 2004).

Otra conclusión importante surge a partir de la observación de las Figuras 4.9.F, 4.11.F, 4.13.F y 4.15.F. Se puede observar de manera análoga en todas estas figuras como la velocidad de la endocitosis dinamina-independiente aumenta con el incremento de la entrada de Ca^{2+} a la célula. Esto se refuerza con los resultados representados en la Figura 4.7.E, donde se observó una clara relación positiva entre la velocidad de endocitosis y la entrada de Ca^{2+} durante SQP50ms aplicados a distintas $[\text{Ca}^{2+}]_e$. Todo esto indica que la endocitosis dinamina-independiente que se activa bajo nuestras condiciones experimentales sería modulada positivamente por el Ca^{2+} citosólico. Esto es hasta ahora lo único que sabemos sobre este mecanismo endocítico, y hasta el momento no tenemos evidencias de otros aspectos asociados a este proceso. Si consideramos su dependencia con el Ca^{2+} ,

podemos suponer razonablemente la participación de alguna enzima Ca^{2+} dependiente que intervenga en su regulación. Hay evidencias que indican que la proteína quinasa C (PKC) participa de la regulación de la endocitosis en varios sistemas (Herring y col, 2005; Kanda y col, 2011; Jin y col, 2019). En las próximas secciones analizaremos esta hipótesis.

4.4 Dependencia de la endocitosis dinamina-independiente con la proteína quinasa C (PKC).

En las secciones previas de esta Tesis, determinamos que la internalización de membrana que se produce en respuesta a la exocitosis de IRP se desarrolla por medio de dos mecanismos endocíticos: uno dependiente y otro independiente de la GTPasa dinamina. Los datos sugieren además que dichos mecanismos actuarían en diferentes rangos de entrada de Ca^{2+} , y consecuentemente de grados de liberación de IRP, siendo el mecanismo dinamina-dependiente el que actuaría en respuesta a la liberación del 50% de IRP por PAs o SQP5ms, y el dinamina independiente el que prevalecería frente a la liberación de fracciones mayores de IRP por estímulos más prolongados. La endocitosis dinamina-dependiente que se produce en respuesta a la exocitosis de fracciones pequeñas de IRP ya ha sido descrita por nosotros en trabajos previos (Moya-Díaz y col, 2016; Moya Díaz y col, 2019; Montenegro y col, 2020), y un proceso muy similar ha sido también descrito por otros autores (Fulop y col, 2008; Wu y col, 2009; Xue y col, 2012). Datos no publicados de nuestro laboratorio indican que dicho mecanismo es independiente de clatrina, por lo que no consistiría en una endocitosis clásica, la cual se activa frente a estimulaciones más potentes (Artalejo y col, 2002; Elhamdami y col, 2006; Tesis doctoral de Ana Verónica Belingheri, 2016). Respecto a la endocitosis dinamina-independiente, hasta el momento sólo podemos decir que nuestros resultados sugieren que es modulado por la entrada de Ca^{2+} . Esto último, predice que algún mecanismo enzimático de regulación sensible a Ca^{2+} participaría de esta endocitosis. Estudios previos llevados a cabo por otros autores apoyan esta idea. Por ejemplo, registros de capacitancia realizados en células cromafines bovinas en cultivo, estimuladas con trenes de SQP50ms a una frecuencia de 2 Hz, mostraron una exocitosis

seguida de una endocitosis rápida, la cual fue inhibida con el inhibidor de calmodulina calmidazolium, anticuerpos monoclonales anti-calmodulina y péptidos antagonistas (CAM-KII₂₉₀₋₃₀₉ y RS20) de esta proteína (Artalejo y col, 1996). Por otro lado, experimentos realizados por el grupo de Corey Smith en *slices* de medula adrenal bovina, han demostrado la participación de la PKC en la regulación de la endocitosis desarrollada en respuesta a una exocitosis evocada por una estimulación similar a la que reciben las células cromafines en condiciones fisiológicas de reposo (tren 100 PAs, 0,5Hz). Sin embargo, no se detectó participación de PKC en la endocitosis cuando se emulaba una condición de estrés, donde la frecuencia de estímulos es 30 veces superior a la basal (Chan y Smith, 2003b).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, una posible hipótesis para explicar nuestros resultados sería que el aumento de la endocitosis dinamina-independiente frente al incremento en $\int I_{Ca^{2+}}$ podría estar asociado a la activación de un sensor proteico de Ca^{2+} . Este sensor, estaría impulsando la actividad de la maquinaria de la endocitosis dinamina-independiente en forma leve cuando se estimula con pulsos cortos, y de una manera más evidente cuando se aplican pulsos despolarizantes de mayor duración, es decir, cuando se genera una mayor entrada de Ca^{2+} al citosol. En esta Tesis evaluamos la posibilidad de que dicho sensor de Ca^{2+} sea la PKC.

4.4.1 Inhibición de la endocitosis dinamina-independiente con estaurosporina

Como primer paso decidimos realizar experimentos utilizando el protocolo de liberación gradual de IRP ya descrito en esta Tesis, pero en células tratadas con estaurosporina (100 nM) agregada en la solución externa. Las células estuvieron en contacto con la droga mínimamente por 5 minutos antes de iniciar las mediciones. Este alcaloide microbiano inicialmente fue descrito como un inhibidor de PKC, aunque hoy se sabe que no es específico, sino que es un potente inhibidor de varias quinasas (Omura y col, 1995). En la Figura 4.16, paneles A y B, se muestran graficados los parámetros $I_{Ca^{2+}}$ y $\int I_{Ca^{2+}}$ para las condiciones control y estaurosporina.

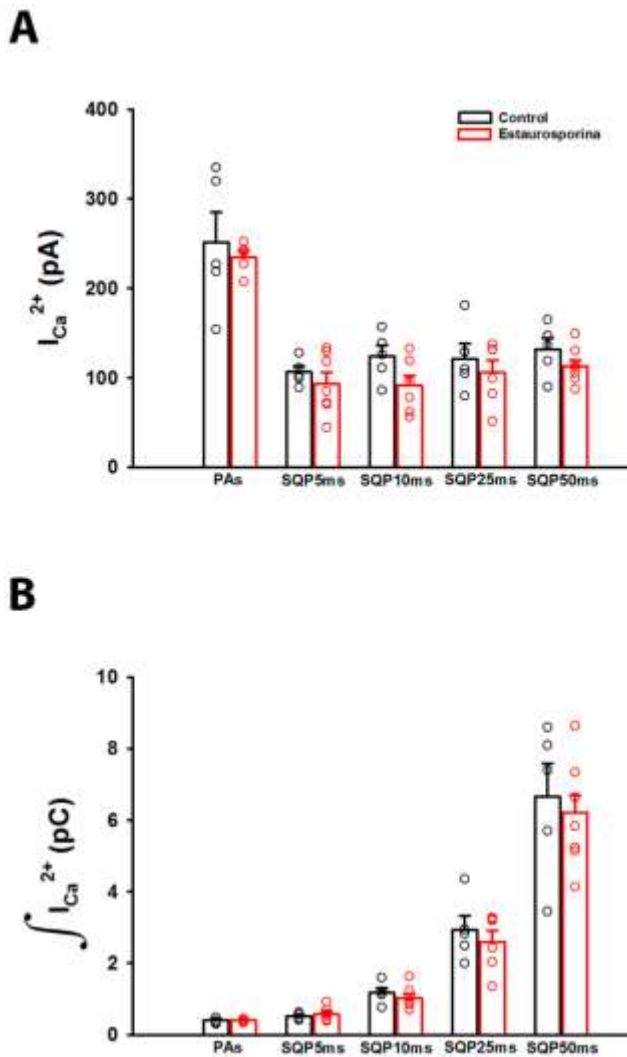


Figura 4.16- Corrientes y entradas de calcio bajo tratamiento con estaurosporina. (A) El gráfico muestra los promedios (barras vacías) (\pm ES) de los valores de $I_{Ca^{2+}}$ (A) y $\int I_{Ca^{2+}}$ (B), y los valores experimentales individuales (una medición por célula, círculos vacíos) en las condiciones control (negro) y estaurosporina (rojo) para PAs y SQP5-50ms. No se observan diferencias entre las dos condiciones experimentales para cada estímulo empleado en ninguna de las dos variables representadas. El número de células registradas en las condiciones control y estaurosporina para PAs y SQP5-50 ms fue $n_{control}=6, 6, 6, 6, 6$ y $n_{estaurosporina}=6, 8, 8, 8, 10$, respectivamente.

Es posible observar que el tratamiento no afecta los valores medidos de $I_{Ca^{2+}}$ y $\int I_{Ca^{2+}}$. Por otro lado, a partir de los registros de capacitancia que se muestran en la Figura 4.17.A, se puede observar que la estaurosporina prácticamente no afecta a la amplitud de la exocitosis para PAs (i), ni para SQP50ms (ii). Sin embargo, mientras que la droga no modifica la caída en capacitancia representativa de la endocitosis en los trazados correspondientes a PAs (ambos se recuperan completamente a los valores basales pre-estímulo), para la estimulación con SQP50ms el registro correspondiente a la condición estaurosporina evidencia una disminución en la caída de la señal capacitiva respecto del control (ii). En los paneles B, C y D de la Figura 4.17 se muestra la cuantificación de los parámetros $\Delta C_{m_{exo}}$, $\Delta C_{m_{endo}}$ y endo/exo respectivamente. Mientras que $\Delta C_{m_{exo}}$ no muestra diferencias entre condiciones experimentales para cada pulso aplicado, en $\Delta C_{m_{endo}}$ y endo/exo

se observa una disminución estadísticamente significativa para SQP25ms y SQP50ms, pero no para los pulsos más cortos.

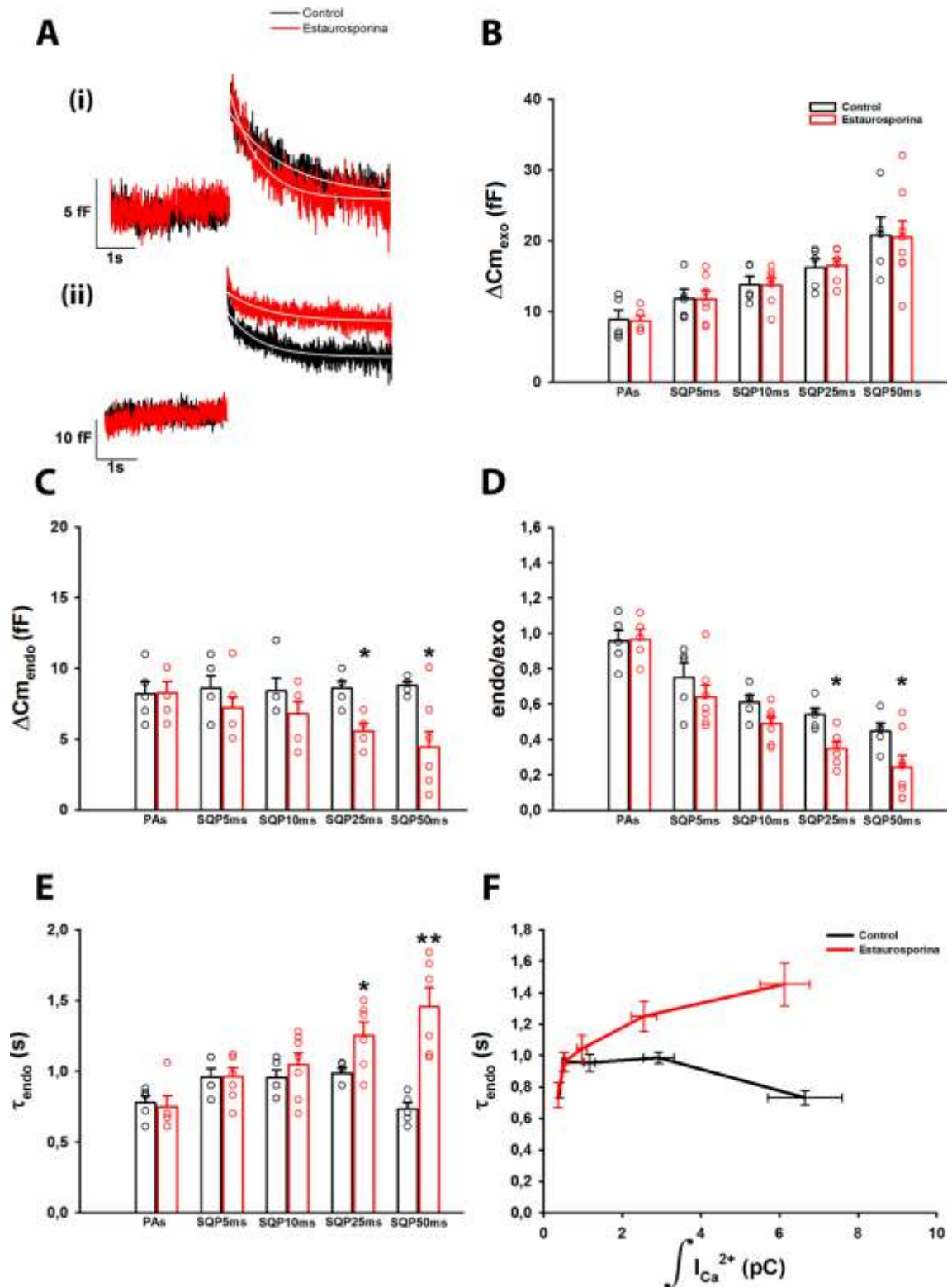


Figura 4.17 – Exocitosis y endocitosis bajo tratamiento con estaurosporina. (A) Trazados representativos de capacitancia para PAs (i) y SQP50ms (ii) en las condiciones control (negro) y con estaurosporina (rojo). Las líneas blancas superpuestas a las caídas de los registros representan el ajuste de las mismas a una función monoexponencial decreciente para PAs

($\tau_{\text{endo Control}}$: 0,86 s, $R > 0,9243$; $\tau_{\text{endo estaurosporina}}$: 0,73 s, $R > 0,9036$) y SQP50ms ($\tau_{\text{endo Control}}$: 0,76 s, $R > 0,8630$; $\tau_{\text{endo estaurosporina}}$: 1,21 s, $R > 0,7677$). **(B)**, **(C)**, **(D)** y **(E)** Los gráficos muestran el promedio (\pm ES) (barras) y los valores experimentales individuales (círculos vacíos, una medición por célula) de $\Delta C m_{\text{exo}}$, $\Delta C m_{\text{endo}}$, endo/exo y τ_{endo} , en las condiciones control (en negro) y estaurosporina (en rojo), respectivamente, para PAs y SQP5-50ms. $\Delta C m_{\text{exo}}$ no muestra diferencias entre ambas condiciones experimentales para ninguno de los estímulos aplicados, pero $\Delta C m_{\text{endo}}$ y endo/exo disminuyen significativamente para SQP25ms y SQP50ms en células tratadas con estaurosporina respecto del control. Finalmente, observamos que τ_{endo} aumenta (se desacelera) significativamente para SQP25ms y SQP50ms en células tratadas con estaurosporina respecto del control. **(F)** Se grafican los promedios (\pm ES) de τ_{endo} en función de los valores promedios (\pm ES) de $\int \text{Ca}^{2+}$ de todos los estímulos empleados, en las condiciones control (línea negra) y estaurosporina (línea roja). Observamos que τ_{endo} aumenta en forma monótonica cuando se aplica estaurosporina, perdiendo el comportamiento bifásico observado en la curva control. El número de células registradas en la condición control ($n_{\text{PAs}}=6$; $n_{\text{SQP5ms}}=6$; $n_{\text{SQP10ms}}=6$; $n_{\text{SQP25ms}}=6$; $n_{\text{SQP50ms}}=6$) y con estaurosporina ($n_{\text{PAs}}=6$; $n_{\text{SQP5ms}}=8$; $n_{\text{SQP10ms}}=8$; $n_{\text{SQP25ms}}=8$; $n_{\text{SQP50ms}}=10$), es la misma para todos los paneles a excepción del **(E)** y **(F)**, donde para SQP25ms y SQP50ms fueron $n=5$ y $n=6$, respectivamente. Test de *Student* para dos muestras independientes, * $p < 0,01$ y ** $p < 0,001$.

Finalmente, al analizar la constante temporal de la caída endocítica para cada estímulo en ambas condiciones experimentales, encontramos que τ_{endo} aumenta (se desacelera) significativamente con estaurosporina para SQP25ms y SQP50ms, pero no para los pulsos más cortos (Figura 4.17.E). Cabe destacar que en la condición con estaurosporina solamente el 60% de los trazados de capacitancia pudieron ser ajustados a una caída monoexponencial simple para SQP25ms y SQP50ms, dado que el porcentaje restante no presentaba indicios de endocitosis, o la caída de la señal capacitiva era tan sutil que el ajuste arrojaba un valor muy indeterminado de τ_{endo} . En el panel F de la Figura 4.17 se muestra un gráfico de τ_{endo} en función de la entrada de Ca^{2+} . Vemos como la curva que corresponde al tratamiento con estaurosporina pierde el efecto bifásico característico de la curva control. Pero a la inversa de lo que ocurrió cuando se inhibió a la dinamina, el comportamiento es creciente. Estos resultados, en conjunto, sugieren que el mecanismo independiente de dinamina estaría siendo regulado por la activación de alguna proteína quinasa sensible a estaurosporina.

La estaurosporina es un inhibidor no selectivo de proteínas quinasas que se asocia al sitio de unión a ATP en estas proteínas. Si bien en primer lugar fue catalogada como un inhibidor de PKC (Tamaoki y col, 1986), posteriormente se descubrió que también tenía como blanco de acción a otras proteínas quinasas tales como la tirosina quinasa (Nakano y col, 1987), la quinasa de la cadena liviana de la miosina (Watson y col, 1988) y la cdc2 quinasa (Gadbios y col, 1992), entre otras. Sin embargo, ciertas evidencias nos permiten sospechar que PKC puede ser la quinasa involucrada en nuestro mecanismo endocítico. En primer lugar, ya dijimos que este mecanismo aumenta con la entrada de Ca^{2+} a la célula, característica propia de PKC por ser una quinasa Ca^{2+} dependiente. En segundo lugar, resultados previos en *slices* de glándula adrenal de ratón muestran que de hecho existen mecanismos endocíticos modulados por PKC (Chan y Smith, 2003b). Por ello, en las secciones siguientes evaluaremos si efectivamente el mecanismo dinamina-independiente es modulado específicamente por PKC.

4.4.2 Inhibición de la endocitosis dinamina-independiente con bisindolylmaleimida XI

Como segundo paso decidimos utilizar el compuesto bisindolylmaleimida XI (Wilkinson, 1994), un inhibidor específico de las isoformas de PKC calcio-dependientes (PKC_α y PKC_β), las cuales están presentes en nuestro modelo experimental (Terbush y Holz, 1990; Morgan y col, 2005). Los resultados en general fueron similares a los obtenidos con estaurosporina. El tratamiento con bisindolylmaleimida XI (Bis XI, 3 μM), la cual fue agregada en el baño extracelular 5 minutos previos a la primera medición, no tuvo efecto sobre los parámetros $I_{\text{Ca}^{2+}}$ y $J_{\text{Ca}^{2+}}$ respecto de la condición control (Figura 4.18, paneles A y B). En el panel A de la Figura 4.19 se muestran trazados representativos de capacitancia para PAs (i) y SQP50ms (ii) en ambas condiciones experimentales. Si bien Bis XI no provoca cambios evidentes en la amplitud del incremento de capacitancia inducido por los estímulos, a simple vista podemos observar que la droga promueve una reducción de la caída de la señal capacitiva, representativa de la endocitosis, para SQP50ms, pero no para PAs. Consistentemente, $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$ no muestra cambios en todo el rango de

estimulación para ambas condiciones (Figura 4.19.B), pero $\Delta C_{m_{\text{endo}}}$ y endo/exo son reducidos significativamente por Bis XI para los SQP25ms y SQP50ms, aunque no para los pulsos más cortos, PAs, SQP5ms y SQP10ms (Figura 4.19, paneles C y D).

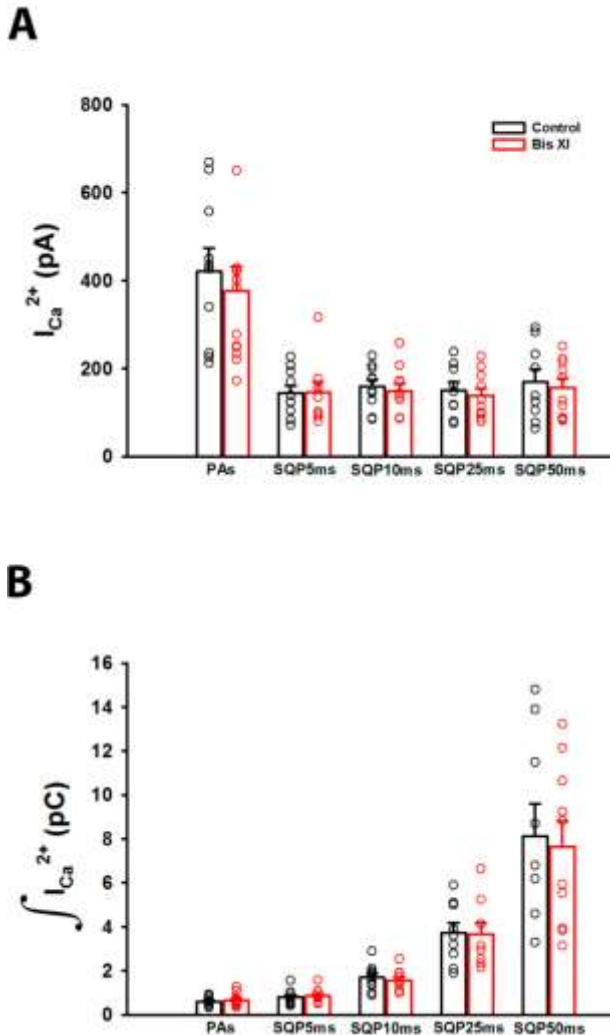


Figura 4.18- Corrientes y entradas de calcio bajo tratamiento con bisindolylmaleimida XI. El gráfico muestra los promedios (barras vacías) (\pm ES) de los valores de $I_{Ca^{2+}}$ (**A**) y $\int I_{Ca^{2+}}$ (**B**), y los valores experimentales individuales (una medición por célula, círculos vacíos) en las condiciones control (negro) y Bis XI (rojo) para PAs y SQP5-50ms. No se observan diferencias entre condiciones experimentales para cada estímulo empleado en ninguna de las dos variables representadas. El número de células registradas en las condiciones control y Bis XI para PAs y SQP5-50 ms fue $n_{\text{control}}=10, 10, 10, 8, 8$ y $n_{\text{BisXI}}=12, 10, 10, 10, 10$, respectivamente.

Luego, al analizar la cinética de la endocitosis, obtuvimos un aumento significativo en τ_{endo} (desaceleración de la endocitosis) para los SQP25ms y SQP50ms en la condición con Bis XI respecto del control, lo cual no ocurrió para los pulsos más cortos (Figura 4.19.E). Es importante mencionar que solamente un 50% de los trazados de capacitancia correspondientes a los estímulos SQP25ms y SQP50ms pudieron ser ajustados a una curva monoexponencial de caída simple, dado que la fracción restante de los mismos

no presentaba indicios de endocitosis, o la señal capacitiva era lo suficientemente ruidosa como para permitir un ajuste apropiado.

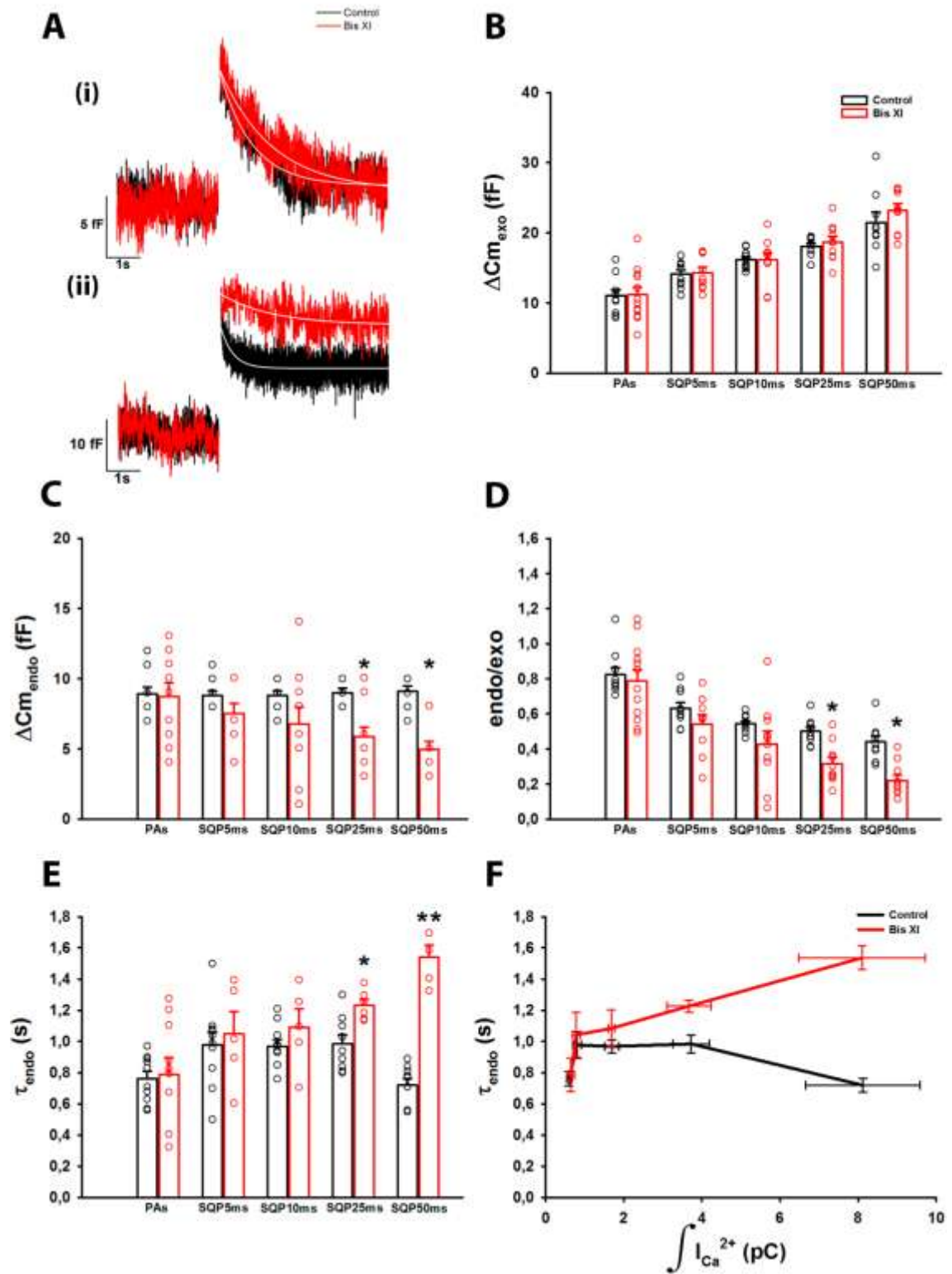


Figura 4.19 – Exocitosis y endocitosis bajo tratamiento con bisindolylmaleimida XI. (A) Trazados representativos de capacitancia para PAs (i) y SQP50ms (ii) en condiciones control (negro) y Bis XI (rojo). Las líneas blancas superpuestas a las caídas de los registros

representan el ajuste de las mismas a una función monoexponencial decreciente para PAs ($\tau_{\text{endo Control}}$: 0,74 s, $R>0,8855$; $\tau_{\text{endo Bis XI}}$: 0,91 s, $R>0,9066$) y SQP50ms ($\tau_{\text{endo Control}}$: 0,55 s, $R>0,5666$; $\tau_{\text{endo Bis XI}}$: 1,52 s, $R>0,5527$). **(B), (C), (D) y (E)** Los gráficos muestran el promedio (\pm ES) (barras) y los valores experimentales individuales (círculos vacíos, una medición por célula) de $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$, $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$, endo/exo y τ_{endo} , en las condiciones control (en negro) y Bis XI (en rojo), respectivamente, para PAs y SQP5-50ms. $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$ no muestra diferencias entre ambas condiciones experimentales para ninguno de los estímulos aplicados, pero $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$ y endo/exo disminuyen significativamente para SQP25ms y SQP50ms en células tratadas con Bis XI respecto del control. Finalmente, observamos que también τ_{endo} aumenta (se desacelera) significativamente para SQP25ms y SQP50ms en células tratadas con Bis XI respecto del control. **(F)** Se grafican los promedios (\pm ES) de τ_{endo} en función de los valores promedios (\pm ES) de $\int\text{Ca}^{2+}$ de todos los estímulos empleados, en las condiciones control (línea negra) y Bis XI (línea roja). Observamos que τ_{endo} aumenta en forma monótonica cuando se aplica Bis XI, perdiendo el comportamiento bifásico observado en la curva control. El número de células registradas en la condición control ($n_{\text{PAs}}=10$; $n_{\text{SQP5ms}}=10$; $n_{\text{SQP10ms}}=10$; $n_{\text{SQP25ms}}=8$; $n_{\text{SQP50ms}}=8$) y con Bis XI ($n_{\text{PAs}}=12$; $n_{\text{SQP5ms}}=10$; $n_{\text{SQP10ms}}=10$; $n_{\text{SQP25ms}}=10$; $n_{\text{SQP50ms}}=10$), es la misma para todos los paneles a excepción del (E) y (F), donde para SQP25ms y SQP50ms fueron $n=5$ y $n=5$, respectivamente. Test de *Student* para dos muestras independientes, $*p<0,015$ y $**p<0,001$.

El efecto de esta droga sobre la endocitosis también se ha visto en otros modelos de estudio. Por ejemplo, resultados recientes publicados por el grupo de Ling Gang Wu, mostraron que bisindolylmaleimida XI genera un claro efecto inhibitorio sobre la endocitosis disparada en cáliz de Held y neuronas hipocámpales (Jin y col, 2019), al estimular con una despolarización cuadrada de 20 ms de duración. Sin embargo, es importante mencionar que el proceso endocítico registrado por estos autores era casi 20 veces más lento que el reportado en esta Tesis.

Finalmente, en el panel F de la Figura 4.19 se grafica τ_{endo} en función de $\int\text{Ca}^{2+}$. Al igual que con estaurosporina, es posible observar cómo en presencia de Bis XI se pierde el comportamiento bifásico característico de la curva control, mostrando en cambio un comportamiento puramente creciente. Estos resultados sugieren, dada la especificidad de Bis XI, que PKC estaría modulando el mecanismo endocítico independiente de dinamina.

4.4.3 El pre-tratamiento con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) modula la endocitosis dinamina-independiente.

El conjunto de resultados mostrados previamente indica que la re-internalización de las vesículas secretorias fusionadas desde IRP depende de dos mecanismos endocíticos que operan solapadamente. El primero, dinamina-dependiente, prevalece cuando se aplica una despolarización muy breve de tipo PAs o SQP5ms, mientras que el otro, dinamina-independiente y dependiente de PKC, incrementa su actividad endocítica cuando se prolonga la duración de las despolarizaciones, y en consecuencia se induce una mayor entrada de Ca^{2+} . Este segundo mecanismo termina prevaleciendo con pulsos despolarizantes del tipo SQP25ms y SQP50ms, cuando se completa la liberación de IRP. Curiosamente, la acción de estos dos mecanismos permite mantener en nuestra condiciones experimentales niveles de $\Delta C_{m_{endo}}$ constantes en todo el rango de estimulación aplicado, es decir, a medida que se libera gradualmente IRP. Sin embargo, dado que la exocitosis aumenta con el incremento de la duración de los estímulos, la eficiencia de la endocitosis decae. De hecho, la relación endo/exo muestra que la endocitosis evocada por PAs es completamente compensatoria (endo/exo \approx 1), lo cual hace del mecanismo dinamina-dependiente una maquinaria sumamente eficiente para este tipo de estimulación. Contrariamente, para SQP50ms, donde prevalece el mecanismo independiente de dinamina, la endocitosis compensa solamente un 45% de la exocitosis (endo/exo \approx 0,45). Esto último plantea algunas dudas en cuanto a la relevancia de este segundo mecanismo en nuestro modelo experimental. Por este motivo, nos planteamos como objetivo intentar estimular farmacológicamente al mecanismo independiente de dinamina, de modo de aumentar su capacidad compensatoria. Si bien esto no demostraría en forma acabada que este mecanismo sea el encargado de re-internalizar completamente la membrana frente a la liberación total de IRP, sería por un lado un resultado que reforzaría mucho nuestras conclusiones acerca de la existencia de este mecanismo, y por el otro demostraría que dicha mecanística tiene potencialmente la capacidad de llevar a cabo la tarea. Para estos experimentos utilizamos el éster de forbol PMA, un compuesto que tiene un efecto potenciador sobre la actividad de PKC (Castagna y col, 1982). El efecto

de PMA sobre diferentes procesos mediados por PKC ha sido reportado en variadas ocasiones en células cromafines. Por ejemplo, en células cromafines bovinas se ha reportado que la potenciación de PKC por PMA provocó incrementos significativos en la transferencia de vesículas a la membrana y en la magnitud de la exocitosis evocada (Vitale y col, 1995; Gillis y col, 1996; Smith y col, 1998; Trifaró y col, 1985; Trifaró y col, 2008). Incluso, en un trabajo muy reciente, el grupo de Ling Gang Wu informó que la activación de PKC con PMA potenció a una endocitosis lenta inducida por despolarizaciones de 20 ms en cálix de Held (Jin y col, 2019). Sin embargo, los autores no mencionan si se trata de un mecanismo dependiente o no de la GTPasa dinamina.

Se ha descrito además, en ensayos realizados en células de osteosarcoma humano (Krug y Tashjian, 1987; Krug y col, 1987), células tumorales GH₃ obtenidas de glándulas pituitarias de rata (Ballester y Rosen, 1985) y líneas celulares 3Y1 de fibroblastos de rata (Lu y col, 1998), que la utilización de PMA a altas concentraciones y por un largo período de tiempo a 37° C, promueve la migración de PKC a la zona de la membrana plasmática, su ubiquitinización, y su posterior degradación en complejos proteosomales, conduciendo de esta forma a la disminución marcada de sus niveles celulares.

Por lo tanto, decidimos plantear dos esquemas experimentales utilizando PMA, donde las concentraciones y tiempos de incubación variaron. Esto se realizó para poner a prueba si la potenciación y/o la degradación de PKC por el tratamiento con éste ester de forbol modifican la eficiencia compensatoria del mecanismo endocítico dinamina-independiente. Consecuentemente, un grupo de células fue expuesto por 7 min a una concentración baja de PMA en el baño extracelular (100 nM), con el objetivo de lograr la potenciación de PKC. Separadamente, otro grupo de células fue incubado por 2 horas y media a 37°C (en estufa de cultivo) conteniendo una concentración alta (4 µM) de PMA en medio DMEM con baja glucosa, para lograr la degradación de PKC.

En los paneles A y B de la Figura 4.20 se encuentran graficados los parámetros $I_{Ca^{2+}}$ y $\int I_{Ca^{2+}}$ para las condiciones control y ambos tratamientos con PMA. Observamos que los tratamientos con PMA no modificaron las corrientes ni la entrada de Ca^{2+} respecto de la condición control para cada estímulo aplicado.

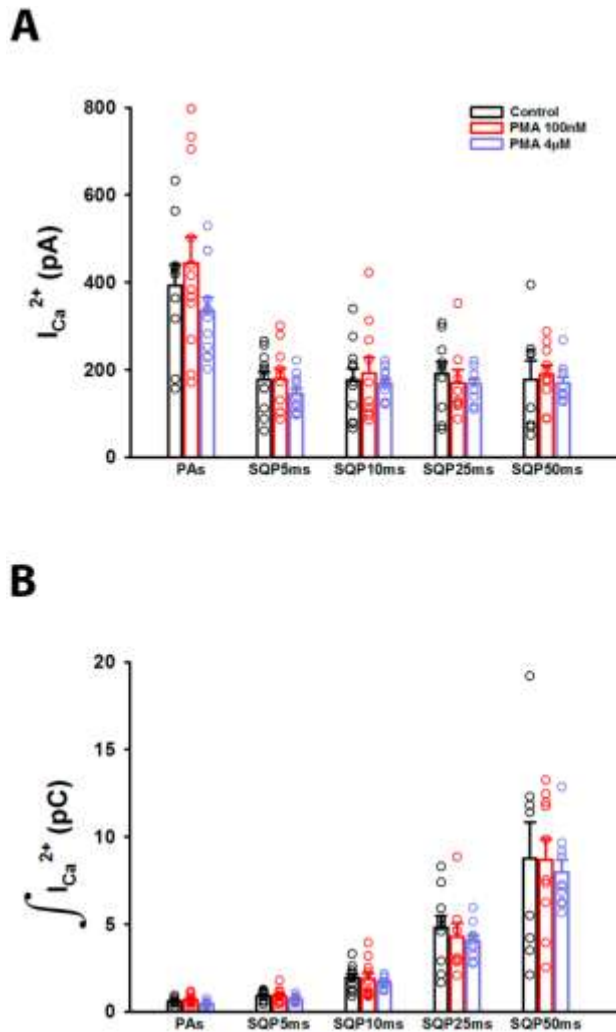


Figura 4.20- Corrientes y entradas de calcio bajo tratamiento con PMA. (A)

El gráfico muestra los promedios (barras vacías) (\pm ES) de los valores de $I_{Ca^{2+}}$ (**A**) y $\int I_{Ca^{2+}}$ (**B**), y los valores experimentales individuales (una medición por célula, círculos vacíos) en las condiciones control (negro), PMA 100 nM (rojo) y PMA 4 μ M (azul), para PAs y SQP5-50ms. No se observan diferencias entre condiciones experimentales para cada estímulo empleado en ninguna de las dos variables representadas. El número de células registradas para cada condición experimental se muestran en la Tabla 4.5.

Tratamiento	n				
	PAs	SQP5ms	SQP10ms	SQP25ms	SQP50ms
Control	10	12	11	10	10
PMA 100 nM	12	10	10	10	10
PMA 4 μ M	12	11	11	10	10

Tabla 4.5 – Células individuales medidas para cada tratamiento. El número de mediciones individuales para cada condición experimental que se corresponde con las Figuras 4.20 y 4.21.

Por otro lado, en la Figura 4.21 A se muestran trazados representativos de capacitancia para PAs (i) y para SQP50ms (ii) en las tres condiciones experimentales. Se puede ver que en el caso de PAs, ninguno de los dos tratamientos con PMA afectó la respuesta respecto del control. Sin embargo, para SQP50ms se puede observar una marcada potenciación en la caída de la señal capacitiva para el tratamiento con PMA 100 nM respecto del control, sin cambios notorios en la amplitud de la excitación previa. Esto implica un

aumento en la eficiencia de la endocitosis al compensar la exocitosis. En cambio, para la condición PMA 4 μM notamos una clara disminución de la caída de la señal de capacitancia respecto del control, también sin cambios aparentes en la exocitosis.

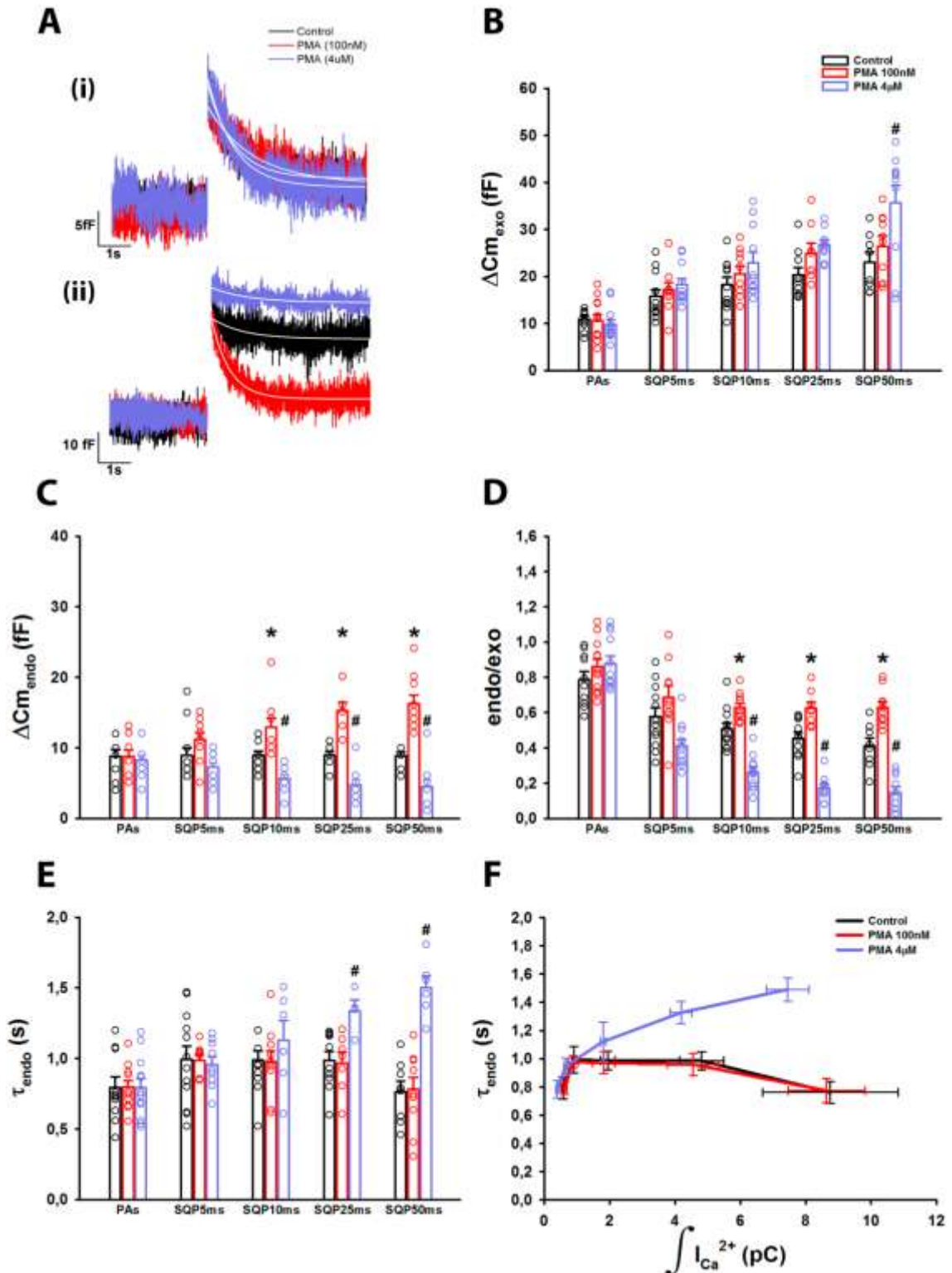


Figura 4.21 – Exocitosis y endocitosis bajo tratamiento con PMA. (A) Registros representativos de capacitancia para estímulos PAs (i) y SQP50ms (ii) en las condiciones

control (negro), PMA 100 nM (rojo) y PMA 4 μ M (azul). Las líneas blancas superpuestas a las caídas de los registros representan el ajuste de las mismas a una función monoexponencial decreciente para PAs ($\tau_{\text{endo Control}}$: 0,72 s, $R > 0,9189$; $\tau_{\text{endo PMA 100nM}}$: 0,92 s, $R > 0,8683$; $\tau_{\text{endo PMA 4}\mu\text{M}}$: 0,82 s, $R > 0,8939$) y SQP50ms ($\tau_{\text{endo Control}}$: 0,85 s, $R > 0,6854$; $\tau_{\text{endo PMA 100nM}}$: 0,61 s, $R > 0,9006$; $\tau_{\text{endo PMA 4}\mu\text{M}}$: 1,21 s, $R > 0,5568$). **(B), (C), (D) y (E)** Los gráficos muestran los promedios (\pm ES) (barras) y los valores experimentales individuales (círculos vacíos, una medición por célula) de $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$, $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$, endo/exo y τ_{endo} en las condiciones control (en negro), PMA 100 nM (en rojo) y PMA 4 μ M (en azul), respectivamente, para PAs y SQP5-50 ms. $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$ solo muestra diferencias significativas entre las condiciones PMA 4 μ M y el control para SQP50ms. $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$ y endo/exo aumentan significativamente para SQP10-50 ms en células pre-tratadas con PMA 100 nM respecto del control. Contrariamente, para los mismos pulsos, ambos parámetros se hacen estadísticamente menores respecto del control, cuando se pre-trató con PMA 4 μ M. Por último, τ_{endo} con PMA 4 μ M aumenta significativamente (se desacelera) respecto del control para los estímulos SQP25ms y SQP50ms. **(F)** Se grafican los promedios (\pm ES) de τ_{endo} en función de los valores promedios (\pm ES) de $\int\text{I}_{\text{Ca}}^{2+}$ de todos los estímulos empleados, en las condiciones control (línea negra), PMA 100 nM (línea roja) y PMA 4 μ M (línea azul) para PAs y SQP5-50ms. Observamos que τ_{endo} con PMA 4 μ M aumenta en forma monótonica, perdiendo el comportamiento bifásico descrito para la condición control. El número de células registradas para cada condición se muestran en la Tabla 4.5. La cantidad de células individuales correspondientes a PMA 4 μ M es la misma en todos los paneles, con excepción de τ_{endo} (paneles (E) y (F)) donde para SQP25ms y SQP50ms fueron $n=5$ y $n=5$, respectivamente. Análisis de varianza (ANOVA) - Test de *Bonferroni*, * $p < 0,005$; # $p < 0,001$.

Esto último es consistente con los datos obtenidos en las secciones anteriores con estaurosporina y con Bis XI, y es coherente con un efecto inhibitorio de PMA 4 μ M sobre PKC como fue definido previamente, el cual se manifiesta en nuestro caso exclusivamente para los estímulos más prolongados.

En los paneles B, C y D de la Figura 4.21 se muestran los gráficos de la cuantificación de los parámetros $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$, $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$ y endo/exo respectivamente. Es posible notar que, a medida que aumentamos la duración del estímulo, la exocitosis registrada para ambos tratamientos con PMA tiende a ser ligeramente más grande que el control. Esta diferencia en el salto exocítico muestra significancia sólo para el pulso SQP50ms en la condición con PMA 4 μ M. Este efecto podría explicarse en base al efecto que tiene PMA en promover la disgregación del citoesqueleto de actina cortical que confina al reservorio de vesículas secretorias alejado de los sitios de anclaje en la

membrana en células cromafines (Vitale y col, 1992a), generando una translocación ininterrumpida de vesículas que aumenta el tamaño de RRP (Vitale y col, 1995). Por otro lado, PMA 100 nM indujo un aumento significativo de $\Delta C_{m_{\text{endo}}}$ y endo/exo respecto del control para los pulsos SQP10-50ms. Esto está de acuerdo a lo que esperábamos, dado el efecto potenciador de este tratamiento sobre la actividad de PKC. Este resultado es coherente con lo obtenido por el grupo de Ling Gang Wu en cálix de Held y en células hipocampales en cultivo, donde vieron que la endocitosis evocada por depolarizaciones de 20 ms e inhibida con bisindolilmaleimida, podía ser recuperada a valores controles con el tratamiento con el forbolester (Jin y col, 2019). Sin embargo, dicha endocitosis tiene una cinética mucho más lenta que la nuestra. Estos datos refuerzan mucho nuestra hipótesis sobre la dependencia de la endocitosis dinámica independiente con PKC, y también demuestran que este mecanismo es capaz de actuar con una capacidad mayor a la observada en condiciones controles, re-internalizando una fracción importante (>60%, ver Figura 4.21.D) de la membrana fusionada por la liberación completa de IRP por SQP50ms. Finalmente, al analizar la velocidad de la endocitosis, encontramos que τ_{endo} no muestra diferencias entre el control y el tratamiento con PMA 100 nM en todo el rango de estimulación (Figura 4.21.E).

La pre-incubación por 2 horas y media a 37° C con PMA 4 μ M produjo un efecto similar al obtenido con los otros tratamientos para inhibir PKC (estaurosporina, Bis XI), aunque más agudo, ya que $\Delta C_{m_{\text{endo}}}$ y endo/exo cayeron significativamente respecto del control para los SQP10-50ms (Figura 4.21. paneles C y D). Finalmente, podemos observar que, de acuerdo a lo esperado, τ_{endo} aumentó significativamente para SQP25ms y SQP50ms respecto del control (Figura 4.21.E). Es importante mencionar que algunos trazados capacitivos obtenidos con SQP25ms y SQP50ms en la condición PMA 4 μ M no presentaban endocitosis, o que la señal de registro de los mismos era demasiado ruidosa para obtener una estimación fiable de τ_{endo} . Por ello, solamente el 50% de los trazados correspondientes a estos pulsos, en esta condición experimental, pudieron ser ajustados a una curva monoexponencial decreciente para la obtención de τ_{endo} . Finalmente, podemos observar en el

gráfico de τ_{endo} en función de $J_{\text{Ca}^{2+}}$, que la inhibición de PKC con 4 μM de PMA provoca la pérdida del comportamiento bifásico característico de la curva control, mostrando en cambio un comportamiento puramente creciente, es decir una desaceleración progresiva en la velocidad de la endocitosis a medida que aumenta el influjo de Ca^{2+} (Figura 4.21.F). Este resultado también es coherente con lo mostrado en las sub-secciones previas, lo cual confirma la importancia de PKC en la endocitosis dinámico-independiente.

En resumen, en la primera parte de esta Tesis, corroboramos que la endocitosis dependiente de dinamina sigue todas las características cinéticas ya descritas por Moya-Díaz y colaboradores (2016). Sin embargo, al estudiar las endocitosis evocadas por la liberación gradual de IRP, observamos que a medida que aumenta la magnitud del estímulo y por lo tanto la entrada de Ca^{2+} , la dependencia de estas endocitosis con la GTPasa dinamina se va perdiendo. Por un lado, se observa una desaceleración de este proceso con la entrada de Ca^{2+} , y por otro, pasa a tomar relevancia una endocitosis dinámico-independiente. Si bien otros autores han reportado la existencia de endocitosis independiente de dinamina en otros modelos experimentales (Zhang y col, 2004; Xu y col, 2008; Van Hook y Thoreson, 2012), hay pocas citas en la literatura, y esta es la primera vez que este tipo de mecanismo se describe en células cromafines. Este segundo mecanismo endocítico se acelera a mayores entradas de Ca^{2+} , y es dependiente de PKC. Es posible que este proceso independiente de dinamina sea una herramienta de la célula para compensar a la exocitosis provocada por estímulos medianamente fuertes, incapaces de ser compensados por medio de la endocitosis dinámico-dependiente activada luego de PAs, que tendría baja capacidad. Resulta, sin embargo, controvertido que en nuestros experimentos este proceso dinámico-independiente no logre compensar completamente a la exocitosis. Pese a esto, nuestros resultados sugieren que dicho mecanismo posee potencialmente la capacidad de hacerlo, ya que el tratamiento con PMA potencia su eficiencia compensatoria.

4. Resultados y Discusión II

4.5 Exocitosis y Endocitosis asociadas a IRP en células cromafines bovinas. Efectos de la inhibición de la dinamina.

En esta segunda etapa de la Tesis se estudiará el efecto sobre las células cromafines de dos mutaciones de la dinamina-2, A618T y S619L, asociadas a la Miopatía Centro-Nuclear (MCN), una enfermedad hereditaria que afecta severamente al músculo esquelético. No existen datos hasta el momento en la literatura que evalúen el efecto de estas mutaciones sobre la exocitosis y la endocitosis de células cromafines *in vivo*. Para poder encarar este objetivo, en primer lugar debemos tener en cuenta que a diferencia de la dinamina-1 (isoforma predominante en células cromafines de ratón), la dinamina-2 se expresa mayoritariamente en células cromafines bovinas (Cook y col, 1994). Por ello, los experimentos de la segunda etapa de esta Tesis fueron realizados en cultivos primarios de este segundo tipo celular. Sin embargo, antes de estudiar el efecto de A618T y S619L, debemos evaluar en este modelo experimental la exocitosis y la endocitosis generadas en condiciones controles y frente a un agente ya conocido que inhiba la acción de la dinamina, en respuesta a un protocolo de estimulación similar al aplicado sobre células cromafines de ratón en la primera parte de esta Tesis.

4.5.1 Exocitosis y Endocitosis asociadas a IRP en condiciones controles en células cromafines bovinas

En primer lugar, decidimos analizar el comportamiento de las variables $I_{Ca^{2+}}$, $\int I_{Ca^{2+}}$, $\Delta C_{m_{exo}}$, $\Delta C_{m_{endo}}$, endo/exo y τ_{endo} obtenidas en la condición control al estimular las células con el mismo protocolo de pulsos (PAs y SQP5-50ms) que veníamos utilizando en la primera parte de la Tesis para células murinas. Como estos experimentos se realizaron de forma pareada con el tratamiento con Anti-Dyn (ver más abajo), la condición control se obtuvo a partir de

registros realizados luego de 5 minutos de haber alcanzado el *whole cell* (similar a la condición experimental DIAL5m en la sub-sección 4.3.2 de la parte Resultados y Discusión I). Notamos que las corrientes de Ca^{2+} para PAs y SQP5-50ms siguen un patrón similar a lo observado en células murinas: las $I_{\text{Ca}^{2+}}$ para SQP5-50ms son significativamente menores respecto de aquellas obtenidas para PAs (ANOVA - test de *Bonferroni*, $p < 0,022$) (ver Figura 4.22.A, barras negras). Por otro lado, también al igual que en células de ratón, la $I_{\text{Ca}^{2+}}$ se hace estadísticamente mayor para los pulsos SQP25ms y SQP50ms respecto de PAs (ANOVA - test de *Bonferroni* con $p < 0,001$), y respecto de SQP5ms (ANOVA - test de *Bonferroni* con $p < 0,001$) (ver Figura 4.22.B, barras negras). Notamos que las $I_{\text{Ca}^{2+}}$ obtenidas para cada uno de los tipos de estímulos aplicados en células bovinas son significativamente más grandes que las registradas para células murinas (test de Student para PAs, $p < 0,006$; test de Student para los pulsos: SQP5ms ($p < 0,001$), SQP10ms ($p < 0,001$), SQP25ms ($p < 0,001$) y SQP50ms ($p < 0,025$). Sin embargo, esto podría deberse a que la superficie de la membrana plasmática en las células cromafines bovinas es mayor que en las murinas, lo cual se corrobora al analizar la capacitancia total de la membrana celular de ambos tipos celulares (bovinas: $8,9 \pm 0,3$ pF, $n=42$; murinas: $5,9 \pm 0,1$ pF, $n=67$; test de Student, $p < 0,001$). Por lo tanto, es razonable pensar que las $I_{\text{Ca}^{2+}}$ sean mayores en las células bovinas como consecuencia de un mayor número neto de CCVD expresados en membrana. De hecho, al comparar el promedio de las densidades de las corrientes de Ca^{2+} (cociente entre $I_{\text{Ca}^{2+}}$ y la capacitancia celular ($I_{\text{Ca}^{2+}} [\text{pA/pF}]$)), obtenidas para cada pulso empleado en ambos modelos celulares, observamos que los valores de este parámetro no difieren entre células cromafines bovinas y murinas ($I_{\text{Ca}^{2+}} [\text{pA/pF}]$, bovinas: PAs ($50,8 \pm 7,9$, $n=9$); SQP5ms ($32,4 \pm 2,3$, $n=7$); SQP10ms ($31,9 \pm 4,6$, $n=8$); SQP25ms ($33,6 \pm 4,7$, $n=11$); SQP50ms ($29,2 \pm 5,8$, $n=7$); murinas: PAs ($53,9 \pm 4,3$, $n=21$); SQP5ms ($25,2 \pm 5,1$, $n=10$); SQP10ms ($28,2 \pm 3,7$, $n=14$); SQP25ms ($25,4 \pm 3,1$, $n=12$); SQP50ms ($28,6 \pm 4,4$, $n=12$)).

La Figura 4.23 panel A, muestra trazados de capacitancia típicos para PAs y SQP50ms obtenidos en dos experimentos, uno control (en negro) y otro luego de dializar con Anti-Dyn (en rojo). Analizando los trazados en la condición control observamos que la endocitosis evocada por PAs compensa

completamente el cambio de capacitancia provocado por la exocitosis anterior (ver Figura 4.23.Ai). Sin embargo, no se observa el mismo fenómeno compensatorio para la endocitosis evocada por SQP50ms (ver Figura 4.23.Aii). Este comportamiento de la endocitosis, para estos dos pulsos, es similar a lo observado en células murinas en la misma condición experimental. Al analizar $\Delta C_{m_{exo}}$ en los controles (barras negras), observamos que los valores promedio de este parámetro mostraron una tendencia creciente y saturable para los pulsos despolarizantes de duración creciente, haciéndose estadísticamente más grandes para SQP25ms y SQP50ms respecto de PAs (ANOVA - test de *Bonferroni* con $p < 0,001$) y de SQP5ms (ANOVA - test de *Bonferroni* con $p < 0,001$) (ver Figura 4.23.B). Es importante mencionar que los valores de exocitosis obtenidos son muy similares a lo vistos previamente en células murinas. Por otro lado, los valores promedios de $\Delta C_{m_{endo}}$ en condiciones controles se mantuvieron constantes para todos los estímulos empleados (ver Figura 4.23.C, barras negras), denotando una gran similitud con sus homólogos obtenidos en células de ratón. Finalmente, el cociente endo/exo también siguió un patrón similar a lo visto en células murinas, decayendo significativamente para SQP10-50ms respecto de PAs (ANOVA - test de *Bonferroni* con $p < 0,001$) y para SQP25-50ms respecto de SQP5ms (ANOVA - test de *Bonferroni* con $p < 0,01$) (ver Figura 4.23.D, barras negras). Por último, al analizar el comportamiento de τ_{endo} en función de los pulsos despolarizantes aplicados (ver Figura 4.23.E, barras negras) y en función de la $[Ca^{2+}]_i$ generada por esos mismos estímulos (ver Figura 4.23.F, puntos y líneas negras), observamos que este parámetro se comporta de manera bifásica, muy similar a lo registrado anteriormente en células murinas, aumentando significativamente para SQP5-25ms respecto de PAs (ANOVA - test de *Bonferroni* con $p < 0,015$, se desacelera la endocitosis), para luego disminuir de forma significativa (ANOVA - test de *Bonferroni* con $p < 0,05$, se acelera la endocitosis) para SQP50ms respecto de SQP5-25ms. Estos resultados nos permiten concluir que el comportamiento de los diferentes parámetros obtenidos con la estimulación por PAs y SQP5-50ms en condición control en células bovinas es muy similar al obtenido previamente en ratón.

4.5.2 Inhibición de la acción de la dinamina con un anticuerpo monoclonal antidinamina en células cromafines bovinas

En segundo lugar, para evaluar la participación de la dinamina en la endocitosis rápida de células cromafines bovinas, con una estrategia ya convalidada en la primera parte de esta tesis, como también en trabajos previos (Moya-Díaz y col, 2016; Moya-Díaz y col, 2019; Montenegro y col, 2020) en células cromafines de ratón, realizamos experimentos empleando el anticuerpo monoclonal anti-dinamina 1 y 2 (Anti-Dyn, 7 nM). Luego de 5 minutos de diálisis con Anti-Dyn a través de la pipeta de *patch*, procedimos a estimular las células con el mismo protocolo de pulsos (PAs y SQP5-50ms) que veníamos utilizando en la primera parte de la Tesis.

En la Figura 4.22, paneles A y B, se grafica $I_{Ca^{2+}}$ y $\int I_{Ca^{2+}}$, respectivamente, para las condiciones experimentales control y Anti-Dyn. No observamos diferencias entre el tratamiento con Anti-Dyn y el control para ninguno de los dos parámetros.

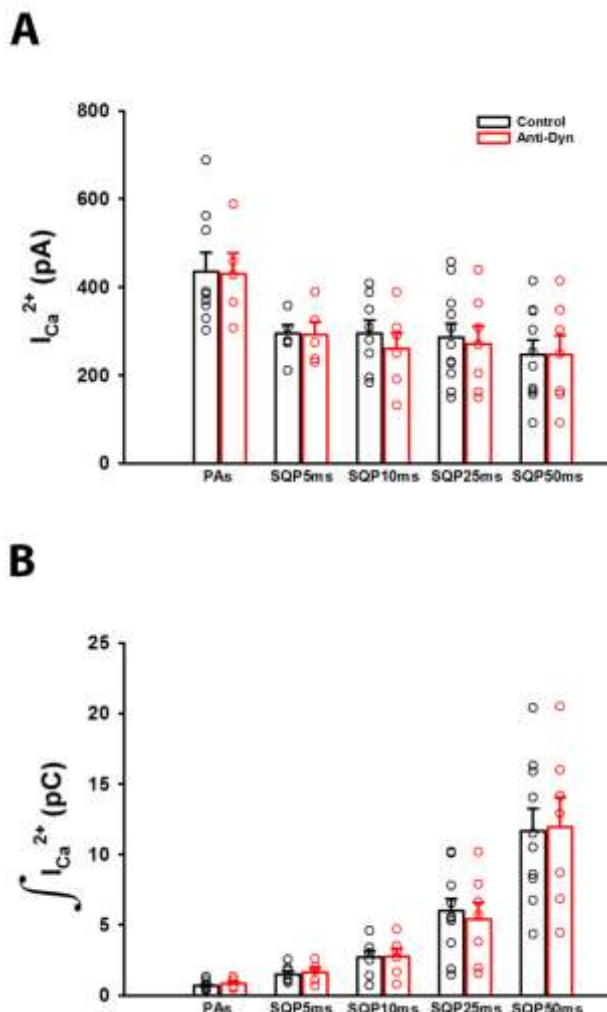


Figura 4.22- Corrientes y entradas de calcio bajo tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-dinamina (Anti-Dyn). (A) El gráfico muestra los promedios (barras vacías) (\pm ES) de los valores de $I_{Ca^{2+}}$ (A) y $\int I_{Ca^{2+}}$ (B), y los valores experimentales individuales (una medición por célula, círculos vacíos) en las condiciones control (negro) y Anti-Dyn (rojo), para PAs y SQP5-50ms respectivamente. No se observaron diferencias entre tratamientos para cada estímulo empleado en ninguna de las dos variables representadas. El número de células registradas en las condiciones control y Anti-Dyn para PAs y SQP5-50 ms fue $n_{control}=9, 7, 8, 11, 10$ y $n_{Anti-Dyn}=5, 5, 6, 7, 7$, respectivamente.

La Figura 4.23.A muestra trazados representativos de capacitancia para los estímulos PAs (i) y SQP50ms (ii), en ambas condiciones experimentales. Se puede observar que el tratamiento con Anti-Dyn no afecta el salto de capacitancia asociado con la exocitosis, pero sin embargo provoca una clara atenuación en la caída de la señal capacitiva para PAs, pero no para SQP50ms. Por lo tanto el efecto de Anti-Dyn es similar a lo mostrado en células murinas en la primera parte de resultados y discusión de esta Tesis (ver subsección 4.3.2 en Resultados y Discusión I). En los paneles B, C y D de la Figura 4.23 se grafican $\Delta C_{m_{exo}}$, $\Delta C_{m_{endo}}$ y endo/exo para control y Anti-Dyn. Mientras que la $\Delta C_{m_{exo}}$ medida no se vio afectada por Anti-Dyn para ningún pulso, $\Delta C_{m_{endo}}$ disminuyó significativamente respecto al control para PAs y SQP5ms, pero no para SQP10-50ms. Consecuentemente, la relación endo/exo también mostró diferencias estadísticas para PAs y SQP5ms, pero no para los estímulos de mayor duración. Estos resultados también son similares a lo observado en células de ratón. Finalmente, el tratamiento con Anti-Dyn aumentó significativamente τ_{endo} (se desaceleró la endocitosis) para PAs y SQP5ms respecto del control, sin afectar a este parámetro para SQP10-50ms (Figura 4.23.E), también en forma similar a lo observado en ratón. Por último, en el panel F de la Figura 4.23 se grafica τ_{endo} en función de $\int I_{Ca^{2+}}$ para ambas condiciones experimentales. Se puede ver que el comportamiento de τ_{endo} bajo el tratamiento con Anti-Dyn, al igual que para todos los tratamientos de inhibición de la dinamina en células murinas, mostró una caída monótonica (aceleración de la endocitosis) con el aumento en la entrada de Ca^{2+} , diferenciándose del comportamiento bifásico observado en la condición control.

En términos generales, el comportamiento de todos los parámetros asociados a la exocitosis y a la endocitosis en el rango de estímulos aplicados en células bovinas, fueron muy similares a lo obtenido en la primera parte de esta Tesis para células murinas. Estos resultados confirman que en las cromafines bovinas, al igual que en las murinas, la endocitosis rápida que se activa luego de un estímulo de duración muy corto, como es un PAs o SQP5ms, es de naturaleza dinamina-dependiente. Y a la vez, estos experimentos también apoyan la idea de que, al igual que en las células de ratón, la endocitosis activada luego de estímulos prolongados, como

SQP50ms, sería dinamina-dependiente. La demostración de la existencia de estos dos procesos endocíticos que operan en el mismo rango de estímulos en un modelo celular diferente, le otorga mayor robustez a las conclusiones planteadas en la primer parte de esta Tesis.

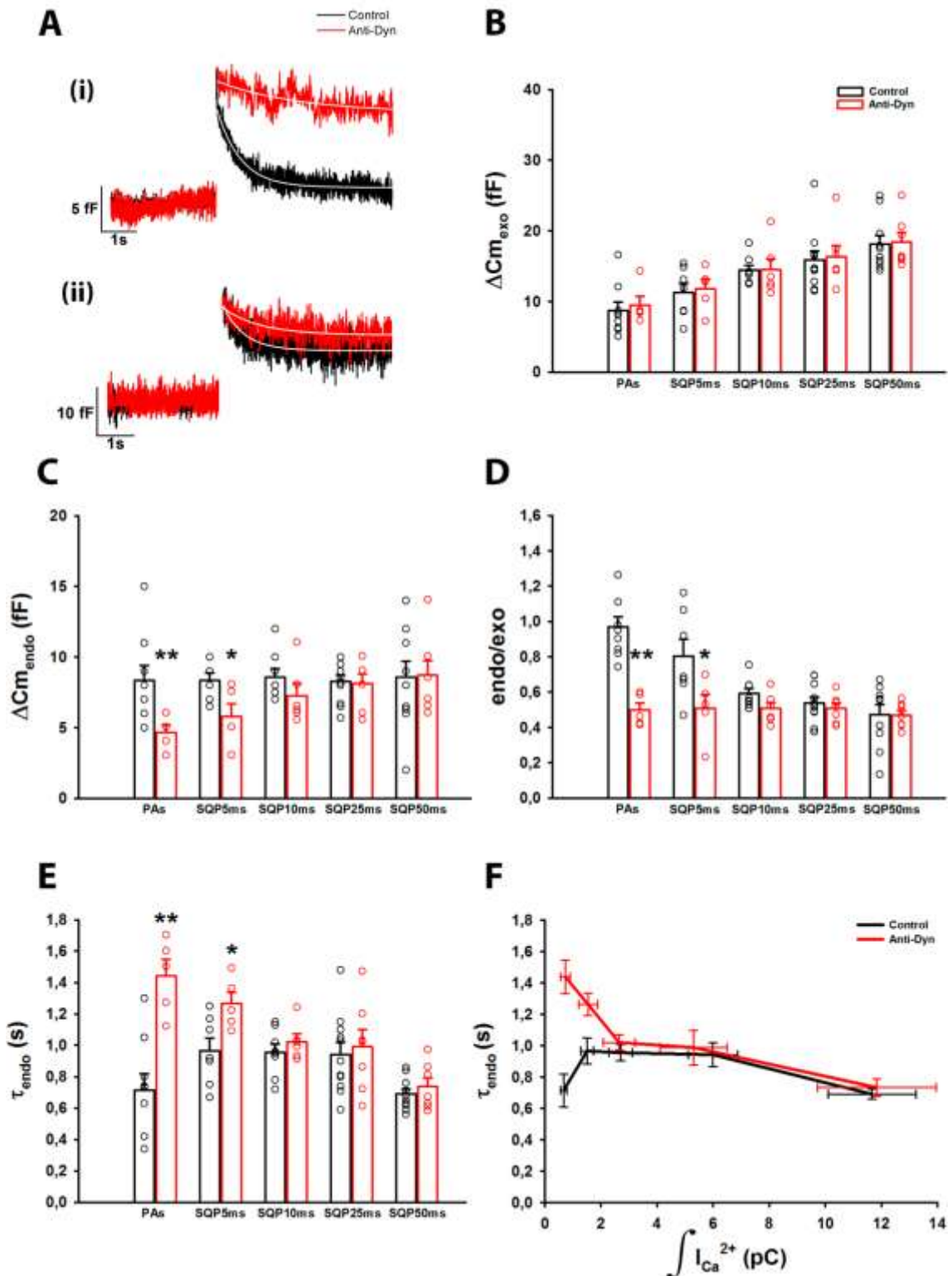


Figura 4.23 – Exocitosis y endocitosis bajo tratamiento con Anti-Dyn. (A) Registros representativos de capacitancia para estímulos PAs (i) y SQP50ms (ii), en las condiciones

control (negro) y Anti-Dyn (rojo). Las líneas blancas superpuestas a las caídas de los registros representan el ajuste de las mismas a una función monoexponencial decreciente para PAs ($\tau_{\text{endo Control}}$: 0,67 s, $R > 0,9473$; $\tau_{\text{endo Anti-Dyn}}$: 1,53 s, $R > 0,6618$) y SQP50ms ($\tau_{\text{endo Control}}$: 0,57 s, $R > 0,7256$; $\tau_{\text{endo Anti-Dyn}}$: 0,82 s, $R > 0,5913$). Los gráficos en **(B)**, **(C)**, **(D)** y **(E)** muestran los promedios (\pm ES) (barras) y los valores experimentales individuales (círculos vacíos, una medición por célula) de $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$, $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$, endo/exo y τ_{endo} en las condiciones control (en negro) y Anti-Dyn (en rojo), respectivamente, para PAs y SQP5-50ms. Mientras que $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$ no muestra diferencias entre tratamientos, $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$ y endo/exo disminuyen significativamente para PAs y SQP5ms en células tratadas con Anti-Dyn respecto del control. Finalmente, τ_{endo} aumenta significativamente (se desacelera) en células tratadas con Anti-Dyn respecto del control para PAs y SQP5ms. **(F)** Se grafican los promedios (\pm ES) de τ_{endo} en función de los valores promedios (\pm ES) de $\int \text{Ca}^{2+}$ de todos los estímulos empleados, en las condiciones control (línea negra) y Anti-Dyn (línea roja) para PAs y SQP5-50ms. Bajo el tratamiento con Anti-Dyn, el parámetro τ_{endo} pierde el comportamiento bifásico característico del control, decayendo monotónicamente. El número de células registradas en las condiciones control y Anti-Dyn para PAs y SQP5-50 ms es la misma en todos los paneles ($n_{\text{control}} = 9, 7, 8, 11, 10$ y $n_{\text{Anti-Dyn}} = 5, 5, 6, 7, 7$). Test de *Student* para dos muestras independientes, * $p < 0,022$ y ** $p < 0,001$.

4.6 Breve Resumen de Antecedentes de A618T y S619L

Clásicamente se ha descrito a la GTPasa dinamina como una proteína fundamental en el proceso de escisión de membranas que ocurre en la etapa final de la endocitosis o en la generación de vesículas emergentes desde organelas intracelulares. En el sistema nervioso y células endócrinas, la dinamina participa en mecanismos fundamentales tales como en el reciclado de vesículas sinápticas y secretorias, internalización de receptores post-sinápticos, formación *de novo* de vesículas secretorias o que contienen neuropéptidos, y remodelado de la membrana plasmática y del citoesqueleto (Ferguson y De Camilli, 2012). La activación por defosforilación y posterior unión a membranas de esta proteína, promueve la polimerización de monómeros de la misma alrededor de la estructura en forma de cuello que se forma entre la vesícula emergente y la membrana. Luego, por medio de la hidrólisis de GTP, la dinamina polimerizada facilita la constricción del cuello vesicular dando paso al cierre del poro de fisión, escisión de la vesícula y liberación de la misma al citosol. Este mecanismo celular es esencial para el

transporte de proteínas entre compartimientos (Schmid y Frolov, 2011); para el mantenimiento o modificación de la superficie, forma y composición de la membrana plasmática; para el reciclado de proteínas de membrana; y para el reciclado de vesículas secretorias y sinápticas (Cárdenas y Marengo, 2010). Finalmente, hay también antecedentes que sugieren la participación de la dinamina en la regulación de la estabilidad, apertura y cierre del poro de fusión durante la exocitosis (Shin y col, 2018; Wu y col, 2019).

Todo lo mencionado arriba ejemplifica por qué una correcta funcionalidad de la dinamina es esencial para fisiología celular. Por lo tanto, un malfuncionamiento de esta proteína puede potencialmente causar serias afecciones con importancia clínica. Una de las afecciones más graves es el cuadro conocido como Miopatía Centro-Nuclear (MCN), el cual afecta gravemente la integridad de los músculos. En particular, la MCN se desarrolla desde el nacimiento como consecuencia de mutaciones puntuales en la dinamina-2 (isoforma ubicua de la dinamina), y se caracteriza por presentar un cuadro sintomático compatible con una atrofia general de los músculos esqueléticos (Jeannet y col, 2004). La mayoría de las mutaciones que desarrollan MCN, se localizan en el dominio homólogo a plectrinas (PH), ubicado en la región central de la estructura de la dinamina-2 (Böhm y col, 2012), el cual tiene como función la unión a lípidos que se produce posteriormente a la activación de esta proteína (Ramachandran y col, 2009; Bethoney y col, 2009).

Como ya dijimos, en la segunda etapa de esta Tesis, nos concentraremos en estudiar los efectos sobre la endocitosis y la exocitosis de la expresión de dos mutaciones de la dinamina-2, A618T y S619L, ubicadas en el dominio PH, y directamente relacionadas con el desarrollo de la MCN. Hasta el momento, otros autores han evaluado el efecto de estas mutantes en tejidos musculares en moscas *drosophila* (Chin y col, 2015) y en ratones (Muñoz y col, 2020), pero no en modelos secretorios tales como el que se emplea en esta Tesis.

Estudios previos realizados *in vitro* mostraron que A618T y S619L presentaban aumentos significativos en las actividades GTPasa y de fisión de membranas respecto de la dinamina-2 *wild type* (WT), los cuales fueron mucho más marcados para S619L. En particular observaron que la actividad GTPasa

se encontraba aumentada para A618T sólo cuando los experimentos eran realizados en presencia de lípidos, mientras que para S619L esta actividad exacerbada era independiente de la presencia o ausencia de lípidos en el medio (Kenniston y Lemmon, 2010; Chin y col, 2015). También se ha visto, en experimentos *in vitro*, que este aumento en la actividad GTPasa estaría dado por la facilidad que tienen los monómeros de ambas mutantes a auto-ensamblarse, es decir, a generar rápidamente grandes polímeros de dinamina en solución, siendo S619L la más propensa a desarrollar esta autopimerización (Wang y col, 2010; Kenniston y Lemmon, 2010). Además, se ha observado también que estas mutantes enlentecen el *turnover* de la F-actina que forma parte de podosomas en células musculares (Lin y col, 2020). Finalmente, se ha demostrado que ambas mutantes pierden la sensibilidad a los cambios en la curvatura de la membrana que regularmente presenta la dinamina-2 WT. Mientras que la actividad de fisión de la dinamina-2 WT aumenta cuando es incubada con membranas lipídicas de mayor curvatura (Liu y col, 2011), esta variable no se modifica cuando ambas mutantes son sometidas a un similar tratamiento (Chin y col, 2015).

Los estudios acerca del comportamiento *in vitro* de A618T y S619L sugieren que es muy probable que la expresión de dichos mutantes provoque cambios sustantivos en la fisiología celular. En la primer parte de Resultados y Discusión de esta Tesis, vimos que la dinamina desempeñaba un rol crítico en la endocitosis que se desarrolla a consecuencia de la exocitosis de fracciones pequeñas de IRP. Por lo tanto, nos pareció importante estudiar el efecto de A618T y S619L sobre la endocitosis asociada a este pool vesicular. Del párrafo anterior se deduce que, si bien *in vitro* favorecerían la fisión, los efectos de estas mutaciones son variados y complejos. Por lo tanto, las consecuencias resultantes de estas mutantes sobre la endocitosis evaluada *in vivo* es aún un tema no resuelto.

4.7 Efectos de las mutaciones A618T y S619L de Dinamina-2 sobre la exocitosis de IRP y la endocitosis asociada en células cromafines bovinas.

Para evaluar el efecto de A618T y S619L sobre la exocitosis de IRP y la endocitosis asociada, empleamos, al igual que en la primer parte de esta Tesis, el protocolo de pulsos despolarizantes que combina PAs y los pulsos cuadrados SQP5-50ms. Esto se realizó en células que expresen por separado a estos mutantes o al WT de la dinamina-2 (0,5 μ g de ADN en todos los casos). Las células transfectadas pudieron ser identificadas durante los experimentos gracias a que las variantes de dinamina se hallaban fusionadas a la proteína verde fluorescente EGFP. En el panel A y B de la Figura 4.24 se representan los valores promedio de $I_{Ca^{2+}}$ y $\int I_{Ca^{2+}}$ obtenidos de células expresando dinamina-2 A618T, S619L y WT para todos los estímulos empleados. Aunque las mutantes muestran una cierta tendencia a la disminución en $I_{Ca^{2+}}$ y $\int I_{Ca^{2+}}$, ambos parámetros no mostraron diferencias significativas entre condiciones.

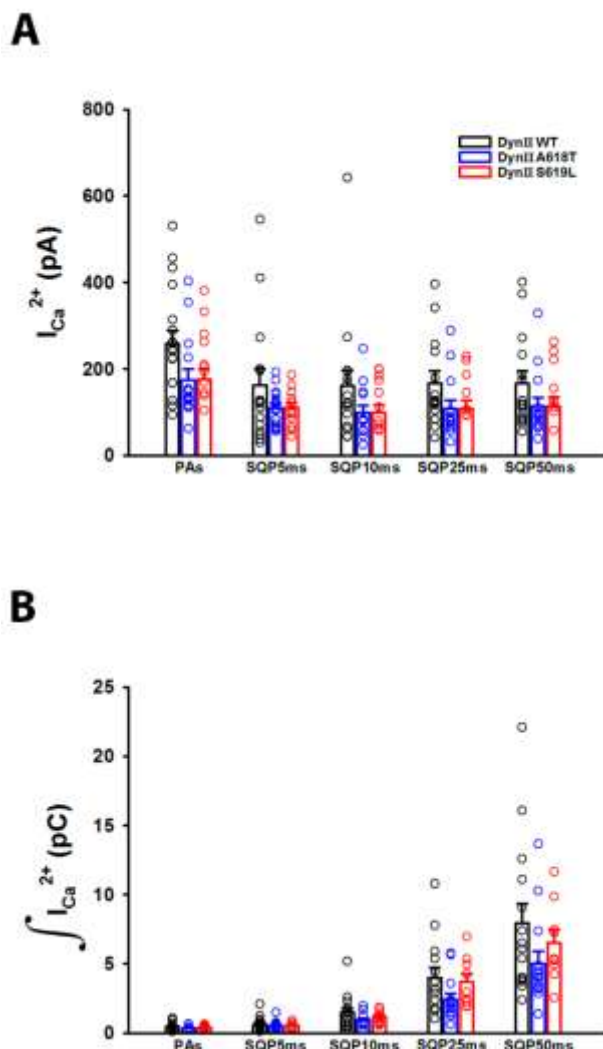


Figura 4.24- Corrientes y entradas de calcio en células que expresan las variantes de dinamina-2 WT, A618T y S619L. (A) El gráfico muestra los promedios (barras vacías) (\pm ES) de los valores de $I_{Ca^{2+}}$ (A) y $\int I_{Ca^{2+}}$ (B), y los valores experimentales individuales (una medición por célula, círculos vacíos) en las condiciones WT (negro), A618T (azul) y S619L (rojo) para PAs y SQP5-50ms. No se observan diferencias entre condiciones experimentales para cada estímulo empleado en ninguna de las variables representadas. El número de células registradas para cada condición experimental se muestra en la Tabla 4.6.

La Figura 4.25.A exhibe trazados típicos de capacitancia para PAs (i) y SQP50ms (ii) en las tres condiciones experimentales.

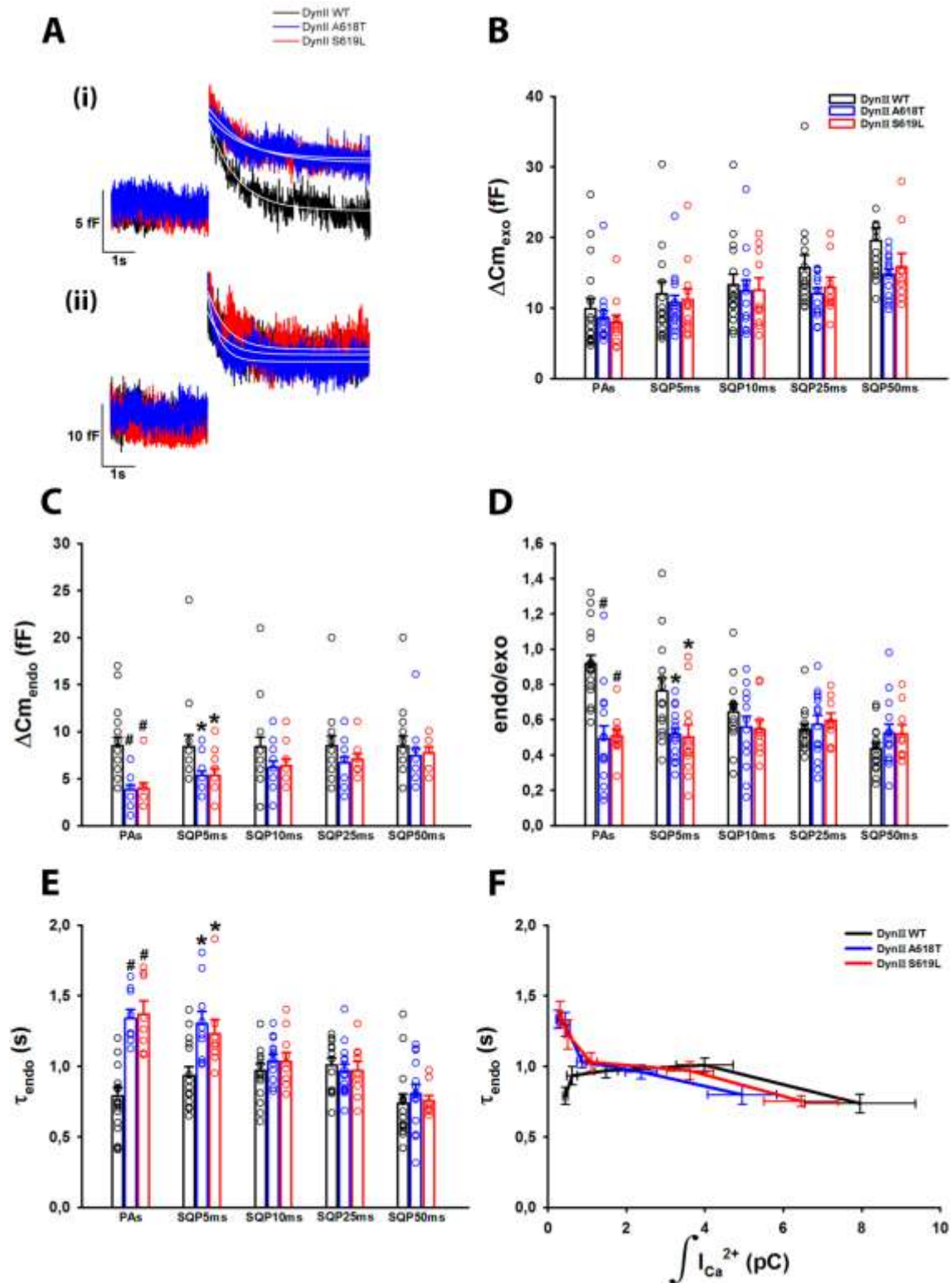


Figura 4.25 – Exocitosis y endocitosis en células que expresan las variantes de dinamina-2 WT, A618T y S619L. (A) Registros representativos de capacitancia para estímulos PAs (i) y SQP50ms (ii), en las condiciones WT (negro), A618T (azul) y S619L (rojo). Las líneas

blancas superpuestas a las caídas de los registros representan el ajuste de las mismas a una función monoexponencial decreciente para PAs ($\tau_{\text{endo WT}}$: 0,86 s, $R>0,9154$; $\tau_{\text{endo A618T}}$: 1,34 s, $R>0,8044$; $\tau_{\text{endo S619L}}$: 1,36 s, $R>0,8847$) y SQP50ms ($\tau_{\text{endo WT}}$: 0,52 s, $R>0,5963$; $\tau_{\text{endo A618T}}$: 0,65 s, $R>0,7456$; $\tau_{\text{endo S619L}}$: 0,58 s, $R>0,6629$). Los gráficos en **(B)**, **(C)**, **(D)** y **(E)** muestran los promedios (\pm ES) (barras) y los valores experimentales individuales (círculos vacíos, una medición por célula) de $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$, $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$, endo/exo y τ_{endo} en las condiciones WT (en negro), A618T (en azul) y S619L (en rojo), respectivamente, para PAs y SQP5-50 ms. $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$ no muestra diferencias entre tratamientos, pero $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$ y endo/exo disminuyen significativamente para PAs y SQP5ms en células que expresan A618T y S619L respecto del WT. Por último, τ_{endo} con A618T y S619L aumenta significativamente (se desacelera) respecto del WT para los estímulos PAs y SQP5ms. **(F)** Se grafican los promedios (\pm ES) de τ_{endo} en función de los valores promedios (\pm ES) de $\int \text{Ca}^{2+}$ de todos los estímulos empleados, en las condiciones WT (línea negra), A618T (línea azul) y S619L (línea roja) para PAs y SQP5-50ms. Observamos que τ_{endo} con A618T y S619L decae monótonicamente, perdiendo el comportamiento bifásico descrito para la condición WT. El número de células registradas para cada condición se muestra en la Tabla 4.6. Análisis de varianza (ANOVA) - Test de *Bonferroni*, * $p<0,01$; # $p<0,001$.

Tratamiento	n				
	PAs	SQP5ms	SQP10ms	SQP25ms	SQP50ms
WT	18	15	16	14	15
A618T	15	16	13	14	14
S619L	11	12	10	9	9

Tabla 4.6 – Número de células registradas para cada tratamiento y estímulo. Se representa el número de mediciones experimentales (un registro por célula) correspondiente a las Figuras 4.24 y 4.25.

Se puede observar que los aumentos de capacitancia asociados a la exocitosis son similares en los tres grupos experimentales para ambos estímulos. Por otro lado, mientras hay una clara disminución en la amplitud de la endocitosis para los registros PAs obtenidos de células con A618T y S619L respecto de aquellas con el WT, no se observaron diferencias en los trazados asociados a SQP50ms. Estas observaciones se confirman al evaluar los parámetros $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$, $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$ y endo/exo (paneles B, C y D de la Figura 4.25). Observamos que $\Delta\text{Cm}_{\text{exo}}$ no cambia significativamente entre condiciones experimentales para cada estímulo aplicado, aunque se percibe una tendencia a disminuir en las mutantes que se va haciendo más notoria al aumentar la duración de los pulsos. Por otro lado, los parámetros $\Delta\text{Cm}_{\text{endo}}$ y endo/exo

disminuyen significativamente para las mutantes respecto del WT cuando se aplican PAs y SQP5ms, pero no cuando se emplean estímulos de mayor duración (SQP10-50ms). Por último, para ambas mutantes τ_{endo} aumentó significativamente en comparación a WT para PAs y para SQP5ms, respectivamente, pero no para los estímulos más prolongados (Figura 4.25.E). Dicho de otra manera, al igual que Anti-Dyn (y otros inhibidores de dinamina utilizados en la primera parte de esta Tesis), A618T y S619L provocaron una significativa reducción en la velocidad de la endocitosis rápida que se genera en respuesta a PAs y SQP5ms. El panel F de la Figura 4.25 muestra las curvas que representan a τ_{endo} en función de la $\int \text{Ca}^{2+}$. Para WT, τ_{endo} sigue un comportamiento bifásico, donde el valor de τ_{endo} aumenta (se desacelera) inicialmente a bajas $\int \text{Ca}^{2+}$, para luego disminuir (acelerarse) a mayores entradas de Ca^{2+} . En cambio, para A618T y S619L la fase de subida de τ_{endo} desaparece completamente, y por el contrario se observa una monotónica caída de τ_{endo} , es decir un aumento de la velocidad de la endocitosis a medida que aumenta la entrada de Ca^{2+} .

Debemos destacar que es muy llamativa la similitud de los resultados obtenidos con A618T y S619L en células bovinas respecto de aquellos registrados en este mismo preparado celular en presencia de Anti-Dyn, o en células cromafines de ratón tratadas con diversos inhibidores de dinamina. La expresión de estas mutantes provocó el mismo patrón inhibitorio sobre los parámetros $\Delta \text{Cm}_{\text{endo}}$ y τ_{endo} observado previamente en células de ratón tratadas con GTP γ S, Anti-Dyn, GST-Dyn y DynI K44A. Al igual que en esos casos, las mutantes redujeron y enlentecieron la endocitosis solamente cuando se estimuló a las células con PAs y SQP5ms, pero no al aplicar SQP10-50ms. En este contexto, A618T y S619L tendrían un efecto inhibitorio sobre la endocitosis rápida dinamina-dependiente que se induce frente PAs y SQP5ms. ¿Pero, cómo se explicaría esto mecanísticamente? La respuesta a esta pregunta no es obvia, ya que dichas mutantes presentan actividades GTPasa y de fisión de membranas *in vitro* incrementadas (Kenniston y Lemmon, 2010; Chin y col, 2015), lo cual podría sugerir en primer lugar una acción activadora y no inhibitoria sobre la endocitosis.

Ha sido reportado que la actividad GTPasa aumentada de A618T y S619L sería facilitada por la tendencia que tienen estas mutantes de dinamina-2 a formar grandes cúmulos en solución (Wang y col, 2010; Kenniston y Lemmon, 2010). De tomar lugar este fenómeno en el ambiente citoplasmático, podría implicar que haya menos disposición de esta proteína libre en los sitios de endocitosis o en otros donde la dinamina puede cumplir funciones de importancia. Es posible que durante todo el período de cultivo previo a los experimentos, mayor a 24 horas, estos cúmulos se formen de manera importante y alteren la funcionalidad de la dinamina en la endocitosis. Otra posibilidad, que puede incluso depender de la anterior, es que las mutantes afecten indirectamente a la endocitosis debido a una alteración en el citoesqueleto de actina. Es sabido que la dinamina, además de actuar de manera directa en varios tipos de endocitosis, favorece la polimerización del citoesqueleto de actina. Este efecto de la dinamina sobre la actina ha sido descrito tanto en podocitos de líneas celulares renales (Gu y col, 2010) y musculares de ratón (Lin y col, 2020), como en neuronas corticales de rata y líneas celulares de neuroblastoma humano (Yamada y col, 2013) (en la sección 4.10 profundizaremos un poco más sobre este tema). Por otro lado, hay sobradas evidencias de que la red de actina cortical participa activamente en varios mecanismos de endocitosis. Por ejemplo, es esencial en la endocitosis ultra-rápida medida en neuronas hipotalámicas (Watanabe y col, 2013), contribuye a la endocitosis de tipo *bulk* (Gorman y col, 2015), y asiste como mecanismo auxiliar a la endocitosis mediada por clatrina (Artalejo y col, 2002, Chan y Smith, 2003a, Hosoi y col, 2009, Boulant y col, 2011). Además en nuestro laboratorio hemos determinado la importancia de la actina cortical en la endocitosis rápida que se produce luego de la liberación de fracciones de IRP (Montenegro y col, 2020).

Las hipótesis presentadas arriba son atractivas, no son mutuamente excluyentes, y pueden en potencia ser explicaciones posibles de nuestros resultados. En las próximas secciones profundizaremos más sobre el efecto de estas mutaciones en los procesos de endocitosis y exocitosis en células cromafines bovinas, y presentaremos resultados que serán discutidos en base a las hipótesis mencionadas.

4.8 Efecto de A618T y S619L sobre la exocitosis y la endocitosis de *pools* grandes de vesículas.

Para continuar con el estudio de los efectos de A618T y S619L sobre la exocitosis y la endocitosis en células cromafines bovinas, decidimos evaluar dichos procesos frente a la aplicación de estímulos que en condiciones controles liberan grandes cantidades de vesículas (Engisch y Nowycky, 1998; Tesis Doctoral de Ana Verónica Belingheri, 2016). Es importante mencionar que cuando se induce la liberación de poblaciones de vesículas significativamente mayores a IRP, intervienen mecanismos endocíticos diferentes, principalmente la endocitosis mediada por clatrina. Consecuentemente la recuperación de las vesículas secretorias para un nuevo ciclo exocítico procede por caminos diferentes, más largos y lentos que los descritos para IRP, y que implican en general la regeneración de las vesículas en Golgi y su posterior maduración y traslado a la membrana plasmática (Houy y col, 2013).

Decidimos utilizar un protocolo de estimulación que consiste en un único pulso SQP de 500 ms (definido de ahora en más como SQP500ms) sobre células que expresen por separado a las mutantes A618T, S619L o a la dinamina-2 WT, todas unidas a EGFP. En la Figura 4.26.A, se muestra un esquema del pulso SQP500ms (i) con el promedio de todos los trazados de corrientes de Ca^{2+} (ii), registrados en las condiciones WT (línea negra), A618T (línea azul) y S619L (línea roja). Observamos que las células que expresan A618T y S619L presentan una corriente de Ca^{2+} que se inactiva mucho más rápidamente respecto de aquella obtenida en la condición WT. Esto se refleja en la entrada de Ca^{2+} calculada a partir de las corrientes. Los gráficos de los paneles B y C en la Figura 4.26 muestran los promedios y valores individuales obtenidos para los parámetros $I_{\text{Ca}^{2+}}$ y $J_{\text{Ca}^{2+}}$, respectivamente. Mientras que para $I_{\text{Ca}^{2+}}$ no se observan diferencias estadísticas entre condiciones experimentales, la entrada de Ca^{2+} en células con A618T y S619L es significativamente más baja respecto de aquellas con el WT. Esta diferencia en la $J_{\text{Ca}^{2+}}$ es congruente con la mayor velocidad de inactivación de las corrientes de Ca^{2+} registradas en células que expresan estas mutaciones (Figura 4.26.Aii).

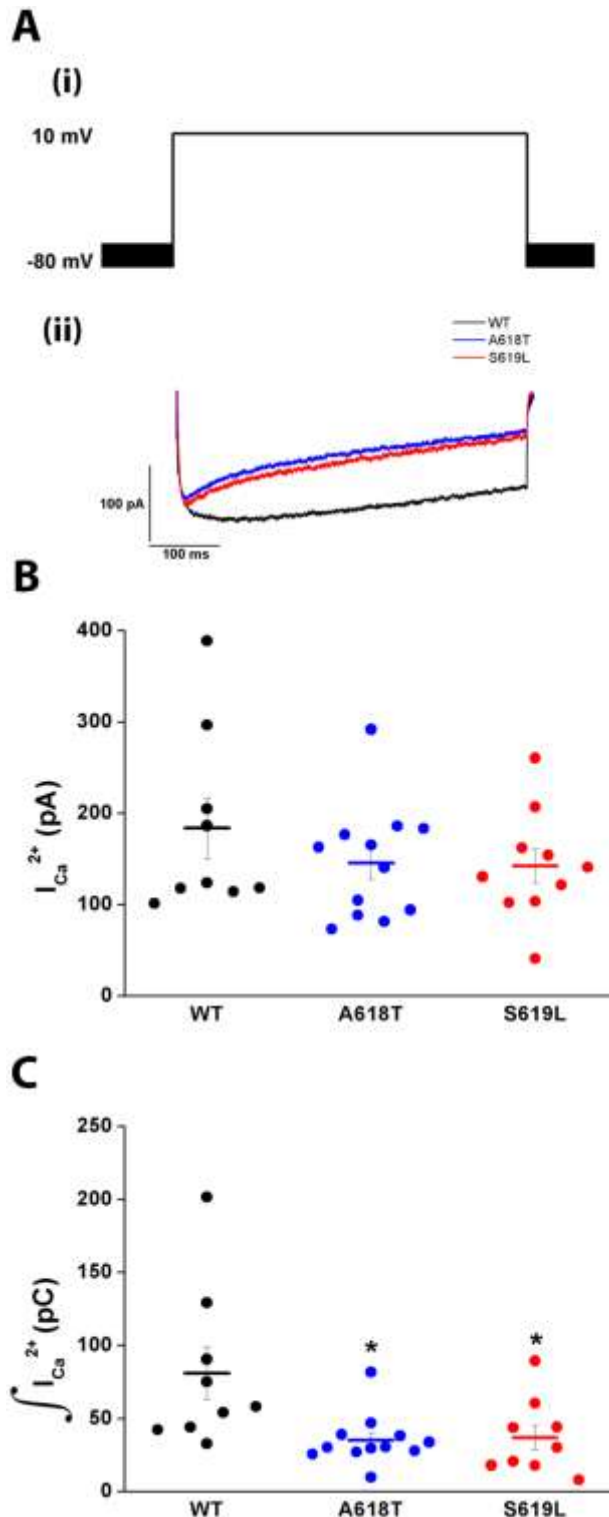


Figura 4.26 – Corrientes y entradas de calcio inducidas por estímulos SQR500ms en células que expresan las variantes de dinamina-2 WT, A618T y S619L. (A) (i) Esquema de estímulos aplicados. Se utilizaron SQRs únicos de 500 ms de duración, desde un potencial de mantenimiento de -80 mV. Se realizó un registro único por célula. (ii) Promedios de las corrientes de Ca^{2+} obtenidas, en las condiciones experimentales WT, A618T y S619L. Es notable como la corriente de Ca^{2+} se inactiva más lentamente en las células que expresan WT, mientras que dicha inactivación se acelera en células con A618T y S619L. (B) El gráfico muestra el promedio de los valores de $I_{Ca^{2+}}$ (línea horizontal \pm ES) y los valores experimentales individuales (una medición por célula, círculos llenos) en las condiciones WT (negro), A618T (azul) y S619L (rojo) para SQR500ms. No se observan diferencias estadísticas entre condiciones experimentales para este parámetro. (C) Se grafican los promedios y los valores experimentales individuales de $\int I_{Ca^{2+}}$ (\pm ES) para SQR500ms, siguiendo el mismo código de colores que en (B). Las condiciones A618T y S619L resultaron ser significativamente menores que el WT para este parámetro. El número de

células registradas para cada condición experimental es la misma en ambos paneles ($n_{WT} = 9$; $n_{A618T} = 12$; $n_{S619L} = 10$). Análisis de varianza (ANOVA) - Test de *Bonferroni*. * $p < 0,005$.

En el panel A de la Figura 4.27 se muestran trazados representativos de capacitancia para las tres condiciones experimentales. Se puede observar que el registro correspondiente a WT evidencia un salto de capacitancia asociado a

la exocitosis marcadamente grande, de más de 300 fF. Este valor está en el orden de los obtenidos con despolarizaciones prolongadas en nuestras condiciones experimentales (Tesis Doctoral de Ana Verónica Belingheri, 2016). Contrariamente, para las mutantes A618T y S619L el aumento de capacitancia inducido por el mismo tipo de despolarización fue un orden de magnitud más bajo. La cuantificación del parámetro $\Delta C_{m_{\text{exo}}}$ (Figura 4.27, panel B) confirma los resultados del ejemplo del panel A.

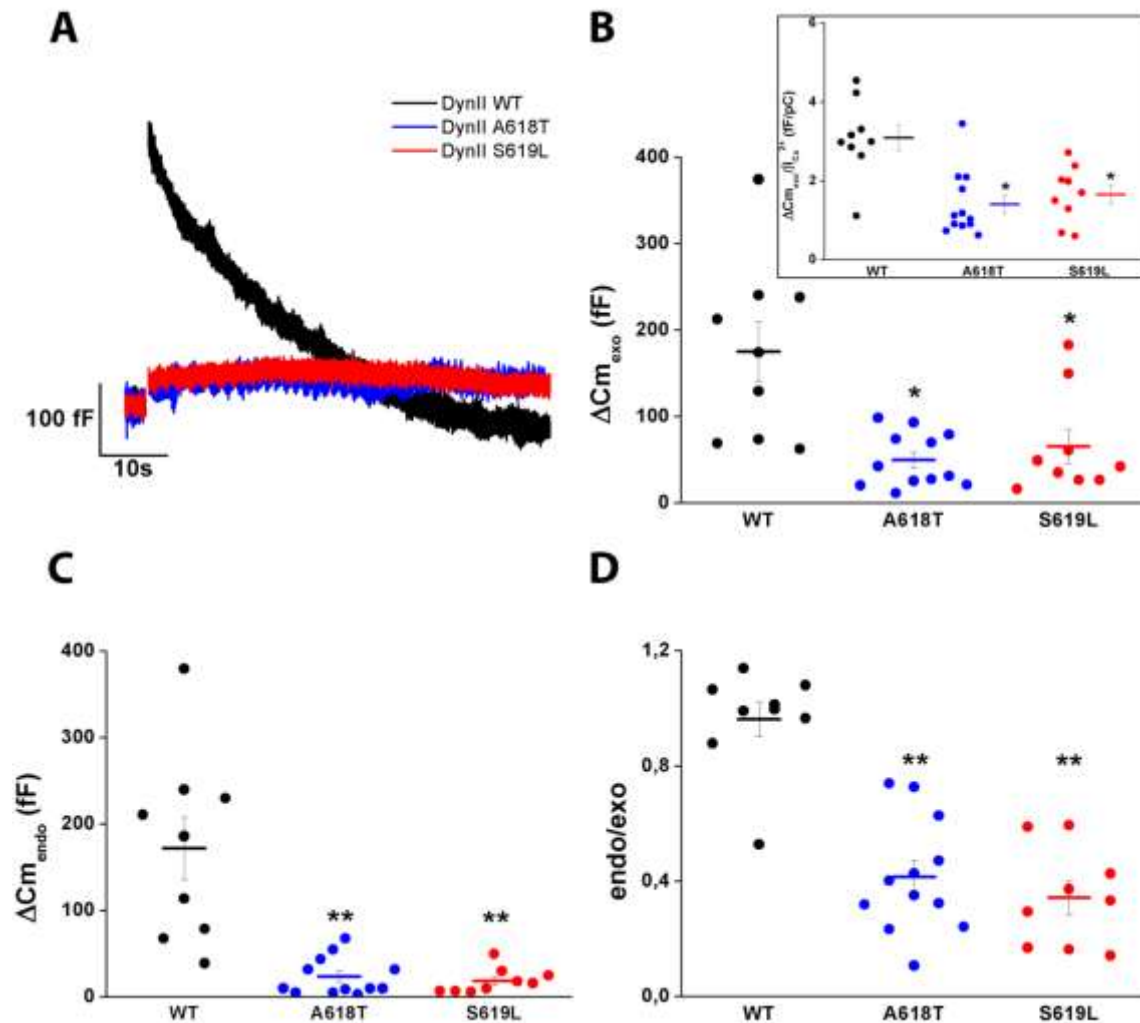


Figura 4.27 – Exocitosis y endocitosis inducidas por estímulos SQP500ms en células que expresan las variantes de dinamina-2 WT, A618T y S619L. (A) Registros representativos de capacitancia para estímulos SQP500ms en las condiciones WT (negro), A618T (azul) y S619L (rojo). En (B), *inset* en (B), (C) y (D) se muestran los promedios (línea horizontal \pm ES) y los valores experimentales individuales (círculos llenos, una medición por célula) de $\Delta C_{m_{\text{exo}}}$, $\Delta C_{m_{\text{exo}}}/\int Ca^{2+}$, $\Delta C_{m_{\text{endo}}}$ y endo/exo en las condiciones WT (en negro), A618T (en azul) y S619L (en rojo), respectivamente, para SQP500ms. Los cuatro parámetros disminuyen significativamente en células que expresan A618T y S619L respecto del WT. El número de células registradas para cada condición experimental es la misma en todos los paneles ($n_{\text{WT}} =$

9; $n_{A618T} = 12$; $n_{S619L} = 10$). Análisis de varianza (ANOVA) - Test de *Bonferroni*, * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

La exocitosis registrada, representada por $\Delta C m_{exo}$, en WT da un promedio de aproximadamente 175 fF. Estos valores son similares a los obtenidos con despolarizaciones equivalentes aplicadas sobre células cromafines bovinas (Engisch y Nowycky, 1998; Rosa y col, 2007) o sobre células cromafines murinas (Tesis Doctoral de Ana Verónica Belingheri, 2016). Este valor corresponde aproximadamente a 140 vesículas secretorias (1,3 fF/vesícula, Moser y Neher, 1997b), lo que da cuenta de la totalidad del RRP estimado en *slices* de médula adrenal de ratón (Voets y col, 1999) o en células cromafines bovinas en cultivo (Ashery y col, 2000). Tal como se observa en el ejemplo del panel A, $\Delta C m_{exo}$ es marcadamente disminuida en células que expresan A618T y S619L. Esto puede ser parcialmente explicado por la significativa disminución registrada de la $\int I_{Ca^{2+}}$, ya que el Ca^{2+} es un factor imprescindible tanto para la activación de la fusión como para la translocación/maduración vesicular (Heinemann y col, 1993; Heinemann y col, 1994). Sin embargo, al normalizar la $\Delta C m_{exo}$ por $\int I_{Ca^{2+}}$ [$\Delta C m_{exo} / \int I_{Ca^{2+}}$], vemos que dicho parámetro también disminuye significativamente para A618T y S619L respecto de WT (*inset* panel B, Figura 4.27), lo cual sugiere que ambas mutantes tienen también un efecto directo sobre la magnitud de la exocitosis. En particular, una alteración en la funcionalidad de la dinamina puede afectar directamente la generación y la translocación de las vesículas secretorias, disminuyendo la disponibilidad de las mismas para la secreción. Se debe recordar que la dinamina interviene en forma directa en la escisión de las vesículas formadas en Golgi, como también en forma indirecta sobre los procesos de tráfico de vesículas a la membrana debido a su importancia en la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina (Yang y col, 2001; Gu y col, 2010). El hecho de que estímulos breves, como los utilizados en el capítulo anterior, no hayan afectado significativamente la exocitosis, pero sí lo hayan hecho los estímulos prolongados utilizados aquí, sugiere que las células transfectadas con A618T o S619L no tienen alterado el funcionamiento de la maquinaria de fusión vesicular en sí misma, pero sí la provisión de una dada cantidad de vesículas a los sitios de exocitosis. Por otro lado, se debe recordar

que frente a estímulos breves (Figura 4.25.B), se observó también una tendencia creciente (aunque no significativa) de reducción de la exocitosis con la duración del estímulo, lo que no hace sino reforzar el razonamiento previo. Por lo tanto, este segundo factor también puede contribuir significativamente a la fuerte inhibición de la exocitosis registrada en presencia de A618T y S619L.

En el panel A de la Figura 4.27 también podemos observar que la caída de capacitancia asociada a la endocitosis es muy notoria en la condición WT, retornando a los niveles basales en el período de registro. Este tipo de proceso ya fue descrito por otros autores, es evocado por estímulos medianamente intensos, como lo aplicados en esta sección, y es definido como endocitosis compensatoria, ya que recupera a la superficie de membrana a valores similares a los registrados a la exocitosis previa (Artalejo y col, 1995; Artalejo y col, 1996; Artalejo y col, 2002; Engisch y Nowycky, 1998; Smith y Neher, 1997). Desde el punto de vista cinético, esta endocitosis se encuadra en lo que generalmente se llama endocitosis lenta ($\tau_{\text{endo WT}}: 24,4 \pm 2,9 \text{ s}$, $n=9$), que ha sido previamente asociada a un mecanismo clatrina-dependiente (Engisch y Nowycky, 1998; Elhamdani y col, 2006; Tesis Doctoral de Ana Verónica Belingheri, 2016). Artalejo y colaboradores estimaron en células cromafines bovinas una constante temporal de aproximadamente 8,5 s (Artalejo y col, 1995; Artalejo y col, 1996); mientras que en nuestro laboratorio en células murinas obtuvimos una constante de aproximadamente 7 s (Tesis doctoral de Ana Verónica Belingheri, 2016). La constante temporal, claramente más lenta, obtenida en esta Tesis en condición WT (Figura 4.27.A) puede explicarse por la dependencia observada entre la velocidad de esta endocitosis y la entrada de Ca^{2+} . Diversos autores observaron que despolarizaciones más prolongadas, que provocaban entradas de Ca^{2+} mayores, aceleraban la endocitosis (Smith y Neher, 1997; Engisch y Nowycky, 1998; Rosa y col, 2007). Mientras que en este trabajo se aplicaron despolarizaciones de 500 ms, en el trabajo de Tesis de Belingheri se estimuló con pulsos SQPs de 1000 ms de duración, mientras que Artalejo aplicó intensos trenes de estimulación.

El panel A de la figura 4.27 muestra que las células transfectadas con A618T o S619L prácticamente no mostraron signos de endocitosis. La cuantificación de los parámetros $\Delta C_{\text{m endo}}$ y endo/exo (Figura 4.27, paneles C y D, respectivamente) confirma esta observación. Esto podría estar relacionado

en cierta medida con la mencionada reducción de la [Ca^{2+} , y su efecto sobre la endocitosis (Smith y Neher, 1997; Engisch y Nowycky, 1998; Rosa y col, 2007). El Ca^{2+} es responsable de la activación de la fosfatasa calcineurina, la cual a su vez activa a la dinamina citoplasmática (Marks y McMahon, 1998), que migra a membrana para participar de la etapa final de la endocitosis (McMahon y Boucrot, 2011). La relevancia del Ca^{2+} en este tipo de endocitosis ha sido puesta de manifiesto tanto en células cromafines (Chan y Smith, 2001; Elhamdani y col, 2006), como en otros modelos celulares (He y col, 2008). Experimentos realizados en calix de Held por el grupo de Ling Gang Wu, mostraron que la amplitud y la velocidad de la endocitosis clatrina dependiente podían ser moduladas por la concentración de calcio de los medios extracelular o intracelular (Wu y col, 2009). Otros mecanismos posibles, que no excluyen al anterior, que permiten explicar la dramática inhibición de la endocitosis en células que expresan A618T o S619L, ya fueron tratados previamente en la sección 4.7, y son la posibilidad de que las mutantes afecten la dinámica del citoesqueleto de actina, y la tendencia que tienen estas mutaciones a favorecer el auto-ensamblaje y por lo tanto a formar cúmulos citosólicos. Como mencionamos previamente, existen numerosas evidencias que describen la participación activa de la F-actina cortical en varios mecanismos de endocitosis (Artalejo y col, 2002; Hosoi y col, 2009, Boulant y col, 2011; Gormal y col, 2015; Watanabe y col, 2013; Montenegro y col, 2020). Particularmente, estudios empleando técnicas de microscopía electrónica y confocal en cultivos de las líneas celulares de riñón MDCK y BSC1, han propuesto un mecanismo por el cual la F-actina favorece activamente la endocitosis mediada por clatrina (Boulant y col, 2011). Se plantea que se formaría una cubierta de F-actina asociada a la cubierta de clatrina sobre la vesícula en formación, ejerciendo una fuerza de tensión que estabiliza a la conformación omega de la vesícula. Dado que la polimerización de la actina es modulada por la dinamina (Gu y col, 2010), nos planteamos la posibilidad de que las mutaciones A618T y S619L desfavorezcan la correcta polimerización de la actina en los sitios de endocitosis, y por lo tanto puedan afectar al proceso endocítico analizado en esta sección. Los efectos de estas mutaciones sobre el citoesqueleto de actina y sobre la formación de cúmulos citosólicos de dinamina serán abordados más adelante en esta Tesis.

4.9 A618T y S619L afectan la secreción en células cromafines bovinas.

El objetivo central de las secciones pasadas fue evaluar los efectos de A618T y S619L sobre la endocitosis. Sin embargo, los resultados de la última sección muestran también un claro efecto negativo de estas mutantes sobre la magnitud de la exocitosis cuando se induce la liberación de cantidades relativamente importantes de vesículas (pero no cuando se liberan pocas vesículas). Esto sugiere que las mutantes promoverían una disminución en la cantidad de vesículas disponibles para ser exocitadas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que una de las limitaciones de la técnica de capacitancia es que no puede diferenciar eficientemente la exocitosis de la endocitosis cuando los estímulos que inducen la primera son prolongados. Esto es debido a que potencialmente la exocitosis se puede mantener en el tiempo y superponerse con la endocitosis, que habitualmente posee una cinética mucho más lenta. Esto es aplicable a los SQP500ms, pero no a los SQP50ms o menores, ya que los procesos de endocitosis más rápidos descritos tienen constantes temporales de varios cientos de milisegundos. Por otro lado, hay antecedentes que muestran que la dinamina, además de tener un rol preponderante en la endocitosis, tiene una acción importante en la modulación de la apertura/cierre del poro de fusión, y por lo tanto en la cinética de la exocitosis. Por lo tanto, en esta sección nos enfocamos en estudiar el efecto de estas mutaciones sobre la magnitud y la cinética de la exocitosis en células cromafines bovinas utilizando la técnica de amperometría (ver sección 3.4 en Materiales y Métodos) frente a la aplicación de estímulos sostenidos en el tiempo. Esta metodología nos permite cuantificar directamente el número de evento de exocitosis, y además visualizar en tiempo real la cinética de liberación de catecolaminas desde las vesículas individuales. Esta técnica ha sido de gran uso en las células cromafines (Leszczyszyn y col, 1991; Wightman y col, 1991; Chow y col, 1992; Wu y col, 2019), como también en otros tipos celulares (Alvarez de Toledo y col, 1993).

Con el objetivo de mantener la integridad del medio intracelular, en estos experimentos no se aplicó la técnica de *patch clamp* en modo *whole cell* como

método de estimulación. Por el contrario, las células se estimularon por aplicación de un agonista nicotínico a través de una micropipeta ubicada a aproximadamente 30 μm del borde celular y conectada a un microinyector neumático (Figura 4.28.A).

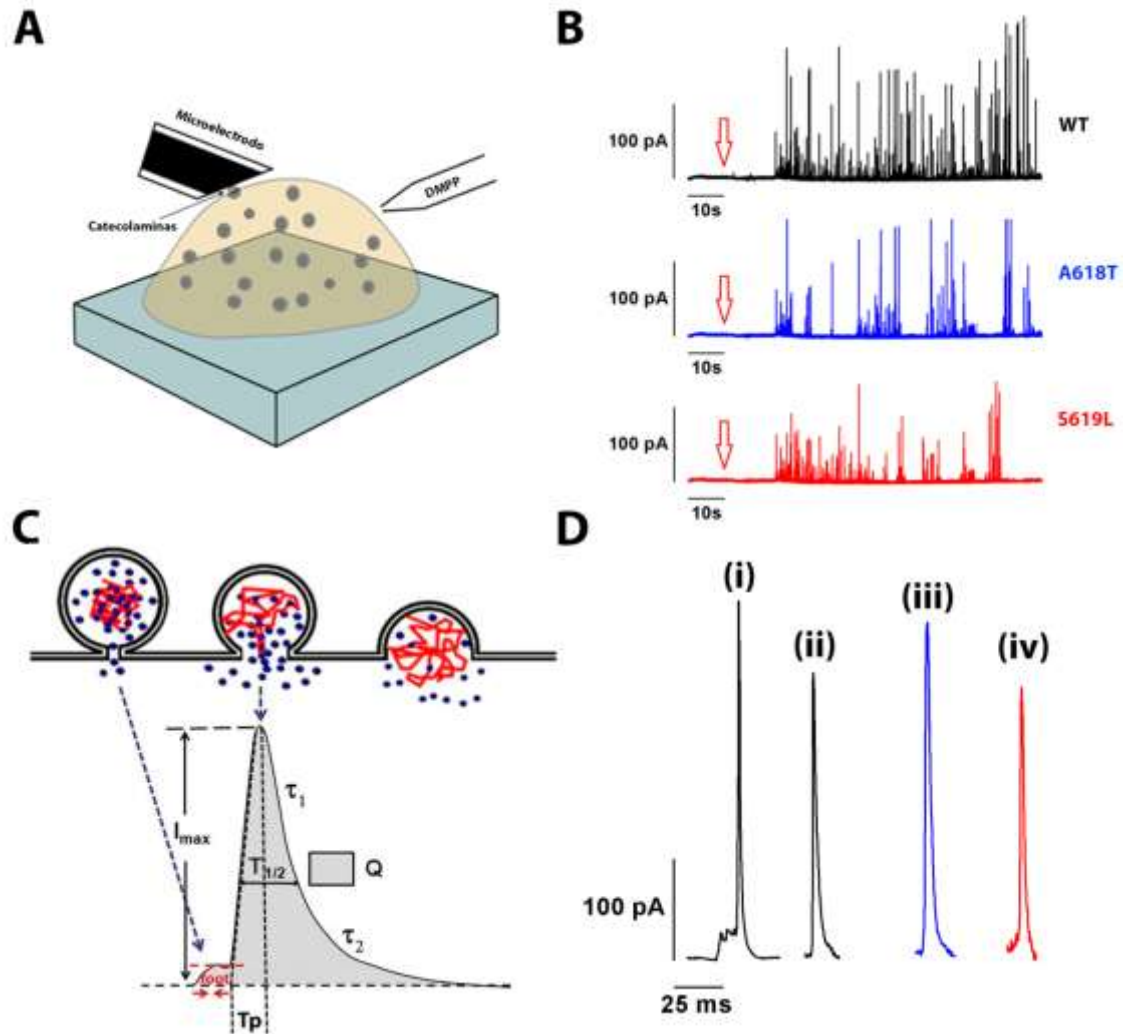


Figura 4.28 – Registros de la exocitosis por amperometría en células que expresan las variantes de dinamina-2 WT, A618T y S619L. (A) Esquema de la configuración experimental utilizada para la obtención de registros amperométricos. Las células cromafines bovinas fueron estimuladas con un *puff* del agonista nicotínico DMPP (50 μM) por 10 s. Simultáneamente se registró la oxidación de catecolaminas con un electrodo de carbono ($E^0 = +650 \text{ mV}$) situado próximo a la superficie celular. (B) Trazados representativos de registros amperométricos para las condiciones experimentales WT (negro), A618T (azul) y S619L (rojo). En cada registro se pueden observar espigas (señal de corriente amperométrica) causadas por la liberación de catecolaminas de eventos exocíticos individuales. A los 20 s de comenzado el registro se estimuló (flecha roja vacía) por un periodo de 10 s con DMPP para luego seguir registrando la actividad exocítica por otros 90 s adicionales (120 s totales de registro). (C) Esquema de una espiga asociada a un evento exocítico individual. Cada evento amperométrico típico tiene un

componente de corriente mayor, comúnmente identificado como la espiga, el cual puede o no ser precedido por una señal de corriente menor denominado *foot*. De la espiga amperométrica se extraen varios parámetros. I_{Max} : amplitud de corriente máxima; $T_{1/2}$: tiempo transcurrido a la mitad de la amplitud máxima; T_p : tiempo transcurrido desde el comienzo de la espiga (final de *foot* cuando este es registrado) hasta la I_{max} ; τ_1 y τ_2 : constantes cinéticas de decaimiento del evento exocítico que son obtenidas por medio de un ajuste biexponencial del tipo $Y = Y_0 + A_1 (1 - e^{-t/\tau_1}) + A_2 (1 - e^{-t/\tau_2})$; Q : contenido cuántico obtenido de la integral de la espiga. **(D)** Se muestran trazados representativos de espigas amperométricas para las condiciones WT (en negro) con y sin *foot* (i) y (ii), respectivamente, A618T (en azul) (iii) y S619L (en rojo) (iv).

Se registraron las corrientes amperométricas con un electrodo de fibra de carbono de aproximadamente 10 μm de diámetro. Al comienzo de cada experimento se obtuvieron registros amperométricos durante 20 s en condiciones basales, luego de lo cual las células fueron estimuladas con un *puff* del agonista nicotínico 1,1-dimethyl-4-phenyl-piperazinium (DMPP, 50 μM diluido en medio extracelular) aplicado por un período de 10 s, para luego seguir registrando la actividad exocítica por otros 90 s adicionales (Momboisse y col, 2014). Para evitar la estimulación de células vecinas, como consecuencia de la difusión del agonista en solución, los registros fueron realizados solamente sobre aquellas células que estuviesen aisladas de otras por una distancia mínima de 150 μm . En el panel B de la Figura 4.28 se muestran registros representativos completos de amperometría, obtenidos de la estimulación de células que expresan por separado WT, A618T y S619L (todas asociadas a EGFP). La oxidación en la superficie del electrodo de las catecolaminas liberadas desde una vesícula única genera una corriente transitoria en forma de “espiga” amperométrica. A simple vista podemos notar que la cantidad de espigas disminuye en células que expresan las mutaciones respecto de aquellas que expresan WT. Un evento amperométrico genérico tiene la forma que se representa en el esquema de la Figura 4.28.C. Ocasionalmente, este puede presentar al comienzo un *foot* (“pie” en inglés) que precede a la señal mayor, la que comúnmente se identifica como la espiga. Comúnmente sólo una fracción menor del total de los eventos presenta un *foot* distinguible y que puede ser medido, ya que este tipo de proceso se caracteriza por tener una amplitud de corriente muy pequeña (Alvarez de Toledo y col, 1993). La presencia del *foot* es atribuida a la filtración de catecolaminas a

través del estrecho poro de fusión que se forma al comienzo de la fusión entre la vesícula y la membrana (Almers, 1990), y provee información sobre la estabilidad y dinámica de este poro de fusión inicial (Zhou y col, 1996). De la espiga amperométrica posterior se pueden obtener los parámetros I_{Max} , $T_{1/2}$, T_p , Q , τ_1 y τ_2 , tal como se explicó en la sección 3.4 de Materiales y Métodos (referirse a esta sección para ver los significados de cada uno). Las constantes τ_1 y τ_2 se obtienen ajustando la caída de la señal a una ecuación de caída biexponencial del tipo $Y = Y_0 + A_1 (1 - e^{-t/\tau_1}) + A_2 (1 - e^{-t/\tau_2})$. Finalmente, en la Figura 4.28.D podemos apreciar trazados representativos de espigas amperométricas para las condiciones WT (en negro) con y sin foot (i) y (ii), respectivamente, A618T (en azul) (iii) y S619L (en rojo) (iv).

En la Figura 4.29.A se grafica el número de espigas por célula obtenido durante los 100 s de registro a partir del estímulo, para las tres condiciones experimentales. En esta figura, el número de espigas correspondiente a cada célula se representa como un círculo individual (círculos grandes vacíos). En el diagrama de caja la línea media simboliza la mediana de las espigas totales para cada condición experimental, la línea superior e inferior de la caja representan los percentiles 75 y 25, respectivamente, de la distribución. Las líneas de *whiskers* superior e inferior representan los valores máximo y mínimo, respectivamente, en la distribución. Este gráfico confirma que el número de espigas decae significativamente en las células que expresan A618T y S619L respecto del WT. Otra medida de la exocitosis total es el valor de carga acumulada ($\sum Q$) en función del tiempo total del registro. Este parámetro se obtuvo para cada célula registrada, y consiste en ordenar primero la aparición de todas las espigas en el tiempo (de 0 a 100 s en nuestro caso), y luego, respetando ese orden, calcular el valor acumulado de Q de dichas espigas. Como Q es un indicador del contenido de catecolaminas en cada evento exocítico, $\sum Q$ representa la secreción acumulada de la célula en la ventana temporal analizada (Chan y Smith, 2001). En el panel B de la Figura 4.29 se muestran los promedios obtenidos de este parámetro en la población de células registradas en función del tiempo para las tres condiciones experimentales. Observamos que la secreción acumulada en las células que expresan los mutantes de dinamina-2 es significativamente menor respecto al

WT. Esto es congruente con lo observado para la cantidad total de espigas por célula y con los resultados obtenidos en los experimentos de capacitancia estimulando con SQP500ms. Por lo tanto, los resultados de este capítulo, juntamente con los mostrados en la sección previa, indican que la expresión de A618T o S619L provoca una reducción de la exocitosis. Como se discutió previamente, esto puede deberse a los efectos combinados de una reducción de la entrada de Ca^{2+} y una disminución de la provisión de vesículas liberables a los sitios de exocitosis.

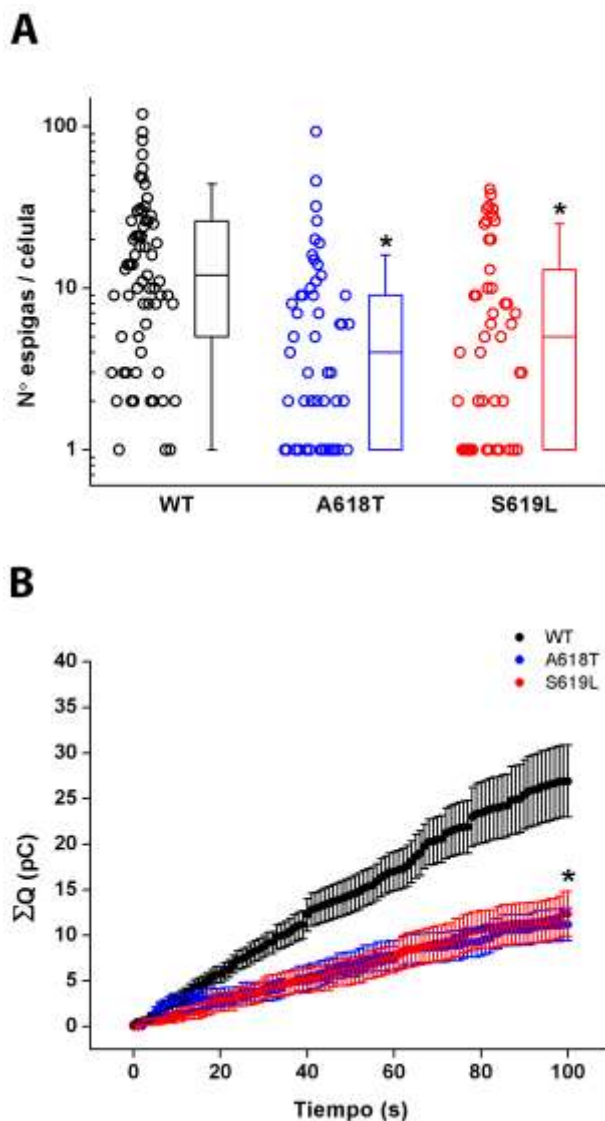


Figura 4.29- Cuantificación de la exocitosis en células que expresan las variantes de dinamina-2 WT, A618T y S619L. (A) Se grafica en escala logarítmica el número de espigas amperométricas por célula, para las condiciones WT (negro), A618T (azul) y S619L (rojo). En el diagrama de caja, la línea media simboliza la mediana; la línea superior e inferior, los percentiles 75 y 25, respectivamente; y los *whiskers* superior e inferior, los valores máximo y mínimo, respectivamente. Notar que en las condiciones A618T y S619L, los *whiskers* correspondientes al valor mínimo se encuentran solapados con la línea del percentil 25. Los círculos vacíos representan las mediciones en células individuales (una medición por célula). Se observa que el número de espigas por célula disminuye significativamente en células que expresan A618T y S619L respecto al WT. **(B)** El gráfico representa los promedios acumulados (\pm ES) de Q

(ΣQ), obtenidos durante 100 segundos de registro, para, WT (puntos negros), A618T (puntos azules) y S619L (puntos rojos). Se cuantificó ΣQ a cada segundo. Se observa un decaimiento significativo de A618T y S619L respecto a WT. Para el análisis del panel (A) se consideró a la totalidad de células registradas ($n_{WT} = 77$; $n_{A618T} = 61$; $n_{S619L} = 62$), mientras que en el panel (B) se consideró solamente a aquellas células que presentaron 5 o más espigas en su registro ($n_{WT} = 46$; $n_{A618T} = 24$; $n_{S619L} = 26$). En (A) se empleó un test de Kruskal-Wallis con contraste de

Dunn's, $*p < 0,001$. En (B) se empleó un test de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras independientes, $*p < 0,05$.

Siguiendo con nuestro análisis, decidimos estudiar si la expresión de A618T o S619L afectaban la magnitud y/o la cinética de los eventos individuales. Para ello, obtuvimos los parámetros I_{Max} , $T_{1/2}$, T_p , τ_1 , τ_2 y Q de cada espiga individual, en cada condición experimental. El conjunto de datos de estos parámetros fue analizado tomando como unidad experimental a cada célula. Para esto se obtuvo, para cada parámetro, la mediana del valor obtenido en todas las espigas de una misma célula, y luego se determinó el promedio de las medianas entre células. Es importante mencionar que para obtener un valor confiable de la mediana en cada célula solo se tomaron y analizaron aquellas células que presentaron 5 o más espigas en su registro.

En la Figura 4.30, paneles A, B, C, D, E y F, se encuentran graficados I_{Max} , $T_{1/2}$, T_p , τ_1 , τ_2 y Q , respectivamente, para las tres condiciones experimentales. En cada panel se muestra el promedio (línea horizontal) \pm ES de las medianas obtenidas en cada célula (círculos grandes vacíos). Si bien se puede observar que todos los parámetros medidos en S619L presentan una cierta tendencia a disminuir respecto del WT, no se observaron diferencias estadísticas entre las condiciones experimentales. Estos resultados indican que ambas mutaciones no afectan significativamente la magnitud ni la cinética de difusión del contenido vesicular al medio extracelular, y esto sugiere que no estarían alterando la cinética de fusión de la vesícula a la membrana.

Con el fin de analizar otro factor asociado a la cinética de fusión vesicular, se estudió la cantidad, duración y amplitud de los *foot* pertenecientes a las espigas amperométricas que fueron obtenidas en cada condición experimental. Un aumento en estos parámetros es interpretado como una mayor estabilidad del poro de fusión inicial (Lindau y Alvarez de Toledo, 2003). Dado que ha sido propuesto que la polimerización de la dinamina alrededor del cuello vesicular otorga restricciones a la expansión de esta estructura (Wu y col, 2019), sería posible que las mutantes en estudio afecten este proceso.

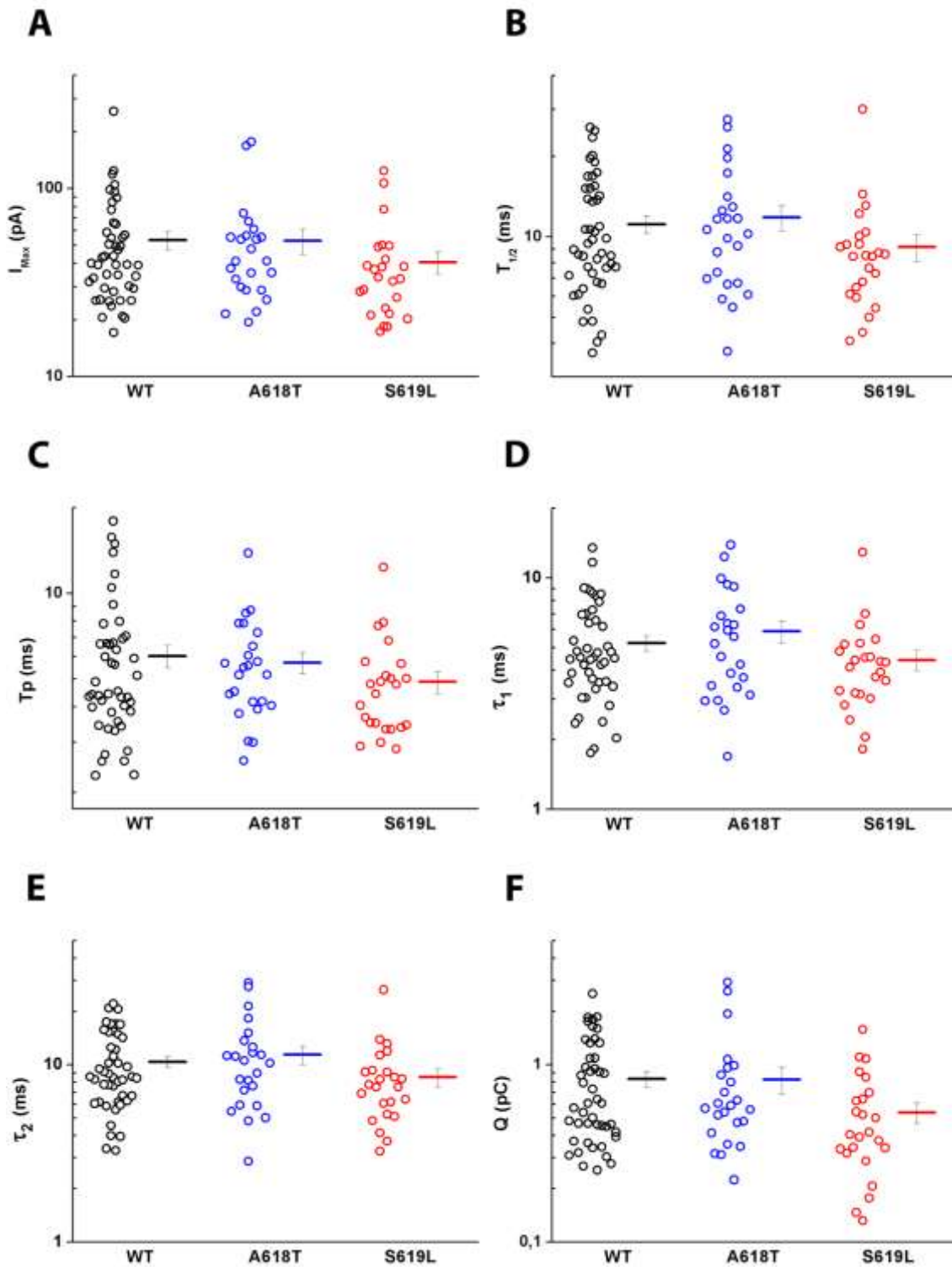


Figura 4.30- Cinética y magnitud de espigas amperométricas obtenidas de células que expresan las variantes de dinamina-2 WT, A618T y S619L. En (A), (B), (C), (D), (E) y (F) se grafican en escala logarítmica los promedios (línea horizontal) \pm ES de las medianas obtenidas en cada célula (círculos vacíos, una medición por célula) de los parámetros I_{Max} , $T_{1/2}$, T_p , τ_1 , τ_2 y Q , respectivamente, para las condiciones WT (negro), A618T (azul) y S619L (rojo). No se observaron diferencias estadísticas entre condiciones en ninguno de los parámetros

analizados. Para estos gráficos se consideró solamente a aquellas células que presentaron 5 o más espigas en su registro ($n_{WT} = 46$; $n_{A618T} = 24$; $n_{S619L} = 26$).

Para estimar la cantidad de *foot*, cuantificamos la presencia de estas estructuras calculando el “porcentaje de *foot*”. Este parámetro nos permite tener una idea de la cantidad de eventos de tipo *foot* independientemente del número de espigas en cada registro, y se calcula como el cociente entre el número de *foot* y el número de espigas obtenidos dentro de cada célula, multiplicado por 100 (ver sección 3.4 en Materiales y Métodos). Es importante mencionar que para calcular este parámetro solo se tienen en cuenta aquellas células que presentaron 5 o más espigas en su registro. Una aclaración importante es que un mayor número de *foot* implica que tenemos un mayor número de eventos en los que el poro inicial de fusión duró el tiempo suficiente como para ser detectado, y por eso está relacionado con la estabilidad de dicha estructura. En la Figura 4.31, panel A, se muestra graficado el porcentaje de *foot* obtenido para cada célula (círculos grandes vacíos), en cada condición experimental. En el diagrama de caja, la línea media simboliza la mediana; la línea superior e inferior, los percentiles 75 y 25, respectivamente; y los *whiskers* superior e inferior, los valores máximo y mínimo, respectivamente. No se evidenciaron diferencias significativas entre condiciones para este parámetro, lo cual sugiere que A618T y S619L no afectarían la detección de estos eventos respecto del WT. En los paneles B y C de la Figura 4.31, se muestran graficadas la duración y amplitud de los *foot*, respectivamente, para todas las condiciones experimentales. Para esta cuantificación se obtuvo, para cada parámetro, la mediana del valor obtenido en todos los *foot* de una misma célula, y luego se determinó el promedio de las medianas (línea \pm ES) entre células (círculos grandes vacíos). Debemos mencionar que para este análisis se utilizaron aquellas células que presentaron 5 o más espigas amperométricas y eventos de tipo *foot*, en su registro. Al igual que para el porcentaje de *foot*, no se vieron diferencias estadísticas para ambos parámetros en las tres condiciones experimentales. Estos resultados en su conjunto indican que estas mutaciones de dinamina-2 no afectarían la estabilidad del poro de fusión inicial formado entre la vesícula secretoria y la membrana plasmática.

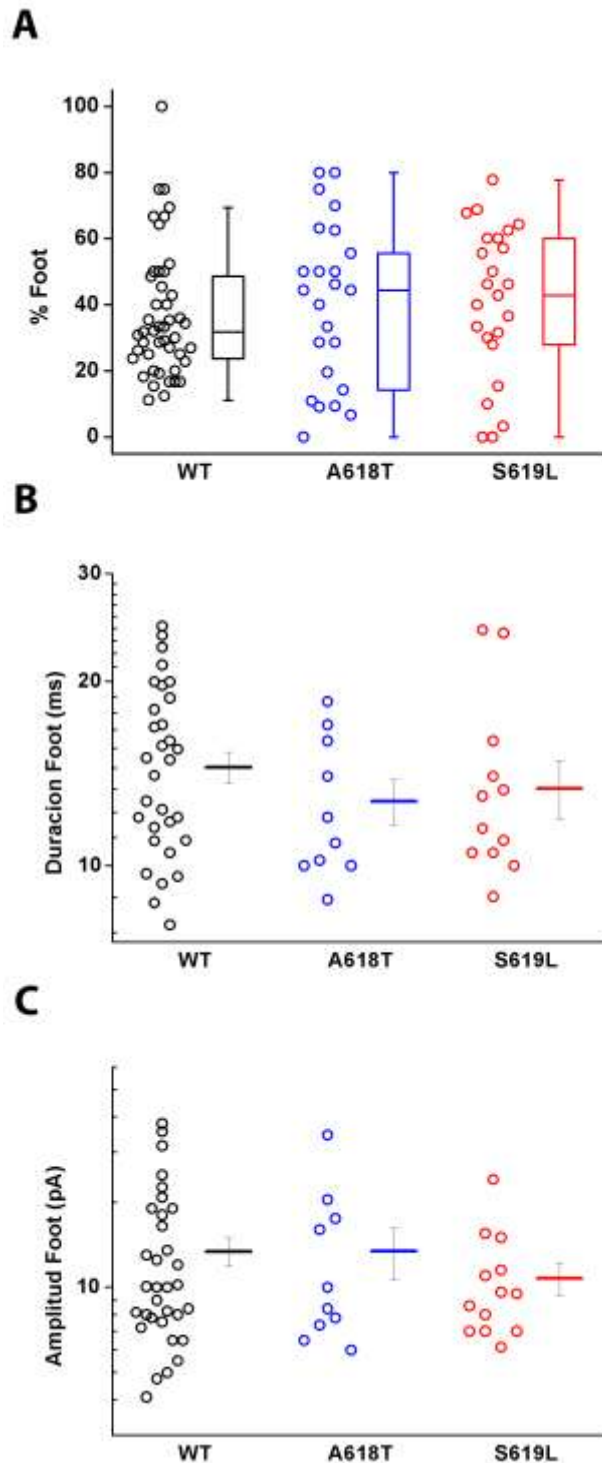


Figura 4.31- Análisis de los foot de espigas amperométricas obtenidos de células que expresan las variantes de dinamina-2 WT, A618T y S619L. En (A) se grafica el porcentaje de *foot* por célula, para las condiciones WT (negro), A618T (azul) y S619L (rojo). Este parámetro se obtiene realizando el porcentaje del cociente entre el número de *foot* y el número de espigas obtenidos en cada célula. En el diagrama de caja, la línea media simboliza la mediana; la línea superior e inferior, los percentiles 75 y 25, respectivamente; y los *whiskers* superior e inferior, los valores máximo y mínimo, respectivamente. Los círculos vacíos representan las mediciones en células individuales (una medición por célula). No se observaron diferencias estadísticas entre condiciones experimentales para este parámetro. En (B) y (C) se grafican en escala logarítmica los promedios (línea horizontal) \pm ES de las medianas obtenidas en cada célula de la duración total y amplitud de los *foot*, respectivamente, para las tres condiciones experimentales. Los círculos vacíos representan las medianas obtenidas en células individuales. En ambos parámetros, no se observaron diferencias significativas

entre condiciones. El gráfico en (A) se elaboró con los datos de aquellas células que presentaron 5 o más espigas en su registro ($n_{WT} = 46$; $n_{A618T} = 24$; $n_{S619L} = 26$). Para graficar (B) y (C) se emplearon solamente a aquellas células que presentaron 5 o más *foot*, en su registro ($n_{WT} = 33$; $n_{A618T} = 10$; $n_{S619L} = 13$).

Los resultados de esta sección muestran que la expresión de A618T o S619L en células cromafines bovinas no afecta el proceso de fusión de

vesículas individuales, pero indican que disminuye la frecuencia de eventos exocíticos. Esto es congruente con el decaimiento de la exocitosis en los experimentos de capacitancia estimulando con SQP500ms. El hecho de que no hayamos encontrado alteraciones en la magnitud de la exocitosis disparada por estímulos breves (que liberan unas pocas vesículas), pero que sí la hayamos observado frente a estímulos eléctricos más prolongados o con agonistas aplicados a lo largo de varios segundos (que liberan mayor cantidad de vesículas) sugiere que A618T y S619L están comprometiendo la provisión de vesículas a los sitios de exocitosis. Como ya mencionamos, esto puede tener diferentes explicaciones. Una posible hipótesis sería que esté afectada la producción de vesículas *de novo* desde el aparato de Golgi, dado que la dinamina-2 facilita la escisión de membrana desde esta organela para la formación de nuevas vesículas secretorias (Yang y col, 2001).

Otra hipótesis, mencionada previamente, sería que esté alterada la dinámica del citoesqueleto de actina.

Como se discutió anteriormente, la F-actina participa de una gran variedad de procesos celulares que han sido estudiados en esta Tesis, tales como la translocación de vesículas secretorias hacia los sitios de exocitosis (Li y col, 2018; Gutiérrez y Villanueva, 2018), la endocitosis rápida evocada por PAs (Montenegro y col, 2020) y la endocitosis clatrina-dependiente (Boulant y col, 2011). En base a estos antecedentes, y a los cambios observados en los distintos procesos, podemos considerar la posibilidad que de ambas mutaciones se encuentren afectando, por algún mecanismo aun no dilucidado, al citoesqueleto de actina. En otras palabras, una alteración en la dinámica del citoesqueleto de actina podría ser un factor común de todos los cambios observados a consecuencia de la expresión de A618T y S619L. Por lo tanto, en la próxima sección de esta Tesis evaluaremos el impacto de estas mutaciones sobre el citoesqueleto de F-actina en células cromafines bovinas.

4.10 A618T y S619L afectan la formación de filamentos de actina.

En las secciones pasadas se ha mostrado, a través de distintas técnicas experimentales, que la expresión de A618T o S619L afecta significativamente a la exocitosis y a la endocitosis en células cromafines bovinas. Como se mencionó previamente en varias instancias de esta tesis, estos efectos pueden estar siendo potencialmente causados por una disrupción del citoesqueleto de actina. Como ya hemos visto, la actina participa activamente en numerosos procesos relacionados con el reciclado vesicular, como puede ser la translocación de vesículas a la membrana (Papadopulos y col, 2015; Li y col, 2018; Gutiérrez y Villanueva, 2018), diversos procesos de endocitosis (Boulant y col, 2011; Watanabe y col, 2013; Gormal y col, 2015; Wu y col, 2016), y en la regulación de la apertura/cierre del poro de fusión formado entre la vesícula y la membrana plasmática (Shin y col, 2018). Por otro lado, hay evidencias de que la dinamina promueve la polimerización del citoesqueleto de actina (Gu y col, 2010; Yamada y col, 2013; Lin y col, 2020). En base a estos antecedentes, decidimos evaluar si las mutantes de dinamina-2, A618T y S619L, afectan la dinámica del citoesqueleto de actina en nuestro modelo experimental. Células cromafines bovinas, expresando por separado las dinaminas A618T, S619L y WT (unidos a una proteína fluorescente roja (mCherry)), fueron permeabilizadas con digitonina (20 μ M) e incubadas por 20 minutos con un conjugado de actina globular (G-actina) 0,3 μ M unida a Alexa Fluor 488, cuya fluorescencia permite identificar la formación *de novo* de F-actina (Olivares y col, 2014; Gonzalez-Jamett y col, 2017). Posteriormente, las células se fijaron y se obtuvieron imágenes, mediante microscopía confocal, de las células que presentaron señales distinguibles en ambos canales (mCherry y Alexa Fluor 488). En la Figura 4.32.A filas (i), (ii) e (iii), se muestran imágenes confocales representativas de células expresando dinamina-2 WT, A618T y S619L, respectivamente, e incubadas con el conjugado G-actina/Alexa Fluor 488 y el compuesto fluorescente 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que se utiliza como marcador del núcleo celular. A simple vista, se puede notar que en la condición WT la fluorescencia asociada a la formación *de novo* de F-actina es intensa y claramente extendida en la región cortical de la célula, mientras que A618T y

S619L muestran una marca más tenue y fragmentada. Se cuantificó el porcentaje de formación *de novo* de actina filamentosa (F-actina) en el plano ecuatorial de cada célula, como el cociente entre el área verde fluorescente asociada a Alexa Fluor 488 y el área total celular. El valor del área de F-actina es el mismo valor de área de una máscara construida por un algoritmo predeterminado del programa *Image J*. Esta máscara se generó utilizando la señal verde fluorescente (F-actina) de aquellos píxeles que presentaban un valor de intensidad por arriba de cierto umbral (ver sección 3.5.1 en Materiales y Métodos).

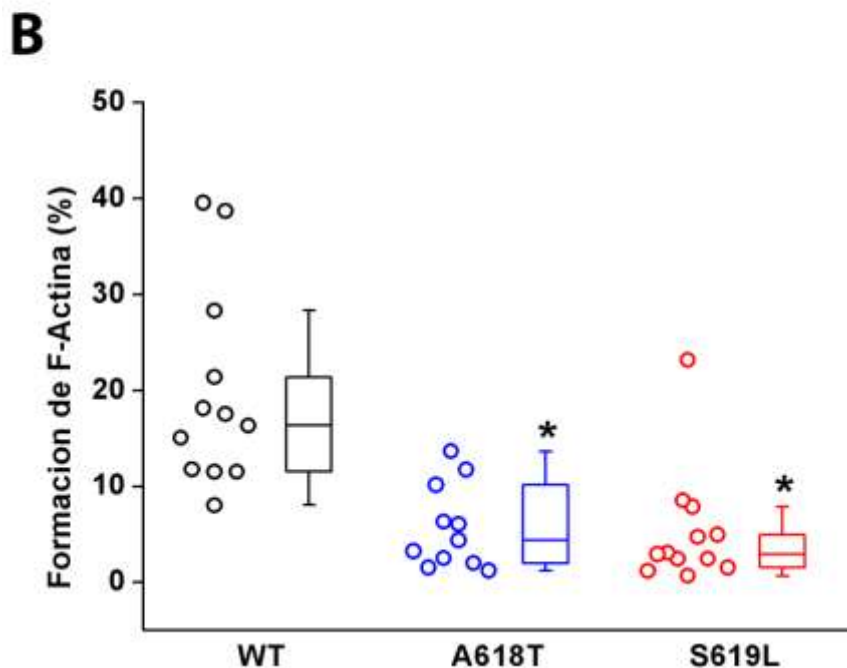
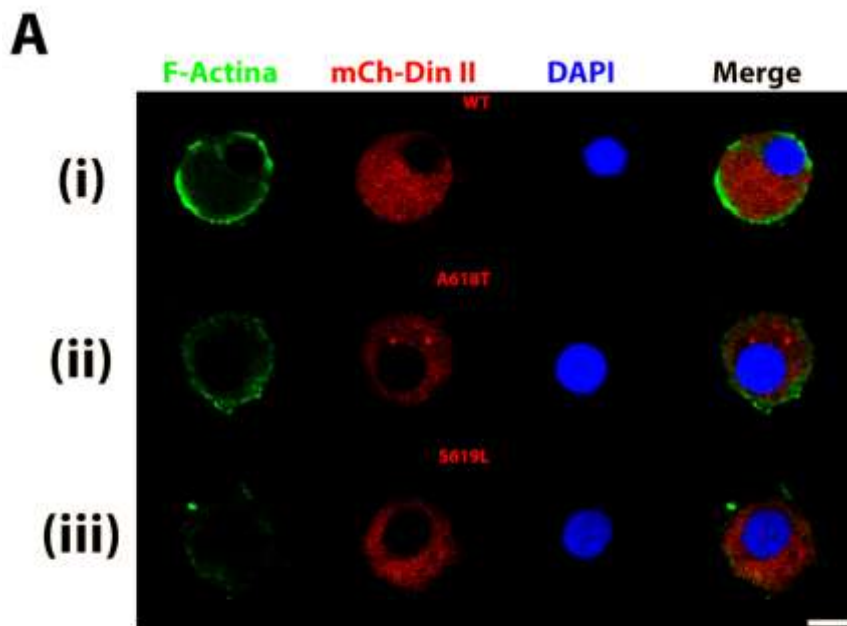


Figura 4.32- Formación *de novo* de F-actina en células que expresan las variantes de dinamina-2 WT, A618T y S619L. (A) En las filas (i), (ii) y (iii) se muestran imágenes representativas de células cromafines bovinas obtenidas por microscopia confocal en el plano ecuatorial, expresando las variantes de dinamina-2 WT, A618T y S619L, respectivamente, unidas al marcador rojo fluorescente mCherry. Para evaluar el porcentaje de formación *de novo* de F-actina, las células fueron incubadas con el conjugado G-actina Alexa Fluor 488, mientras que para la tinción del núcleo se empleó la sonda azul fluorescente DAPI. Barra de escala (en blanco) = 5 μm . (B) Se grafican los porcentajes de formación de F-actina para las condiciones WT (negro), A618T (azul) y S619L (rojo). Este parámetro se calcula como el porcentaje entre el cociente del área verde fluorescente y el área total celular (sin el área nuclear). En el diagrama de caja, la línea media simboliza la mediana; la línea superior e inferior, los percentiles 75 y 25, respectivamente; y los *whiskers* superior e inferior, los valores máximo y mínimo, respectivamente. Los círculos vacíos representan las mediciones en células individuales (una medición por célula). Observamos una caída significativa en este parámetro para las condiciones A618T y S619L respecto de la WT. El número de células en cada condición experimental fue: $n_{WT} = 12$; $n_{A618T} = 11$; $n_{S619L} = 12$. Test de Kruskal-Wallis con contraste de *Dunn's*, $*p < 0,001$.

En el panel B de la Figura 4.32 se grafica esta cuantificación para las tres condiciones experimentales, lo cual corrobora la apreciación previamente realizada. El porcentaje de formación de F-actina para A618T y S619L resultó significativamente menor que en WT. Esto indica que la formación *de novo* de F-actina está seriamente comprometida por la presencia de las mutantes. Esto está de acuerdo con la hipótesis que sugiere que los cambios observados en la exocitosis, la secreción, y la endocitosis en células que expresan dichas mutaciones pueden tener como denominador común a la alteración de la dinámica de F-actina cortical. Como se mencionó al principio de esta sección, hay antecedentes que indican que la dinamina, directa o indirectamente, favorece la polimerización del citoesqueleto de actina. Por ejemplo, un estudio realizado en podocitos de células renales indica que la dinamina promovería la polimerización de filamentos de actina (Gu y col, 2010) a través de un proceso de retroalimentación positiva, donde la polimerización de una proteína promovería la de la otra, y viceversa. Otro estudio, realizado sobre la formación de filopodios en neuronas corticales de rata y en líneas celulares de neuroblastoma humano, ha revelado que la regulación de la actina por parte de la dinamina es crítica para formación de estas estructuras, cuyo desarrollo

depende casi enteramente de la dinámica del citoesqueleto de actina (Yamada y col, 2013). Más importante, hay antecedentes en la bibliografía previos a esta Tesis que indican que variantes de dinamina-2 relacionadas con la MCN afectan la formación *de novo* de F-actina. Un estudio realizado por el laboratorio de la Dra. Ana María Cárdenas, demostró que las variantes de dinamina-2 R465W y R369W disminuyen significativamente la formación de F-actina *de novo* en líneas celulares de mioblastos (Gonzalez-Jamett y col, 2017). Estas mutantes, al igual que A618T y S619L, poseen una actividad GTPasa significativamente aumentada respecto de la isoforma WT y tienden a formar agregados en solución (Wang y col, 2010; Kenniston y Lemmon, 2010). González-Jamett y colaboradores plantean que este efecto sobre la formación de F-actina *de novo* podría deberse principalmente a que ambas mutaciones toman lugar en el dominio medio, muy cerca del sitio de unión a la actina (residuos 399 a 444), lo cual podría generar un cambio conformacional de la estructura de la dinamina en esa zona, desfavoreciendo la unión con la actina. Sin embargo, se ha visto que las mutaciones puntuales A618T y S619L están ubicadas en el dominio PH de la dinamina, situándose más lejos de la supuesta región de unión a actina (Böhm y col, 2012). No obstante, González-Jamett y colaboradores también observaron la formación de grandes cúmulos proteicos citoplasmáticos de dinamina al sobre-expresar las mutaciones R465W y R369W, y no descartan que los efectos observados puedan deberse a esto.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos preguntamos ¿por qué las mutantes A618T y S619L afectarían negativamente la formación de F-actina *de novo*? De la misma forma que se lo plantearon González-Jamett y colaboradores (2017), la respuesta podría estar en el comportamiento hiperactivo de estas mutaciones y su potencial tendencia a formar agregados citosólicos. La formación de estos complejos de dinamina en solución ha sido reportada en primer lugar por los grupos de investigación de Wang y colaboradores (2010) y Kenniston y Lemmon (2010), en experimentos *in vitro*. Además, estos autores observaron que este comportamiento favorecería la ganancia de actividad GTPasica que poseen ambas mutantes. Teniendo en cuenta que la dinamina es una proteína que cumple un rol esencial en la dinámica del citoesqueleto de actina, la formación de estos agregados podría disminuir la concentración de dinamina disponible por debajo del mínimo

necesario requerido para mantener una dinámica normal del citoesqueleto de actina. Otra observación importante la realizaron Wang y colaboradores (2010), quienes reportaron que A618T forma polímeros de dinamina altamente estables, insensibles a ser despolimerizados por el agregado de GTP. Esto podría afectar la formación *de novo* de F-actina, la cual depende de la dinámica de ensamblado/desensamblado de la dinamina (Gu y col, 2010). En un estudio reciente realizado en mioblastos, se demostró que la vida media de podocitos (estructuras compuestas por un núcleo de actina, rodeado y estabilizado por anillos de dinamina) era prolongada de decenas de minutos con dinamina *wild type*, a varias horas en presencia de A618T o S619L (Lin y col, 2020). Los autores concluyen que los podocitos formados bajo la influencia de A618T o S619L perduran por más tiempo gracias a la dificultad de ambos mutantes a despolimerizarse, incluso en presencia de GTP. Esta dificultad de las dinaminas mutantes para despolimerizarse, y por lo tanto intervenir dinámicamente en diferentes sitios donde su acción es requerida podría explicar los decrementos observados en la formación *de novo* de F-actina, como también en la endocitosis y, de manera indirecta, en el proceso de tráfico de vesículas a la membrana que es fundamental para sostener la exocitosis.

De modo de seguir analizando los posibles mecanismos por los cuales A618T y S619L afectan la fisiología de las células cromafines, en la próxima sección de esta Tesis estudiaremos la formación de agregados citoplasmáticos de dinamina, y evaluaremos la distribución de los gránulos secretorios próximos a la membrana plasmática.

4.11 A618T y S619L promueven la formación de agregados citoplasmáticos de dinamina y deprimen la recuperación de vesículas secretorias en las proximidades de la membrana plasmática.

En la sección 4.10 observamos que A618T y S619L afectan significativamente la formación *de novo* de F-actina. En esa misma sección planteamos como hipótesis que esto podría tal vez explicarse por la tendencia que tienen estas mutantes a la formación de grandes agregados

citoplasmáticos estables, lo cual disminuiría la concentración de dinamina libre que pueda interactuar con la F-actina en formación. La formación de agregados de A618T y S619L ha sido demostrada hasta el momento solamente en condiciones *in vitro*. Wang y colaboradores (2010), observaron que la incubación de A618T, en un medio *buffer* de baja concentración salina (lo cual favorece la auto-polimerización de esta proteína), resultaba en la formación de agregados proteicos en solución. Estos agregados eran resistentes a ser disgregados por la aplicación de GTP libre al medio de incubación. Este mismo fenómeno también ha sido descrito para la mutante S619L por Kenniston y Lemmon (2010), quienes observaron que esta mutación tenía la capacidad de formar oligómeros de alto orden (significativamente más grandes que WT) cuando se la incubaba en solución a temperaturas fisiológicas (37 °C). Es importante mencionar que este fenómeno no ha sido descrito hasta el momento en experimentos *in vivo*, por lo que nos preguntamos si podría producirse en nuestras células transfectadas con estas mutantes.

Para contestar la pregunta planteada arriba, en esta sección estudiamos si la expresión de A618T y S619L en nuestro modelo de estudio promovía la formación de agregados citosólicos de dinamina *in vivo*. En segundo término, evaluamos si estas mutantes alteran la distribución de los gránulos secretorios, particularmente en la proximidad de la membrana plasmática, lo cual depende en buena medida de la formación *de novo* de F-actina cortical (Papadopulos y col, 2015; Li y col, 2018; Gutiérrez y Villanueva, 2018). Para todo esto obtuvimos imágenes de microscopía confocal en células cromafines bovinas fijadas (ver sección 3.5.2 en Materiales y Métodos), co-expresando alguna de las variantes de dinamina-2 (WT, A618T o S619L, fusionadas a EGFP) y el neuropéptido Y fusionado a mCherry (NPY-mCherry), como marcador de los gránulos secretorios (0,5 µg de ADN en todos los casos). En un grupo de experimentos las células se mantuvieron en reposo previamente a la fijación, mientras que en otro, las células se fijaron luego de la aplicación del agonista nicotínico DMPP 50 µM durante 10 s (ver sección 3.5.2 en Materiales y Métodos). Ya demostramos en experimentos de amperometría que este tratamiento induce secreción en forma significativa y consistente.

En la Figura 4.33, panel A, se muestran imágenes confocales representativas del plano ecuatorial de células cromafines bovinas no estimuladas para WT (i), A618T (ii) y S619L (iii). Mientras la variante WT tiene una distribución algo difusa en el citosol, aunque más concentrada en la periferia celular, las mutantes A618T y S619L tienden a formar grandes agregados citosólicos con poca marca difusa (Figura 4.33.Ai-iii). Se debe mencionar que WT también ha presentado ocasionalmente la formación de estos agregados (se pueden ver algunos en la figura), aunque de tamaño menor y en forma menos frecuente.

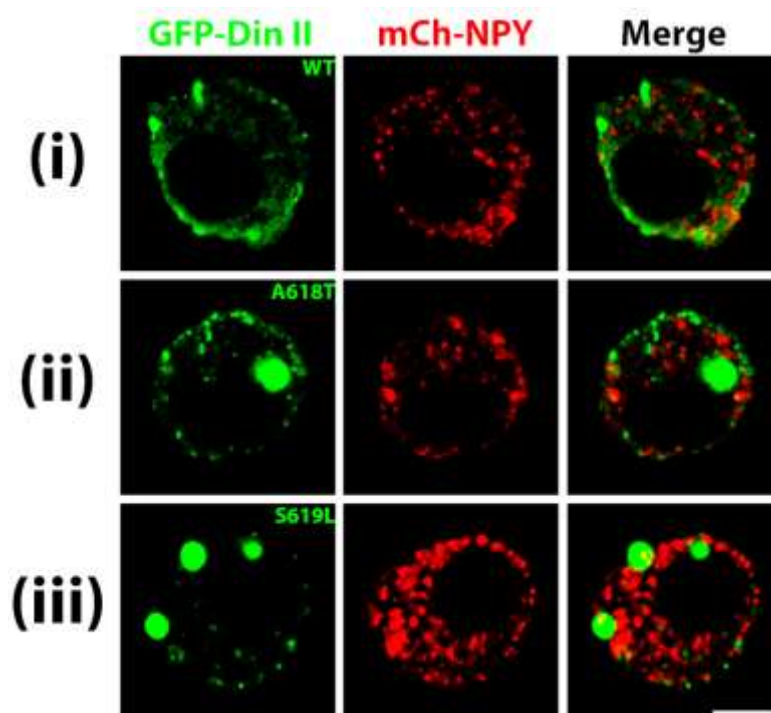


Figura 4.33- Co-expresión de dinamina-2 (en sus formas WT, A618T o S619L) y NPY-mCherry en células cromafines bovinas. En las filas (i), (ii) y (iii) se muestran imágenes representativas de células cromafines bovinas obtenidas por microscopía confocal en el plano ecuatorial, co-expresando cada una de las variantes de dinamina-2 WT, A618T o S619L (unidas a EGFP), respectivamente, y al marcador de gránulos secretorios NPY-mCherry. Es posible apreciar la formación de grandes agregados de dinamina en las células que expresan a las mutantes A618T y S619L. Barra de escala (en blanco) = 5 μm .

Para corroborar estas observaciones con un análisis cuantitativo se reconstruyó tridimensionalmente a cada agregado citosólico asociado a EGFP (ver sección 3.5.2 en Materiales y Métodos), y se le estimó el área de su superficie externa. Luego, estos se agruparon en cuatro grupos según sus valores de área de superficie externa. El primer grupo contempló a todos los

agregados de $0,5 \mu\text{m}^2$ en adelante. Este valor mínimo se estableció en base a límite de resolución aproximado del microscopio confocal. El segundo grupo, a los valores de áreas mayores a $10 \mu\text{m}^2$; el tercero a los valores de áreas superiores a $20 \mu\text{m}^2$; y el cuarto, a los valores de áreas mayores a $30 \mu\text{m}^2$. En los paneles A, B, C y D de la Figura 4.34, se muestran graficadas las frecuencias relativas acumuladas de cada grupo definido previamente ($>0,5 \mu\text{m}^2$, $>10 \mu\text{m}^2$, $>20 \mu\text{m}^2$ y $>30 \mu\text{m}^2$, respectivamente) vs el área (μm^2), para las tres condiciones experimentales.

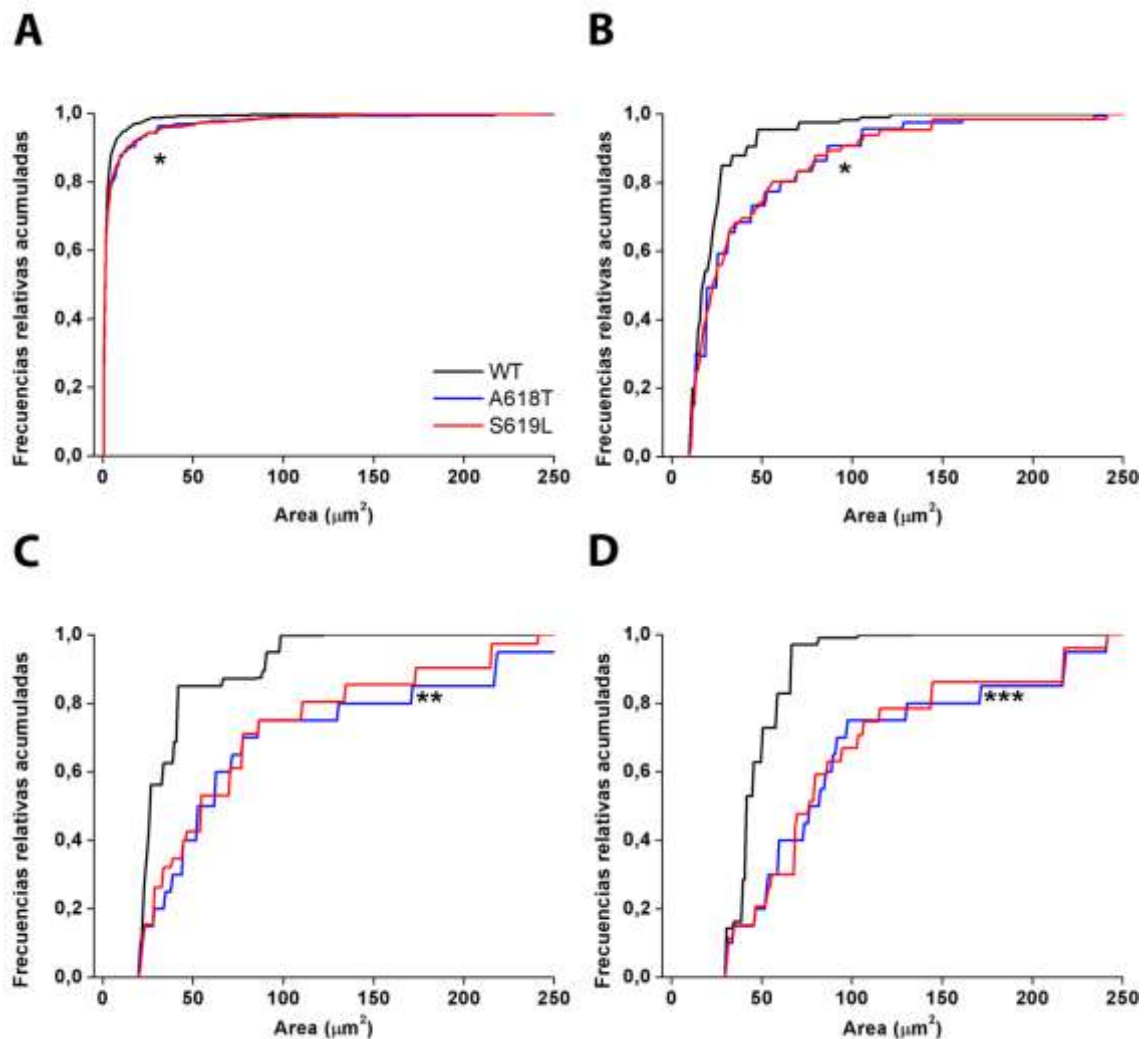


Figura 4.34- Análisis de las frecuencias relativas acumuladas para los valores de área de los agregados de dinamina-2 WT, A618T y S619L. En los paneles (A), (B), (C) y (D) se grafican las frecuencias relativas acumuladas vs el área (μm^2) para valores de área mayores a $0,5 \mu\text{m}^2$, $10 \mu\text{m}^2$, $20 \mu\text{m}^2$ y $30 \mu\text{m}^2$, respectivamente, de los agregados de dinamina-2 WT (línea negra), A618T (línea azul) y S619L (línea roja), formados en células cromafines bovinas no estimuladas. En los cuatro gráficos observamos que la frecuencia relativa acumulada para A618T y S619L llega a la saturación a valores de área significativamente mayores que WT. El número de células analizadas en cada condición experimental fue: $n_{\text{WT}} = 12$; $n_{\text{A618T}} = 10$; n_{S619L}

= 11. Test de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras independientes, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En los cuatro gráficos observamos que la frecuencia relativa acumulada para A618T y S619L llega a la saturación a valores de área significativamente mayores que WT. Esto se observa con mayor claridad a medida que se aumenta el tamaño mínimo de área considerada. De hecho, notamos que la mayor diferencia entre condiciones se observa para los agregados con áreas mayores a $30 \mu\text{m}^2$ (panel D). Esta cuantificación corrobora que los agregados formados por las mutantes de dinamina-2 son más grandes que aquellos formados por la WT.

Una segunda estrategia de análisis consistió en cuantificar el número absoluto de agregados mayores a $30 \mu\text{m}^2$ por célula (Figura 4.35). Se observa que en las condiciones A618T y S619L la cantidad de estos agregados por célula es significativamente mayor que en WT, independientemente de si las células estuvieron en reposo (panel A) o estimuladas con $50 \mu\text{M}$ de DMPP por 10 s previamente a ser fijadas (panel B). Estos resultados demuestran que A618T y S619L incrementan la tendencia de la dinamina a formar grandes agregados citoplasmáticos de dinamina en células cromafines bovinas *in vivo*.

Finalmente, decidimos cuantificar la presencia de gránulos secretorios por medio de la medición del valor porcentual de área ocupada por NPY-mCherry (%NPY total) en el plano ecuatorial celular (ver sección 3.5.2 en Materiales y Métodos), como el cociente entre el área ocupada por la marca de NPY y el área total celular, multiplicado por 100.

También se calculó el porcentaje de NPY en la periferia (%NPY periferia), como el cociente entre el área ocupada por la marca de NPY en un anillo de $1 \mu\text{m}$ alineado circunferencialmente con el borde celular y el área total de dicho anillo, multiplicado por 100. Este parámetro brinda información del porcentaje de gránulos secretorios que se encuentran en la región cortical de la célula, incluyendo los próximos a la membrana plasmática. Finalmente, calculamos el porcentaje de NPY periferia / NPY total (% NPY periferia / total), como el cociente entre el valor de área de la marca de NPY en la periferia y el valor del área de la marca de NPY total, multiplicado por 100. Este último

parámetro nos da información sobre la distribución espacial relativa de los gránulos secretorios.

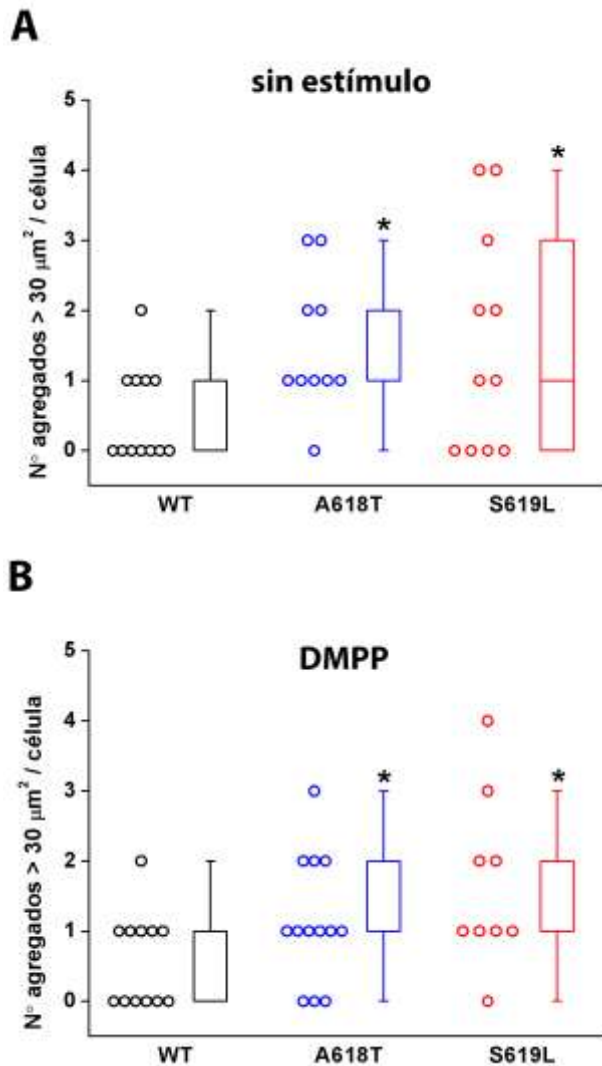


Figura 4.35- Número absoluto de agregados de dinamina con áreas mayores a $30 \mu\text{m}^2$ en células expresando las variantes de dinamina-2 WT, A618T y S619L. En (A) y (B) se grafican el número de agregados con áreas mayores a $30 \mu\text{m}^2$ por célula para las condiciones WT (negro), A618T (azul) y S619L (rojo), en células sin estimular y con estímulo de DMPP por 10 s, respectivamente. En el diagrama de caja, la línea media simboliza la mediana; la línea superior e inferior, los percentiles 75 y 25, respectivamente; y los *whiskers* superior e inferior, los valores máximo y mínimo, respectivamente. Notar en ambos paneles que en algunas condiciones experimentales la línea media y el *whiskers* inferior se encuentran solapados con la línea del percentil 25. Los círculos vacíos representan las mediciones en células individuales (una medición por célula).

Se observa que el número de agregados con áreas mayores a $30 \mu\text{m}^2$ es significativamente mayor en células que expresan A618T y S619L respecto al WT, en células sin y con estímulo. El número de células analizadas en cada condición experimental fue: $n_{\text{WT}} = 12$; $n_{\text{A618T}} = 10$; $n_{\text{S619L}} = 11$. Test de Kruskal-Wallis con contraste de *Dunn's*, $*p < 0,001$.

Estos tres parámetros se midieron en células mantenidas en reposo, o estimuladas previamente a la fijación. Esta última condición nos permite tener una estimación de la capacidad que tiene la célula para recuperar sus *pools* vesiculares luego de haber liberado una fracción de estos como consecuencia de la estimulación.

En la Figura 4.36, paneles A, B y C, se representan los parámetros %NPY total, %NPY periferia y %NPY periferia / total, respectivamente, para las

tres condiciones experimentales, en células cromafines bovinas no estimuladas.

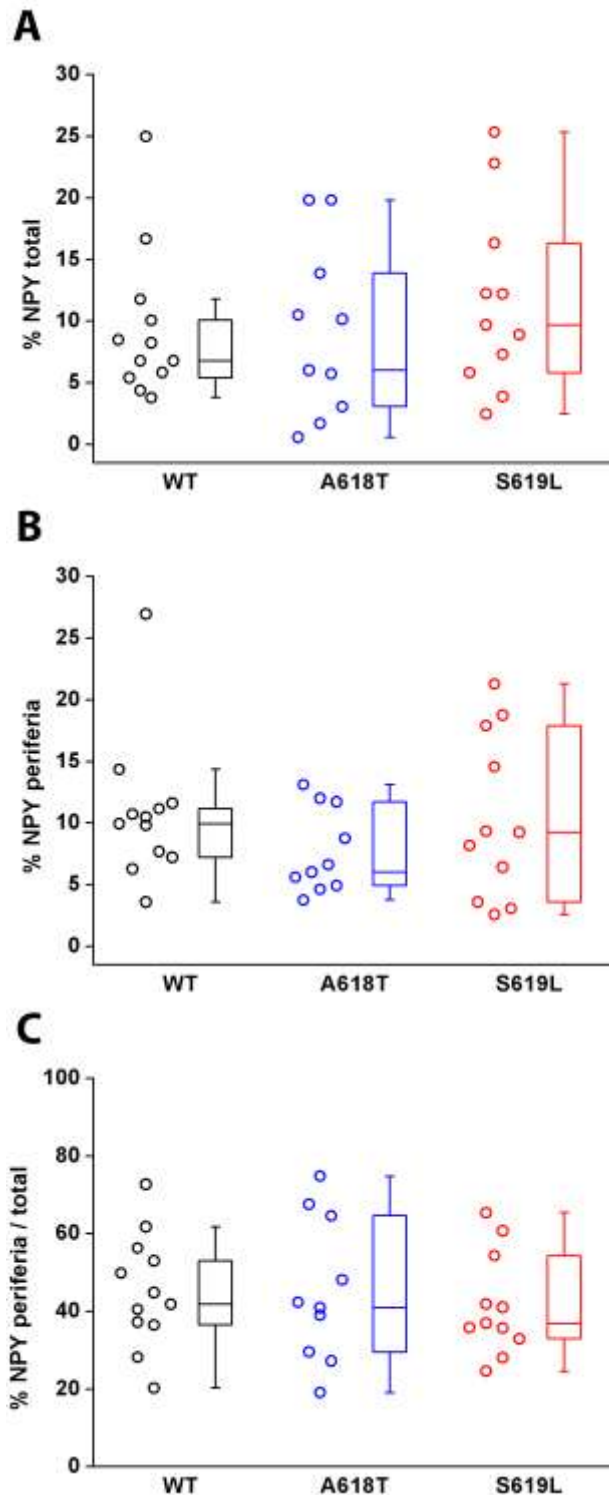


Figura 4.36- Cuantificación de la presencia de gránulos secretorios en células no estimuladas expresando las variantes de dinamina-2 WT, A618T y S619L. En (A), (B) y (C) se grafican los parámetros %NPY total, %NPY periferia y %NPY periferia/total, respectivamente, para las condiciones experimentales WT (en negro), A618T (en azul) y S619L (en rojo). Estos parámetros fueron calculados a partir de los valores de área ocupados por el marcador de gránulos secretorios NPY-mCherry, en el plano ecuatorial total y en la periferia de células cromafines bovinas sin estimular. En el diagrama de caja, la línea media simboliza la mediana; la línea superior e inferior, los percentiles 75 y 25, respectivamente; y los *whiskers* superior e inferior, los valores máximo y mínimo, respectivamente. Los círculos vacíos representan las mediciones en células individuales (una medición por célula). No se observan diferencias entre condiciones en los parámetros calculados. El número de células analizadas en cada condición experimental fue: $n_{WT} = 12$; $n_{A618T} = 10$; $n_{S619L} = 11$.

Ninguno de los parámetros presentó diferencias significativas entre las tres condiciones experimentales. Esto sugiere que la expresión de las mutantes

no estaría afectando la producción, ni la movilización de vesículas a la periferia celular en estas condiciones experimentales.

En la Figura 4.37, paneles A, B y C, se muestran graficados los parámetros %NPY total, %NPY periferia y %NPY periferia / total, respectivamente, para las tres condiciones experimentales, en células que fueron estimuladas antes de su fijación.

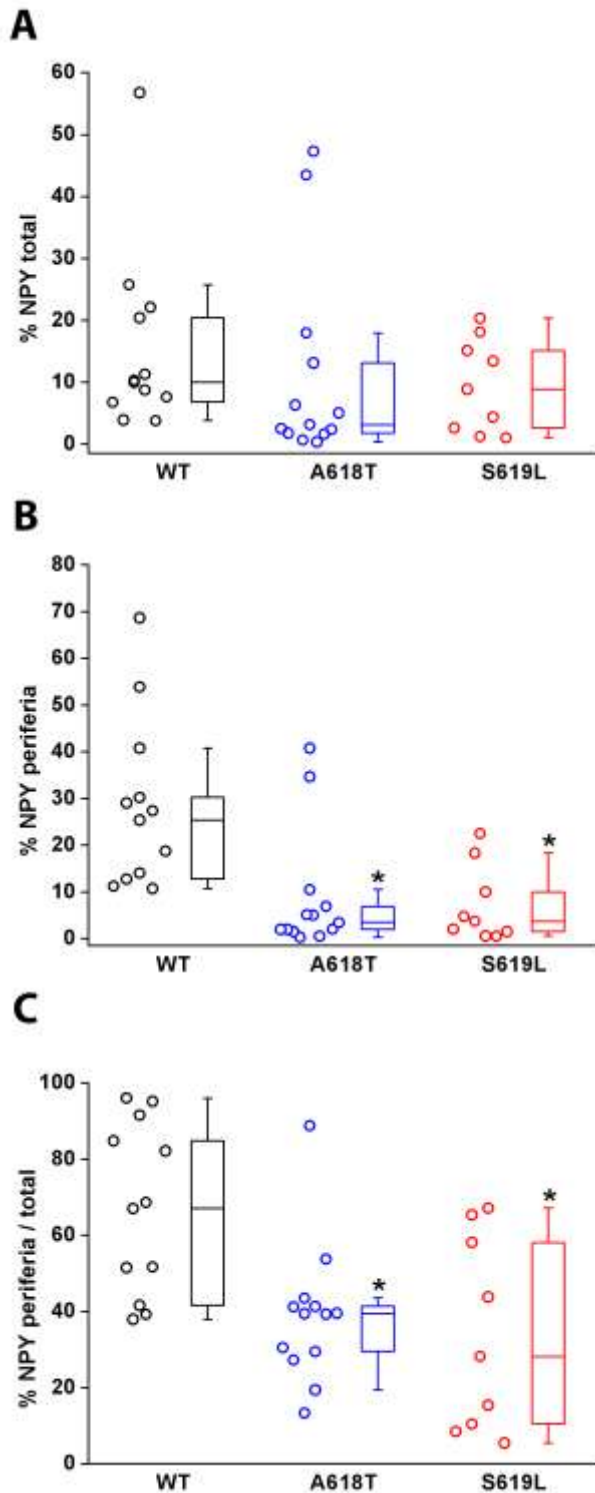


Figura 4.37- Cuantificación de la presencia de gránulos secretorios en células estimuladas expresando las variantes de dinamina-2 WT, A618T y S619L. En (A), (B) y (C) se grafican los parámetros %NPY total, %NPY periferia y %NPY periferia/total, respectivamente, para las condiciones experimentales WT (en negro), A618T (en azul) y S619L (en rojo). Estos parámetros fueron calculados a partir de los valores de área ocupados por el marcador de gránulos secretorios NPY-mCherry, en el plano ecuatorial total y en la periferia de células cromafines bovinas estimuladas. En el diagrama de caja, la línea media simboliza la mediana; la línea superior e inferior, los percentiles 75 y 25, respectivamente; y los *whiskers* superior e inferior, los valores máximo y mínimo, respectivamente. Los círculos vacíos representan las mediciones en células individuales (una medición por célula). No se observan diferencias estadísticas entre condiciones para %NPY total. Sin embargo, notamos una caída significativa en %NPY periferia y %NPY periferia/total para A618T y S619L respecto de WT. El número de células analizadas en cada condición experimental fue: $n_{WT} = 12$; $n_{A618T} = 10$; $n_{S619L} = 11$. Test de Kruskal-Wallis con contraste de *Dunn's*, $*p < 0,001$.

Notamos nuevamente que %NPY total no cambia entre las tres condiciones experimentales, lo cual confirma que la producción de gránulos secretorios no se ve afectada por las mutantes. Sin embargo, se evidencia una significativa reducción de los parámetros %NPY periferia y %NPY periferia / total en A618T y S619L respecto a WT. Este resultado nos indica que la traslocación de vesículas secretorias hacia la periferia celular luego de la estimulación (es decir la recuperación de las vesículas en las proximidades de la membrana plasmática) se vio afectada negativamente en las células que expresan A618T o S619L.

Es sabido que la traslocación de las vesículas secretorias hacia la membrana plasmática es muy dependiente del citoesqueleto de actina (Papadopulos y col, 2015; Li y col, 2018; Gutiérrez y Villanueva, 2018). Los resultados de las dos últimas secciones muestran que la formación *de novo* de F-actina, y la translocación de vesículas hacia la periferia celular luego de un estímulo que provoca exocitosis, se ven significativamente comprometidas en las células que expresan A618T y S619L. Esto es congruente con los cambios en exocitosis y secreción reportados en las secciones anteriores. A su vez, en esta última sección se demostró que en las células cromafines bovinas, A618T y S619L promueven la formación de grandes agregados citosólicos de dinamina. Los cambios observados en la dinámica del citoesqueleto de actina podrían ser una consecuencia de una reducción en la disponibilidad de dinamina libre que interaccione con la actina. También existiría la posibilidad que dichos agregados de dinamina tengan secuestrada parte de la actina celular. Se reportó recientemente que estas mutantes estabilizan a complejos moleculares de actina y dinamina por el término de horas, reduciendo el *turnover* de las mismas (Lin y col, 2020). Sin embargo, esta posibilidad no ha sido analizada en esta Tesis.

Los resultados de esta segunda parte de Tesis doctoral demuestran que las mutantes de dinamina-2 A618T y S619L, vinculadas al desarrollo de la miopatía centronuclear, afectan negativamente procesos exocitóticos y endocitóticos en células cromafines bovinas. Las evidencias experimentales expuestas, indican que estos cambios pueden ser consecuencia de alteraciones producidas por estas mutantes sobre la dinámica del citoesqueleto de actina.

5. Discusión General

Durante los últimos 20 años, nuestro laboratorio se ha dedicado a estudiar la exocitosis, la endocitosis y el reciclado vesicular asociados a IRP. En estos trabajos se concluyó que IRP se encuentra altamente acoplado a CCVD del tipo P/Q, gracias a interacciones moleculares en las que interviene la secuencia *synprint* de dicho canal, y que permite que IRP sea liberado completamente por estímulos de tipo SQP50ms (Alvarez y col, 2008; Alvarez y Marengo, 2011, Alvarez y col, 2013). Posteriormente, se determinó que la exocitosis de ETAP, un subconjunto de vesículas secretorias de IRP que se libera frente a un PAs, es seguida en forma prácticamente inmediata por una endocitosis rápida, dinamina y actina dependiente, que re-internaliza la totalidad de la membrana previamente exocitada, y permite la recuperación rápida de IRP (Moya-Diaz y col, 2016; Montenegro y col, 2020). Sin embargo, al momento de comenzar esta Tesis, no se habían estudiado los mecanismos de endocitosis que se activan en todo el rango de liberación de IRP. Debido a que diferentes autores han determinado que un incremento en el grado de estimulación, y consecuentemente en la exocitosis, genera una transición entre diferentes mecanismos endocíticos (Chan y Smith, 2001; Wu y Wu, 2009), en una primera parte de esta Tesis, estudiamos la endocitosis provocada por la liberación de fracciones crecientes de IRP en células cromafines murinas. Corroboramos que la endocitosis inducida por PAs poseía las características cinéticas y la dinamina-dependencia ya descritas por Moya-Diaz y colaboradores (2016). Sin embargo, esta endocitosis tiende a perder importancia a medida que aumenta la magnitud del estímulo y la entrada de Ca^{2+} a la célula. Por un lado, se observa una desaceleración de este proceso con la entrada de Ca^{2+} , y por otro, pasa a tomar protagonismo una endocitosis claramente dinamina-independiente. Este es un resultado totalmente original de este trabajo de tesis. Si bien otros autores han reportado la existencia de endocitosis independiente de dinamina en otros modelos experimentales (Zhang et al., 2004; Xu et al., 2008; Van Hook y Thoreson, 2012), hay pocas citas en la literatura, y esta es la primera vez que este tipo de mecanismo se

describe en células cromafines. Este segundo mecanismo endocítico, al contrario de lo que ocurre con el primero, se acelera a mayores entradas de Ca^{2+} (esto puede verse claramente en todos los experimentos realizados con distintos inhibidores de dinamina), y es dependiente de PKC. Esta endocitosis podría ser la respuesta de la célula a estímulos gradualmente más fuertes, que generan una exocitosis de magnitud tal que la endocitosis rápida dinamina-dependiente, que se activa frente a ETAP, no posee la capacidad de compensar. Visto de esta manera, resulta lógico que dicha endocitosis dinamina-independiente se vea más activada a mayores entradas de Ca^{2+} , lo cual implica mayor exocitosis, y por lo tanto mayor necesidad de compensación por parte de la endocitosis. Es posible que este mecanismo represente una transición entre la endocitosis rápida dinamina-dependiente y la endocitosis clatrina dependiente, la cual se activa a demandas exocíticas mayores aún (Artalejo et al., 1995; Engisch y Nowycky, 1998). Sin embargo, es paradójico que, en nuestros experimentos, esta endocitosis dinamina-independiente no llegue a compensar completamente a la exocitosis. No obstante, los resultados con PMA (estimulante de PKC) indican que este mecanismo tiene la potencialidad de alcanzar una mayor capacidad compensatoria. Este tema deberá ser estudiado más profundamente en el futuro.

En la segunda parte de la Tesis evaluamos el efecto de dos mutaciones de la dinamina-2, A618T y S619L, relacionadas con el desarrollo de la miopatía centronuclear, sobre la exocitosis y la endocitosis en células cromafines bovinas. Encontramos que la expresión de cualquiera de estas mutantes inhibió significativamente a la endocitosis evocada por PAs, pero no a la inducida por SQP50ms. A su vez, la expresión de A618T o S619L resultó también inhibitoria para la endocitosis inducida por SQP500ms. Es importante recordar que la exocitosis de cantidades relativamente grandes de vesículas, como la evocada por este último estímulo, suele ir acompañada de una endocitosis clatrina y dinamina dependientes (Engisch y Nowycky, 1998; Chan y Smith, 2001; Artalejo y col, 2002). Estos resultados, por un lado confirman en células bovinas lo observado previamente en células murinas, respecto a la presencia de mecanismos de endocitosis dinamina-dependiente e independiente asociados a la exocitosis de IRP. Pero además indican que la expresión de dichas mutantes resulta inhibitoria para la endocitosis dependiente de

dinamina. En segundo lugar, la expresión de A618T o S619L redujo significativamente la exocitosis inducida por SQP500ms o por la aplicación del agonista nicotínico DMPP por 10 s, pero no afectó a la exocitosis inducida por estímulos eléctricos de corta duración, como tampoco modificó los diferentes parámetros amperométricos relacionados con la fusión vesicular. Estos resultados en su conjunto sugieren que las mutantes podrían estar afectando la producción, o bien el tráfico de vesículas secretorias a la membrana. Esta última hipótesis resultó reforzada al analizar la distribución espacial de vesículas secretorias. Particularmente, las células que expresan A618T o S619L mostraron una caída significativa de la presencia de vesículas en la periferia celular luego de la aplicación de un estímulo. Esto sugiere la existencia de un impedimento en las células que expresan las mutantes para recuperar la población de vesículas próximas a la membrana plasmática. Dado que la expresión de A618T o S619L también disminuyeron significativamente la formación *de novo* de F-actina cortical, los resultados en conjunto de esta segunda parte de la Tesis permiten hipotetizar que una alteración en la dinámica de F-actina podría ser un común denominador que explique los efectos de las mutantes sobre los procesos de endocitosis y exocitosis. El citoesqueleto de actina participa activamente del tráfico de vesículas hacia los sitios de exocitosis en la membrana (Papadopulos y col, 2015; Li y col, 2018; Gutiérrez y Villanueva, 2018), como también en diversos mecanismos de endocitosis (Boulant y col, 2011; Watanabe y col, 2013; Gormal y col, 2015; Wu y col, 2016; Montenegro y col, 2020). El mecanismo por el cual A618T y S619L afectan la formación *de novo* de F-actina cortical es desconocido. En esta Tesis se muestra que, al igual que ha sido demostrado previamente *in vitro* (Wang y col, 2010; Kenniston y Lemmon, 2010), estas mutantes tienden a formar grandes agregados moleculares en nuestras células. Se puede hipotetizar que esto último reduciría la participación activa de la dinamina en los mecanismos celulares que está involucrada. No obstante, estas siguen siendo preguntas sin contestar, y que deberán ser abordadas en futuros trabajos.

6. Bibliografía

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

Antonny B, Burd C, De Camilli P, Chen E, Daumke O, Faelber K, Ford M, Frolov VA, Frost A, Hinshaw JE, Kirchhausen T, Kozlov MM, Lenz M, Low HH, McMahon H, Merrifield C, Pollard TD, Robinson PJ, Roux A y Schmid SL (2016). Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *The EMBO Journal* 35, 2270–2284.

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.

Almers W (1990). Exocytosis. *Annu. Rev. Physiol.*52, 607-24.

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

Alvarez de Toledo G, Fernández-Chacón R y Fernández JM (1993). Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature* 363, 554-558.

Alvarez de Toledo G, Montes MA, Montenegro P y Borges R (2018). Phases of the exocytotic fusion pore. *FEBS Letters* 592, 3532–3541.

Alvarez YD, Ibanez LI, Uchitel OD y Marengo FD (2008). P/Q Ca^{2+} channels are functionally coupled to exocytosis of the immediately releasable pool in mouse chromaffin cells. *Cell calcium* 43, 155-164.

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

Alvarez 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 Ca^{2+} channel $\alpha 1A$ 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, Ryan TA (2013). Dynamin phosphorylation controls optimization of endocytosis for brief action potential bursts. *eLife* 2, e00845.

Arriagada-Diaz J, Prado-Vega L, Cárdenas AM, Ardiles AO y Gonzalez-Jamett AM (2020). Dynamin Superfamily at Pre- and Post synapses: Master Regulators of Synaptic Transmission and Plasticity in Health and Disease. *The Neuroscientist*, 1-18.

Arroyo G, Aldea M, Fuentealba J, Albillos A, 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 the 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 Science* 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.

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

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

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.

Ballester R y Rosen OM (1985). Fate of Immunoprecipitable Protein Kinase C in GH3 Cells Treated with Phorbol 12-Myristate 13-Acetate. *The journal of biological chemistry* 260 (28), 15194-15199.

Barald KF. Monoclonal antibodies to embryonic neurons: cell-specific markers for chick ciliary ganglion (1982). *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). Tesis Doctoral “Endocitosis rápida en células cromafines de ratón: mecanismos asociados, su regulación por Ca²⁺ y su participación en el reciclado vesicular.

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.

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

Bethoney KA, Kinga MC, Hinshaw JE, Ostapc EM y Lemmon MA (2009). A possible effector role for the pleckstrin homology (PH) domain of dynamin. *Proceedings of the National Academy of Science* 106 (32), 13359–13364.

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 signalling 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-Schmiedeberg's Archiv fur experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 219, 17-22.

Bohm J,, Laporte J (2012). Mutation Spectrum in the Large GTPase Dynamin 2, and Genotype–Phenotype Correlation in Autosomal Dominant Centronuclear Myopathy. *Hum Mutat.* 33(6), 949–959.

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.

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.

Borges R, Gandía L y Carbone E (2018). Old and emerging concepts on adrenal chromaffin cell stimulus-secretion coupling. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 470, 1–6.

Boulant S, Kural C, Zeeh JC, Ubelmann F y Kirchhausen T (2011). Actin dynamics counteract membrane tension during clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol.* 13(9), 1124–1131.

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.

Brose N, Petrenko AG, Südhof TC, Jahn R. (1992) Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* 256(5059), 1021-5.

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

Burgoyne RD y Clague MJ (2003). Calcium and calmodulin in membrane fusion. *Biochimica et Biophysica Acta* 1641, 137– 143.

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

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

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

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

Carr JF y Hinshaw JE (1997). Dynamin Assembles into Spirals under Physiological Salt Conditions upon the Addition of GDP and γ -Phosphate Analogues. *The Journal of Biological Chemistry* 44, 28030–28035.

Carroll RC, Beattie EC, Xia H, Scher CL, Altschuleri Y, Nicoll RA, Malenka RC y Zastrow MV (1999). Dynamin-dependent endocytosis of ionotropic glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (24), 14112–14117.

Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa K y Nishizuka Y (1982). Direct Activation of Calcium-activated, Phospholipid-dependent Protein Kinase by Tumor-promoting Phorbol Esters. *The journal of biological chemistry* 257 (13) 7847-7851.

Catterall WA (1999). Interactions of presynaptic Ca^{2+} 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, Mauro A (1973). Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. The journal of cell biology 57, 499 -524.

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

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

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

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

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

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

Cheek, T.R. and Burgoyne, R.D. (1986). Nicotine-evoked disassembly of cortical actin filaments in adrenal chromaffin cells. FEBS Lett. 207, 110–114.

Chen YA, Scheller RH. (2001) SNARE-mediated membrane fusion. Nat Rev Mol Cell Biol 2(2), 98- 106.

Chin YA, Lee A, Kan HW, Laiman J, Chuang MC, Hsieh ST y Liu YW (2015). Dynamin-2 mutations associated with centronuclear myopathy are hypermorphic and lead to T-tubule fragmentation. *Human Molecular Genetics* 24 (19), 5542–5554.

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.

Cohen MW, Joneq OT y Angelides KJ (1991). Distribution of Ca²⁺ Channels on Frog Motor Nerve Terminals Revealed by Fluorescent α -Conotoxin. *The Journal of Neuroscience* 4, 1032-1039.

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 Science* 91, 644-648.

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

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

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

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

de la Vega M, Marin M, Kondo N , Miyauchi K , Kim Y , Epand RF , Epand RM y Melikyan GB (2011). Inhibition of HIV-1 endocytosis allows lipid mixing at the plasma membrane, but not complete fusion. *Retrovirology* 99 (8), 1-19.

Durieux AC, Vignaud A, Prudhon B, Viou MT, Beuvin M, Vassilopoulos S, Fraysse BI, Ferry A, Laine J, Romero NB, Guicheney P y Bitoun M (2010). A centronuclear myopathy-dynamin 2 mutation impairs skeletal muscle structure and function in mice. *Human Molecular Genetics* 19 (24), 4820–4836.

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

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

Dodge jr. FA y Rahamimoff R (1967b). Co-operative Action a Calcium Ions in Transmitter Release at the Neuromuscular Junction. *The Journal of Physiology* 193, 419-432.

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

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.

Dumitrescu-Pene T, Rosé SD, Lejen T, Marcu MG y Maria Trifaró JM (2005). Expression of various scinderin domains in chromaffin cells indicates that this protein acts as a molecular switch in the control of actin filament dynamics and exocytosis. *Journal of Neurochemistry* 92, 780–789.

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

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

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

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

Engisch KL y Nowycky MC (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.

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 KM, Lemmon MA, Bchlessinger J y Sigler PB (1994). Crystal structure at 2.2 Å resolution of the pleckstrin homology domain from human dynamin. *Cell* 79, 199-209.

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.

Gadbios DM, Hamaguchi JR, Swank RA y Bradbury EM (1992). Staurosporine is a potent inhibitor of p34cdc2 and p34cdc2-like kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 80-85.

Gerber SH, Südhof TC.(2002) Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes* 51 suppl 1, S3-11.

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

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

Gonzalez-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.

Gonzalez-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, Cárdenas AM (2013a). Dynamin-2 Regulates Fusion Pore Expansion and Quantal Release through a Mechanism that Involves Actin Dynamics in Neuroendocrine Chromaffin Cells. *PLOS ONE* 8 (8), e70638 1-10.

González-Jamett AM, Baez-Matus X, Olivares MJ, Hinostroza F, Guerra-Fernández MJ, Vasquez-Navarrete J, Bui MT, Guicheney P, Romero NB, Bevilacqua JA, Bitoun M, Caviedes P y Cárdenas AM (2017). Dynamin-2 mutations linked to Centronuclear Myopathy impair actin-dependent trafficking in muscle cells. *Scientific Reports* 4580 (7), 1-16.

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* 35, 1380-1389.

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

Graham ME, O'Callaghan DW, McMahon HT y Burgoyne RD (2002). Dynamin-dependent and dynamin-independent processes contribute to the regulation of single vesicle release kinetics and quantal size. *Proceedings of the National Academy of Science* 99, 7124-7129.

Gu C, Yaddanapudi S, Weins A, Osborn T, Reiser R, Pollak M, Hartwig J y Sever S (2010). Direct dynamin-actin interactions regulate the actin cytoskeleton. *The EMBO Journal* 29, 3593-3606.

Gulyás-Kovács A, de Wit H, Milosevic I, Kochubey O, Toonen R, Klingauf J, Verhage M, Sørensen JB (2007). Munc18-1: sequential interactions with the fusion machinery stimulate vesicle docking and priming. *J Neurosci* 27, 8676-8686.

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

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

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.

Henley JR, Krueger EWA, Oswald BJ y McNiven MA (1998). Dynamin-mediated Internalization of Caveolae. *The Journal of Cell Biology* 141 (1), 85–99.

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.

Herring D, Huang RQ, Singh M, Dillon GH y Leidenheimer NJ (2005). PKC modulation of GABA A receptor endocytosis and function is inhibited by mutation of a dileucine motif within the receptor $\beta 2$ subunit. *Neuropharmacology* 48, 181–194.

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.

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

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, 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 (2001) Effects of glucocorticoids on adrenal chromaffin cells. *J Neuroendocrinol* 13, 216-20.

Hodgkin AF, Huxley AL (1952). Measurement of Current-Voltage Relations in the Membrane of the Giant Axon of *Loligo*. *Journal of Physiology* 1:424-448.

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.

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

Horrigan F y Bookman R (1994). Releasable pools and the Kinetics of Exocytosis in Adrenal Chromaffin Cells. *Neuron* 13:1119-1129.

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

Houy S, Croisé P, Gubar O, Chasserot-Golaz S, Tryoen-Tóth P, Bailly Y, Ory S, Bader MF, Gasman S. (2013) Exocytosis and Endocytosis in Neuroendocrine Cells: Inseparable Membranes! *Front Endocrinol (Lausanne)* 4, 135.

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.

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

Inoue M, Sakamoto Y, Fujishiro N, Imanaga I, Ozaki S, Prestwich GD y Warhina 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.

James NG, Digman MA, Ross JA, Barylko B, Wang L, Li J, Chen Y, Mueller JD, Gratton E, Albanesi JP, Jameson DM (2014). A mutation associated with centronuclear myopathy enhances the size and stability of dynamin 2 complexes in cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1840, 315–321.

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

Jeannot PY, Bassez G, Eymard B, Laforêt P, Urtizberea JA, Rouche A, Guicheney P, Fardeau M y Romero NB (2004). Clinical and histologic findings in autosomal centronuclear myopathy. *Neurology* 62, 1484–1490.

Jin YH, Wu XS, Shi B, Zhang Z, Guo X, Gan L, Chen Z y Wu LG (2019). Protein kinase C and calmodulin serve as calcium sensors for calcium-stimulated endocytosis at synapses. *The Journal of Neuroscience* 39 (48), 9478-9490.

Jones SM, Howell KE, Henley JR, Cao H, McNiven MA (1998). Role of Dynamin in the Formation of Transport Vesicles from the Trans-Golgi Network. *Science* 279, 573-577.

Kabbani N, Jeromin A, Levenson R (2004). Dynamin-2 associates with the dopamine receptor signalplex and regulates internalization of activated D2 receptors. *Cellular Signalling* 16, 497 – 503.

Kanda VA, Purtell K y Abbott GW (2011). Protein Kinase C downregulates IKs by stimulating KCNQ1-KCNE1 potassium channel endocytosis. *Heart Rhythm* 8(10), 1641–1647.

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

Kenniston JA y Lemmon MA (2010). Dynamin GTPase regulation is altered by PH domain mutations found in centronuclear myopathy patients. *The EMBO Journal* 29, 3054–3067.

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.

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.

Krug E, Biemann HP y Tashjian AH (1987). Evidence for Increased Synthesis as Well as Increased Degradation of Protein Kinase C after Treatment of Human Osteosarcoma Cells with Phorbol Ester. *The Journal of Biological chemistry* 262 (24), 1185-11856.

Krug E y Tashjian AH (1987). Time-dependent Changes in Protein Kinase C Distribution and Disappearance in Phorbol Ester-treated Human Osteosarcoma Cells. *Cancer Research* 47, 2243-2246.

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. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 435, 472-478.

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.

Latarjet M y Ruiz-Liard A (2011). Anatomía Humana 4ta edición.

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

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

Leszczyszyn DJ, Jankowski JA, Viveros OH, Diliberto EJ, Near JA, y Wightman RM (1991). Secretion of Catecholamines from Individual Adrenal Medullary Chromaffin Cells. *J. Neurochem.* 56(6), 1855-1863.

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 in Cell Biology* 1426, 1-13.

Lin SS, Hsieh TL, Liou GG, Li TN, Lin HC, Chang CW, Wu HY, Yao CK y Liu YW (2020). Dynamin-2 Regulates Postsynaptic Cytoskeleton Organization and Neuromuscular Junction Development. *Cell Reports* 33, 108310, 1-16.

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

Liu PS, Liu GH y Chao WL (2008). Effects of nonylphenol on the calcium signal and catecholamine secretion coupled with nicotinic acetylcholine receptors in bovine adrenal chromaffin cells. *Toxicology* 244, 77-85.

Liu YW, Neumann S, Ramachandran R, Ferguson SM, Pucadyil TJ y Schmid SL (2011). Differential curvature sensing and generating activities of dynamin isoforms provide opportunities for tissue-specific regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (26), E234–E242.

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

Lu Z, Liu D, Hornia A, Devonish W, Pagano M y Foster DA (1998). Activation of Protein Kinase C Triggers Its Ubiquitination and Degradation. *Molecular and Cellular Biology* 18, 839–845.

Lupas A, Van Dyke M, Stock J (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252,1162–64.

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.

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.

Marengo FD y Cárdenas AM (2018). How does the stimulus define exocytosis in adrenal chromaffin cells? *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. Invited Review.

Marks B y McMahon HT (1998). Calcium triggers calcineurin-dependent synaptic vesicle recycling in mammalian nerve terminals. *Current Biology* 8, 740–749.

Marks B, Stowell M HB, Vallis Y, Mills IG, Gibson A, Hopkins CR y McMahon HT (2001). GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature* 410, 231–235.

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* 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.

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.

Momboisse F, Olivares MJ, Báez-Matus X, Guerra MJ, Flores-Muñoz C, Sáez JC, Martínez AD y Cárdenas AM (2014). Pannexin 1 channels: new actors in the regulation of catecholamine release from adrenal chromaffin cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 270 (8), 1-12.

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.

Montenegro M, Bayonés L, Moya-Díaz J, Borassi C, Toscani AM, Gallo LI y Marengo FD (2020). Rapid vesicle replenishment after the immediately releasable pool exocytosis is tightly linked to fast endocytosis, and depends on basal calcium and cortical actin in chromaffin cells. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/jnc.15276>.

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.

Mooren OL, Kotova TI, Moore AJ, Schafer DA (2009). Dynamin2 GTPase and cortactin remodel actin filaments. *J Biol Chem* 284, 23995–24005.

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.

Morgan A, Burgoyne RD, Barclay JW, Craig TJ, Prescott GR, Ciufo LF, Evans GJO y Graham ME (2005). Regulation of exocytosis by protein kinase C. *Biochemical Society Transactions* 33, 1341-1344.

Moser T y Neher E (1997a). 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.

Moser T, Neher E (1997b). Estimation of mean exocytosis vesicle capacitance in mouse adrenal chromaffin cell. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:6735–6740.

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

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

Moya-Diaz J, Bayonés L, Montenegro M, Cardenas AM, Koch H, Doi A y Marengo FD (2019). Ca²⁺-Independent and Voltage-Dependent Exocytosis in Mouse Chromaffin Cells. *Acta Physiologica* 4, e13417.

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

Muñoz XM, Christine Kretz C, Silva-Rojas R, Ochala J, Menuet A, Romero NB, Cowling BS, y Laporte J (2020). Physiological impact and disease reversion for the severe form of centronuclear myopathy linked to dynamin. *JCI Insight* 5(18), e137899.

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

Nakano H, Kobayashi E, Thkhashi I, Tamaoki T, Kuzuu Y y Iba H (1987). Staurosporine inhibits tyrosin-especific protein kinase activity of Rous sarcoma virus transforming protein p60. *The Journal of Antibiotics* 40, 706-708.

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 fibers. *Nature* 260:779-8026.

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, 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.

Nicoziani P, Vilhardt F, Llorente A, Hilout L, Courtoy PJ, Sandvig K (2000). Role for dynamin in late endosome dynamics and trafficking of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Mol. Biol. Cell* 11, 481–495.

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, Rettig J (2007). Primed vesicles can be distinguished from docked vesicles by analysing their mobility. *The Journal of neuroscience* 27(6): 1386-1396.

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

O'Connor DT y Frigon RP (1984). Chromogranin A, the Major Catecholamine Storage Vesicle Soluble Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 259, 3237-3247.

Olivares MJ, González-Jamett AM, Guerra MJ, Baez-Matus X, Haro-Acuna V, Martínez-Quiles N, Cárdenas AM (2014). Src Kinases Regulate De Novo Actin Polymerization during Exocytosis in Neuroendocrine Chromaffin Cells. *PLOS ONE* 9 (6), e99001 1-14.

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.

Omura S, Sasaki Y, Iwai Y y Takeshima H (1995). Staurosporine, a Potentially Important Gift from a Microorganism. *The Journal of Antibiotics* 48, 535-548.

Okamoto PM, Tripet B, Litowski J, Hodges RS, Vallee RB (1999b). Multiple distinct coiledcoils are involved in dynamin self-assembly. *J. Biol. Chem.* 274, 10277-86.

Okamoto PM, Gamby C, Wells D, Fallon J y Vallee RB (2001). Dynamin isoform-specific interaction with the shank/ProSAP scaffolding proteins of the postsynaptic density and actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 276(51), 48458–48465.

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

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

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

Papadopulos A, Gomez GA, Martin S, Jackson J, Gormal RS, Keating DJ, Yap AS y Meunier FA (2015). Activity-driven relaxation of the cortical actomyosin II network synchronizes Munc18-1-dependent neurosecretory vesicle docking. *Nature Communications* 6297 (6), 1-11.

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

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.

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

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, 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.

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

Porat-Shliom N, Milberga O, Masedunskasa A y Weigert R (2013). Multiple roles for the actin cytoskeleton during regulated exocytosis. *Cell Mol Life Sci.* 70(12), 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.

Powell KA y Robinson PJ (1995). Dephosphin/dynamin is a neuronal phosphoprotein concentrated in nerve terminals: evidence from rat cerebellum. *Neuroscience* 64 (3), 821-833.

Purves D., George J. Augustine, David Fitzpatrick, William C. Hall, Anthony-Samuel LaMantia, James O. McNamara, Leonard E. White (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.

Quinan C y Berger AA (1933). Observations on human adrenals with special reference to the relative weight of the normal medulla. *Ann Intern Med* 6, 1180–1192.

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.

Ramachandran R, Pucadyil TJ, Liu YW, Acharya S, Leonard M, Lukiyanchuk V y Schmid SL (2009). Membrane Insertion of the Pleckstrin Homology Domain Variable Loop 1 Is Critical for Dynamin-catalyzed Vesicle Scission. *Molecular Biology of the Cell* 20, 4630–4639.

Ramachandran R y Schmid SL (2018). The dynamin superfamily. *Current Biology* 28, R367–R420.

Reid AT, Lord T, Stanger SJ, Roman SD, McCluskey A, Robinson PJ, Aitken RJ y Nixon B (2012). Dynamin Regulates Specific Membrane Fusion Events Necessary for Acrosomal Exocytosis in Mouse Spermatozoa. *The Journal of Biological Chemistry* 287 (45), 37659 –37672.

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 PJ, Sontag JM, Liu JP, Fykse EM, Slaughter C, McMahon H, Sudhof TC (1993). Dynamin GTPase regulated by protein kinase C phosphorylation in nerve terminals. *Nature* 365, 163-166.

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.

Rosa JM, de Diego AMG, Gandía L, García AG (2007). L-type calcium channels are preferentially coupled to endocytosis in bovine chromaffin cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 357, 834–839.

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

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 (2003). Endocytosis at the synaptic terminal. *The Journal of physiology* 553, 345-355.

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

Sakmann Bert (1995). Single Channel Recording.

Sankaranarayanan S y Ryan TA (2000). Real-time measurements of vesicle-SNARE recycling in synapses of the central nervous system. *Nature Cell Biology* 2, 197-204.

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.

Schmid SL y Frolov VA (2011). Dynamin: Functional Design of a Membrane Fission Catalyst. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 27, 79–105.

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

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

Seward EP, Chernevskaya NI, 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.

Shupliakov O, Low P, Grabs D, Gad H, H, David C, Takei JK, De Camilli P, Brodin L (1997). Synaptic Vesicle Endocytosis Impaired by Disruption of Dynamin-SH3 Domain Interactions. *Science* 276, 259-263.

Sidiropoulos PNM, Miehe M, Bock T, Tinelli E, Oertli CI, Kuner R, Meijer D, Wollscheid B, Niemann A y Suter U (2012). Dynamin 2 mutations in Charcot–Marie–Tooth neuropathy highlight the importance of clathrin-mediated endocytosis in myelination. *Brain* 135, 1395–1411.

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

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

Smith C 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.

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.

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.

Stevens DR, Schirra C, Becherer U y Rettig J (2011). Vesicle pools: lessons from adrenal chromaffin cells. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 3 (2), 1-9.

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.

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.

Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kate Y, Morimoto M y Tomita F (1986). Staurosporine, a potent inhibitor of phospholip/ Ca^{++} dependent protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research communications* 135, 397-402.

Tanabe K y Takei K (2012). Dynamin 2 in Charcot-Marie-Tooth Disease. *Acta Med. Okayama* 66 (3), 183-190.

Tanifuji S, Funakoshi-Tago M, Ueda F, Kasahara T y Mochida S (2013). Dynamin Isoforms Decode Action Potential Firing for Synaptic Vesicle Recycling. *The Journal Of Biological Chemistry* 288 (26), 19050 –1905.

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.

Terbush DR y Holz RW (1990). Activation of Protein Kinase C Is Not Required for Exocytosis from Bovine Adrenal Chromaffin Cells. *The journal of biological chemistry* 265 (34), 21179-21184.

Thompson HM, Cao H, Chen J, Euteneuer U, McNiven MA. (2004) Dynamin 2 binds gamma-tubulin and participates in centrosome cohesion. *Nat Cell Biol* 6, 335-342, 2004.

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

Trifaró J.M, Bader MF y Doucet JP (1985). Chromaffin cell cytoskeleton: its possible role in secretion. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 63, 661-679.

Trifaró JM, Rosé SD y Marcu MG (2000). Scinderin, a Ca^{2+} -Dependent Actin Filament Severing Protein that Controls Cortical Actin Network Dynamics During Secretion. *Neurochemical Research* 25 (1), 133–144.

Trifaró J.M, Gasman S y Gutierrez 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.

Tuma PL y Collins CA (1994). Activation of dynamin GTPase is a result of positive cooperativity. *J. Biol. Chem.* 269, 30842–47.

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

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.

Van Hook MJ y Thoreson WB (2012). Rapid synaptic vesicle endocytosis in cone photoreceptors of salamander retina. *Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 18112–18123.

Van Weering JRT, Toonen RF, V Matthijs (2007). The Role of Rab3a in Secretory Vesicle Docking Requires Association/Dissociation of Guanidine Phosphates and Munc18-1. *PLoS One* 18, 2(7):e616.

Verkhatsky A. (2002) The endoplasmic reticulum and neuronal calcium signaling. *Cell Calcium* 32, 393-404.

Villalobos C, Nunez L, Montero M, Garcia AG, Alonso MT, Chamero P, Alvarez J y García-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, Rodriguez del Castillo A y Trifaro JM (1992a). Protein kinase C activation by phorbol esters induces chromaffin cell cortical filamentous actin disassembly and increases the initial rate of exocytosis in response to nicotinic receptor stimulation. *Neuroscience*, 51 (2), 463-474.

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.

Wang L, Barylko B, Byers C, Ross JA, Jameson DM y Albanesi JP (2010). Dynamin 2 Mutants Linked to Centronuclear Myopathies Form Abnormally Stable Polymers. *The journal of biological chemistry* 285 (30), 22753–22757.

Warnock DE, Terlecky LJ y Schmid SL (1995). Dynamin GTPase is stimulated by crosslinking through the C-terminal proline-rich domain. *EMBO J.* 14, 1322–28.

Warnock DE, Hinshaw JE y Schmid SL (1996). Dynamin Self-assembly Stimulates Its GTPase Activity. *The Journal of Biological Chemistry* 37, 22310–22314.

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

Watanabe S, Benjamin R, Rost BR, Camacho-Pérez M, Davis MW, Söhl-Kielczynski B, Rosenmund C; 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, Jorgensen EM (2014). Clathrin regenerates synaptic vesicles from endosomes. *Nature* 13, 228–233.

Watson SP, McNally J, Shipman LJ y Godfrey PP (1988). The action of the protein kinase C inhibitor, staurosporine, on human platelets. *Biochem. J.* 249, 345-350.

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

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

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

Wilkinson SE, Parker PJ y Nixon JS (1994). Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C. *Biochem. J.* 294, 335-337.

Wollman R y Meyer T (2012). Coordinated oscillations in cortical actin and Ca²⁺ correlate with cycles of vesicle secretion. *Nat Cell Biol.* 14(12), 1261–1269.

Wu XS, McNeil BD, Xu J, Fan J, Xue L, Melicoff E, Adachi R, Bai L y Wu LG (2009). Ca²⁺ and calmodulin initiate all forms of endocytosis during depolarization at a nerve terminal. *Nature Neuroscience* 12(8), 1003–1010.

Wu PC, Fann MJ, Kao LS. (2010) Characterization of Ca²⁺ signaling pathways in mouse adrenal medullary chromaffin cells. *J Neurochem* 112, 1210–1222.

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. *Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 34, 2652-2659.

Wu Q, Zhang Q, Liu B, Li Y, Wu X, Kuo S, Zheng L, Wang C, Zhu F y Zhou Z (2019). Dynamin 1 Restrains Vesicular Release to a Subquantal Mode In Mammalian Adrenal Chromaffin Cells. *The Journal of Neuroscience* 39(2), 199–211.

Wu XS, Lee S, Sheng J, Zhang Z, Zhao W, Wang D, Jin Y, Charnay P, Ervasti JM y Wu LG (2016). Actin is crucial for all kinetically distinguishable forms of endocytosis at synapses. *Neuron* 92(5), 1020–1035.

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

Xu J, McNeil B, Wu W, Nees D, Bai L y Wu LG (2008). GTP-independent rapid and slow endocytosis at a central synapse. *Nature neuroscience* 11, 45-53.

Xue H, Wang C, Bai J, Chapman ER, Jackson MB. (2004) Transmembrane Segments of Syntaxin Line the Fusion Pore of Ca²⁺-Triggered Exocytosis. *Science* 304, 289-292.

Xue L, McNeil BD, Wu XS, Luo F, He L y Wu LG (2012). A Membrane Pool Retrieved via Endocytosis Overshoot at Nerve Terminals: A Study of Its Retrieval Mechanism and Role. *The Journal of Neuroscience* 32(10), 3398–3404.

Yamada H, Abe T, Satoh A, Okazaki N, Tago S, Kobayashi K, Yoshida Y, Oda Y, Watanabe M, Tomizawa K, Matsui H Y Takei K (2013). Stabilization of Actin Bundles by a Dynamin 1/Cortactin Ring Complex Is Necessary for Growth Cone Filopodia. *The Journal of Neuroscience* 33(10), 4514–4526.

Yang Z, Li H, Chai Z, Fullerton MJ, Cao Y, Toh BH, Funder JW y Liu JP (2001). Dynamin II Regulates Hormone Secretion in Neuroendocrine Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (6), 4251–4260.

Zhang C, Xiong W, Zheng H, Wang L, Lu B y Zhou Z (2004). Calcium- and Dynamin-Independent Endocytosis in Dorsal Root Ganglion Neurons. *Neuron* 42, 225–236.

Zhou Z y Misler S (1995). Amperometric detection of stimulus-induced quantal release of catecholamines from cultured superior cervical ganglion neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 6938-6942.

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