Biblioteca Digital
F C E N - U B A

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

Tesis Doctoral

Endocitosis rápida en células cromafines de ratón: mecanismos asociados, su regulación por Ca2+ y su participación en el reciclado vesicular

Belingheri, Ana Verónica

2016-09-22

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

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

Cita tipo APA:
Belingheri, Ana Verónica. (2016-09-22). Endocitosis rápida en células cromafines de ratón: mecanismos asociados, su regulación por Ca2+ y su participación en el reciclado vesicular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Belingheri, Ana Verónica. "Endocitosis rápida en células cromafines de ratón: mecanismos asociados, su regulación por Ca2+ y su participación en el reciclado vesicular". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-09-22.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

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

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Endocitosis rápida en células cromafines de ratón: mecanismos asociados, su regulación por Ca^{2+} y su participación en el reciclado vesicular

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

Ana Verónica Belingheri

Director de Tesis: Fernando Diego Marengo

Consejero de Estudios: Osvaldo Daniel Uchitel

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (CONICET). Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular. Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular Profesor Héctor Maldonado.

Buenos Aires, 2016

Endocitosis rápida en células cromafines de ratón: mecanismos asociados, su regulación por Ca^{2+} y su participación en el reciclado vesicular

En las células cromafines se han descripto varios tipos de endocitosis (clatrina dependiente, kiss & run, bulk *endocitosis), las cuales contribuyen a la recuperación y el reciclado de la membrana plasmática, de sus proteínas, y de las vesículas que se han fusionado por exocitosis. En esta Tesis doctoral se ha medido electrofisiológicamente la endocitosis rápida en células cromafines de ratón, observándose dos modalidades. Por un lado, una endocitosis compensatoria que evoluciona con una única constante temporal rápida de ~8 seg, e internaliza aproximadamente la misma cantidad de membrana que fue exocitada durante la estimulación. Esta modalidad se dispara en respuesta a una entrada de Ca^{2+} menor a 79 pC (grupo LCG, por "low current group"). Por otro lado, se identificó una endocitosis en exceso que internaliza una cantidad de membrana mayor a la exocitada previamente, evolucionando con dos constantes temporales, una rápida de cinética similar a la del LCG y una ultra-rápida de ~0,6 seg. Esta última modalidad es disparada por una entrada de Ca^{2+} mayor a 79 pC (grupo HCG, por "high current group"). Por medio de la utilización de fármacos específicos, se demuestra en esta Tesis que la endocitosis rápida depende específicamente tanto de la entrada de Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje (CCDV) de tipo L como del Ca^{2+} liberado desde el retículo endoplasmático. Además, la utilización de BAPTA demostró que la endocitosis rápida sería dependiente de una señal de Ca^{2+} localizada. Por otro lado, dos inhibidores del reclutamiento de clatrina inhibieron totalmente la endocitosis en el grupo LCG, y parcialmente en el grupo HCG. Esto sugiere que en este último grupo, se activaría un mecanismo clatrino-independiente. En HCG ambos componentes cinéticos se vieron afectados por los inhibidores de clatrina, sugiriendo que cuando la entrada de Ca^{2+} es muy alta la endocitosis clatrina-dependiente puede evolucionar a velocidades aún no reportadas en la literatura. Finalmente, experimentos de imaging con FM1-43 mostraron que la endocitosis en exceso inducida por una despolarización con alto K^+ se compone de una fracción reciclable a vesículas liberables y de otra no reciclable en un período de 30 minutos, siendo la primera inhibida parcialmente por un bloqueante del reclutamiento de clatrina. Estos resultados en su conjunto nos permiten sugerir un modelo en el cual: (a) la entrada localizada de Ca^{2+} por CCDV tipo L induce la liberación de más Ca^{2+} del retículo endoplásmico. (b) El*

consecuente aumento de este catión induce la activación de una endocitosis clatrina dependiente, que debido a su Ca^{2+} dependencia se muestra muy rápida al comienzo mientras el Ca^{2+} alto persiste en el citosol, y más lenta luego de que la concentración citosólica del catión ha disminuido. Esto explicaría la clatrino dependencia de ambos componentes. (c) Esta endocitosis clatrina dependiente resulta parcialmente en la generación de nuevas vesículas liberables. (d) La gran entrada de Ca^{2+} en el grupo HCG induciría además la activación de un proceso clatrina independiente, que no se recicla en vesículas liberables en los tiempos del experimento.

Palabras clave: endocitosis rápida, Ca^{2+}, exocitosis, clatrina, dinamina, kiss & run, bulk endocitosis.

Rapid endocytosis in mouse chromaffin cells: mechanisms, Ca^{2+} regulation and vesicle recycling

Chromaffin cells have various types of endocytosis (clathrin-dependent, kiss & run, bulk endocytosis), which allow the recovery and recycling of membrane and proteins of the previously fused vesicles. We measured two modes of rapid endocytosis in mouse chromaffin cells. On one hand, compensatory endocytosis (compensates approximately the same amount of membrane that was added during stimulation) is associated with a Ca^{2+} entry lower than 79 pC (LCG group) and a single time constant of ~8 sec. On the other hand, excess retrieval (the endocytosis surpasses the amount of the previously exocytosed membrane), is triggered by a Ca^{2+} entry bigger than 79 pC (HCG group) and has two time constants, a fast one (~8 sec) and an ultrafast one (~0,6 sec). The results of this Thesis show that the activation of rapid endocytosis is dependent on a localized Ca^{2+} signal, and specifically depends on Ca^{2+} influx through L-type voltage dependent Ca^{2+} channels (VDCC) and Ca^{2+} released from the endoplasmic reticulum. Additionally, we found that rapid endocytosis is clathrin dependent, almost entirely for the LCG group, and partially for the HCG group. Particularly in HCG, it is interesting that clathrin specific blockers inhibited the fast, but also the ultrafast component, what suggests that clathrin dependent endocytosis can progress at rapid speeds not previously reported when the Ca^{2+} entry is very big. The electrophysiological study on endocytosis was complemented with experiments of imaging using the membrane fluorescent probe FM1-43. After applying a high K^{+} depolarization that allows a large Ca^{2+} influx, we recorded an endocytosis that surpassed the previous exocytosis. We found that the internalized membrane was partially recycled to releasable vesicles, by a mechanism that is at least in part clathrin dependent. There was also a large internalized membrane fraction which was not releasable during the experimental period. We propose a tentative model in which: (a) Ca^{2+} entry through L-type VDCC triggers the release of more Ca^{2+} from endoplasmic reticulum; (b) the resulting increase of Ca^{2+} activates a rapid clathrin dependent endocytosis, and particularly in HCG the higher Ca^{2+} concentration during the first hundreds of milliseconds after the stimulus provokes the appearance of the ultrafast component; (c) clathrin dependent endocytosis partially results in the generation of new releasable vesicles in less than 30 min; (d) in

HCG, the high Ca^{2+} entry also provokes the activation of a clathrin independent endocytosis that does not produce releasable vesicles in the experimental period.

Keywords: rapid endocytosis, Ca^{2+}, exocytosis, clathrin, dynamin, kiss & run, bulk endocytosis.

Índice

1- INTRODUCCIÓN 1

1.1 Médula Adrenal y Células Cromafines 1

1.1.1 Generalidades 1
1.1.2 Características de las células cromafines 2
1.1.3 La respuesta al estrés 6
1.1.4 Catecolaminas empaquetadas en vesículas 7
1.1.5 Ventajas de las células cromafines como modelo neurobiológico 9

1.2 Señales de calcio en células cromafines 11

1.2.1 Fuentes de calcio extracelulares - Canales de calcio 12
1.2.2 Fuentes de calcio intracelulares 14

1.3 Exocitosis en células cromafines 21

1.3.1 Generalidades 21
1.3.2 Etapas en el proceso de secreción 22
1.3.3 El poro de fusión y mecanismos de exocitosis 25
1.3.4 Pools vesiculares 30

1.4 Endocitosis 33

1.4.1 Generalidades 33
1.4.2 Mecanismos de endocitosis 33
1.4.3 Caracterización cinética de la endocitosis 41

1.5 Ciclado vesicular 45

2- MÉTODOS EXPERIMENTALES 49

2.1 Cultivo de células cromafines de ratón 49

2.1.1 Procedimiento para el cultivo 49
2.1.2 Soluciones utilizadas 51

2.2 Técnica de Patch Clamp 51

2.2.1 Circuito equivalente de la célula y medición de la capacitancia de membrana 53
2.2.2 Dispositivo de Patch Clamp 57
2.2.3 Protocolos de estimulación utilizados 57
2.2.4 Preparación de micropipetas 59
2.2.5 Soluciones experimentales 59

2.3 Técnica de imaging utilizando el fluoróforo FM1-43. 60

2.3.1 Características del fluoróforo FM1-43 61
2.3.2 Dispositivo experimental 62
2.3.3 Protocolo básico para la medición de exocitosis, endocitosis y ciclado vesicular durante un mismo experimento 63
2.3.4 Soluciones utilizadas 66

2.4 Análisis de datos y estadística 66

2.4.1 Procesamiento de los experimentos electrofisiológicos 66
2.4.2 Procesamiento de los experimentos de imaging 69
2.4.3 Análisis estadístico 70

4.5 Reactivos y químicos 70

1- OBJETIVOS 71

1.1 Objetivo general 71

1.1 Objetivos particulares 71

3- RESULTADOS Y DISCUSIÓN 74

3.1 Dos modos de endocitosis rápida en células cromafines de ratón. Análisis comparativo. 74

3.2 Dependencia de la endocitosis rápida con el calcio 91

3.2.1- Efectos de un buffer rápido de calcio 91
3.2.2- Fuentes de calcio 94

3.3 Mecanismos moleculares que intervienen en la endocitosis rápida 110

3.3.1 Efecto de la inhibición de la dinamina sobre la endocitosis: 111
3.3.2- Endocitosis clatrina dependiente: 115
3.3.3- DISCUSIÓN 120

3.4 Evaluación del reciclado vesicular 124

A- RESULTADOS 124
B - DISCUSIÓN 128

3.5 Caracterización de la endocitosis rápida que se produce frente a un estímulo que simula un potencial de acción (PAs) 132

A- RESULTADOS 132
B - DISCUSIÓN 135

4 – DISCUSIÓN GENERAL 137
5 – REFERENCIAS..... 144

Lista de abreviaturas

Aga: ω-agatoxina IVA.

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

CCDV: Canales de Calcio Dependientes de Voltaje.

Cm: Capacitancia de la membrana celular.

CPZ: chlorpromazina

$[Ca^{2+}]$: concentración de Ca^{2+}

DCV: Dense Core Vesicle

EGTA: Ethylene Glycol Tetraacetic Acid.

Endo: endocitosis

Endo-Exo: diferencia entre endocitosis y exocitosis

Exo: exocitosis

Exo1: exocitosis inducida por el estímulo.

Exo2: fracción de membrana endocitada que se recicla hacia vesículas liberables.

FNL: Fracción no Liberable.

HCG: High Current Group.

HVA: high voltage activated.

IP: corriente que circula por la pipeta.

IP_3: inositol 1,4,5-trifosfato

IRP: Immediately Releasable Pool.

LCG: Low Current Group.

LVA: Low Voltage Activated.

Nitre: nitrendipina.

PA: Potencial de Acción.

PAs: Potencial de Acción Simulado.

$PI(4,5)P_2$: fosfatidilinosotol 4,5 bisfosfato

Ra: resistencia de acceso.

Rm: resistencia de los canales iónicos.

RP: Reserve Pool.

RRP: Ready Releasable Pool.

Ry: rianodina.

SNAP-25: Synaptosomal-Associated Protein of 25 kDa.

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

SRP: Slowly Releasable Pool.

T + C: tapsigargina + cafeína.

t-SNARE: SNARE target.

U: Uniporter

UP: Unprimed Pool.

Vm: potencial de membrana.

Vp: voltaje entre la pipeta y el baño.

v-SNARE: SNARE vesicular.

ΔCm: cambio de capacitancia de la membrana celular.

ΔV: cambio de voltaje (despolarización).

2APB: 2-aminoethoxydiphenyl borate.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro universo, que todo lo abarca, es una inmensa red de interacciones. Por eso agradezco a cada uno de los elementos que lo componen. Porque por el hecho de haber estado en contacto directo conmigo o con lo que sea que es mi ser, o por haberlo hecho con cualquiera que haya formado parte de mi vida, terminaron de una u otra manera influenciándome, y permitieron que hoy sea quien soy y que mi vida sea la que es.

Le agradezco especialmente:

A mi director Fernando, por su ayuda, dedicación, y por haberme dado todo su apoyo para realizar esta tesis.

A mis compañeros y amigos de grupo: Yanina, por todo lo que me enseñó, por su ayuda y por todos los momentos que compartimos; Mauricio, porque siempre tiene un gesto amable y está dispuesto a darme una mano con lo que sea, porque hizo que mi estadía en el labo sea mucho más amena; Jose, por los consejos y todos los momentos compartidos.

A Osvaldo y a todas las personas que forman (o formaron) parte de su grupo. A los otros grupos del LFBM y a todos los integrantes del IFIByNE. Gracias a todos por lo compartido durante estos años.

A mi familia, que siempre me apoyó.

A Maxi, que está a mi lado incondicionalmente y que siempre me ayuda en cada etapa de mi vida.

A Marcos y Agustín, por iluminar cada uno de mis días y ser mis grandes Maestros.

Porque todos ellos estuvieron presentes durante estos años y me ayudaron a realizar esta Tesis.

A mis amores

Maxi, Marcos y Agustín

1- INTRODUCCIÓN

1.1 Médula Adrenal y Células Cromafines

1.1.1 Generalidades

El sistema nervioso autónomo es fundamentalmente un sistema eferente e involuntario que transmite información desde el sistema nervioso central hasta la periferia, estimulando órganos particulares. Sus acciones incluyen, el control de la frecuencia y la fuerza de contracción cardíaca, la contracción y dilatación de vasos sanguíneos, la contracción y relajación del músculo liso en varios órganos, acomodación visual, tamaño pupilar y secreción de glándulas exocrinas y endocrinas, regulando funciones tan importantes como la digestión, la circulación sanguínea, la respiración y el metabolismo (Purves D y col., 2004).

El sistema nervioso autónomo se divide funcionalmente en el sistema simpático y en el sistema parasimpático. El sistema simpático juega un papel fundamental en la preservación del organismo, ya que genera una respuesta rápida y efectiva ante los estímulos externos y/o internos que puedan amenazar la integridad del individuo. De esta manera responde a diferentes fuentes de estrés, manteniendo la homeostasis del sistema. Mientras tanto la acción del sistema parasimpático es generalmente opuesta al simpático, y su función está orientada a la conservación de la energía del organismo, manteniendo los estados basales o de reposo de las diferentes variables reguladas (Purves D y col., 2004).

Tanto en el sistema simpático como en el parasimpático, los axones preganglionares (que salen desde la médula espinal en el simpático, o de la médula y el tallo cerebral en el parasimpático) llegan a una serie de ganglios intermedios, desde donde parten las fibras postganglionares que se dirigen al órgano efector. Una excepción a esta regla la constituye la médula de la glándula adrenal, la cual está inervada directamente por las fibras preganglionares simpáticas. Debido a esto, la médula adrenal es considerada un ganglio simpático modificado. Las células que la conforman, las cromafines, son neuronas postganglionares modificadas, que secretan el contenido de sus vesículas a la circulación sanguínea general del organismo.

El neurotransmisor involucrado en las sinapsis ganglionares de los sistemas simpático y parasimpático es la acetilcolina. Este mismo neurotransmisor también es

liberado por las neuronas postganglionares del parasimpático. Por otro lado, el neurotransmisor que es liberado en las sinapsis que se establecen entre las fibras postganglionares del sistema simpático y el órgano efector es la noradrenalina (Purves D y col., 2004). Sin embargo, la médula adrenal libera noradrenalina en baja proporción (20% del total de catecolaminas aproximadamente), ya que la principal sustancia activa liberada por esta glándula es la adrenalina (Purves D y col., 2004).

Toda la adrenalina circulante procede de la secreción de la médula suprarrenal, la cual genera una concentración basal de dicha hormona en la sangre de 250 pg/ml (de Diego AMG y col., 2008). Por otro lado, prácticamente toda la noradrenalina circulante deriva de las terminaciones nerviosas simpáticas y del encéfalo, y es el resultado de un "escape" de la recaptación local que se produce en las brechas sinápticas.

1.1.2 Características de las células cromafines

A- Generalidades de la Glándula Adrenal

Las glándulas adrenales son órganos pares ubicados en el retroperitoneo, sobre el extremo superior de cada riñón (figura 1.1 A). Externamente están rodeadas por una gruesa cápsula de tejido conectivo denso irregular. Al realizar un corte macroscópico pueden observarse la corteza externa, que representa la mayor parte de la glándula, y una médula interna (figura 1.1 B). Desde los puntos de vista embriológico y funcional la corteza y la médula representan en realidad dos órganos endocrinos diferentes.

La corteza se divide en tres zonas concéntricas, denominadas desde el exterior hacia el interior, zona glomerular, que es productora de mineralocorticoides, zona fasciculada y zona reticular, que producen glucocorticoides y hormonas sexuales, respectivamente. Aparte de sus muchos efectos sobre órganos a distancia, estos esteroides también cumplen una función paracrina sobre las células cromafines de la médula adrenal (Bornstein SR y col., 1997), al favorecer la producción de adrenalina a partir de noradrenalina (Hodel A, 2001) y evitar la formación de prolongaciones (tipo dendríticas o axónicas) en estas células. Es sabido que las células cromafines en cultivo, eventualmente generan procesos de características similares a las neuritas (Trifaró JM y Lee R, 1980; Unsicker K y col., 1978), y que el agregado de esteroides al medio de cultivo inhibe este crecimiento (Anderson DJ y Axel R, 1986).

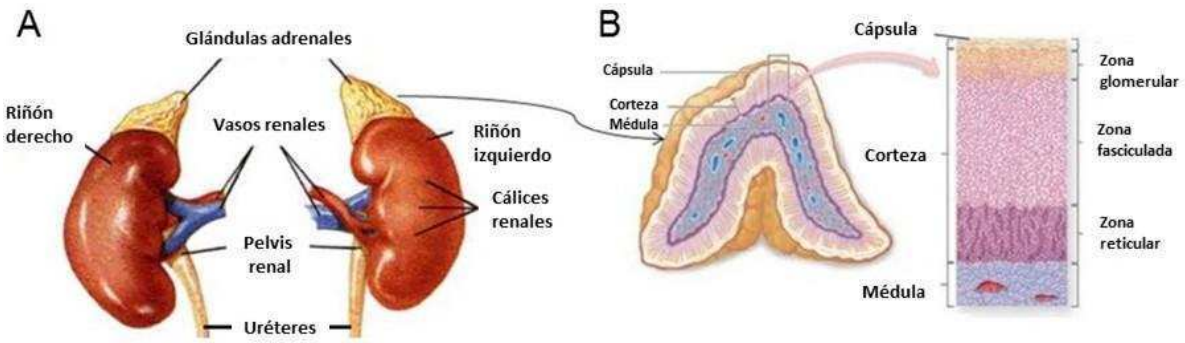

Figura 1.1 - La glándula adrenal. (A) *La representación muestra la localización de las glándulas adrenales y sus relaciones anatómicas con el riñón.* ***(B)*** *El corte longitudinal en la glándula permite diferenciar los dos órganos secretorios: la corteza por fuera y la médula en la zona interna. También puede observarse en el detalle de la derecha la disposición de los tejidos que la constituyen.*

Por su parte, la médula está constituida principalmente por las células cromafines, que constituyen el 63% de su volumen, tomando como ejemplo la glándula adrenal de rata adulta (Unsicker K y Krieglstein K, 1996). El término cromafín fue acuñado por el histólogo Alfred Kohn (1867-1959), y hace referencia a la propiedad típica que presentan estas células en colorearse con las sales de cromo. Además de las células cromafines, la médula adrenal está constituida por los vasos sanguíneos, incluyendo las células endoteliales, musculares lisas y perivasculares que representan el 20% del volumen de la médula. El tejido conectivo intersticial ocupa alrededor del 12% de la médula adrenal y las neuronas el restante 5% (Unsicker K y Krieglstein K, 1996).

Desde el punto de vista embriológico, las células cromafines de la médula adrenal derivan del neuroectodermo (Aloe L y Levi-Montalcini R, 1979; Tischler AS, 2002; Weston JA, 1970). Algunos de los progenitores neuronales provenientes de la cresta neural originan el sistema simpático, mientras que otros migran e invaden la corteza suprarrenal (Le Douarin NM y col., 2008) dando lugar a la médula de dicha glándula. Más tarde, como consecuencia de la actividad de diversos factores de crecimiento (Dutt S y col., 2006; Barald KF, 1982) que estimulan la vía del AMP cíclico, las células se diferencian y se induce la síntesis de catecolaminas (Bilodeau ML y col., 2000; Bilodeau ML y col., 2005).

B- Generalidades de la Células Cromafines

Debido a su desarrollo, bioquímica y fisiología, las células cromafines están fuertemente relacionadas con las neuronas simpáticas, aunque poseen importantes características morfológicas y también bioquímicas que las diferencian claramente de

aquellas. Ambos tipos celulares poseen la maquinaria para sintetizar, almacenar, liberar, y recaptar catecolaminas. En contraste con las neuronas simpáticas postganglionares, la mayoría (80%) de las células cromafines sintetizan adrenalina, la cual es un producto de la noradrenalina (ver más adelante). Desde un punto de vista morfológico, las células cromafines carecen de axones y dendritas, presentando *in situ* una forma columnar. Otra propiedad morfológica que las caracteriza es la presencia de miles de grandes gránulos densos en su citoplasma, donde almacenan las sustancias activas liberadas por estas células. Al igual que en un ganglio simpático, estas células son inervadas por los axones colinérgicos preganglionares que parten de los somas neuronales localizados en la columna intermedio-lateral de la médula espinal. Específicamente, las células cromafines son inervadas por fibras preganglionares simpáticas del nervio esplácnico (Hirano T, 1982), y se encuentran dentro de la glándula dispuestas en cordones (Díaz–Flores L y col., 2008), lo cual favorece su relación con los capilares, a los que liberan sus productos de secreción (figura 1.2A).

Los terminales axónicos del nervio esplácnico liberan acetilcolina sobre las células cromafines, las cuales poseen receptores colinérgicos de membrana, tanto nicotínicos como muscarínicos, que unen con alta afinidad a este neurotransmisor. La secreción en las células cromafines es mayormente estimulada por la activación de receptores nicotínicos, que son receptores del tipo ionotrópico. El subtipo de receptor nicotínico más importante en las células cromafines es el complejo pentamérico formado por las subunidades α3 y β4, que forman el canal que atraviesa la membrana (Sala F y col., 2008). Sin embargo en estas células también hay receptores muscarínicos, metabotrópicos acoplados a proteína G, que pueden contribuir a la regulación de la secreción de catecolaminas (Aguilar JS y col., 1992). Dentro de los receptores muscarínicos hay cinco subtipos (M1-M5). En células cromafines vacunas se observó mayor proporción del subtipo M2, y en menor proporción los subtipos M1, M3 y M4 (Aguilar JS y col., 1992; Fernando JC y col., 1991; Olivos L y Artalejo AR, 2008). Cuando las células cromafines son excitadas, se disparan potenciales de acción en la membrana plasmática de las mismas. Brevemente, luego de que los terminales axónicos del nervio esplácnico liberan acetilcolina sobre las células cromafines, este neurotransmisor se une al receptor nicotínico, el cual responde con un cambio conformacional que aumenta su permeabilidad a cationes, ingresando fundamentalmente Na^+ (Biales B y col., 1976). Es necesario aclarar que en algunos casos se observó que la fase de subida del potencial de acción depende tanto de los canales de Na^+ como de los de Ca^{2+} (Brandt BL y col., 1976;

Kidokoro Y y Ritchie AK, 1980; Nassar-Gentina V y col., 1988). A consecuencia del cambio en el potencial de membrana que se produce durante el potencial de acción, se activan canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV) en la membrana plasmática (García AG y col., 2006). Las corrientes de Ca^{2+} que se activan durante un potencial de acción son el disparador natural de la exocitosis (Augustine GJ y Neher E, 1992), lo que permite la liberación de los productos de secreción en las células cromafines (ver secuencia de eventos esquematizados en la figura 1.2 B), al igual que en otras células neuroendocrinas y en las neuronas (Aunis D, 1998; Cheek TR y Barry VA, 1993; Livett BG, 1993). La repolarización del potencial de acción depende de la inactivación de los canales de Na^+ y de la activación de canales de K^+. Consistentemente con el rol propuesto para los canales BK en varios tipos celulares (Lancaster B y Adams PR, 1986; Lancaster B y col., 1991; Lang y Ritchie 1987 y 1990), tanto las corrientes tipo BK_i (*inactivating BK current*) como las de tipo BK_s (*noninactivating BK current*) contribuyen a la fase de repolarización del potencial de acción en células cromafines (Solaro CR y col., 1995). Si bien los canales BK fueron los más estudiados en las células cromafines, también se ha determinado que éstas poseen canales de K^+ de tipo *small K,* rectificadores tardíos, activados por proteína G y de tipo M (Artalejo AR y col., 1993; Cannon SD y col., 1994; Marty A y Neher E, 1985; Wallace DJ y col., 2002).

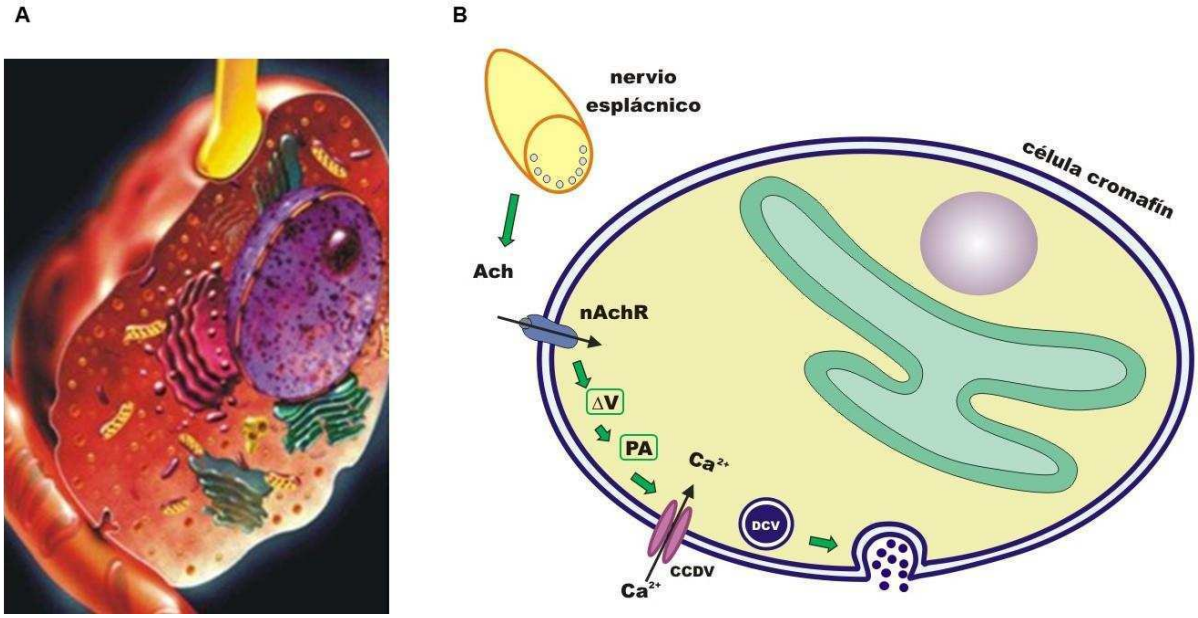

Figura 1.2 - La célula cromafín. (A) *Se representa la ultraestructura de una célula cromafín, en contacto directo con un terminal nervioso preganglionar simpático responsable de su estimulación, y con un capilar sanguíneo hacia donde secreta las catecolaminas mediante exocitosis.* ***(B)*** *Esquema que representa la secuencia de eventos que desencadenan la liberación de catecolaminas. Las células cromafines reciben*

estimulación simpática desde el nervio esplácnico, que libera acetilcolina (Ach). En consecuencia se produce la apertura de los canales catiónicos asociados a los receptores nicotínicos presentes en la membrana (nAchR), lo que genera una corriente predominante de Na^+ y en consecuencia una despolarización (ΔV). Cuando dicha despolarización supera cierto umbral se disparan potenciales de acción (PA), que a su vez generan la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV). Esta elevación localizada del Ca^{2+} intracelular dispara el proceso de exocitosis, que permite se liberen al espacio extracelular las moléculas contenidas en las vesículas secretorias.

1.1.3 La respuesta al estrés

En condiciones normales, en las cuales el organismo no está sometido a estrés, las neuronas preganglionares simpáticas del nervio esplácnico disparan a frecuencias bajas, manteniendo la frecuencia de disparo de potenciales de acción en las células cromafines en aproximadamente 0,5 Hz. A este estado se lo denomina *breed and feed* (Blandt BL y col., 1976). En estas condiciones las células cromafines liberan pequeñas cantidades de catecolaminas al sistema circulatorio, que contribuyen a que los parámetros fisiológicos (como por ejemplo el tono vascular y la frecuencia cardíaca) se mantengan en sus niveles de reposo. En condiciones de estrés agudo, debido por ejemplo al ataque de un depredador, o simplemente a ejercicio, el sistema nervioso simpático inicia una respuesta denominada *fight or flight*, en la cual la médula suprarrenal es activada simultáneamente con la rama simpática del sistema nervioso autónomo y actúa en forma sinérgica con éste. La estimulación de la médula adrenal por parte de las terminales preganglionares del simpático produce un aumento en la frecuencia de disparo de las células cromafines hasta un valor 30 veces mayor al de reposo (~15Hz) (Iijima T y col., 1992). Esto genera una liberación masiva de adrenalina (en mayor medida) y noradrenalina (en menor medida) a la circulación general. Estas hormonas llegan a los órganos blanco, y su efecto se suma al de la noradrenalina liberada desde los terminales simpáticos, contribuyendo a la activación de receptores adrenérgicos. Es importante notar que muchas células que no reciben inervación simpática sí poseen receptores adrenérgicos. Por ejemplo, la adrenalina genera un aumento importante del metabolismo basal del organismo ante situaciones de estrés (De Diego AMG y col, 2008). Este mecanismo en su conjunto participa del llamado principio de *yin y yang*, controlado por los sistemas simpático y parasimpático. La base de este principio es que la interrelación entre estos dos sistemas, clásicamente caracterizados como opuestos y recíprocos, es crucial. Bajo ciertas condiciones fisiológicas o patológicas, pueden ser además sincrónicos y

sinérgicos (Paton JFR y col., 2005). Esto es fundamental para la supervivencia del individuo, ya que permite el mantenimiento de la homeostasis del sistema bajo diferentes condiciones, tanto en reposo como de distintos grados de estrés, provenientes del medio externo o interno al organismo.

1.1.4 Catecolaminas empaquetadas en vesículas

En las células cromafines se describieron fundamentalmente dos tipos de vesículas: las llamadas vesículas secretorias o gránulos secretorios, que tienen ~200 nm de diámetro en promedio y son densas al microscopio electrónico (DCV, por *Dense Core Vesicles*); y las vesículas pequeñas (~40 nm) de baja densidad al microscopio electrónico, similares a las vesículas sinápticas (Annaert WG y col., 1993; Koval LM y col., 2001; Tanner VA y col., 1996). Los productos clásicos de secreción de las células cromafines, como la adrenalina, la noradrenalina y una variedad de péptidos activos, son almacenados en las vesículas secretorias. La propiedad electrodensa de estas vesículas se debe a la presencia de proteínas fuertemente empaquetadas, de las cuales la más importante es la cromogranina (Banks P y Helle K, 1965; O´Connor DT y Frigon RP, 1984). Además, las células cromafines secretan factores tróficos: FGF-2 (por *fibroblast growth factor*), miembros de la superfamilia de TGF-β (por *transforming growth factor*) y neurotrofinas (NT4 y otros componentes neurotróficos no identificados) (Unsicker K y Krieglstein K, 1996) que promueven la supervivencia de varios tipos neuronales (Schumm MA y col., 2004).

El producto de secreción más importante de las células cromafines es la catecolamina adrenalina, y en menor medida, su precursor noradrenalina. Una vez que la célula las produce, estas moléculas son transportadas hacia el interior de las vesículas donde se almacenan, mediante los transportadores VMAT1 y VMAT2 (Erickson JD y col., 1996). Estos transportadores utilizan el gradiente de H^+ generado por una bomba H^+-ATPasa (Dean GE y col., 1986). Dicha bomba genera pH ácido de un valor aproximado de 5.5 en el interior vesicular, el cual es utilizado como fuerza impulsora para transportar las catecolaminas. Además, como se ha mencionado previamente, las DCV contienen una matriz proteica compuesta fundamentalmente de cromograninas (Banks P y Helle K, 1965; O´Connor DT y Frigon RP, 1984), lo que le confiriere su típica característica electrodensa debido al gran empaquetamiento de estas proteínas conjuntamente con cationes que

neutralizan sus cargas negativas (figura 1.3). Las DCV contienen además péptidos menores como el neuropéptido Y y la encefalina (Lewis RV y col., 1979; Viveros OH y col., 1979; Kataoka Y y col., 1985), nucleótidos de adenina (ATP), Ca^{2+} (Winkler H y Westhead E, 1980; Winkler H, 1982,Winkler H y Fischer-Colbrie R, 1992, Winkler H, 1993), sintaxina 1A, sinaptotagmina I (Yoo SH y col., 2005) y activador de plasminógeno (Parmer RJ y col., 1997).

Asimismo estas células expresan las enzimas necesarias para la síntesis de las catecolaminas que secretan. Esta ruta biosintética comienza con la formación de dopa a partir del aminoácido tirosina, por acción de la tirosina hidroxilasa. Este primer paso es el limitante en la ruta biosintética. Luego, la enzima dopa descarboxilasa cataliza la eliminación del grupo carboxilo de la dopa y la convierte en dopamina. A continuación, la dopamina es hidroxilada por la dopamina-β-hidroxilasa, transformándose en noradrenalina. Las células que secretan adrenalina, pero no las que secretan noradrenalina, expresan la feniletanolamina-N-metiltransferasa, que cataliza la reacción de metilación que convierte la noradrenalina en adrenalina. Este último paso es regulado de manera positiva (estimulado) por glucocorticoides (Hodel A, 2001).

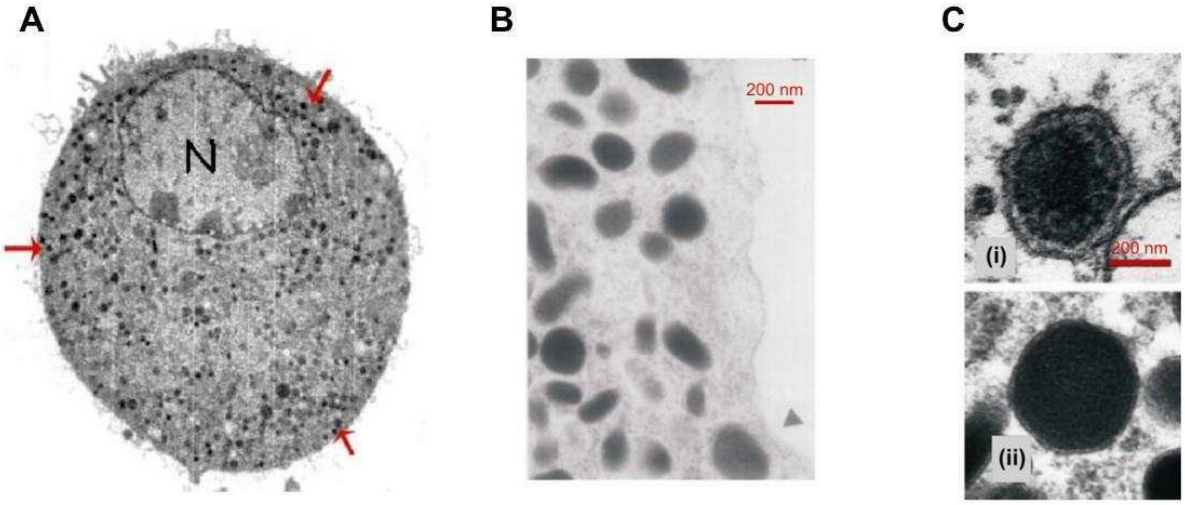

Figura 1.3 - Vesículas secretorias. (A) *Imagen de una célula cromafín obtenida con microscopía electrónica de transmisión, donde se observa el núcleo (indicado con una N), y un notable contenido de vesículas secretorias (algunas indicadas con flechas rojas a modo de ejemplo) que se visualizan electrodensas al microscopio electrónico. Imagen extraída y modificada de Ashery U y col., 2000.* ***(B)*** *En esta Microscopia electrónica de transmisión de la zona cortical de una célula cromafín bovina se observa la ubicación de las vesículas secretorias con respecto a la membrana plasmática (Imagen extraída de Vitale N y col., 2005).* ***(C)*** *Se observan las diferencias entre las vesículas cargadas con adrenalina de las cargadas con noradrenalina.* ***(i)*** *Las vesículas que contienen adrenalina muestran un halo en su periferia,* ***(ii)*** *mientras que las que contienen noradrenalina son sólidas. Imágenes extraídas y modificadas de Crivellato E y col., 2008.*

1.1.5 Ventajas de las células cromafines como modelo neurobiológico

En general, las células cromafines poseen varias características que las hacen muy ventajosas como modelo de experimentación del proceso de neurosecreción en términos generales. En este proceso podemos incluir la exocitosis (tanto la fusión de la vesícula a la membrana, como la liberación de sustancias activas), el acople estímulo-secreción (generalmente disparado por una entrada de Ca^{2+}), la formación del poro de fusión vesicular, etc., e incluso la endocitosis, que es necesaria para la regeneración de la membrana luego de la exocitosis y para la formación de nuevas vesículas secretorias.

En primer lugar, las células cromafines son fácilmente cultivables (Livett BG, 1984). Los cultivos primarios de células cromafines son eficientes, y generan cantidades desde masivas hasta al menos aceptables de células, dependiendo la especie desde donde se extraigan (vaca, rata y ratón son las más utilizadas). Además, el tamaño de estas células es marcadamente mayor que la mayoría de las terminales nerviosas y adoptan una geometría esférica en cultivo, lo que constituye un único compartimiento eléctrico y difusivo. Estas características permiten una relativamente fácil aplicación del microelectrodo de *patch clamp*, un control confiable del voltaje transmembranal, y permite la evaluación de la capacitancia de membrana como una medida de la exocitosis y la endocitosis. Por otro lado, su geometría y tamaño también facilitan la aplicación de técnicas de *imaging* de Ca^{2+} utilizando fluoróforos aplicados directamente en la solución interna. Otra ventaja que presentan las células cromafines es la posibilidad de evaluar la dinámica de liberación de adrenalina desde vesículas únicas por técnicas amperométricas (Chow RH y col., 1992; Wightman RM y col., 1991). Esto es posible debido a que las catecolaminas son susceptibles a ser oxidadas, si se les aplica el potencial redox correspondiente a través de un microelectrodo de fibra de carbono en contacto con la superficie celular. Esta técnica puede ser aplicada conjuntamente con mediciones electrofisiológicas de corrientes y capacitancia celular, tanto en la célula completa como en un parche de membrana (Albillos A y col., 1997; Alés E y col., 1999).

Acordes con su origen embriológico, los mecanismos secretorios de las células cromafines poseen muchas similitudes con los de las neuronas, tanto en aspectos moleculares como biofísicos. Debido a esto, se ha utilizado reiteradamente a las células cromafines como modelo de estudio de mecanismos que serían más complicados de abordar en terminales sinápticas. En las células cromafines se ha descripto la presencia

de la gran mayoría de las proteínas involucradas en la fusión vesicular que han sido identificadas en zonas activas de las terminales sinápticas (Burgoyne RD y Morgan A, 2003; Gerber SH y Südhof TC, 2002; Hodel A y col., 1994; Morgan A y Burgoyne RD, 1995; Roth D y Burgoyne RD, 1994; Sørensen JB y col., 2006). Del mismo modo, desde un punto de vista más macroscópico, tanto en terminales sinápticas como en neuronas se ha determinado la presencia de fusión vesicular de tipo completa y de tipo parcial (*kiss & run, cavicapture*). Sin embargo, respecto a estos tipos de fusión, las células cromafines han permitido un abordaje directo de estos procesos (Alés E y col., 1999; Elhamdani A y col., 2006), algo que en terminales nerviosas sería muy complicado. Los mecanismos de endocitosis, que recuperan la membrana luego de la fusión también muestran paralelismos entre células cromafines y terminales nerviosas, encontrándose procesos rápidos y lentos, dependientes e independientes de clatrina (Artalejo CR y col., 1995; Burgoyne RD, 1995; Chan SA y Smith C, 2001; He Z y col., 2008; Hsu SF y Jackson MB, 1996; Maxfield FR y McGraw TE, 2004; Neher E y Zucker RS, 1993; Nucifora PG y Fox AP, 1998; Smith C y Neher E, 1997; Thomas P y col., 1994; von Gersdorff H y Matthews G, 1994; Zhang C y col., 2004).

Existen numerosos ejemplos de cómo las células cromafines han servido como modelo neurobiológico. En estas células se logró aislar por primera vez una organela secretoria mediante ultracentrifugación (Blaschko H y Welch AD, 1953). También en ellas, se logró establecer por primera vez 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 D y Radda GK, 1978). Además, las células cromafines han sido el modelo fundamental para definir los *pools* vesiculares presentes en la vía secretoria, mediante el análisis cinético de los diferentes componentes de exocitosis que se manifiestan ante la fotólisis de compuestos de Ca^{2+} enjaulado (Neher E y Zucker RS, 1993, Rettig J y Neher E, 2002; Sørensen JB, 2004). También estas células han permitido caracterizar cinéticamente varios tipos de endocitosis que se desarrollan en tiempos que van desde pocos cientos de milisegundos a minutos (Artalejo CR y col., 1996, 2002; Chan SA y col., 2003, 2005). Por medio de la aplicación de la amperometría y de la capacitancia en *patch*, estas células también han servido para definir en forma directa los distintos tipos de fusión de las vesículas. Las primeras evidencias directas de la existencia de la fusión transitoria fueron obtenidas por la medición de capacitancia (Spruce BA y col., 1990) y amperometría (Zhou Z y col., 1996) de una vesícula única, pero la combinación de ambas técnicas en las células cromafines demostraron que la liberación de la adrenalina

coincidía temporal y espacialmente con el aumento en capacitancia transitorio, demostrando más fehacientemente la existencia de este tipo de fusión (Albillos A y col., 1997, Alés E y col., 1999). En cuanto a la maquinaria exocitótica, en las células cromafines se han realizado avances en la determinación de los eventos moleculares que ocurren durante la formación del complejo SNARE (por *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors)* (Sørensen JB y col., 2003; Sørensen JB y col., 2006).

Las similitudes de las células cromafines con las neuronas, sumadas al hecho de que poseen ventajas cualitativas como sistema experimental, hacen que constituyan un excelente modelo neurobiológico. Por este motivo, en el pasado y en la actualidad han sido extensamente utilizadas para estudiar los mecanismos involucrados en la exocitosis, así como también en la endocitosis y en el ciclado de membrana internalizada hacia vesículas liberables.

1.2 Señales de calcio en células cromafines

El Ca^{2+} es un segundo mensajero fundamental en la regulación de diferentes funciones en todos los tipos celulares sin excepción, tanto en células excitables como en no excitables. Interviene por ejemplo en la contracción muscular, la transcripción génica, la secreción, la fertilización, la proliferación, el desarrollo, el aprendizaje, la memoria, la muerte celular, etc. (Berridge MJ y col., 2000). Esta versatilidad sólo puede lograrse con un fino y preciso control de su concentración en el espacio 3D (a nivel subcelular), en el tiempo y también en amplitud (Laude AJ y Simpson AWM, 2009). Dependiendo de los procesos que se estén regulando, las señales de Ca^{2+} pueden ser altamente localizadas (microdominios o nanodominios) o globales (Berridge MJ y col., 2000; Berridge MJ, 2001; Croft W y col., 2016; Laude AJ y Simpson AWM, 2009; Rizzuto R y Pozzan T, 2006), como también pueden durar de milisegundos a horas (Augustine GJ y Neher E, 1992; Berridge MJ y col., 2000; Berridge MJ, 2001; Feske S, 2007; Laude AJ y Simpson AWM, 2009; Llinas R y col., 1992; Neher E, 1998b). Muchos procesos suceden como consecuencia de un aumento transitorio en la concentración citosólica de Ca^{2+} en lugares subcelulares específicos. Ese aumento se produce principalmente debido a la entrada de Ca^{2+} desde fuentes extracelulares o a su liberación desde reservorios intracelulares (Augustine GJ y Neher E, 1992; Berridge MJ y col., 2000; Fabiato A, 1983; García AG y col., 2006; Gunter TE y col., 1994). Sin embargo, también serán fundamentales en la forma y dinámica de

estas señales tanto los sistemas de buffers celulares, como los sistemas de remoción del catión. Por ejemplo, los microdominios locales de [Ca^{2+}], que tienen una importancia crucial en la fusión vesicular regulada en neuronas y células neuroendocrinas, poseen una magnitud y dinámica que depende de la disposición espacial de fuentes de Ca^{2+} (canales de membrana, por ejemplo), y de buffers de Ca^{2+} endógenos (Marengo FD y Monck JR, 2000; Marengo FD y Monck JR, 2003; O'Sullivan AJ y col., 1989; Rizzuto R y Pozzan T, 2006; Xu T y col., 1997; Zhou Z y Neher E, 1993). Los diferentes sistemas de extrusión de Ca^{2+} (intercambiadores y bombas), localizados tanto en la membrana plasmática como en las organelas intracelulares, también influirán en la dinámica temporal de estas señales de Ca^{2+} (Pan CY y Kao LS, 1997), y consecuentemente en la duración en el tiempo de ciertas funciones que ellas regulan. Por lo tanto, las señales de Ca^{2+} citosólicas resultan de la participación conjunta de fuentes de Ca^{2+} extracelulares e intracelulares, buffers de Ca^{2+} y sistemas de remoción (figura 1.4).

1.2.1 Fuentes de calcio extracelulares - Canales de calcio

La principal fuente de Ca^{2+} involucrada en la transmisión sináptica y en la secreción neuroendocrina es la extracelular, y está mediada por los CCDV localizados en la membrana plasmática (Augustine GJ y Neher E, 1992). Se han encontrado estos canales en todas las células excitables (Hille B, 1992).

Estos CCDV pueden clasificarse electrofisiológicamente en dos grupos dependiendo del umbral de voltaje al cual se activan: los de alto umbral de activación (HVA, por *high voltage activated*) y los de bajo umbral de activación (LVA, por *low voltage activated*).

Los HVA son proteínas oligoméricas constituidas por una subunidad α1 y por subunidades regulatorias (α2-δ, γ, β). La α1 posee todas las propiedades básicas del canal (Catterall W, 2000), y es la formadora del poro. Tiene aproximadamente 2000 aminoácidos, y presenta una estructura terciaria similar a los canales de Na^{+} dependientes de voltaje (Tsien RW y col., 1991); es decir que está constituida por 4 dominios, los que a su vez están formados por 6 segmentos transmembrana en α-hélice. Dentro de este grupo se pueden distinguir los subtipos N, P/Q, R y L, todos presentes en células cromafines, en proporciones variables según la especie. Estos subtipos fueron distinguidos inicialmente a partir de su sensibilidad diferencial a distintas drogas y toxinas. La corriente tipo N es bloqueada irreversiblemente por el péptido llamado ω-conotoxina-GVIA, proveniente del

caracol marino *Conus geographicus* (Olivera BM y col., 1994). Las corrientes tipo P/Q son bloqueadas con alta especificidad por un componente peptídico del veneno de araña *Agenelopsis aperta* conocido como w-agatoxina-IVA (Olivera BM y col., 1994). Estos dos tipos de canales poseen la región *synprint* (por *synaptic protein interaction site*), que es capaz de interactuar con proteínas de la maquinaria exocitótica (Catterall WA, 2011). Lo que sugiere que estos canales pueden localizarse en regiones de la membrana donde el complejo SNARE se haya formado, lo que permitiría su interacción con las proteínas que forman dicho complejo, y por lo tanto con las vesículas secretorias o sinápticas. Por otro lado, las corrientes de tipo R son inhibidas por la toxina peptídica SNX-482, aislada del veneno de la tarántula africana *Hysterocrates gigas* (Newcomb R y col., 1998). Estos canales no poseen la región *synprint*, pero se vio que en ciertos preparados también pueden colocalizar con las vesículas. Finalmente, las corrientes denominadas de tipo L son sensibles a las dihidropiridinas (García AG y col., 2006). Estos canales están presentes en las células cromafines de ratón en una proporción de hasta el 40 – 50 % del total de la corriente de Ca^{2+} (Hernández-Guijo JM y col., 1998). Estos canales no se encuentran particularmente acoplados a las vesículas secretorias o sinápticas, pero tienen la particularidad de participar significativamente durante señales de Ca^{2+} globales y sostenidas. Esto se logra porque poseen una inactivación por Ca^{2+} y por voltaje lentas, lo que permite un flujo sostenido de Ca^{2+} durante despolarizaciones repetidas o prolongadas. Estas características les permiten regular procesos lentos y/o sostenidos, como la exocitosis frente a trenes de despolarizaciones mantenidas en el tiempo, y la translocación vesicular entre *pools* (Álvarez YD y col., 2008). Además, estos canales tienen participación directa en el control de la endocitosis de vesículas en células cromafines bovinas (Rosa JM, y col., 2007), donde a pesar de su modesta contribución a la corriente de Ca^{2+} total (en esta especie su contribución es del 20 % (Albillos A y col., 1993; Gandia L y col., 1993)), existen evidencias que indican que están preferentemente acoplados a la endocitosis (Rosa JM y col., 2011). Otra característica de estos canales es su baja inactivación en estado estacionario, lo que favorece su disponibilidad a potenciales cercanos al de reposo fisiológico.

El segundo tipo de CCDV, el LVA presenta como se mencionó previamente un umbral bajo de activación y de inactivación, y está representado por el canal de tipo T. Estos canales están formados solamente por la subunidad α_1, y normalmente no se expresan en células cromafines en cultivo. Sin embargo, se ha demostrado que su expresión puede ser favorecida por incubaciones prolongadas en AMP cíclico, por

exposición a hipoxia (Carabelli V y col., 2007), o a consecuencia de una estimulación β adrenérgica (Novara M y col., 2004), la cual puede ocurrir "in vivo" de manera autocrina. La expresión de estos canales puede representar un mecanismo más de plasticidad celular, ya que contribuyen a bajar el umbral de excitabilidad y de secreción de catecolaminas (Giancippoli A y col., 2006; Novara M y col., 2004) durante la estimulación simpática sostenida, y/o frente a aumentos de catecolaminas circulantes. Farmacológicamente, los canales tipo T son más sensibles al bloqueante inorgánico Ni^{2+} que a Cd^{2+}, y también pueden ser bloqueados por mibefradil (Mishra SK y Hermsmeyer K, 1994). Se ha sugerido que estos canales se expresan mayoritariamente en células cromafines inmaduras en desarrollo (Bournaud R y col., 2001).

Los CCDV, como ocurre también para los canales dependientes de voltaje de Na^+ y de K^+, son altamente selectivos para un tipo iónico determinado. Cuando está abierto, el canal forma un poro que se extiende a través de toda la membrana. Este poro es, en casi toda su longitud, mucho más ancho que el ion, salvo en un pequeño tramo donde se encuentra el filtro que establece la selectividad iónica del canal. Este filtro restringe el paso del ion de acuerdo con el tamaño, carga y energía libre de hidratación del ion (Hille B, 2001). En las células cromafines, los canales de Ca^{2+} son activados fisiológicamente por el cambio de potencial que se produce durante los potenciales de acción que se propagan por toda la superficie celular. Cuando se supera el umbral de activación de estos canales, ocurre un cambio conformacional de la proteína que genera la apertura del poro. De esta forma y gracias al gradiente electroquímico del ion, los iones Ca^{2+} atraviesan el poro, generándose un influjo de este catión hacia el medio intracelular.

1.2.2 Fuentes de calcio intracelulares

Las señales de Ca^{2+} citosólicas pueden provenir no solamente de la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular a través de canales situados en la membrana plasmática. También se pueden originar de la liberación de Ca^{2+} acumulado dentro de compartimientos intracelulares. Estos compartimientos, que son organelas limitadas por membranas biológicas, básicamente contienen una bomba de Ca^{2+} que es capaz de transportar Ca^{2+} contra gradiente hacia el lumen del compartimiento, y un sistema de liberación del catión que puede ser disparado por una señal fisiológica. Dicho sistema de liberación es generalmente un canal, y la salida de Ca^{2+} al citosol se produce gracias a la energía en forma de gradiente acumulado por la bomba.

La liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares puede generar un aumento localizado en la concentración de Ca^{2+}, formándose micro o nanodominios de [Ca^{2+}] en una parte específica de la célula (Rizzuto R y Pozzan T, 2006), como también aumentos globales y sostenidos de este catión.

El retículo endoplasmático es una organela involucrada en la homeostasis del Ca^{2+} citosólico en innumerables tipos celulares (Endo M y col., 1970; Fabiato A, 1983; Pozzan T y col., 1994; Rigual R y col., 2002). Esta organela se comporta como un compartimiento de Ca^{2+} capaz de intercambiar a este catión de forma dinámica de la manera que fue definida arriba, ya que por un lado puede captarlo y almacenarlo, y por el otro también tiene la capacidad de inducir su rápida liberación hacia el citosol a través de los canales de Ca^{2+} específicos presentes en su membrana. Acumula Ca^{2+} en su lumen a través de la bomba Ca^{2+}-ATPasa del retículo sarco-endoplasmático o SERCA (Mathiasen D y col., 1993), que se localiza en la membrana de dicha organela y transporta el Ca^{2+} desde el citosol, con gasto de la energía de enlace del ATP, hacia el interior del retículo. Esta bomba posee una estequiometria óptima de 2 Ca^{2+} transportados por cada ATP hidrolizado (Villalobos C y col., 2002). La presencia de dicha bomba permite la formación de un importante gradiente de Ca^{2+} entre el lumen del retículo endoplasmático y el citosol, siendo la concentración de Ca^{2+} basal en ambos compartimentos del orden de ~500 µM (Montero M y col., 1997) y ~100 nM (Meldolesi J y Pozzan T, 1998) respectivamente. Esta organela además puede liberar el Ca^{2+} acumulado, dado que posee en su membrana canales de Ca^{2+} activables por ligando, que son regulados por mensajeros intracelulares específicos y permiten su liberación al citosol (Berridge MJ, 1993; Berridge MJ, 1997; Inue M y col., 2003). Existen dos tipos de canales activados por ligando en la membrana del retículo endoplasmático, los llamados canales activables por inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), y los receptores de rianodina.

En los primeros, el IP_3 se genera mediante la activación de la fosfolipasa C (PLC). Cuando esta proteína es activada por ciertas proteínas G o por interacción por Ca^{2+}, escinde al fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato en dos moléculas más pequeñas que actúan como segundos mensajeros (Purves D y col., 2004). Uno de ellos, el diacilglicerol, es una molécula que permanece en la membrana plasmática y activa a la PKC que a su vez fosforila a sus proteínas sustrato, tanto en la membrana plasmática como en otros lugares (Purves D y col., 2004); y el otro producto del clivaje es el IP_3, que deja la membrana plasmática, difunde en el citoplasma y se une a su receptor. El receptor de IP_3 es un canal de Ca^{2+} intracelular de cuatro subunidades activable por ligando,

(Maeda N y col., 1991) localizado principalmente en la membrana del retículo endoplasmático (Otsu H y col., 1990). Su apertura depende no sólo de la unión de varias moléculas de IP_3 (Marchant JS y Taylor CW, 1997), sino que también es regulada por el ion Ca^{2+}, que se une a distintos sitios (Taylor CW y Laude AJ, 2002). De hecho, en realidad la función principal del IP_3 es la de liberar la inhibición por Ca^{2+} del canal, que ocurre a bajas concentraciones de Ca^{2+} cuando este ion se une al sitio de inhibición, permitiendo que los sitios de activación sean los que estén ocupados por Ca^{2+}, para que de este modo el canal se abra (Mak DOD y col., 1998). Entonces dependiendo del estado del receptor, el número de moléculas de IP_3 y los iones Ca^{2+} unidos, el canal se abre y el Ca^{2+} sale del lumen del retículo hacia el citoplasma siguiendo su gradiente electroquímico (Foskett JK y col., 2007).

Por su parte, los receptores de rianodina son activados fundamentalmente por Ca^{2+} a concentraciones menores que las necesarias para activar al de IP_3 (Iino M, 1990). En consecuencia, un aumento del Ca^{2+} citosólico provocado por la activación de CCDV, puede activar por sí solo a los receptores de rianodina, conduciendo a la salida de dicho catión desde el retículo endoplasmático, y contribuyendo por lo tanto a un aumento aún mayor del Ca^{2+} citosólico. En otras palabras, este sistema actúa como un mecanismo de amplificación de la señal de Ca^{2+}. Este fenómeno, llamado "liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}", ha sido observado por primera vez en células musculares esqueléticas (Endo M y col., 1970), aunque constituye la fuente principal de Ca^{2+} en células cardíacas (Fabiato A, 1983). En estos modelos experimentales el CCDV tipo L tiene un papel preponderante en la activación de estos receptores, debido a un íntimo acople espacial entre las dos proteínas.

La disposición geométrica del retículo endoplasmático y su relación espacial con otras organelas o estructuras celulares, como por ejemplo la membrana, la mitocondria, el núcleo o las vesículas secretorias (Csordas G y Hajnoczky G, 2003; Rizzuto R y col., 1998), provoca la existencia de barreras difusivas para el Ca^{2+} que pueden favorecer tanto la activación de los receptores de rianodina como la formación de dominios de aumento localizado de este catión luego de su liberación. Por ejemplo, en el músculo cardíaco, los CCDV de tipo L se encuentran en los túbulos T formando una estructura de díada con los receptores de rianodina del retículo. Esta estructura forma un espacio de pocos nanómetros delimitado por membranas, donde el ingreso moderado de Ca^{2+} por los canales induce un gran aumento localizado de la concentración del catión que activa los receptores de rianodina (Langer GA y Peskoff A, 1996) induciendo la liberación masiva de

Ca^{2+} que provoca la contracción. En células cromafines bovinas y de ratón se demostró la existencia de un mecanismo de amplificación de la señal de Ca^{2+} a través de los receptores de rianodina (Verkhratsky A, 2002; Wu PC y col., 2010).

Otra organela involucrada en la homeostasis del Ca^{2+} es la mitocondria. Debido a la baja afinidad por Ca^{2+} de su mecanismo de recaptación, la mitocondria está bien adaptada para captar el Ca^{2+} de los microdominios locales de Ca^{2+} elevado, y por lo tanto puede actuar como un buffer local de este catión (Montero M y col., 2000). Sin embargo, esta organela no funciona como una fuente de liberación de Ca^{2+} en condiciones fisiológicas (Gunter TE y col., 1994). Luego de captar el Ca^{2+} rápidamente desde los microdominios a través de un uniporter, la mitocondria libera el Ca^{2+} al citosol más lentamente a través del intercambiador Na^{2+}/Ca^{2+} (Babcock BF y col., 1997; Gunter TE y Pfeiffer DR, 1990; Gunter TE y col., 1994), manteniendo la concentración de Ca^{2+} citoplasmática levemente aumentada, por períodos que sobrepasan la duración del estímulo (Villalobos C y col., 2002).

Finalmente, las vesículas secretorias pueden actuar también como una fuente de Ca^{2+}. La concentración de Ca^{2+} total en el lumen vesicular es de ~40 mM (Hutton JC, 1989; Winkler H y Westhead E, 1980), quedando sólo el 10% libre dentro de la vesícula ya que la mayoría de este Ca^{2+} está asociado a proteínas de la matriz vesicular (cromograninas). Los gránulos secretorios poseen mecanismos para la rápida captación y liberación de Ca^{2+} (Borges R y col., 2012). La acumulación del Ca^{2+} se produce a través de una ATPasa sensible a tapsigargina (Santo Domingo J y col., 2008). Por otro lado, la liberación de Ca^{2+} desde las vesículas ocurre tanto mediante los receptores de IP_3, como de los de rianodina (Borges R y col., 2012; Huh YH y col., 2005). Se estima que la liberación de Ca^{2+} desde las vesículas podría contribuir a su movimiento y propia liberación (Borges R y col., 2012; Camacho M y col., 2008; Santo Domingo J y col., 2008).

1.2.3 Regulación del calcio citosólico en el tiempo y el espacio celular

Luego de la entrada de Ca^{2+} al citosol desde una dada fuente, la concentración de Ca^{2+} citosólica sigue patrones espaciales y temporales complejos. Tanto en las terminales sinápticas como en las células neuroendocrinas, la fuente principal de Ca^{2+} que activa la liberación de las vesículas son los CCDV. Se ha estimado que durante la activación de los CCDV se genera un aumento localizado en la concentración de Ca^{2+} adyacente a la membrana plasmática, formándose micro o nanodominios próximos a los CCDV (Rizzuto

R y Pozzan T, 2006), que pueden alcanzar concentraciones entre 10 µM y 100 µM (Augustine GJ y Neher E, 1992; Llinas R y col., 1992; Neher E, 1998b). Específicamente en células cromafines, luego de la aplicación de despolarizaciones breves por medio de la técnica de *patch clamp* en modo *voltaje clamp*, se han detectado gradientes de Ca^{2+} próximos a la membrana plasmática medidos con indicadores fluorescentes (Augustine GJ y Neher E, 1992; Marengo FD y Monck JR, 2000). Estos gradientes de Ca^{2+} que se manifiestan inmediatamente al finalizar una despolarización breve (<5 mseg), serían una señal adecuada para disparar la exocitosis, y se disipan completamente en aproximadamente 300 mseg después de la repolarización (Marengo FD y Monck JR, 2000; Monck JR y col., 1994). En células cromafines bovinas se determinó que estos gradientes locales colocalizan con la fusión vesicular (Robinson IM y col., 1995). Después de la disipación del gradiente de Ca^{2+}, la concentración de Ca^{2+} permanece uniformemente elevada, lo que sería una señal adecuada por ejemplo para la movilización vesicular y el reclutamiento de las vesículas secretorias hacia la membrana plasmática. Luego el nivel citoplasmático de Ca^{2+} retorna lentamente a su valor basal (Marengo FD y Monck JR, 2003).

Se piensa que las fases correspondientes a la formación y disipación del gradiente están fuertemente influenciadas por la presencia de buffers citosólicos de Ca^{2+}, mientras que la caída posterior en la concentración global depende de la actividad de bombas y transportadores, tanto de la membrana plasmática como de compartimientos intracelulares (Marengo FD y Monck JR, 2003; Villalobos C y col, 2002).

Respecto a los buffers de Ca^{2+}, las células cromafines poseen sistemas endógenos, tanto fijos como móviles. Éstos son moléculas, en general proteínas, con la capacidad de unir iones Ca^{2+} con un determinado Kd, por lo que disminuyen la concentración de este ion libre en el citosol en el estado de reposo, cuando este catión se encuentra en equilibrio químico con los buffers. Además cumplen una función muy importante en estados transitorios fuera del equilibio, ya que ante la entrada de este catión desde diversas fuentes regulan tanto la intensidad, como la distribución espacial y temporal de las señales de Ca^{2+} (Marengo FD y Monck JR, 2000; Marengo FD y Monck JR, 2003; O'Sullivan AJ y col., 1989; Xu T y col., 1997; Zhou Z y Neher E, 1993). Si se compara la cantidad total de Ca^{2+} que ingresa al citosol, medida por la integral de la corriente de Ca^{2+}, con el cambio de la $[Ca^{2+}]$ intracelular obtenida del promedio espacial de la fluorescencia, se concluye que la mayoría del Ca^{2+} entrante no queda disponible en el citosol en su forma libre (Marengo FD y Monck JR, 2000). De hecho sólo entre el 0,1 y el

1% del Ca^{2+} que ingresa a la célula está libre en el citosol, mientras que la mayoría del Ca^{2+} está ligado a los buffers citosólicos (Marengo FD y Monck JR, 2000; Neher E y Augustine GJ, 1992). Como se mencionó más arriba, estos buffers modulan los perfiles espaciales y temporales de los gradientes de Ca^{2+}. Los buffers fijos (no difusibles o pobremente difusibles) restringen la disipación de los gradientes y por lo tanto favorecen su localización espacial. A su vez, la presencia de buffers móviles aceleran la disipación de los gradientes, permitiendo que estos se expandan a distancias mayores (Marengo y Monck, 2000; Neher E, 1998; Zhou Z y Neher E, 1993). Se estimó que las células cromafines tienen una contribución mayoritaria de buffers fijos sobre móviles, con una proporción de 4 a 1 en favor de los primeros (Zhou Z y Neher E, 1993). Como buffer endógeno fijo se propusieron como candidatas a varias proteínas que unen Ca^{2+}, como las anexinas, la calmodulina y calbindina (Buffa R y col., 1989; Hikita T y col., 1984).

Respecto a los mecanismos activos de remoción del Ca^{2+} citosólico, las células cromafines poseen diversos transportadores y bombas encargados de remover a este catión. La remoción de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática se debe a la operación conjunta de una Ca^{2+}-ATPasa (estequiometria $1Ca^{2+}$ / ATP) y del intercambiador $3Na^{+}/1Ca^{2+}$ (Herrington J y col., 1996; Pan CY y Kao LS, 1997). Estos dos mecanismos funcionando simultáneamente son capaces de disminuir la $[Ca^{2+}]$ citosólico a una velocidad máxima de 0,2 µM/seg en células cromafines de rata a 27°C (Park YB y col., 1996).

Otra forma de remoción de Ca^{2+} es la recaptación de este ion por el retículo endoplasmático mediante la Ca^{2+}-ATPasa presente en su membrana. De la tres isoformas que existen, en las células cromafines se detectaron dos, de pesos moleculares 116 y 100 kDa que corresponden a los subtipos SERCA 2b y SERCA 3 (Poulsen JC y col., 1995). Estas ATPasas poseen una estequiometria de 2 Ca^{2+} removidos por ATP hidrolizado (Villalobos C y col., 2002), y presentan una velocidad máxima de remoción de Ca^{2+} ubicada en un rango entre 1 y 1,5 µM/seg.

La mayoría del aumento de Ca^{2+} producido por su entrada a través de los CCDV, puede ser removido por las mitocondrias ubicadas cerca de la membrana plasmática. En células cromafines, se observó además que la mitocondria parece tener un papel importante en la remoción del Ca^{2+} citosólico, especialmente del Ca^{2+} liberado por el retículo endoplasmático desde los receptores de rianodina (Wu PC y col., 2010). Esta organela que normalmente actúa como un compartimiento intracelular de Ca^{2+} vacío, puede acumular grandes cantidades de Ca^{2+} cuando la concentración de Ca^{2+}

citoplasmático aumenta por encima de 10^{-6} M. La acumulación de Ca^{2+} en la mitocondria es usualmente transitoria, siguiendo los picos de [Ca^{2+}] citoplasmáticos que se generan durante la estimulación (Alonso MT y col., 2006; Rizzuto R y col., 2012). El Ca^{2+} es captado por esta organela a través de un mecanismo de transportador uniporter, que es un sistema de baja afinidad pero de alta capacidad (Gunter TE y Pfeiffer DR, 1990). La acumulación del Ca^{2+} en la mitocondria se debe a la fuerza impulsora generada por el potencial de membrana de la mitocondria, de entre –150 y –180 mV, que puede promover una importante acumulación de Ca^{2+} en su interior, llegando a valores de 5 – 6 órdenes de magnitud sobre el valor de reposo en ciertas condiciones particulares, en general patológicas (Bernardi P, 1999). Este mecanismo de extracción de Ca^{2+} citosólico se observó tanto en células cromafines de rata (Babcock DF y col., 1997) como de vaca (Xu T y col., 1997). La velocidad máxima de extracción se calculó en 160 µM/seg (Villalobos C y col., 2002). Los aumentos transitorios en la [Ca^{2+}] intramitocondrial participan en la regulación fina de la respiración (Gunter TE y col., 1994), ya que en esa condición se activa la NADH deshidrogenasa y de esta manera aumenta la tasa de la respiración. Esto contribuye a ajustar la síntesis de ATP, anticipándose al incremento en la demanda de energía producido por la estimulación, brindando un soporte energético local al desarrollo de la exocitosis (Villalobos C y col., 2002).

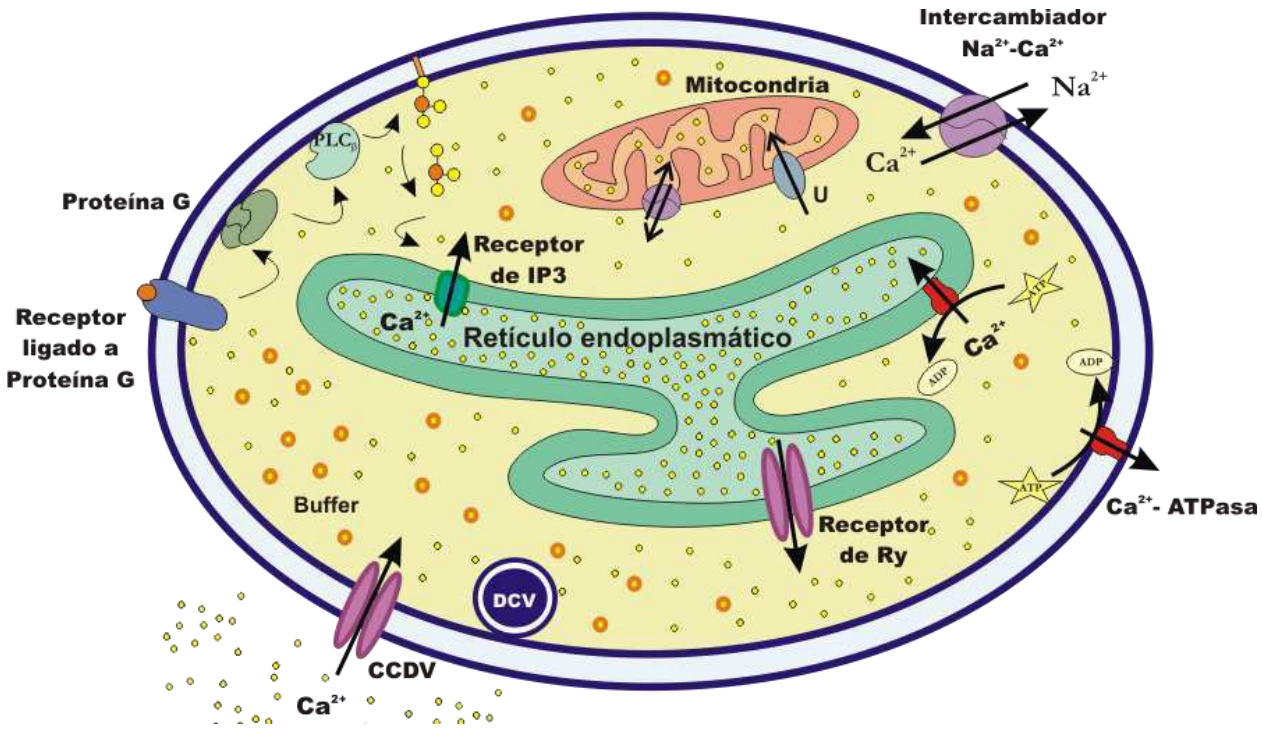

Figura 1.4 - Mecanismos involucrados en la formación y regulación de la señal de Ca^{2+}. *En resumen, el*

Ca^{2+} que ingresa por los CCDV es el responsable fundamental de la exocitosis de las vesículas secretorias. Este mismo Ca^{2+} puede potencialmente inducir la liberación de Ca^{2+} por los receptores de rianodina del retículo endoplasmático. La liberación desde el retículo endoplasmático también puede producirse por los receptores de IP_3. Los sistemas de remoción del Ca^{2+} citosólico son: la mitocondria que capta este Ca^{2+} por el uniporter (U), los mecanismos de extrusión a través de la membrana plasmática, que se deben a la operación conjunta de una Ca^{2+}-ATPasa y del intercambiador de Na^+/Ca^{2+}, y la Ca^{2+} ATPasa del retículo endoplasmático. Finalmente los buffers en el citosol regulan la intensidad y la extensión de la señal de Ca^{2+}. Figura adaptada de García AG y col., 2006.

1.3 Exocitosis en células cromafines

1.3.1 Generalidades

La exocitosis es el proceso de fusión de una vesícula lipídica intracelular a la membrana plasmática, que puede involucrar la secreción al espacio extracelular de diferentes tipos de moléculas solubles contenidas en ellas y/o la última etapa del transporte de proteínas a la membrana plasmática. Este proceso está presente en todas las células eucariotas y se genera a través de mecanismos muy conservados. Todas las células presentan una exocitosis de tipo constitutiva, que forma parte del normal reciclado de lípidos y proteínas entre la membrana plasmática y el interior de la célula. Esta exocitosis constitutiva es activa a los bajos niveles de Ca^{2+} del citosol en la célula en reposo (Jahn R y col., 2003, Sørensen JB, 2004). Por otro lado, la secreción de mensajeros químicos como neurotransmisores u hormonas, que se observa tanto en terminales nerviosas como en células endocrinas y neuroendocrinas, depende en cambio de una exocitosis finamente regulada por la [Ca^{2+}] citosólico, el cual debe superar ciertos valores críticos para activarla. Por lo tanto, para disparar este mecanismo es necesaria la elevación del Ca^{2+} intracelular, la cual se produce fundamentalmente como consecuencia de la apertura de los CCDV, fisiológicamente activados ante la propagación del potencial de acción (Augustine GJ y Neher E, 1992). Si bien las exocitosis constitutiva y la regulada por Ca^{2+} cumplen funciones distintas, los pasos que deben cumplir las vesículas antes de fusionarse son muy similares en ambos casos.

1.3.2 Etapas en el proceso de secreción

Desde el momento en que es formada hasta que es liberada, una vesícula debe pasar por muchas etapas, comenzando con la biogénesis de la vesícula en el Golgi, su posterior maduración, y siguiendo con su transporte hasta las proximidades de la membrana plasmática por el citoesqueleto (Purves D y col., 2004). Una vez que este proceso ha concluido, el primer paso que se debe cumplir para que una vesícula pueda fusionarse es el *docking, tethering,* o anclado, en el cual las vesículas se aproximan a la membrana plasmática estableciendo algún tipo de contacto con ésta. La definición de este proceso presenta contradicciones en la literatura, ya que algunos autores aplican definiciones morfológicas basándose en estudios de microscopía electrónica, mientras que otros utilizan definiciones a nivel molecular. Los primeros definen a las vesículas ancladas morfológicamente como aquellas que se localizan a una distancia de la membrana plasmática menor a la que puede discernir la técnica, o bien por la presencia de un parche de contacto entre la vesícula y la membrana plasmática que se evidencia en las micrografías electrónicas (Hammarlund M y col., 2007; Schikorski T y Stevens CF, 2001; Xu-Friedman MA y col., 2001). Sin embargo, otros autores tienen criterios menos estrictos y las definen como aquellas que se encuentran a una distancia inferior a 200 nm de la membrana plasmática (Ashery U y col., 2000), o a menos de 50 nm (Sugita S, 2008) según el autor. Por otro lado, los que utilizan definiciones a nivel molecular definen que las vesículas ancladas son aquellas en las que ciertas proteínas vesiculares interactúan con otras de la membrana plasmática. Desde un punto de vista molecular, esta etapa es crucial, ya que permite que las vesículas secretorias se anclen al compartimento celular apropiado, es decir, sitios específicos de la membrana plasmática en el caso de las DCV, o la zona activa para las vesículas sinápticas (Becherer U y Retting J, 2006).

Se han descripto varias proteínas que participarían en el anclado molecular. Munc18-1 es una proteína soluble que puede unirse a proteínas de la membrana plasmática y de las vesículas. Su deleción induce una gran reducción del número de vesículas ancladas a la membrana, y una pérdida total en la secreción en células cromafines (Voets T y col., 2001) y en células de la hipófisis (Korteweg N y col., 2005). Parece ser que la interacción entre Munc18-1 y sintaxina (localizada en la membrana plasmática) es crucial en esta etapa (Gulyás-Kovács A y col., 2007). Algunos autores también definen el anclado como una unión inicial donde participan proteínas SNARE (ver más adelante para una descripción de estas proteínas). En este caso, sostienen que el

anclado se establece entre el complejo aceptor sintaxina/SNAP25 localizado en la membrana plasmática, y la sinaptotagmina-1 localizada en la membrana vesicular (de Wit H y col., 2009; Gulyás-Kovács A y col., 2007). En células cromafines, Munc18-1 promueve la formación del complejo aceptor en una proporción 1:1 (de Wit H y col., 2009) y es capaz de determinar el número de sitios de anclado, al modular la red subcortical de actina. Además del papel de Munc18-1 en el anclado, se ha observado que esta proteína también tiene una función crítica en los eventos río abajo que llevan a la exocitosis (de Wit H y col., 2009).

En distintos tipos de células secretorias, se ha postulado que otras proteínas también estarían involucradas en el anclado de las vesículas a la membrana, como ser Rab3A, Rab27, granufilina, exofilina/Slp2a. Sin embargo, parece que éstas no serían esenciales para el anclado de las DCV en células cromafines (Ashery U y col., 2000; van Weering JRT y col., 2007). Las proteínas Rabs son pequeñas GTPasas que se ligan a la membrana de las vesículas secretorias mediante grupos hidrofóbicos ubicados en el C terminal. La Rab3 se expresa en el cerebro, asociada a vesículas sinápticas (Schlüter OM y col., 2002) y en las vesículas secretorias de las células cromafines (Lin CG y col., 1997). La proteína Rab3A, en su forma unida a GTP se inserta en la membrana vesicular y reconoce a la proteína RIM (*Rab3 interacting molecule*) en la membrana plasmática (Jahn R y col. 2003). En particular, en células cromafines, se reportó que Rab3 necesita de la asociación/disociación de fosfatos guanidina para promover el anclado de las vesículas a la membrana plasmática (Van Weering JRT y col., 2007).

Luego del anclado, las vesículas secretorias deben atravesar un proceso complejo de activación (o *priming*), que requiere ATP, Ca^{2+} y varios factores proteicos (Holz RW y col., 1989; Xu Z y col., 1998, Sørensen JB, 2004), durante el cual adquieren la capacidad de fusionarse frente a una señal de Ca^{2+} apropiada. Una de las primeras etapas de la activación es dependiente de ATP, y consiste en el reciclado de complejos SNARE. En este proceso, NSF, que es una chaperona, utiliza la energía de hidrólisis del ATP y a α-SNAP como cofactor para promover el desarmado de los complejos SNARE que quedaron en conformación CIS (en el mismo lado de la membrana plasmática) luego de un proceso de exocitosis previo. Esto permitiría la reutilización de las proteínas SNARE en un nuevo proceso de fusión (Sollner T y col., 1993; Kibble AV y col., 1996; Burgoyne RD y Morgan A, 2003). Luego de esta etapa ATP dependiente, intervienen el Ca^{2+}, Munc18, Munc13 y otras proteínas (Sørensen JB y col., 2003; Borisovska M y col., 2005), para llevar finalmente a la formación/maduración del complejo SNARE. Para la formación de este

complejo, ocurre una interacción entre las denominadas t-SNARE, las proteínas de la membrana plasmática (SNAP-25 y sintaxina), y las v-SNARE, proteínas de la membrana vesicular (sinaptobrevina) (Chen YA y Scheller RH, 2001). Si bien el complejo SNARE ya está maduro, aún falta un proceso final de "*zippering*" (ver más adelante) para que se lleve adelante la fusión.

En el caso de la exocitosis regulada por Ca^{2+}, la fusión de las vesículas ya activadas ocurrirá solamente con alta probabilidad cuando el aumento citosólico de Ca^{2+} supere cierto valor umbral (1-10 µm) en la región próxima a las vesículas (Sugita S, 2008). Para desencadenar esta etapa final de disparo se requiere de un sensor de Ca^{2+} localizado en la zona de exocitosis. El candidato en cumplir este papel, tanto para las vesículas sinápticas como para las densas, es la sinaptotagmina. Esta proteína se encuentra insertada en la membrana vesicular, y posee dos dominios citosólicos (C2A y C2B) con cuatro sitios de unión a iones Ca^{2+}. Cuando los sitios son ocupados llevan a la activación de la proteína, favoreciendo la unión de ésta a la sintaxina (Bennett MK y col., 1992), una proteína del complejo SNARE que se encuentra anclada a la membrana, y a ciertos lípidos de la cara interna de la membrana plasmática (Brose N y col., 1992). Juntamente con esto, el complejo SNARE sufre un proceso llamado *zippering* (Sutton RB y col., 1998) que es fuertemente exergónico desde el punto de vista energético, ya que se liberaría la energía potencial que fue almacenada en las proteínas SNARE durante la hidrólisis del ATP ocurrida en la activación. El *zippering* conduce a la formación de un estado *coil coiled* entre las distintas alfa hélice que forman el SNARE, empezando desde el N terminal y terminando en el C terminal (Borisovska M y col., 2005, Sørensen JB y col., 2006). Esto lleva a la aproximación de una membrana con la otra, reduciendo así la energía de activación necesaria para la fusión, que es de por sí un proceso espontáneo (Jahn R y col., 2003). La aproximación íntima de las dos membranas aumenta marcadamente la probabilidad de fusión entre ambas, llevando a la formación de un poro de fusión (Xue H y col., 2004) que se establece entre los medios extracelular e intracelular. Este proceso se realiza en dos pasos: primero las membranas se aproximan, venciendo las fuerzas electroestáticas, y luego se desestabilizan las porciones hidrofílica e hidrofóbica de la bicapa lipídica. Todas estas transiciones están gobernadas por fuerzas que minimizan la exposición de superficies no polares al medio acuoso (Chernomordik LV y col., 1987; Kozlov MM y Markin VS, 1983). La finalización de este proceso conduce a la liberación del contenido vesicular, ya sea a la brecha sináptica (en el caso de neuronas) o a la circulación sanguínea (en el caso de las células neuroendocrinas).

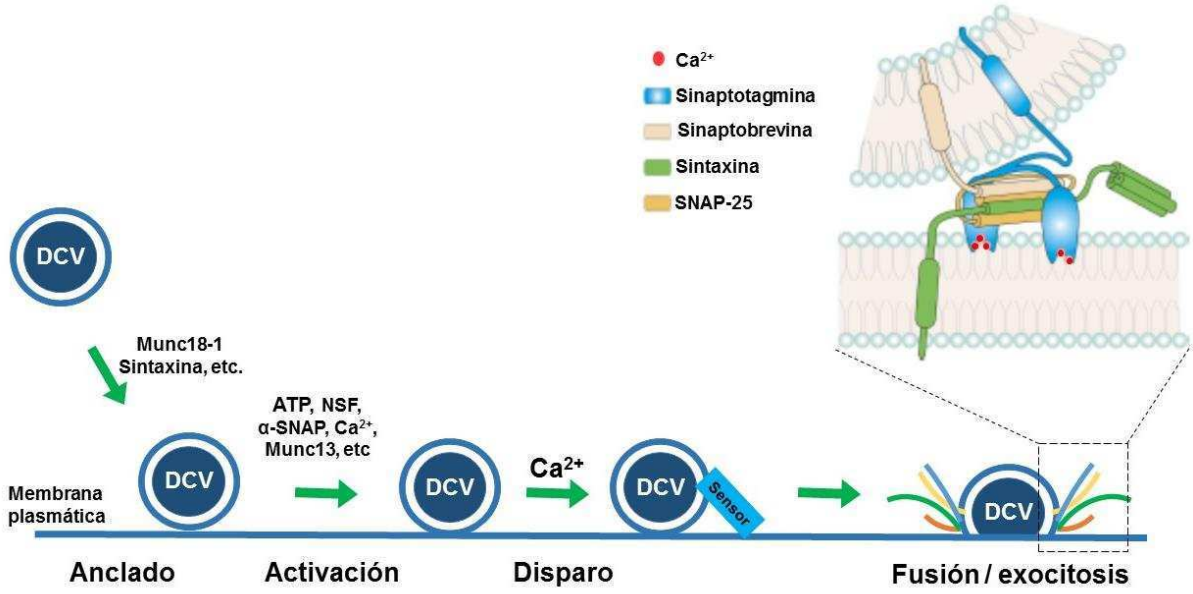

Figura 1.5 - Etapas del proceso de exocitosis. *En el anclado, la vesícula se posiciona próxima a la membrana debido al efecto de interacciones proteicas, entre las cuales estarían involucradas Munc18-1 y sintaxina. En la activación, intervienen varios factores (ATP, NSF, α-SNAP, Ca^{2+}, Munc13, etc.) que permiten que las vesículas experimenten una serie de procesos que las prepara para ser exocitadas frente a una señal de Ca^{2+} apropiada. En esta etapa ocurrirían una serie de reacciones que contribuyen a la activación de las proteínas v-SNARE (sinaptobrevina) y las proteínas t-SNARE (SNAP 25 y sintaxina), y a la consecuente alineación de las mismas. En la exocitosis regulada, ante el incremento de la [Ca^{2+}] citosólica, en este caso debido a la entrada del catión a través de canales de membrana, se produce un cambio conformacional en las proteínas del complejo SNARE. Esto lleva a que la interacción entre las mismas pase de ser débil a fuerte progresando en sentido amino a carboxi terminal (*zippering*), conduciendo a la aposición y aproximación de las membranas vesicular y plasmática que finalmente generan el poro de fusión. En el detalle se muestra un esquema del complejo SNARE, formado por la proteína vesicular sinaptobrevina y por la sintaxina y SNAP-25 localizadas en la membrana plasmática. La sintaxina y la sinaptobrevina aportan sólo un segmento, mientras que el SNAP-25 aporta dos. La sinaptotagmina es una proteína vesicular que funciona como sensor de Ca^{2+}. Esta proteína se une a fosfolípidos de membrana plasmática y a la sintaxina de manera Ca^{2+} dependiente. Diagrama modificado de Sugita S, 2008.*

1.3.3 El poro de fusión y mecanismos de exocitosis

Durante el proceso de fusión, se forma una estructura intermedia llamada poro de fusión que conecta el lumen vesicular con el espacio extracelular (Chen YA y Scheller RH, 2001). Existen dos hipótesis extremas sobre la composición del poro. Algunos autores proponen que el poro de fusión es un estructura proteica formada por las proteínas SNARE (Han X y col., 2004), mientras que otros sugieren que es una estructura lipídica

formada entre la membrana plasmática y la membrana vesicular como consecuencia de la fusión de las mismas (Nanavati C y col., 1992). Actualmente se está consolidando una versión intermedia de ambas hipótesis, que propone que el poro de fusión sería una estructura lipoproteica (Jena BP, 2015; Zhang Z y Jackson MB, 2008).

El poro de fusión es inicialmente estrecho, de menos de 3 nm (Albillos A y col., 1997), y una vez abierto puede volverse a cerrar, o bien dilatarse, conduciendo a la fusión completa de la vesícula en la membrana. El mecanismo de la expansión del poro de fusión no ha sido esclarecido aún, aunque se han propuesto algunas hipótesis. Una de las primeras hipótesis al respecto fue formulada en células en cultivo del epitelio respiratorio de la tráquea, cuyas vesículas poseen principalmente mucina (proteína aniónica de gran tamaño) y una alta concentración de iones Ca^{2+}. Las proteínas aniónicas del lumen interaccionan con los cationes, lo cual evita la repulsión entre sus cargas negativas y consecuentemente las proteínas mantienen una estructura compacta (Verdugo P y col., 1987b). En este modelo se propuso que la dilatación del poro podría ser la consecuencia de la pérdida de los iones solubles, lo que genera un aumento en la repulsión de las cargas negativas de las proteínas, que lleva a una menor compactación de las mismas (Verdugo P, 1984; Verdugo P y col., 1987a). A consecuencia de este proceso, se produciría un abultamiento de la matriz, y el consecuente ingreso de agua, constituyéndose todo este proceso como fuerza impulsora de la dilatación del poro (Verdugo P, 1991). Si bien este mecanismo fue propuesto en las células del epitelio respiratorio, también podría ocurrir en células cromafines, ya que poseen gránulos similares conteniendo cationes y proteínas cargadas negativamente (cromograninas). Se ha demostrado en mastocitos, que la inhibición de este incremento en el volumen de la matriz no evita la expansión del poro de fusión, pero sin embargo el abultamiento de la matriz sí provee la fuerza para la segunda fase de expansión que lleva al colapso total de la vesícula en la membrana plasmática (Monck JR y col., 1991). Actualmente se tienen evidencias sobre la participación de proteínas que son capaces de regular, incluso finamente, la dilatación del poro de fusión, como es el caso de la dinamina-2 (González-Jamett AM y col., 2013), de la actina cortical y de la proteína motora miosina II (Berberian K y col., 2009). A su vez, estos procesos serían regulados por factores tales como la $[Ca^{2+}]$ citosólico (Fernández-Chacón R y Álvarez de Toledo G, 1995) y la kinasa PKC (Scepek S y col., 1998).

Hay estudios que sugieren que la expansión del poro de fusión es un proceso reversible, y sólo una vez que ha alcanzado un diámetro umbral (~3-4 nm en los gránulos

cromafines) la reacción se vuelve irreversible, resultando en el colapso de la vesícula en la membrana celular (Albillos A y col., 1997; Fulop T y col., 2005; Monck JR y Fernández JM, 1992). Sin embargo, otras evidencias muestran que el gránulo puede permanecer con un poro dilatado de 7-12 nm y aun así mantenerse intacto (Liu L y col., 2005). En consonancia con esto, se ha propuesto que el poro estrecho característico (<3 nm) detectado por mediciones electrofisiológicas se puede expandir de manera regulada, actuando como un filtro para la liberación del contenido vesicular, y que sería capaz de seleccionar los compuestos liberables de acuerdo a su tamaño (Barg S y col., 2002; Fulop T y col., 2005; Kasai H y col., 2006; Perrais D y col., 2004; Taraska JW y col., 2003).

Más allá de la existencia de una regulación fina en el tamaño del poro de fusión, hoy en día se aceptan dos modelos extremos para explicar los procesos que gobiernan la exocitosis de neurotransmisores y neurohormonas bajo diferentes condiciones de estimulación. Estos son el colapso completo de la vesícula en la membrana y el *kiss & run* (figura 1.6).

(i) Colapso completo

El modelo clásico de exo-endocitosis propone que el poro de fusión se expande completamente hasta el punto en el que la vesícula colapsa en la membrana plasmática, liberando la totalidad del contenido vesicular (Rizzoli SO y Jahn R, 2007). Este proceso fue propuesto inicialmente por Heuser y Reese (1973) en placa neuromuscular de rana. Utilizando microscopía electrónica y criofractura para analizar la ultraestructura de la terminal, observaron luego de estimular a 10 Hz, una depleción de las vesículas sinápticas. Esta depleción era acompañada, primero por un aumento en la superficie de la membrana plasmática y en la cantidad de vesículas con cubierta (*coated vesicles*), y luego por la aparición de cisternas de membrana de forma irregular. Varios minutos después de la estimulación, estas últimas estructuras desaparecieron y fueron reemplazadas por nuevas vesículas sinápticas. Esto suponía una fusión total de las vesículas en la membrana, su recuperación por endocitosis de vesículas con cubierta de clatrina, la fusión de estas últimas para formar endosomas, y la posterior formación de nuevas vesículas sinápticas a partir de estos endosomas. En células cromafines, hay fuertes evidencias que este tipo de colapso completo vesicular sucede fundamentalmente cuando las células están expuestas a una estimulación intensa, como ocurre frente a una situación de estrés donde se disparan potenciales de acción a alta frecuencia (10-15 Hz) (Chan SA y Smith C, 2001, 2003; Fulop T y col., 2005; Fulop T y Smith C, 2006). Luego, la membrana vesicular

se recupera por endocitosis mediada por clatrina, para mantener constante la superficie celular y para reciclar los componentes de la membrana vesicular (Barg S y Machado JD, 2008).

(ii) Fusión transitoria (kiss & run)

Alternativamente, se ha descripto un modelo de fusión transitoria en el cual el poro de fusión permanece abierto transitoriamente y se cierra antes de su total expansión, liberando sólo una fracción del contenido vesicular (en general las moléculas pequeñas, en forma parcial o total). En este mecanismo, los componentes lipídicos y proteicos de la membrana vesicular no difunden en la membrana plasmática, y la vesícula se recupera intacta en el sitio de exocitosis (Harata NC y col., 2006). Este proceso fue propuesto por primera vez por Ceccarelli y colaboradores, también trabajando en placa neuromuscular de rana y utilizando microscopía electrónica (Ceccarelli B y col., 1973). Al estimular la terminal a 2 Hz, observaron muchas vesículas sinápticas marcadas con peroxidasa de rabanito, pero no encontraron evidencias de depleción vesicular, o de un incremento de vesículas con cubierta ni de cisternas grandes. Por lo tanto propusieron que luego de la fusión, las vesículas sinápticas se recuperan directamente desde la membrana plasmática, y que las vesículas sinápticas reformadas son capaces de almacenar y liberar neurotransmisores nuevamente. Hay evidencias importantes en células cromafines que muestran que este mecanismo prevalecería en reposo, cuando las células están expuestas a potenciales de acción a bajas frecuencias (0,5 Hz) (Fulop T y Smith C, 2006).

Se han descripto variaciones en el modelo de fusión transitoria, que recibieron diferentes nombres dependiendo de las características y de las técnicas utilizadas para describir a las mismas. En células cromafines de rata se ha observado mediante *amperometría de patch* (una técnica que permite monitorear simultáneamente la liberación de catecolaminas y los cambios en la capacitancia de membrana), eventos de fusión transitoria espontáneos descriptos como "*stand alone foot*". Los mismos están caracterizados por la baja conductividad del poro de fusión y por una lenta liberación de una pequeña fracción de adrenalina, lo cual estaría relacionado a un poro de fusión estrecho (Alés E y col., 1999). En presencia de [Ca^{2+}] más altas, se observaron eventos de fusión transitoria denominados "*fast kiss & run*", los cuales están asociados con una liberación de neurohormona más rápida y una mayor conductividad del poro, sugestivo de una mayor dilatación del poro de fusión. En este caso la cantidad de adrenalina liberada es similar a la que se libera durante los eventos de fusión completa (Alés E y col., 1999).

Finalmente, Almers y colaboradores, utilizando microscopía de campo evanescente y péptidos intravesiculares marcados diferencialmente con distintas proteínas fluorescentes, describieron un fenómeno al que denominaron "*cavicapture*". Estos autores propusieron que se producía una apertura transitoria de un poro de fusión, el cual era selectivo en cuanto a la masa molecular de los compuestos contenidos en la vesícula. De este modo se liberaban péptidos tales como el neuropéptido Y, pero se retenían otros mayores como el activador de plasminógeno (Perrais D y col., 2004).

De este modo, parece que las células neuroendocrinas pueden regular la cantidad y el tipo de transmisor que liberan durante la exocitosis al controlar la dinámica del poro de fusión. Se ha propuesto que el tipo de mecanismo de exo-endocitosis que ocurre en las células cromafines está definido en gran medida por la intensidad y duración del estímulo simpático (Fulop T y col., 2005). Así, en condiciones basales, donde las células cromafines presentan frecuencias bajas de potenciales de acción (0,2 - 0,5 Hz), se liberan pequeñas cantidades de catecolaminas a través de un poro de fusión estrecho y transitorio, lo que contribuye a mantener el estado de "*breed and feed*". En el extremo opuesto, la gran activación simpática que ocurre durante el estrés agudo favorece la dilatación del poro y la fusión completa, y en consecuencia se liberan de forma masiva las catecolaminas y los otros contenidos vesiculares incluyendo neuropéptidos, preparando al organismo para el estado de "*fight or flight*".

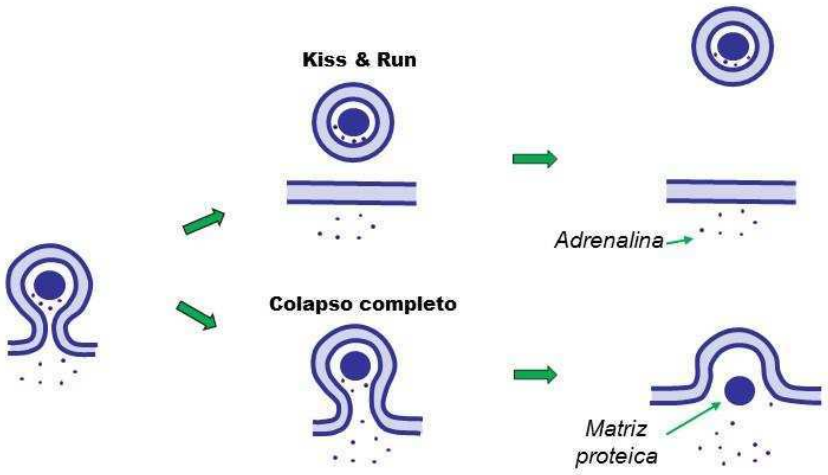

Figura 1.6 - Secuencia de eventos del mecanismo de* kiss & run *y colapso completo. *Luego de la formación del poro de la vesícula, ésta puede recuperarse sin haber perdido su identidad (kiss & run) o llegar al colapso completo. Figura modificada de Chan SA y col., 2010.*

Más allá de los dos modos de exocitosis descriptos arriba, también se observó un tercer tipo de exocitosis, llamada exocitosis compuesta, que estaría favorecida bajo condiciones de estimulación intensa (He L y col., 2009; Matthews G y Sterling P, 2008; Pickett JA y Edwardson JM, 2006).

(iii) Exocitosis compuesta

Utilizando microscopía electrónica se han encontrado evidencias de la presencia de estructuras tubulares o aproximadamente esféricas (formadas por la fusión vesícula-vesícula) en contacto con la membrana plasmática, tanto en células pancreáticas (Ichikawa A, 1965) como en otros tipos celulares (Hafez I y col., 2003; PickettJA y Edwardson JM, 2006). Además, en mastocitos, eosinófilos y cáliz, mediante mediciones de capacitancia celular se observaron saltos mucho más grandes que lo que correspondería a una vesícula, lo que sugiere la fusión de este tipo de estructuras multivesiculares preformadas (Álvarez de Toledo G y Fernández JM, 1990; He L y col., 2009; ScepekS y Lindau M, 1993). Este tipo de fusión es mecanísticamente posible debido a la presencia de las proteínas SNARE en la membrana vesicular. Se ha demostrado que al igual que en la fusión regular, la unión del Ca^{2+} con la sinaptotagmina es la que desencadena la exocitosis compuesta (He L y col., 2009). Este tipo de liberación aumenta el tamaño cuántico y la fuerza sináptica.

1.3.4 Pools vesiculares

Desde el momento en que es formada hasta que es liberada, una vesícula debe pasar por muchas etapas. Estas comienzan con la biogénesis de la vesícula en el Golgi, siguen con su transporte por el citoesqueleto y por varias etapas de maduración que implican recambios proteicos, su llenado con sustancias activas a través de transportadores específicos, su disociación del citoesqueleto, el anclado físico a la membrana plasmática y finalmente su activación y su exocitosis (Bittner MA y Holz RW, 1992; Neher E y Zucker RS, 1993). Esta compleja secuencia de procesos hace que en la célula cromafín se establezcan *pools* vesiculares que se encuentran en distintas etapas de maduración (figura 1.7), y que por lo tanto se secretan con distinta cinética temporal cuando la célula es estimulada.

La cinética temporal de la secreción de las vesículas no sólo está determinada por el grado de maduración de las mismas, sino también por su localización respecto de los canales de Ca^{2+}. Por lo tanto, para estudiar de manera limpia la presencia de estos *pools* vesiculares, es necesario en primer lugar disparar la exocitosis celular aumentando la concentración citosólica de Ca^{2+}en forma homogénea. Esto puede lograrse con la técnica de *flash photolysis* de Ca^{2+} enjaulado (Kaplan y Ellis Davies, 1988), la cual permite que no se generen gradientes de Ca^{2+}, y por lo tanto tampoco una exocitosis diferenciada por la distribución espacial de las vesículas. En segundo lugar se debe utilizar una técnica de registro de la exocitosis de alta resolución temporal, como lo es la medición de la capacitancia celular por medio de la técnica de *patch clamp* en configuración *whole cell* (Neher E y Marty A, 1982), que permita diferenciar los *pools* según su grado de madurez.

Aplicando en células cromafines las dos técnicas previamente mencionadas, se han podido observar inicialmente dos fases de exocitosis cinéticamente diferenciables entre sí: una rápida que se completa en menos de un segundo llamada "*exocytotic burst*" y otra lenta y sostenida que evoluciona por muchos segundos (Heinemann C y col., 1994). Mediciones con mayor resolución temporal permitieron identificar dentro del *exocytotic burst* dos componentes exponenciales, asociados a la existencia de dos grupos de vesículas con distintas cinéticas de liberación. Al componente más rápido del *exocytotic burst* se lo llamó *pool* de vesículas preparadas para liberarse (RRP por R*eady Releasable Pool*), y corresponde a las vesículas que han alcanzado un máximo grado de maduración. El componente más lento del *exocytotic burst* corresponde al *pool* lentamente liberable (SRP por *Slowly Releasable Pool*), conformado por gránulos que si bien han formado el complejo SNARE con la membrana, este no estaría completamente maduro, sino en una conformación distendida (Sørensen JB, 2004), pero que igualmente pueden ser liberados frente a un estímulo aunque con una cinética más lenta. Debido a que el llenado del RRP se corresponde con un vaciamiento del SRP (Voets T y col., 1999), se piensa que estos dos grupos vesiculares se ubicarían secuencialmente (Heinemman C y col., 1994; Sørensen JB, 2004; Voets T y col., 1999). El tamaño del SRP y del RRP corresponden a ~130-150 vesículas cada uno (Becherer U y Rettig J, 2006; Voets T y col., 1999), aunque existen ciertas variaciones según el preparado y el laboratorio donde fueron estimados.

Por otro lado, el componente de liberación lento y sostenido (Heinemann C y col, 1993) representa la suma de dos *pools* vesiculares (Ashery U y col, 2000): un grupo de vesículas ancladas pero que aún no han experimentado la activación y que por lo tanto no tiene ninguna capacidad de liberarse de manera directa, al cual se ha llamado *pool* no

activado (UP, por *Unprimed Pool*); y el llamado *pool* de reserva (RP, por *Reserve Pool*), el cual está formado por vesículas (~2500) que no están ni siquiera ancladas en la membrana. Tanto el UP como el RP son la reserva del SRP y RRP. Ante una elevación sostenida del Ca^{2+} citosólico, estos *pools* vesiculares deben experimentar todo el proceso de activación, o de anclado + activación antes de ser finalmente liberados.

Finalmente, al estimular eléctricamente a las células, se puede determinar que dentro del RRP hay un subgrupo de vesículas que está más próximo a los canales de Ca^{2+}, y como consecuencia más acoplado al estímulo eléctrico, el cual se denomina *pool* inmediatamente liberable (IRP, por *Immediately Releasable Pool*). Estas vesículas se fusionan muy rápidamente cuando la célula es estimulada (Horrigan F y Bookman R, 1994; Voets T y col., 1999), y están particularmente acopladas al subtipo P/Q de canales de Ca^{2+} (Álvarez YD y col., 2008). Este grupo, contiene aproximadamente 20 vesículas (~25% del RRP), y tiene una tasa de liberación 5 veces mayor que el RRP.

Estudios morfológicos y de microscopía de fluorescencia en células cromafines han demostrado que aproximadamente entre ~450-1000 vesículas se encuentran cerca de la membrana plasmática (Burgoyne RD, 1991). A esta población de vesículas se las denomina "vesículas morfológicamente ancladas", y son, como se observa en la figura 1.7, las vesículas del UP, SRP y RRP.

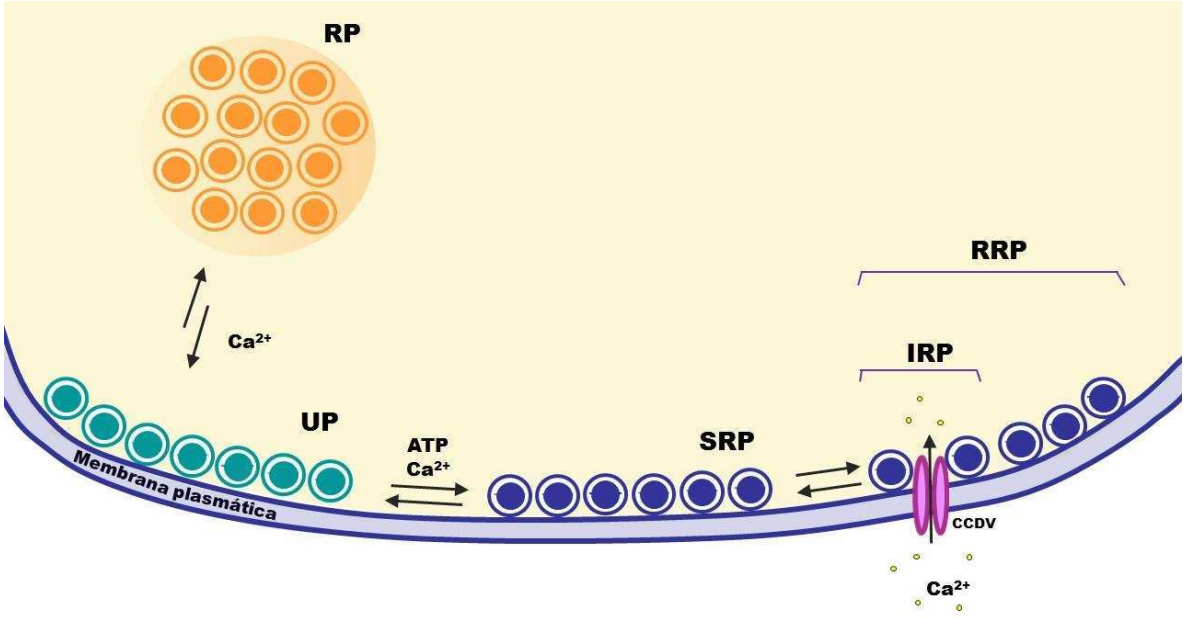

Figura 1.7 - *Diferentes pools vesiculares identificados experimentalmente en células cromafines.* *Las vesículas de las células cromafines deben pasar por distintos pasos hasta llegar a la maduración completa y poder ser liberadas. El RRP y el SRP forman parte del "*exocytotic burst*" determinado por* flash photolysis*. Las*

vesículas que están listas para ser liberadas rápidamente ante el aumento del Ca^{2+} son las que forman parte del RRP. Dentro de este pool *se diferencia un conjunto de vesículas que se encuentra más acoplado al estímulo por su proximidad a los canales de Ca^{2+}, que se denomina IRP. Las vesículas del SRP son liberadas más lentamente debido a que están en un estado de maduración incompleto. Por último las vesículas del* pool *de reserva RP y las del pool no activado o UP deben pasar por varias etapas de maduración para finalmente llegar a fusionarse.*

1.4 Endocitosis

1.4.1 Generalidades

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

La endocitosis es un proceso por el cual se producen pequeñas invaginaciones locales en la membrana plasmática, y mediante la fisión de dichas invaginaciones se forman pequeños corpúsculos intracelulares delimitados por membrana (vesículas o alternativamente cisternas o vacuolas). Por medio de este proceso de internalización de la membrana se contribuye a recuperar los niveles estacionarios de los *pools* de vesículas deprimidos por la exocitosis, y también a restaurar la superficie de la membrana plasmática y la distribución de componentes proteicos de las fracciones de membrana plasmática e intracelular.

1.4.2 Mecanismos de endocitosis

En la sección previa se mostró que las células secretorias emplean tres formas de exocitosis (colapso completo, *kiss & run*, y exocitosis compuesta) para controlar tanto la tasa de liberación como la fracción del contenido vesicular liberado, y así modular la fuerza exocitótica. Estos tres modos de exocitosis estarían acoplados a tres modos de endocitosis: endocitosis clásica mediada por clatrina, *kiss & run*, y *bulk* endocitosis,

respectivamente. Estos modos aseguran el reciclado vesicular, y el mantenimiento de la homeostasis de la membrana y de sus componentes durante las diferentes intensidades de actividad exocitótica.

(i) Endocitosis mediada por clatrina

El mecanismo de endocitosis clásica, o mediado por clatrina, ha sido descripto muy tempranamente (Murthy VN y De Camilli P, 2003; Phillips JH y col., 1983). Este mecanismo es universal en las células eucariotas y participa de diferentes procesos. De hecho, participa tanto en los procesos endocitóticos constitutivos, como en el reciclado de proteínas de la membrana plasmática, la vía de la transferrina y la endocitosis mediada por receptores (Lodish H y col., 2000). En particular, para este trabajo de tesis resulta relevante que se ha demostrado que la endocitosis de vesículas recubiertas con clatrina participa también en el reciclado de las vesículas sinápticas en las terminales nerviosas (Gad H y col., 1998; Heuser JE y Reese TS, 1973; Teng H y Wilkinson RS, 2005) y en la recuperación post-exocitótica a la fusión de vesículas secretorias en células neuroendocrinas.

Luego de que las vesículas colapsan completamente con la membrana plasmática por exocitosis, se inicia un proceso de endocitosis que internaliza una cantidad equivalente de membrana por invaginación de vesículas recubiertas de clatrina, con participación de proteínas accesorias (Smith SM y col., 2008). En sinapsis y en células neuroendocrinas este proceso ocurre en otra región de la membrana plasmática, diferente al de la exocitosis (Maxfield FR y McGraw TE, 2004). Al principio del proceso, diferentes proteínas adaptadoras como Eps15 (por *epidermal growth factor receptor substrate 15*), AP2 (por *adaptor protein complex 2*), AP180 y epsin son reclutadas hacia un sitio de la membrana plasmática rico en fosfatidil-inosotol-4,5-bisfosfato ($PI(4,5)P_2$) favoreciendo la curvatura de membrana (Ferguson SM y De Camilli P, 2012) (figura 1.8 1). Los monómeros de clatrina son reclutados, uniéndose a estas proteínas adaptadoras, y son luego ensamblados formando una cubierta fibrosa, que promueve aún más la curvatura de membrana (figura 1.8 2) y su invaginación (figura 1.8 3) (Slepnev VI y De Camilli P, 2000). Consecutivamente, proteínas como la anfifisina y PAC SIN/synadapin, actúan como sensores de curvatura a través de sus dominios BAR, y permiten el posterior reclutamiento de la dinamina a la cubierta de clatrina a través de sus dominios SH3. La interacción de estos factores accesorios con la clatrina lleva al crecimiento rápido de la cubierta de manera cooperativa, y se forma una invaginación recubierta de clatrina con un cuello

estrecho que la comunica con la membrana plasmática, y que conecta el lumen de la vesícula en formación con el espacio extracelular. Finalmente, el autoensamblamiento de la dinamina, formando un collar o espiral alrededor del cuello de la vesícula en formación, termina por mediar la fisión (Takei K y col., 2005) (figura 1.8 4).

La dinamina es una enzima con actividad GTPasa, que fue aislada por primera vez a partir de extractos cerebrales como una proteína asociada a microtúbulos (Shpetner HS y Vallee RB, 1989). Más tarde se identificó a la dinamina de mamífero como un homólogo del gen *shibire* de *Drosophila Melanogaster* (van der Bliek AM y Meyerowitz EM, 1991), cuyas mutaciones están relacionadas con un fenotipo que tiene sensibilidad a la temperatura y que genera en las moscas: parálisis, inhibición de la endocitosis y depleción de las vesículas secretorias en las terminales sinápticas (van der Bliek AM y Meyerowitz EM, 1991). Estas evidencias revelan la importancia de la dinamina durante la endocitosis y el reciclado de membrana.

La estructura primaria de la dinamina comprende cinco dominios: un dominio GTPasa amino terminal (dominio G), una región central, un dominio efector de GTPasa (GED), un dominio con homología a pleckstrina (PH) y un dominio rico en prolina y arginina carboxi terminal (PRD). La región central está asociada al ensamblaje de monómeros de dinamina (Ramachandran R y col., 2007) y une a la γ–tubulina (Thompson HM y col., 2004). El dominio GED interactúa con el dominio G, y así activa la función GTPasa del mismo (Muhlberg AB y col., 1997; Smirnova E y col., 1999). El dominio PH favorece la unión de la dinamina a fosfolípidos de inositol, como el $PI(4,5)P_2$. Por último, el dominio PRD permite que la dinamina interactúe con el dominio SH3 que poseen ciertas proteínas, la mayoría de las cuales están involucradas en la endocitosis y/o la organización de la red de actina (Ferguson SM y De Camilli P, 2012).

La polimerización de la dinamina resulta de la yuxtaposición de dímeros estables, orientados con sus dominios G en direcciones opuestas. La polimerización parece ser crítica para unir e hidrolizar el GTP, y la actividad GTPasa de la dinamina es promovida por su ensamble (Ferguson SM y De Camilli P, 2012). Se suele describir a la dinamina como una mecano enzima que cataliza la escisión de la membrana durante diferentes procesos celulares, como ser la endocitosis y el brote de las vesículas desde las membranas del Golgi (Praefcke GJ y McMahon HT, 2004). El mecanismo mediante el cual la dinamina cataliza la escisión de las membranas no está completamente esclarecido. Sin embargo, se han sugerido diferentes modelos. Uno de ellos, conocido como el "*pinchase model*", propone que la dinamina se ensambla como un collar alrededor del cuello de

membrana de las vesículas que están siendo endocitadas, y que al constreñirse por la hidrólisis del GTP aprieta el cuello vesicular favoreciendo la fisión. Otro modelo, conocido como "*poppase model*", establece que la dinamina se ensambla como una hélice, y que luego de la hidrólisis del GTP esta hélice se extiende, lo que resulta en el estiramiento del cuello y separación final de las vesículas que están siendo endocitadas. Existen evidencias que apoyan a ambos modelos (Praefcke GJ y McMahon HT, 2004). Es importante notar que se ha visto en estudios *in vitro* que la dinamina aislada y purificada puede cortar túbulos lipídicos sintéticos en presencia de GTP, y aunque *in vivo* existen otras proteínas accesorias que ayudan a completar esta acción, la dinamina es suficiente para mediar la escisión de las membranas (Ferguson SM y col., 2012).

La fisión de las vesículas recubiertas con clatrina (figura 1.8 5) es rápidamente seguida del desensamblado de clatrina (figura 1.8 6) (Maxfield FR y McGraw TE, 2004). La vesícula, sin revestimiento, luego se fusiona con endosomas, desde donde se supone que emergen las vesículas sinápticas definitivas (Murthy VN y De Camilli P, 2003). En el caso de las células cromafines, luego de la endocitosis que recicla componentes de membrana, incluidos los asociados a la exocitosis, las nuevas vesículas secretorias se deben generar aparentemente desde Golgi, ya que tienen que regenerar su núcleo proteico (Fulop T y col., 2005) (ver capítulo de Ciclado Vesicular).

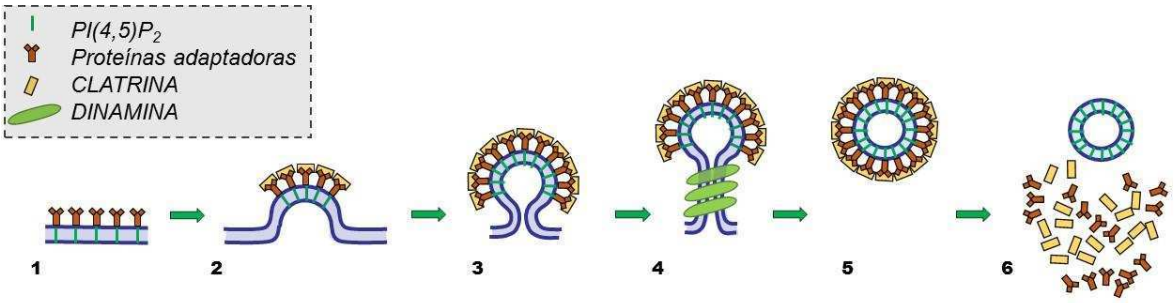

Figura 1.8 - Pasos secuenciales para la endocitosis clatrina dependiente. ***(1)*** *Ensamblado de proteínas adaptadoras en zona de la membrana plasmática rica en PI(4,5)P$_2$.* ***(2)*** *Oligomerización de los monómeros de clatrina unidos a las proteínas adaptadoras, lo cual promueve la curvatura de membrana.* ***(3)*** *La cubierta de clatrina induce la invaginación de la membrana.* ***(4)*** *Polimerización de la dinamina alrededor del cuello para mediar la fisión.* ***(5)*** *Formación de la vesícula cubierta de clatrina.* ***(6)*** *Desensamblado de la cubierta de clatrina. Esquema modificado de Slepnev VI y De Camilli P, 2000.*

¿Pero cómo es que convergen, si es que lo hacen, la vía endocitótica con la generación de nuevas vesículas por parte de Golgi? Ha sido observado desde los 80´s

que proteínas que son componentes de las vesículas secretorias exocitadas, y que se internalizan por endocitosis, transitan a través de Golgi antes de ser recicladas a nuevas vesículas secretorias (Houy S y col., 2013). Más aún, recientemente se ha reportado en células PC12 que proteínas endocitadas convergen con proteínas de secreción en endosomas de reciclado moderadamente rápido (30 seg), desde donde podrían generarse nuevas vesículas (Hoopman P y col., 2010).

(ii) Kiss & run

En este modo de endocitosis la vesícula no colapsa completamente con la membrana plasmática, sino que por el contrario el poro de fusión que se forma durante la exocitosis, luego de permanecer abierto por unos milisegundos (tiempo variable según el tipo de *kiss & run*, ver capítulo de exocitosis), se cierra rápidamente. Por lo tanto, la vesícula es recuperada directamente manteniendo su integridad (incluido el núcleo proteico) luego de la liberación (parcial o total, según el caso) del neurotransmisor. Esta vía parece ser compatible con la dinámica rápida de reciclado que presentan muchas sinapsis, y además permitiría optimizar el gasto de energía ya que se evitaría la formación de nuevas vesículas, requiriéndose sólo su rellenado con neurotransmisores.

La existencia de este mecanismo exo-endocitótico, que subsecuentemente se denominó *kiss & run* (Fesce R y col., 1994), surgió ya desde el tiempo en el que se describió por primera vez el reciclado de las vesículas sinápticas en estudios de microscopía electrónica realizados en la unión neuromuscular de rana (Ceccarelli B y col., 1973; He L y Wu LG, 2007; Heuser JE y Reese TS, 1973). Muy posteriormente, fue corroborado en forma directa usando una elegante combinación de mediciones de capacitancia y amperometría con resolución de vesícula única (Albillos A y col., 1997, Alés E y col., 1999), que mostró que los gránulos pueden liberar sus catecolaminas rápidamente a través de un pequeño poro transitorio. Como el poro no se abría completamente y el tamaño de la vesícula endocitada era similar al de la vesícula previamente exocitada, se concluyó que el poro simplemente se cierra y que el gránulo nunca colapsa en la membrana. Este mecanismo de *kiss & run* fue documentado tanto para pequeñas microvesículas sinápticas (MacDonald PE y col., 2005) como en los gránulos densos (Alés E y col., 1999, Dernick G y col., 2003). Se propuso en varios trabajos que la [Ca^{2+}] citosólica (o de otros cationes divalentes) regula la transición entre *kiss & run* y fusión completa, aunque existen contradicciones en la dirección de dicho

efecto (Alés E y col., 1999; Elhamdani A y col., 2006; Fulop T y Smith C, 2006; Nucifora PG y Fox AP, 1998).

Si bien la función clásica de la dinamina es la de mediar el cierre del poro de fusión y el consecuente corte del cuello vesicular durante la endocitosis clatrina dependiente (Newton AJ y col., 2006; Yamashita T y col., 2005), esta proteína interviene además en el *kiss & run* (Takei K y col., 2005), promoviendo tanto la expansión como el cierre del poro de fusión (González-Jammet AM y col., 2010). En coordinación con la dinamina, la actina F cortical y la miosina, también cumplirían un papel regulatorio importante en la expansión del poro (Berberian K y col., 2009; Doreian BW y col., 2008).

¿Cuáles son los mecanismos biofísicos que pueden llevar a la ocurrencia del *kiss & run*, si en realidad se espera que una bicapa lipídica tan curvada como la que tienen las vesículas se expanda espontáneamente en la membrana plasmática inmediatamente después de su fusión? Esto último ocurriría a menos que exista un mecanismo que favorezca la retención de la curvatura, oponiéndose a la natural tensión operante en la membrana vesicular. Existen claras evidencias que sugieren que durante la generación de la vesícula, la curvatura es impuesta por los componentes y accesorios de la cubierta de clatrina, aunque otros mecanismos como ser una asimetría en la bicapa lipídica o proteínas de membrana en forma de cuña no pueden ser excluidos (Farsad K y De Camilli P, 2003; Saheki Y y De Camilli P, 2012). Posteriormente, el desensamblado de la clatrina, que ocurre pocos segundos después de la formación de la vesícula (Maxfield FR y McGraw TE, 2004), dejaría como consecuencia una membrana vesicular “estresada”, propensa a aplanarse durante la exocitosis. Se propuso que los mecanismos que pueden prevenir el aplanamiento de esta membrana estresada podían llegar a ser: (1) Una fusión incompleta de las dos bicapas, con un *“flickering”* del poro de fusión que permite el escape de las moléculas pequeñas de neurotransmisor, pero que no procede hacia una fusión completa. Este proceso se midió experimentalmente en células cromafines (Albillos A y col., 1997; Fulop T y col., 2005). (2) La presencia de un collar alrededor del sitio de fusión que previene la apertura del poro. Este efecto podría llegar a ser ejercido por la dinamina (Ferguson SM y De Camilli P, 2012; Takei K y col., 2005); y (3) una estructura rígida en la zona activa de la membrana plasmática que no permita acomodar el aplanamiento de una membrana extra adicionada por la exocitosis. Se desconoce cuál de estos mecanismos participa. Otro aspecto que debe tenerse en cuenta es que en los últimos años se determinó la presencia de un entramado localizado de actina que rodea completamente a la vesícula, y la ancla a la membrana, con participación adicional del motor molecular

miosina (Berberian K y col., 2009; Doreian BW y col., 2008). Es decir que cada vez más parecería ser que la apertura del poro y su mantenimiento no es un mecanismo pasivo, sino finamente regulado donde intervienen fuerzas activas.

(iii) Bulk endocitosis

En neuronas y células neurosecretorias, el *kiss & run* y la endocitosis clatrina dependiente son mecanismos que participarían de la endocitosis en condiciones de estimulación leve o intensa, respectivamente. Por otro lado, en experimentos realizados bajo situaciones de estimulación muy intensa, lo que genera exocitosis masiva, aparece otro tipo de endocitosis, denominada *bulk* endocitosis (Holt M y col., 2003; Pérez Bay AE y col., 2007, 2012; Smith CB y Betz WJ, 1996). Esto se podría deber a que los mecanismos habituales de endocitosis tendrían saturada su capacidad de recuperar membrana, y por lo tanto serían incapaces de compensar la rápida depleción de las vesículas y el gran incremento de membrana que ocurre bajo estas condiciones.

En este mecanismo de *bulk* endocitosis, la membrana excedente es rápidamente recaptada, vía la formación de grandes invaginaciones de membrana, que luego sufren una fisión para generar vacuolas y/o cisternas intracelulares (Clayton EL y col., 2008; Hayashi M y col., 2008; Heuser JE y Reese TS, 1973; Holt M y col., 2003; Miller TM y Heuser JE, 1984; Paillart C y col., 2003; Wu W y Wu LG, 2007). Este proceso no es un mecanismo selectivo de recaptación de membrana. Sin embargo, la vacuola o cisterna resultante quedará enriquecida con proteínas típicas de la membrana de las vesículas secretorias. Esto es debido al gran aumento de estas proteínas en la membrana plasmática, como consecuencia de la exocitosis precedente (Heuser JE y Reese TS, 1973). En la presinapsis se observó que dichas vacuolas van desapareciendo subsecuentemente mientras que aparecen nuevas vesículas, lo que indica una relación entre estas organelas y las nuevas vesículas sinápticas (Clayton EL y col., 2008; Heuser JE y Reese TS, 1973; Teng H y col., 2007). Se postuló que las vesículas sinápticas generadas pueden movilizarse desde allí para rellenar los *pools* vesiculares.

La endocitosis de tipo *bulk* tendría la capacidad de compensar la membrana frente a procesos de exocitosis masiva, que de otro modo pondrían en riesgo la homeostasis de la membrana plasmática y la viabilidad celular (Betz WJ y Bewick GS, 1992; Pérez Bay AE y col., 2012). Por lo tanto, este tipo de internalización de membrana operaría de forma más notoria en condiciones de alta estimulación, donde un gran número de vesículas se

fusionan con la membrana plasmática en un intervalo de tiempo corto. Algunos autores proponen que la *bulk* endocitosis se produce en respuesta a una exocitosis de tipo compuesta (Wu LG y col., 2014).

Los mecanismos subyacentes a la *bulk* endocitosis son todavía desconocidos. Dado que es esperable que a consecuencia de la exocitosis masiva se produzca un aumento en la relación superficie-volumen, se propuso que esto forzaría a que la membrana se pliegue, llevando consecuentemente a la formación de invaginaciones profundas (Torri-Tarelli F y col., 1987). Hay ciertas proteínas de la familia BAR, particularmente la sindapina (F-Bar) (Andersson F y col., 2008; Clayton EL y col., 2009; Itoh T y De Camilli P, 2006; Wu M y col., 2010) que acoplan esa deformación de la membrana plasmática con la dinámica de polimerización/despolimerización de la red de actina (Kessels MM y Qualmann B, 2004), permitiendo la progresión de este tipo de endocitosis. El proceso de fisión de estas invaginaciones implicaría un mecanismo activo, con participación de varias proteínas, entre ellas miosina II (Gormal RS y col., 2015) y dinamina (Clayton EL y col., 2009; Evans GJ y col., 2007; Ferguson SM y De Camilli P, 2012; Nguyen TH y col., 2012).

La proteína candidata para ser el sensor de Ca^{2+} de la endocitosis de tipo *bulk* es la calcineurina (Clayton EL y col., 2009; Xue J y col., 2011), una fosfatasa Ca^{2+}-calmodulina dependiente, que desfosforila al menos ocho proteínas, llamadas desfosfinas, que son también esenciales en la endocitosis dependiente de clatrina (Cousin MA y Robinson PJ, 2001; Lee SY y col., 2005). Hay dos hechos claves para su candidatura. Primero se localiza en el citoplasma y tiene una baja afinidad micromolar por el Ca^{2+}, lo que significa que no es sensible al nivel de Ca^{2+} resultante de una actividad leve/moderada, y que sólo detecta los niveles de Ca^{2+} que se generan durante la actividad intensa. Segundo, se ha demostrado que la desfosforilación de uno de sus sustratos clave, la GTPasa dinamina 1 (que es constitutivamente fosforilada en terminales nerviosas en reposo) sólo ocurre al mismo umbral de activación de Ca^{2+} al que se activa la endocitosis de tipo *bulk* (Clayton EL y col., 2009). La desfosforilación de la dinamina 1 permite que esta proteína interactúe con sindapina (Qualmann B y col., 1999; Anggono V y col., 2006). También se postula que la calcineurina, activada por Ca^{2+}-calmodulina, sería responsable de la desfosforilación de la dinamina y la aceleración de la endocitosis dependiente de clatrina.

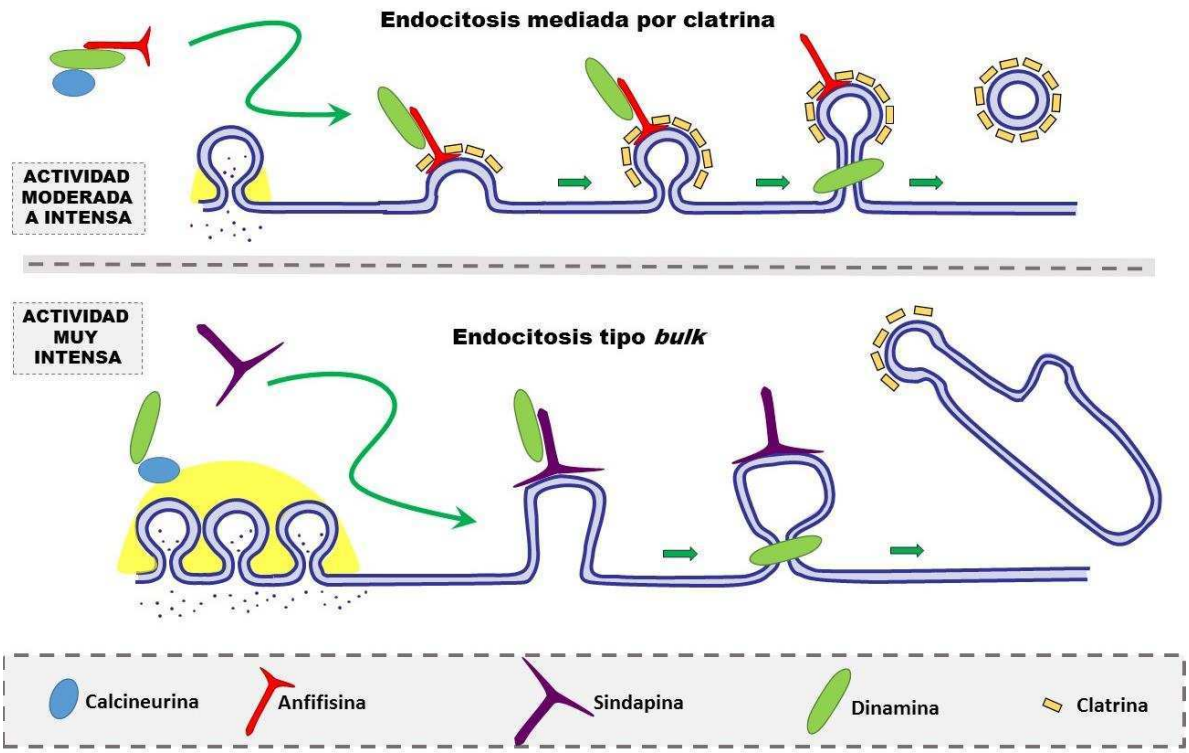

Figura 1.8 - Activación diferencial del modo de endocitosis dependiente de la actividad. *Durante la actividad moderada a intensa, los incrementos de la concentración de Ca^{2+} intracelular permiten que sólo una cierta cantidad de vesículas se fusionen con la membrana plasmática. La membrana adicionada se recupera mediante una endocitosis dependiente de clatrina, que para llevarse a cabo depende a su vez de la interacción de dinamina y anfifisina. En condiciones de actividad más intensa, el aumento de Ca^{2+} intracelular es mucho mayor, por lo que se produce una fusión masiva de vesículas. Esto genera un aumento en la relación superficie-volumen, que fuerza a que la membrana se pliegue. En esta situación, la sindapina se acopla a la deformación de la membrana plasmática, y junto con la dinamina, participan en la endocitosis de tipo* bulk. *Figura modificada de Clayton EL y Cousin MA, 2009.*

1.4.3 Caracterización cinética de la endocitosis

A partir de experimentos en tiempo real, la endocitosis también se clasificó según la velocidad a la que ocurre. Este tipo de estudios se realizaron en general aplicando la técnica de medición de capacitancia, dada su alta resolución temporal. Las primeras determinaciones de la cinética de la endocitosis fueron hechas por el grupo de Erwin Neher. Sin embargo, los primeros trabajos sistemáticos en el área fueron realizados en células cromafines bovinas en cultivo por el grupo de Clive Palfrey (Artalejo CR y col., 1995). Estos autores mostraron que frente a un estímulo intenso, como lo es un tren de despolarizaciones cuadradas de 50 mseg, se disparaba, luego de una exocitosis que

alcanzaba varios cientos de femtofaradios, una endocitosis rápida que generalmente caía más de 100 fF por debajo del valor de capacitancia previo al estímulo. Este proceso se denominó endocitosis en exceso, porque recupera una cantidad de membrana mayor a la adicionada por exocitosis (Artalejo CR y col., 1995; Neher E y Zucker RS, 1993; Thomas P y col., 1994). Esta endocitosis es resistente al lavado o *washout*, y ocurre de una manera "todo o nada" luego de una estimulación fuerte (entrada de Ca^{2+} > 70 pC (Engisch KL y Nowycky MC, 1998)), y por lo tanto no existe una clara relación entre su amplitud y la cantidad de membrana que se adiciona producto de la exocitosis precedente. La magnitud absoluta de membrana internalizada durante la endocitosis en exceso es grande: aproximadamente el 10% de la superficie total de membrana de la célula puede ser internalizada en unos pocos segundos. Este tipo de endocitosis rápida presentaba un componente exponencial al que se llamó ultra-rápido con una constante temporal de fracciones de segundo, uno rápido con una constante de aproximadamente 3 seg y finalmente uno más lento con constante temporal de 13 seg (Artalejo CR y col., 1996). En general no se presentan estos tres componentes juntos. Por su parte, Engisch y Nowycky (1998) determinaron que la endocitosis en exceso sigue una evolución temporal que se ajusta a una doble-exponencial, con una constante de 0,6 seg y otra de 6 seg. Este tipo de endocitosis resultó ser independiente de clatrina, y dependiente de GTP, dinamina, Ca^{2+} y calmodulina (Artalejo CR y col., 1995, 1996, 1997; Burgoyne RD, 1995, Nucifora PG y Fox AP, 1999).

Los grupos de Robert Burgoyne, Erwin Neher y Martha Nowycky (Burgoyne RD, 1995; Engisch KL y Nowycky MC, 1998; Smith C y Neher E, 1997) marcaron la diferencia entre la endocitosis en exceso y un tipo de endocitosis al que llamaron compensatoria. Esta última recupera una cantidad de membrana aproximadamente equivalente en área a la fusionada previamente por la exocitosis asociada. Este proceso evoluciona con una única constante temporal que depende de la [Ca^{2+}] intracelular, que va desde unos 20 seg aproximadamente cuando el estímulo es débil, hasta unos ~ 4-6 seg si la estimulación es fuerte, y es dependiente de calcineurina (Engisch KL y Nowycky MC, 1998; Smith C y Neher E, 1997). Considerando una constante de 6 seg, esta velocidad corresponde a una tasa inicial de aproximadamente 6 $fFseg^{-1}$ (que corresponde a unos ~4-5 vesículas seg^{-1}). Esta actividad endocitótica decae en pocos minutos en la configuración whole cell (Burgoyne RD, 1995; Smith C y Neher E, 1997), probablemente debido al lavado de uno o más factores proteicos citoplasmáticos esenciales hacia el electrodo de registro.

En la tabla de abajo se resumen las características que diferencian a la endocitosis en exceso de la compensatoria.

Propiedad	**Endocitosis compensatoria**	**Endocitosis en exceso**
Efecto de diálisis por whole cell [*♠]	Se pierde en ~10 minutos	Persiste
Cantidad de membrana endocitada [*Δ]	60-100 % de la membrana exocitada	Hasta más del 10% de la superficie celular
Estímulo requerido [*Δ]	Exocitosis (la entrada de Ca^{2+} aumenta la tasa)	Umbral de entrada de Ca^{2+}>70 - 90 pC, $[Ca^{2+}]i$ > 50 μm
Relación con la cantidad de exocitosis previa [*Δ]	Directamente proporcional	Ninguno
Tasa inicial [*]	6 $fFseg^{-1}$ (0,6 $\mu m^2 seg^{-1}$)	240 $fFseg^{-1}$ (24 $\mu m^2 seg^{-1}$)
Constante temporal [Δ ◊]	Mono-exponencial $\tau \approx 6$ seg	Bi-exponencial [Δ] : $\tau_1 \approx 600$ ms; $\tau_2 \approx 6 - 7$ seg Triple-exponencial [◊] : $\tau_1 \approx 300$ ms; $\tau_2 \approx 3$ seg; $\tau_3 \approx 13$ seg.

Tabla 1. ***Características de la endocitosis compensatoria y en exceso en células cromafines***. *Esta tabla contiene información basada en datos de [*]Smith C y Neher E, 1997; [♠]Burgoyne RD, 1995; [Δ]Engisch KL y Nowycky MC, 1998; [◊]Artalejo CR y col., 1996.*

Posteriormente, y sin diferenciar claramente si se estaba en presencia de una endocitosis en exceso o compensatoria, Rosa y colaboradores comprobaron nuevamente la dependencia de la endocitosis rápida con el Ca^{2+}, y determinaron que está activada preferentemente por una entrada de Ca^{2+} desde los CCDV tipo L (Rosa JM y col., 2007). Debido a esto, dichos autores propusieron que el sensor de Ca^{2+} asociado a la endocitosis estaría acoplado espacialmente a dichos canales.

Finalmente, se ha descripto un proceso de endocitosis rápida compensatoria con tiempos característicos menores al segundo, el cual se dispara luego de la aplicación de estímulos que simulan potenciales de acción (Chan SA y Smith C, 2001, Chan SA y Smith C, 2003). Este tipo de endocitosis está presente a frecuencias bajas y se inactiva a frecuencias altas de potenciales de acción (Chan SA y Smith C, 2001). Este mecanismo resultó ser independiente de clatrina y dependiente de dinamina. Una endocitosis de características cinéticas similares se ha propuesto en cáliz de Held, la cual se enlentece a altas frecuencias de estimulación (Sun JY y col., 2002). Esta inhibición a altas frecuencias se explicaría por un efecto inhibitorio del Ca^{2+} citosólico sobre la endocitosis, opuesto a lo descripto previamente para la endocitosis compensatoria convencional (Chan SA y col., 2003; von Gersdorff H y Matthews G, 1994), por lo cual se propuso que el Ca^{2+} tendría un efecto de yin y yang sobre la endocitosis (Wu XS y Wu LG, 2014).

Respecto a los mecanismos celulares involucrados en la endocitosis rápida, existen evidencias que indican que tanto el *kiss & run* como la endocitosis de tipo *bulk* pueden formar parte de la endocitosis definida cinéticamente como rápida (Cousin MA, 2009; Elhamdani A y col., 2006; Wu W y Wu LG, 2007). En general se ha asociado a la endocitosis rápida que ocurre luego de potenciales de acción con el *kiss & run* (Chan SA y col., 2005), mientras que la que ocurre luego de estímulos muy intensos que generan endocitosis en exceso ha sido relacionada con la *bulk* endocitosis (Henkel AW y Almers W, 1996; Pérez Bay AE y col., 2012). Contrariamente, la endocitosis clatrina dependiente fue clásicamente considerada por varios autores como una endocitosis lenta (Artalejo CR y col., 2002; Chan SA y Smith C, 2003; Koval LM y col, 2001). Por ejemplo, Elhamdani y colaboradores (2006) determinaron por mediciones de capacitancia una duración para este tipo de endocitosis que superaba los 10 minutos. Sin embargo, posteriormente en células beta pancreáticas, se ha encontrado un componente endocitótico que sería clatrina dependiente y que puede evolucionar con una cinética mucho más rápida, presentando constantes temporales de unos pocos segundos. Esto la emparenta con el segundo

componente descripto por Artalejo y colaboradores (He Z y col., 2008) o con la endocitosis compensatoria descripta por Engisch y Nowycky (Engisch KL y Nowycky MC, 1998).

En resumidas cuentas, no existe una clara correlación entre los mecanismos endocitóticos descriptos por técnicas de biología celular, bioquímica y molecular, con los componentes cinéticos que se presentan en mediciones de alta resolución temporal realizadas por medio del registro de la capacitancia de la membrana celular. Particularmente, en lo que se refiere a la endocitosis dependiente de clatrina, parecería que puede tener cinéticas temporales muy diferentes dependiendo de las condiciones experimentales y/o el preparado utilizado. Tampoco está claro si hay una completa diferenciación mecanística entre la endocitosis en exceso y la compensatoria. Resulta llamativo que el componente más lento de la endocitosis en exceso tenga una cinética similar a la presentada por la endocitosis compensatoria frente entradas de Ca^{2+} altas, sobre todo teniendo en cuenta que para que se dispare la primera hay que superar un cierto umbral en el influjo de Ca^{2+} a la célula. Podría ser que la endocitosis en exceso sea un proceso complejo donde intervengan varios mecanismos, incluidos los que participan en la endocitosis compensatoria.

1.5 Ciclado vesicular

El ciclado vesicular puede entenderse como un conjunto de eventos celulares que involucran la generación, movilización, maduración, fusión y recuperación de vesículas dentro de la célula (figura 1.9). Estos eventos tienen diversas implicancias en la fisiología celular, como por ejemplo: el recambio constitutivo de la membrana plasmática (Henkel AW y col., 2000), la incorporación de compuestos desde el medio extracelular necesarios para el metabolismo celular - como hierro asociado a transferrina o colesterol asociado a lipoproteínas (Galli T y Haucke V, 2004), la incorporación de proteínas señalizadoras extracelulares como factores de crecimiento (Bonifacino JS y Traub LM, 2003) o la excreción y/o secreción de compuestos producidos dentro de la célula (Verdugo P, 1990). Particularmente en células neurosecretoras y neuronas, los procesos de reciclado vesicular son importantes para el mantenimiento de los *pools* de vesículas secretorias y para el mantenimiento de la composición de la membrana plasmática, incluidas las proteínas de la maquinaria exocitótica (Heuser JE y Reese TS, 1973; Smith C y Neher E, 1997; von Grafenstein H y Knight DE, 1992). Estos *pools* son deprimidos por la exocitosis

y por lo tanto, la endocitosis, el transporte y la maduración de vesículas aseguran la provisión de nuevas vesículas competentes para la liberación, y de esta forma garantizan la confiabilidad de la transmisión de información de las células secretoras a las células blanco.

En la sección anterior (1.4 Endocitosis) se mencionaron las diferentes vías endocitóticas que existen en las células cromafines. Dado que las nuevas vesículas se originan directa o indirectamente a partir de fracciones de la membrana internalizada, la endocitosis constituye el primer paso del ciclado vesicular. Para el caso de la endocitosis mediada por clatrina, en la terminal presináptica la membrana internalizada se fusiona en endosomas, desde donde nuevas vesículas sinápticas funcionales emergen en un corto periodo de tiempo (Heuser JE y Reese TS, 1973; Koenig JH e Ikeda K, 1996; Murthy VN y De Camilli P, 2003). Sin embargo, el reciclado de las DCV en células neuroendocrinas debe seguir una vía más larga, ya que se debe recuperar la matriz de proteínas secretadas durante la exocitosis (Fulop T y col., 2005), lo cual implicaría una etapa de síntesis *de novo* en Golgi. Por lo tanto, a pesar que los tres mecanismos de endocitosis tratados previamente (clatrina dependiente, *kiss & run* y *bulk*) pueden internalizar la membrana de forma rápida, la duración del ciclo de reciclado de vesículas secretorias en células cromafines puede llevar muchos minutos, e incluso horas (Patzak A y col., 1987; Pérez Bay AE y col., 2007; von Grafenstein H y Knight DE, 1992). Se ha descripto que 30 min luego de la estimulación, parte de la inmunomarcación se localizaba en la región del Golgi y luego de 6 h fue finalmente encontrada en vesículas que eran indistinguibles de las vesículas cromafines maduras (Patzak A y Winkler H, 1986). Sin embargo, hay datos que sugieren que este proceso puede ocurrir más rápidamente. Al estudiar la recaptación de la peroxidasa de rabanito luego de la estimulación colinérgica, se halló la primera evidencia que la endocitosis de vesículas en las células cromafines puede re-incorporarse al ciclo secretorio en 5 minutos luego de finalizada la endocitosis (aproximadamente 15 minutos luego de la exocitosis) (von Grafenstein H y Knight DE, 1992). Muy posteriormente, en nuestro grupo (Pérez Bay AE y col., 2007), utilizando el fluoróforo FM1-43 para marcar membranas, se demostró que este período de reciclado puede ser mucho más corto. Más recientemente, se ha reportado en células PC12 que proteínas endocitadas convergen con proteínas de secreción en endosomas de reciclado moderadamente rápido (30 seg), desde donde podrían generarse nuevas vesículas en tiempo relativamente cortos (Hoopman P y col., 2010).

Por otro lado, la internalización directa de la vesícula que se produce en el caso del *kiss & run*, supone una ventaja fisiológica en cuanto a la velocidad y la eficiencia de la recuperación (von Grafenstein H y Knight DE, 1992), ya que deja a las vesículas secretorias con su membrana y sus núcleos proteicos intactos para otra ronda de exocitosis. Si bien las vesículas recaptadas por *kiss & run* pierden parte de sus compuestos activos pequeños, éstos son recaptados posteriormente a la endocitosis a través de transportadores de membrana. Esto les permitiría a las vesículas recicladas por esta vía experimentar varias rondas de exocitosis-endocitosis, tal como fue reportado previamente (Elhamdani A y col., 2001; Fulop T y col., 2005; von Grafenstein H y Knight DE, 1992).

Por último, como antecedente inmediato de este trabajo de tesis, en nuestro laboratorio se observó que en células cromafines de ratón una estimulación intensa y prolongada con alto potasio, que genera exocitosis masiva y endocitosis en exceso, se internaliza una importante fracción de membrana que es rápidamente (en ≤ 2 min) reciclada hacia vesículas liberables. Dicha vía de reciclado rápido tendría una capacidad limitada (~20% de la superficie de membrana), por lo que la exocitosis masiva observada es finalmente compensada por la internalización de una fracción de membrana no reciclable a vesículas liberables (Pérez Bay AE y col., 2007, 2012). Dicha fracción se concentra en endosomas de aproximadamente 600 nm de diámetro, que colocalizan con lisosomas, y que serían formados por un mecanismo de endocitosis de tipo *bulk* (Pérez Bay AE y col., 2012). La magnitud de exocitosis, endocitosis y exceso inducidos por dichas despolarizaciones con alto potasio (Pérez Bay AE y col., 2012; Tesis de Licenciatura de Ana Verónica Belingheri) son comparables a las obtenidas en este trabajo de tesis para el grupo HCG (ver sección 3.1 de resultados).

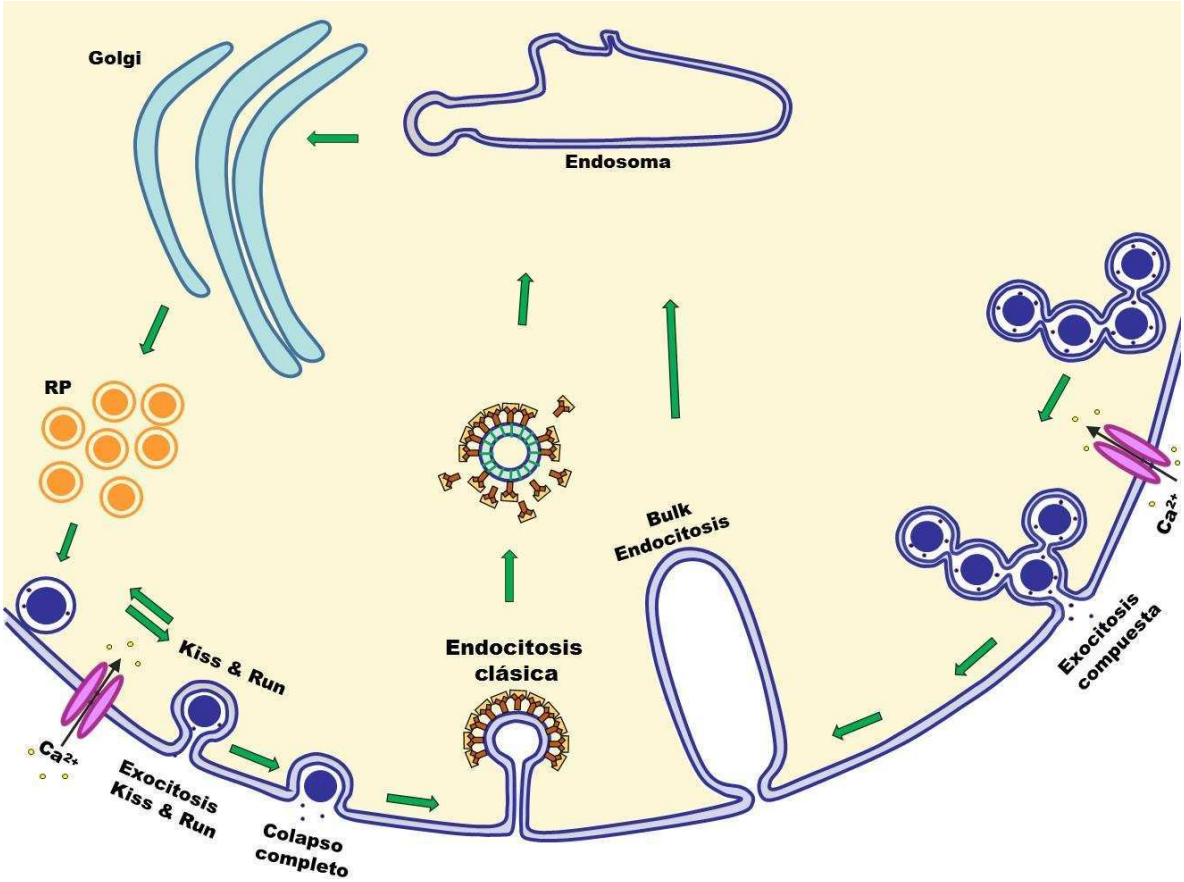

Figura 1.9 - ***Tipos de endocitosis y ciclado vesicular.*** *Las vesículas del* pool *de reserva* (RP) *son translocadas a la membrana. Una vez activadas, la entrada de* Ca^{2+} *dispara la fusión, que puede ser transitoria (kiss & run), o llevar a un colapso completo, en cuyo caso la membrana deberá recuperarse por la vía clásica dependiente de clatrina. Las vesículas endocitadas por la vía clásica pierden rápidamente sus cubiertas de clatrina y son movilizadas hacia endosomas y luego al Golgi. En condiciones de estimulación intensa, lo que genera una fusión masiva de vesículas o también el disparo de una exocitosis compuesta, la gran cantidad de membrana adicionada se puede recuperar a través de una endocitosis de tipo* bulk.

2- MÉTODOS EXPERIMENTALES

2.1 Cultivo de células cromafines de ratón

Los cultivos de células cromafines de ratón son difíciles de preparar debido a la pequeña cantidad de tejido disponible en la médula adrenal. Como consecuencia, muchos aspectos del método detallado abajo han sido pensados para minimizar la pérdida de células e incrementar el rendimiento de las mismas.

Todos los procedimientos realizados en animales fueron llevados a cabo siguiendo las normas aprobadas por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) y de acuerdo a regulaciones internacionales y locales. Se trató de minimizar el sufrimiento y la cantidad de animales utilizados.

2.1.1 Procedimiento para el cultivo

Las glándulas adrenales son obtenidas de ratones de la cepa 129/sv x C57BL/6J de entre 12 y 21 días de edad (figura 2.1). Los animales son anestesiados con una sobredosis de Avertina administrada en forma intraperitoneal en el flanco derecho del abdomen. Se comienza abriendo la cavidad peritoneal y torácica con material quirúrgico adecuado esterilizado con etanol 70 % y enjuagado con agua mQ autoclavada. Se realiza un corte en la vena cava inferior por debajo de la anastomosis con las venas renales y luego se perfunde al animal lentamente a través del ventrículo izquierdo con 10 ml de solución de Hanks previamente filtrada, oxigenada y enfriada, hasta que la sangre es lavada de las glándulas. Se remueven ambas glándulas y se las coloca en una caja de Petri estéril con solución de Hanks fría y oxigenada. Bajo lupa (40 X), se remueve la grasa circundante y se realiza cuidadosamente una disección a fin de poder retirar la zona de la corteza de la glándula, para finalmente aislar 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 los fibroblastos. La médula de la glándula adrenal es transferida a un eppendorf de 1,5 ml y luego digerida durante 20 minutos a 37ºC en solución de Hanks con papaína (1 mg /ml).

Los pasos subsiguientes del cultivo se realizan en un flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad. Se retira la solución que contiene la enzima para luego

removerla por completo mediante tres lavados sucesivos con 200 µl de medio de cultivo DMEM baja glucosa. Las médulas son luego disgregadas y llevadas a un volumen final de 300 µl. Esta suspensión de células es filtrada sucesivamente a través de mallas con poros de 200 y 50 µm.

Las células se plaquean sobre cubreobjetos cortados en cuartos pre-tratados con poli-L-lisina, y colocados de a pares en cajas de Petri de 35mm. Se las deja en estufa a 37ºC con una atmósfera de 95% O_2– 5% CO_2 durante 1 hora para permitir que las células precipiten y se adhirieran al vidrio, y luego se les adiciona 2 ml de volumen final de medio de cultivo a cada caja y se las mantiene en la estufa de cultivo hasta el día del experimento.

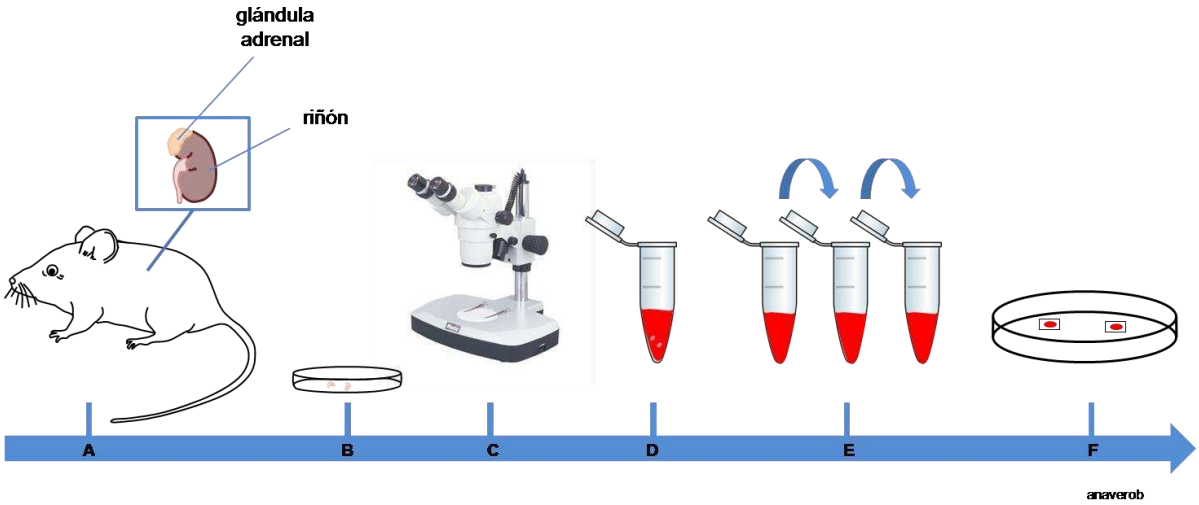

Figura 2.1 - Procedimiento que se realiza para obtener el cultivo de células cromafines. *Sintéticamente,* ***(A)*** *se anestesia al ratón y luego de perfundirlo con solución de Hanks se le extraen ambas glándulas adrenales,* ***(B)*** *y se las coloca en una caja de Petri.* ***(C)*** *Bajo lupa se remueve el tejido graso circundante y se retira la zona de la corteza.* ***(D)*** *Luego la médula es tratada con papaína.* ***(E)*** *Se lava la suspensión de células con medio de cultivo DEMEM baja glucosa, y se la filtra a través de mallas.* ***(F)*** *Se plaquean las células sobre cubreobjetos pretratados con poli-L-lisina,* ***(G)*** *y a la hora se agrega medio de cultivo y se las deja a 37ºC y 95% O_2– 5% CO_2 durante 24-48hs antes de ser utilizadas.*

Las células se utilizan para experimentación luego de 24-48 horas de cultivo. Se distinguen fácilmente de otros posibles tipos celulares contaminantes, fundamentalmente fibroblastos, por su forma aproximadamente esférica (figura 2.2), la presencia de un núcleo que ocupa una importante fracción del volumen celular y la presencia de gránulos

secretorios. Adicionalmente, otros criterios de selección durante los experimentos son la presencia de corrientes de calcio y actividad secretoria, ambas activadas por voltaje.

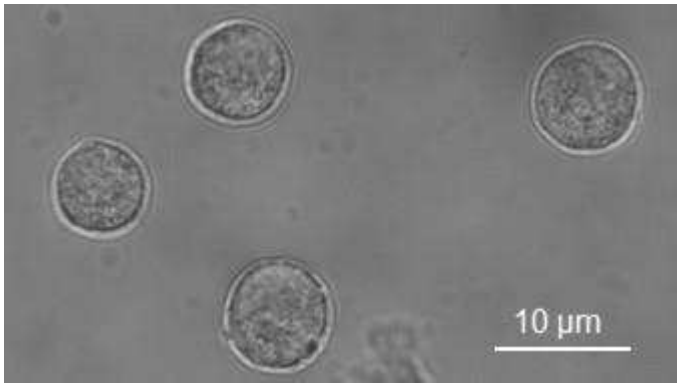

Figura 2.2 - Imagen DIC de células cromafines en cultivo tomadas con un objetivo 40X*. Las células cromafines pueden distinguirse fácilmente de los fibroblastos, eventualmente presentes en el cultivo, debido a su forma esférica, a su tamaño, a la presencia de un núcleo que ocupa un volumen importante de la célula y a su apariencia granulada característica. El diámetro promedio de estas células es de 10 µm.*

2.1.2 Soluciones utilizadas

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

Medio de cultivo: medio Eagle modificado de Dulbecco (DEMEM) baja glucosa suplementado con 5 % de suero fetal bovino, 5 µl/ml de penicilina/estreptomicina, 1,3 µl/ml de gentamicina (todos de GIBCO, Carlsbad -CA, EEUU), 1 mg/ml de seroalbúmina bovina, 10 µM de citosina-1-β-D-arabinofuranósido.

2.2 Técnica de Patch Clamp

En este trabajo se utilizó la técnica de *Patch Clamp* en configuración *whole cell* y modo *voltage clamp* para registrar las corrientes de Ca^{2+} transmembranales y los cambios de capacitancia, estos últimos asociados a procesos de exocitosis y endocitosis que se disparan luego de la activación de dichas corrientes. El método de *voltage clamp* permite fijar y controlar el potencial de membrana, y consecuentemente medir las corrientes que pasan por los canales iónicos a dichos potenciales fijos (Hodgkin AF y Huxley AL, 1952). La aplicación de esta técnica implica la introducción de al menos un microelectrodo que

esté en contacto con el medio intracelular y un electrodo de referencia en el medio extracelular. Si bien se han desarrollado diferentes alternativas para introducir un electrodo en contacto con el citosol, la técnica desarrollada en los años ´70 por Neher y Sakmann (Neher E y Sakmann B, 1976) y conocida como *Patch Clamp* es hoy en día la técnica más elegida para trabajar con la mayoría de los tipos celulares, sobre todo para células pequeñas. Si bien existen distintas configuraciones de esta técnica, el punto común a todas es la formación de un sello de alta resistencia (> 1 GΩ) entre una pipeta de vidrio, de alrededor de 1 µm de diámetro en su punta, y la membrana celular. La resistencia del sello es de crítica importancia, ya que la corriente de fuga que pueda ocurrir a través del mismo debe ser despreciable en comparación a las corrientes que queremos medir en nuestro experimento. El microelectrodo queda conformado por el conjunto de la micropipeta, que se llena con una solución electrolítica que emula al medio intracelular, y un alambre de plata clorurado. Para formar el sello se apoya la micropipeta, que debe estar limpia y pulida, sobre la superficie de la célula (membrana plasmática) y luego se aplican pulsos de presión negativa hasta alcanzar una resistencia mayor a 1 GΩ, lo que se denomina gigasello. De esta forma se obtiene la configuración denominada *cell attached* (figura 2.3 A), que permite medir la actividad de los pocos canales situados en el parche de la membrana que quedaron dentro de la punta de la pipeta con la célula intacta. Luego si se retira la pipeta de la célula, se puede lograr que el parche de membrana quede adherido en la punta de la misma, con su lado interno expuesto a la solución externa. Esta configuración, denominada *inside-out patch*, permite evaluar la actividad de los canales y su regulación por factores que actúen del lado intracelular. Una tercera configuración, *outside out*, permite estudiar las corrientes que atraviesan el parche de membrana con su lado externo mirando la solución extracelular. Sin embargo ninguna de estas tres configuraciones fue utilizada en este trabajo.

Una tercera configuración denominada *whole cell*, que es la utilizada en este trabajo de tesis, permite medir diferentes parámetros eléctricos de membrana a un nivel celular global. En nuestro caso particular, como ya dijimos, nos interesa evaluar las corrientes iónicas de membrana y los cambios de capacitancia de la misma. Para obtener esta configuración, una vez obtenida la configuración *cell attached* se impone a la membrana un potencial de *holding* similar al potencial de reposo de la célula (para las células cromafines de -80 mV – ver aclaración en sección 2.2.3 protocolos de estimulación utilizados) y luego se succiona hasta romper la sección de membrana dentro de la pipeta (figura 2.3 B). Cuando dicha sección de membrana se rompe, la solución incluida en la

pipeta ingresa al interior de la célula reemplazando la solución interna fisiológica y se forma un circuito continuo entre el electrodo y el interior de la célula. La principal resistencia entre el electrodo intracelular y el de referencia queda establecida entonces por la membrana plasmática total, donde podrán registrarse las corrientes tanto iónicas como capacitivas. Es importante preparar la solución de la pipeta intentando simular las condiciones intracelulares, pero introduciendo las modificaciones que sean convenientes a cada serie experimental. Por medio del microelectrodo se controla el potencial del lado interno de la membrana, permitiendo establecer una diferencia de potencial entre el medio intracelular y el extracelular, este último en continuidad con un electrodo de referencia conectado a tierra. Si se fija una diferencia de potencial de –80 mV entre los medios extracelulares e intracelulares (V_{intra} - V_{extra}), la membrana estará en condiciones similares al reposo. Pero si se imponen potenciales más positivos, que superen cierto valor umbral, se activarán canales dependientes del voltaje.

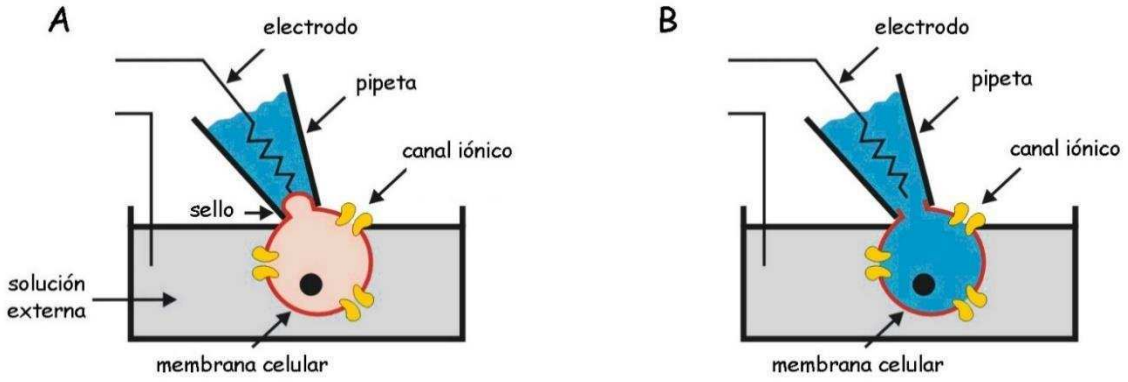

Figura 2.3 - Esquema de dos de las configuraciones de Patch Clamp. (A) *La pipeta se apoya sobre la superficie de la membrana y con presión negativa se forma el sello (configuración* cell attached*).* ***(B)*** *Se rompe la pequeña sección de la membrana contenida dentro de la punta de la pipeta y se consigue llegar a la configuración* whole cell.

2.2.1 Circuito equivalente de la célula y medición de la capacitancia de membrana

La validez de las técnicas para estimar la capacitancia de membrana depende de que el circuito equivalente eléctrico asumido se aproxime al real de la célula en la

configuración w*hole cell*. Un modelo muy simple se aplica para células pequeñas y de forma aproximadamente esférica, como lo son las células cromafines. Éste, que supone que la capacitancia de la pipeta ha sido completamente compensada, consta de un simple circuito RC, con la resistencia de acceso (R_a) en serie con un modelo celular en el que la célula se comporta eléctricamente como una resistencia (R_m) en paralelo con una capacitancia (C_m) (figura 2.4). La R_m está asociada con las resistencias que ofrecen los canales iónicos, y su valor está determinado por el número de canales y el estado de actividad de los mismos, siendo su valor en reposo del orden de 1 GΩ. Por otro lado, debido a su propiedad aislante, la bicapa lipídica se comporta como un capacitor. Dado que la capacitancia de un capacitor es proporcional a la superficie del mismo, los cambios en el área de la membrana producidos por eventos exocitóticos y/o endocitóticos pueden ser monitoreados eléctricamente como cambios de capacitancia del circuito RC. La capacitancia de la membrana plasmática es aproximadamente 1 µF/cm², suponiendo un espesor uniforme de 5 nm para la membrana y una constante dieléctrica relativa entre 2 y 3. Según valores experimentales de nuestra población celular, la capacitancia total de membrana de las células cromafines tiene un valor de entre 3 y 10 pF. La resistencia de acceso es la resultante de la resistencia de la punta de la pipeta más contribuciones de la membrana adherida a consecuencia de la ruptura del sello. El valor de esta resistencia de acceso es típicamente de alrededor de 10 MΩ (Gillis K, 1983), y los valores experimentales en nuestro laboratorio rondan los 10-20 MΩ.

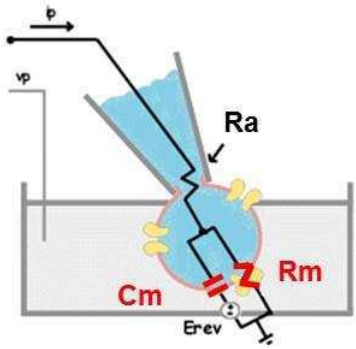

Figura 2.4 ***Circuito equivalente para una célula pequeña de forma esférica bajo configuración*** **whole cell**. *Este modelo simplificado tiene en cuenta la capacidad celular de la membrana* C_m, *la resistencia de los canales iónicos* R_m, *y de la resistencia de acceso* R_a, Vp *es el voltaje entre la pipeta y el baño (conectado a tierra) e* I_p *es la corriente que circula por la pipeta.*

Bajo este modelo, la corriente de membrana tiene una parte iónica y una capacitiva, según la siguiente ecuación:

(1)

$$I_m = I_{ion} + C_m \frac{dV}{dt}$$

Donde *V* es el potencial aplicado, C_m es la capacitancia de la membrana, I_m es la corriente que circula por la membrana, $I_{ión}$ es el componente iónico de la corriente y ($C_m \frac{dV}{dt}$) es el componente capacitivo de la corriente.

La técnica de *voltage clamp* permite, por definición, el control por parte del investigador del potencial de membrana. Si éste se mantiene constante, el segundo término de la corriente se anula (ecuación 1) y por lo tanto la corriente medida es sólo iónica. Únicamente cuando se modifica el potencial, como por ejemplo al principio y al final de la aplicación de un pulso cuadrado, la corriente capacitiva va a aportar a la corriente total pero con un transitorio de muy corta duración. Durante dicho transitorio, la corriente iónica de Ca^{2+}, de evolución mucho más lenta, casi no se ve afectada. A consecuencia de todo esto, para medir 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 mantenimiento utilizado. Estos cambios sinusoidales en el potencial eléctrico aplicado generan corrientes capacitivas continuas ($I = C_m \frac{dV}{dt}$) que son función de la capacitancia de la membrana, la cual es a su vez proporcional a la superficie de la membrana celular. Por medio de un amplificador de tipo *lock-in* o un software que cumple esa función, se separan los componentes capacitivos de los iónicos en la admitancia de la membrana, a partir de lo cual puede calcularse la capacitancia. La aplicación de este voltaje sinusoidal es suspendida durante el estímulo aplicado. Así, es posible registrar el valor de la capacitancia de membrana antes y después de un determinado estímulo.

Una de las características más ventajosas de la medición de capacitancia por la técnica de *Patch Clamp* es la alta resolución temporal con que se puede detectar la fusión vesicular y recuperación de la superficie de membrana por endocitosis (en el orden de milisegundos). Otra gran ventaja es su alta sensibilidad, pudiendo resolver cambios de 3 o 4 femtofaradios (10^{-15} F) en condiciones experimentales óptimas, lo que permite detectar la fusión simultánea de 2 o 3 vesículas.

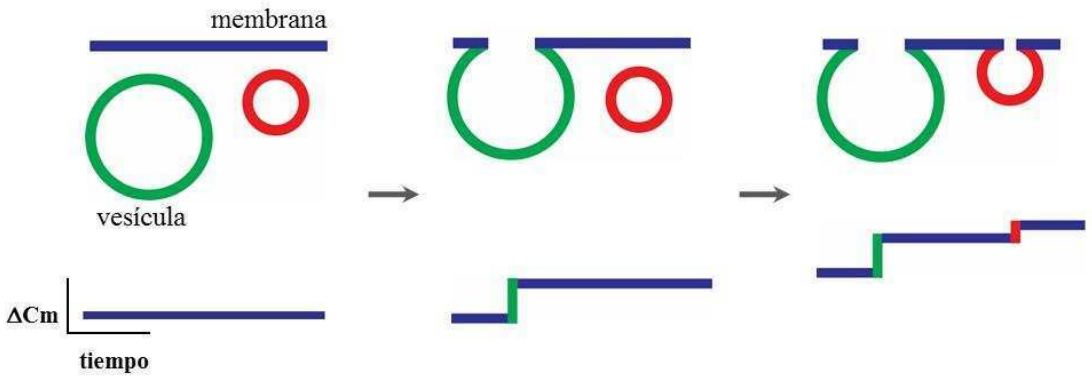

Figura 2.5 - Medición de la capacitancia celular. *Esquema donde se representan los eventos de fusión vesicular (exocitosis), y alineados temporalmente, los cambios en la capacitancia celular producidos por dichos eventos. A medida que se estimula a la célula con pulsos despolarizantes, se observa un aumento en la capacitancia celular, como consecuencia de la fusión de las vesículas con la membrana plasmática. A continuación ocurre la fisión (endocitosis), lo que se ve reflejado en la disminución de la capacitancia celular (esto último no se muestra en el esquema). En las células cromafines se estimó que el tamaño de una vesícula es de 1,3 fF (Moser T y Neher E, 1997b).*

Sin embargo, esta técnica posee algunas limitaciones:

(1) reporta la diferencia neta entre endocitosis y exocitosis. Esto no genera inconvenientes cuando la exocitosis o la endocitosis ocurren separadamente en el tiempo. Pero esta limitación se hace importante, por ejemplo, en procesos de exocitosis sostenida en el tiempo (que sigue progresando cuando la endocitosis ya comenzó). Debido a esto, algunos autores recomiendan complementar esta técnica con un método independiente que permita separar ambos procesos cuando estos ocurren simultáneamente (Smith CB y Betz WJ, 1996).

(2) requiere que las células puedan ser aproximadas como un compartimiento único para el análisis eléctrico. Las células cromafines, que utilizamos en este trabajo de tesis, son óptimas desde este punto de vista, ya que son aproximadamente esféricas y no poseen ningún tipo de neuritas o prolongaciones que puedan representar compartimientos eléctricos separados.

(3) no brinda información sobre el destino de las vesículas endocitadas.

2.2.2 Dispositivo de Patch Clamp

El dispositivo experimental utilizado está compuesto por un microscopio NIKON DIAPHOT TMD, que es el sistema óptico que permite la visualización del preparado y la fijación mecánica del mismo. Sobre plataformas acopladas a este microscopio, se encuentra montado un sistema de micromanipuladores motorizados en tres dimensiones, el cual es un sistema mecánicamente estable que permite manipular la posición del microelectrodo respecto de la célula. Completa a este *set-up* un amplificador de *Patch Clamp* EPC7 (Heka Elektronik) y un sistema conversor A/D D/A (Axon Instruments, Digidata 1200), que permiten controlar el voltaje aplicado, medir y amplificar las corrientes generadas y adquirir las mediciones durante los experimentos. Los datos crudos medidos son filtrados a 3 Hz utilizando un filtro tipo Bessel incluido en el amplificador. El software utilizado, Jclamp (Sci Soft, Branford, CT, USA), permite diseñar los protocolos de pulsos de voltaje utilizados para las mediciones, seleccionar la frecuencia de adquisición, y la frecuencia y la amplitud de la sinusoidal para evaluar la capacitancia. Contiene además el algoritmo utilizado para la evaluación de la capacitancia de membrana, y permite finalmente tanto visualizar y realizar el análisis primario de las corrientes generadas, como de los cambios de capacitancia que se producen. Se han diseñado protocolos específicos (ver abajo), que nos permitieron evaluar las corrientes de Ca^{2+} que ocurren durante los pulsos despolarizantes elegidos, y medir la evolución temporal de la capacitancia antes y después de dichos pulsos.

El microscopio está ubicado sobre una mesa anti-vibratoria para garantizar la estabilidad mecánica del sistema, y dentro de una jaula de Faraday para evitar la introducción de ruidos eléctricos externos.

2.2.3 Protocolos de estimulación utilizados

Antes de alcanzar la configuración de *whole cell* se aplica a la célula un potencial de mantenimiento o *holding* de -80 mV, que se mantiene durante el transcurso de todo el experimento exceptuando el momento donde se aplica el estímulo. Este potencial de mantenimiento es un poco más bajo que el de reposo teórico de las células cromafines, situado en aproximadamente -60 a -70 mV. En registros por *patch* perforado en células cromafines bovinas, se midió un valor del potencial de membrana de -50mv (Wallace DJ y col., 2002). El valor del potencial de mantenimiento utilizado se lo eligió para alejar lo más

posible los picos positivos de las sinusoidales aplicadas de los potenciales de activación de los CCDV. Se iniciaron las mediciones luego de aproximadamente 30 seg de haber alcanzado esta configuración.

Los protocolos para medir la capacitancia de la membrana celular (C_m) parten desde el potencial de *holding*, al que se le suma la sinusoidal que permite la estimación de la capacitancia. Por sobre el potencial de *holding* se pueden aplicar pulsos despolarizantes de formas variables (cuadrados, en rampa, que simulen potenciales de acción) para activar los canales de Ca^{2+} y en consecuencia generar exocitosis y una posterior endocitosis. Durante las despolarizaciones se suspende la aplicación de la función sinusoidal, ya que el algoritmo para la determinación de la capacitancia se indetermina en presencia de corrientes iónicas significativas. Las corrientes de membrana se registraron con una resolución temporal de 100 kHz. Dado que para el registro de la capacitancia se aplicó una sinusoide de voltaje (de amplitud ± 40 mV) con un ciclo de 3,2 mseg, y el algoritmo utilizado por el software calcula un punto por ciclo, las mediciones de capacitancia se obtuvieron con una resolución de 312,5 Hz.

En esta tesis se utilizaron dos protocolos de estimulación diferentes. En la mayor parte de este trabajo se utilizó un pulso cuadrado individual (figura 2.6 A) de 1 seg de duración desde el potencial de *holding* hasta +10 mV, mientras que en el último capítulo de resultados se estimuló a la célula por medio de despolarizaciones que se aproximan, en

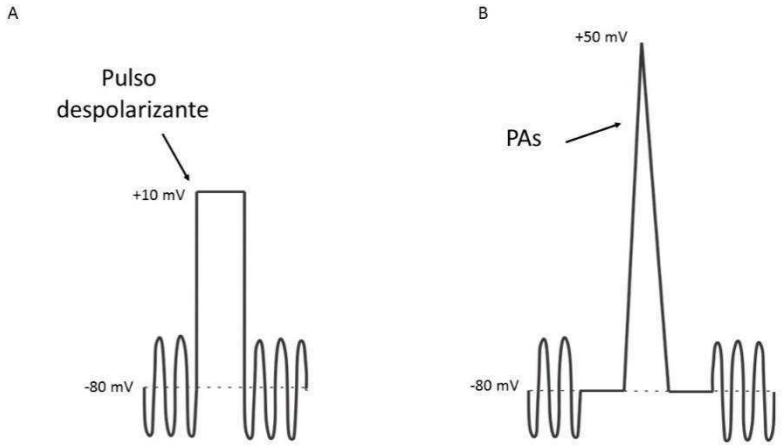

Figura 2.6 - *Protocolos de estimulación utilizados.* *En la figura se esquematiza el patrón de pulsos de voltaje aplicados para inducir la activación de corrientes de Ca^{2+}, exocitosis y endocitosis. En forma previa y posterior a los pulsos de voltaje, se puede observar la onda sinusoidal aplicada sobre el potencial de* holding*, la cual permite la medición de la capacitancia celular. En (**A**) se representa un pulso despolarizante cuadrado de 1 seg de*

duración desde el potencial de holding *hasta +10 mV. En (**B**) se representa un potencial de acción simulado o PAs. Observar la ausencia de la sinusoidal durante 5 mseg antes y después del mismo, lo cual es necesario para una mejor evaluación de la corriente iónica. El estímulo consta de un incremento del potencial desde el* holding *(-80 mV) hasta +50 mV en 2,5 mseg seguido por un descenso hasta el potencial de holding en el mismo tiempo.*

amplitud y duración, a un potencial de acción de células cromafines (Chan SA y col., 2005). A este último lo denominamos PAs (potencial de acción simulado). Cada PAs está formado por una rampa ascendente que parte del potencial de *holding* (-80 mV) y llega hasta un pico de +50 mV en 2,5 mseg, esto seguido por una rampa descendente con la misma duración que retorna al potencial de *holding* (figura 2.6 B).

2.2.4 Preparación de micropipetas

Para construir los microelectrodos de *Patch Clamp* se utilizaron capilares de borosilicato de paredes anchas de 1,5 mm de diámetro externo x 0,86 mm de diámetro interno (Sutter Instrument®). Las pipetas construidas con este tipo de capilares generan poco ruido y tienen valores bajos de capacidad parásita. Estas pipetas se construyeron con un *puller* horizontal (Sutter Instrument Co., modelo P-97), mediante un protocolo de cinco pulsos de calor y estiramiento sucesivos hasta conseguir la forma y la resistencia adecuada. Los valores de resistencia utilizados estuvieron entre 3 y 4 MΩ. Luego se les pulió la punta en una microforja sometiéndolas al calor de una resistencia durante un breve tiempo. Debido a que unaimportante fuente de ruido en las mediciones se debe a variaciones en la capacitancia parásita de las paredes de la pipeta, se cubrió la punta de la misma con un material hidrofóbico (cera odontológica dura) para reducir marcadamente este componente. Este tratamiento aumenta el ancho de la pared de la pipeta (dejando libres de 10 - 20 μm en la punta) y además evita que la solución suba por adsorción por las paredes, con lo cual se reduce su valor de capacitancia.

2.2.5 Soluciones experimentales

Tanto la solución externa como la solución introducida en la pipeta (que finalmente será la solución interna de la célula durante el experimento) deben contener los componentes necesarios para asegurar ciertas condiciones fisiológicas mínimas (concentraciones iónicas, pH, osmolaridad, ATP) durante la medición.

Para poder medir selectivamente las corrientes de Ca^{2+}, fue necesario bloquear las de K^+ y las de Na^+. Para eliminar las corrientes de K^+, este ion fue reemplazado por Cs^+ en la solución interna, manteniendo la osmolaridad y la fuerza iónica. Para bloquear las corrientes de Na^+, se agregó a la solución externa la droga tetrodotoxina, *(TTX).*

Solución interna (en mM): 23 Hepes (pH 7,2), 95 Cs- Glut, 30 CsCl, 8 NaCl, 1 $MgCl_2$, 0,5 Cs-EGTA, 2 Mg-ATP, 0.3 GTP-Li.

Solución externa (en mM): 20 Hepes (pH 7.2), 30 Glucosa, 5 $CaCl_2$, 120 NaCl, 4 $MgCl_2$, 1 TTX.

A estas soluciones se agregaron diferentes fármacos y toxinas para afectar los mecanismos bajo estudio, los cuales se detallarán oportunamente en el texto.

2.3 Técnica de imaging *utilizando el fluoróforo FM1-43.*

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un protocolo utilizando técnicas de imágenes en combinación con el fluoróforo FM1-43, que permite evaluar durante un mismo experimento y en la misma célula los niveles de exocitosis y endocitosis, y además el ciclado de la membrana internalizada hacia vesículas liberables (Pérez Bay AE y col., 2007).

La marcación de la membrana plasmática y de las vesículas internalizadas con este fluoróforo ofrece la oportunidad de adquirir información acerca de la exocitosis y la endocitosis en forma separada, no afectada por la superposición temporal de ambos eventos como ocurre en las mediciones de capacitancia. Por otro lado, permite obtener información sobre la distribución espacial y el destino de la membrana endocitada. Esta técnica no está limitada por la accesibilidad de los electrodos de *Patch Clamp*, ni por la geometría de la célula, y mantiene totalmente la integridad del medio intracelular. Sin embargo, tiene las desventajas de no poseer ni la resolución temporal de milisegundos, ni la sensibilidad que ofrece la medida de capacitancia. Por otro lado, sus estimaciones de endocitosis fundamentalmente, y en menor grado de exocitosis, pueden estar afectadas potencialmente por la exocitosis-endocitosis constitutiva no relacionada con la actividad secretoria. Sin embargo, varios controles realizados previamente por miembros del

laboratorio han demostrado que esta contribución es despreciable en los tiempos experimentales del protocolo mencionado más abajo (Pérez Bay AE y col., 2007).

2.3.1 Características del fluoróforo FM1-43

FM1-43 es una molécula que fue sintetizada por el Dr. Fei Mao de Molecular Probes, Inc (Betz WJ y col., 1992). Es parte de la gran familia de fluoróforos de tipo FM, o *styryl dyes*, que fueron en principio desarrollados como colorantes sensibles al voltaje.

El fluoróforo FM1-43 es una molécula anfipática, con una región hidrofílica o "cabeza polar" cargada positivamente en un extremo y otra hidrofóbica o "cola" compuesta por dos cadenas hidrocarbonadas en el otro (Betz WJ y Bewick GS, 1992; Betz WJ y col., 1996). La cabeza posee un grupo piridina que está unido por un puente de doble enlace a un anillo aromático, lo que constituye la parte fluorescente del colorante (figura 2.7). Este grupo fluorescente es excitado a longitudes de onda centradas en 470 nm, mientras que su emisión máxima es a 580 nm. La cola del FM1-43 es de suma importancia. Primero, es la región del fluoróforo que le permite insertarse en la hemicapa externa de la membrana plasmática de la célula, y en segundo lugar es la interacción de esta cola hidrocarbonada con la membrana plasmática lo que produce un cambio en las propiedades fluorescentes de la molécula. Cuando el indicador fluorescente se encuentra particionado en la membrana aumenta su fluorescencia hasta unas 400 veces.

Los miembros de esta familia poseen cuatro propiedades que los hacen muy útiles para el estudio de la exocitosis, la endocitosis y el tráfico de vesículas:

1) se particionan de manera reversible en la membrana, sin atravesarla;

2) no tienen la capacidad de hacer *flip-flop* por lo que nunca están libres en el citoplasma;

3) son dramáticamente más fluorescentes cuando se particionan en la membrana que en solución acuosa;

4) como consecuencia de las propiedades mencionadas arriba, cuando son internalizados por endocitosis quedan atrapados en la hemicapa interna de las membranas de las vesículas, vacuolas u otras organelas intracelulares.

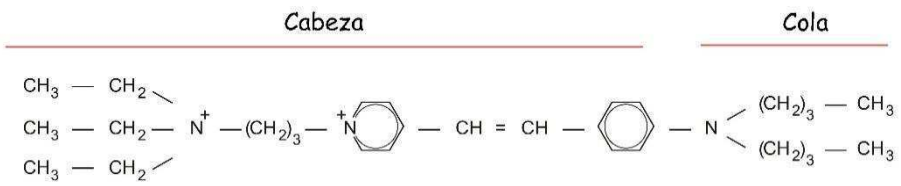

Figura 2.7 - *Estructura del FM1-43.* *Es un fluoróforo de tipo anfipático, con una región hidrofílica, o "cabeza polar", cargada positivamente en un extremo y otra hidrofóbica, o "cola", compuesta por dos cadenas hidrocarbonadas en el otro.*

Para estimar la exocitosis, la endocitosis y el ciclado vesicular durante un mismo experimento, se tuvieron en cuenta los postulados que se mencionan a continuación, los cuales se basan en el conocimiento aceptado actualmente sobre el funcionamiento del FM1-43 (ver propiedades mencionadas arriba): (a) al aplicar el fluoróforo externamente su fluorescencia aumenta dramáticamente cuando este se particiona en la membrana (sin cruzarla), siendo la fluorescencia emitida en la región que ocupa la célula proporcional a la superficie de membrana (Lagnado L y col., 1996; Smith CB y Betz WJ, 1996); (b) cuando ocurre la exocitosis, el lado interno de la membrana de las vesículas que se encuentran en el interior de la célula se pone en contacto con la solución extracelular que contiene el fluoróforo y es marcado. Por lo tanto, la cantidad de FM1-43 insertado en la membrana, y en consecuencia la señal fluorescente, aumentan proporcionalmente con la membrana adicionada. Si el FM1-43 no es lavado y se mide la fluorescencia total de la célula, es irrelevante si la membrana marcada permanece en la superficie celular o es internalizada por endocitosis, debido a que el fluoróforo permanecerá insertado en la misma y continuará contribuyendo a la fluorescencia total de la célula; (c) si se lava el fluoróforo externo, el FM1-43 previamente internalizado por endocitosis permanecerá dentro de la célula mientras que el insertado en la cara externa de la membrana será removido; (d) finalmente se puede provocar la liberación del fluoróforo internalizado induciendo un nuevo evento exocitótico.

2.3.2 Dispositivo experimental

Las células fueron colocadas en una cámara de perfusión con solución estándar, sobre la platina de un microscopio invertido Olympus IX81 preparado para mediciones de epifluorescencia convencional, y equipado con un objetivo Olympus X40 (con una apertura

numérica de 0.95). Para excitar las moléculas del fluoróforo se utilizó iluminación LED a una frecuencia centrada en 515 nm, y se midió la fluorescencia emitida entre 530 y 630 nm. Esto resultó adecuado, ya que el máximo de absorción del FM1-43 está en 479 nm, y el pico máximo del espectro de emisión está en 598 nm. Las imágenes fueron tomadas con una cámara CCD refrigerada (modelo CoolSnap HQ2, Photometrics, Tucson, AZ), y adquiridas mediante el software Metamorph versión 8.0. Se adquirieron imágenes de 512 x 512 píxeles. Para reducir el *fotobleaching* se redujo el tiempo de exposición lo máximo posible (a 100 mseg), sin afectar la calidad de las imágenes adquiridas.

2.3.3 Protocolo básico para la medición de exocitosis, endocitosis y ciclado vesicular durante un mismo experimento

El protocolo básico consta de los siguientes pasos (figura 2.8):

Incubación: con FM1-43 durante 15 minutos en solución estándar (para la composición de las soluciones utilizadas en estos experimentos ver el siguiente capítulo), que es el tiempo necesario para que la señal de fluorescencia alcance un *plateau* (ver imagen y punto I en la figura 2.8 A y Bi, respectivamente).

Estimulación (despolarización): reemplazando la solución estándar por una que contiene K^+50 mM (en reemplazo por Na^+ y manteniendo constante la osmolaridad) durante 30 seg, aún en presencia del fluoróforo. En esta tesis se aplicaron despolarizaciones de 30 seg para poder evidenciar la endocitosis en exceso. Si el tiempo de estimulación en presencia de FM-143 es mucho más prolongado, se manifiesta una exocitosis retrasada que compensa al exceso endocitótico (Pérez Bay AE y col., 2012). La despolarización con alto K^+ causa un claro incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} y una fusión masiva de las vesículas con la membrana plasmática (Pérez Bay AE y col., 2007). En consecuencia, durante este período de estimulación se observa un incremento en la fluorescencia celular (ver II en la figura 2.8 A y Bi). El aumento de la señal fluorescente ocurrido durante esta etapa se utiliza para cuantificar la exocitosis inducida por el estímulo (Exo 1).

Lavado: con solución estándar, sin FM1-43, durante 30 min. En consecuencia, el fluoróforo es removido de la membrana plasmática pero no de la fracción de membrana que había sido internalizada por endocitosis durante el período de estimulación. La señal fluorescente que permanece dentro de la célula al final de este período (ver III en la figura 2.8 A y Bi), se utiliza para cuantificar la endocitosis (Endo) que se produce como

consecuencia del proceso de exocitosis disparado por la estimulación con K^+ 50 mM durante los 30 segundos.

Segunda estimulación (despolarización): nuevamente con K^+ 50 mM pero durante 30 minutos y en ausencia del fluoróforo. El objetivo de este período es el de inducir un nuevo proceso de exocitosis, y la consecuente liberación del FM1-43 incorporado a la membrana previamente internalizada. Es importante tener en mente que solamente se liberará la fracción de membrana intracelular que se haya reciclado a vesículas listas para ser exocitadas. En consecuencia, la señal de fluorescencia celular decae (ver IV en la figura 2.8 A y Bi). Este último paso permite cuantificar a la fracción de membrana que, luego de ser internalizada por endocitosis, se recicla hacia vesículas liberables dentro del intervalo de tiempo que dura el experimento (Exo 2).

Todas las mediciones, una vez adquiridas, fueron transformadas a variaciones porcentuales respecto del punto I de la curva de la figura 2.8 Bi. Es decir, el punto I, que representa el final de la etapa de incubación con FM1-43 fue fijado como el 100%, y todos los cambios posteriores se representaron como modificaciones relativas a ese valor (ver sección 2.4.2 de este capítulo), como puede verse en la figura 2.8 Bii.

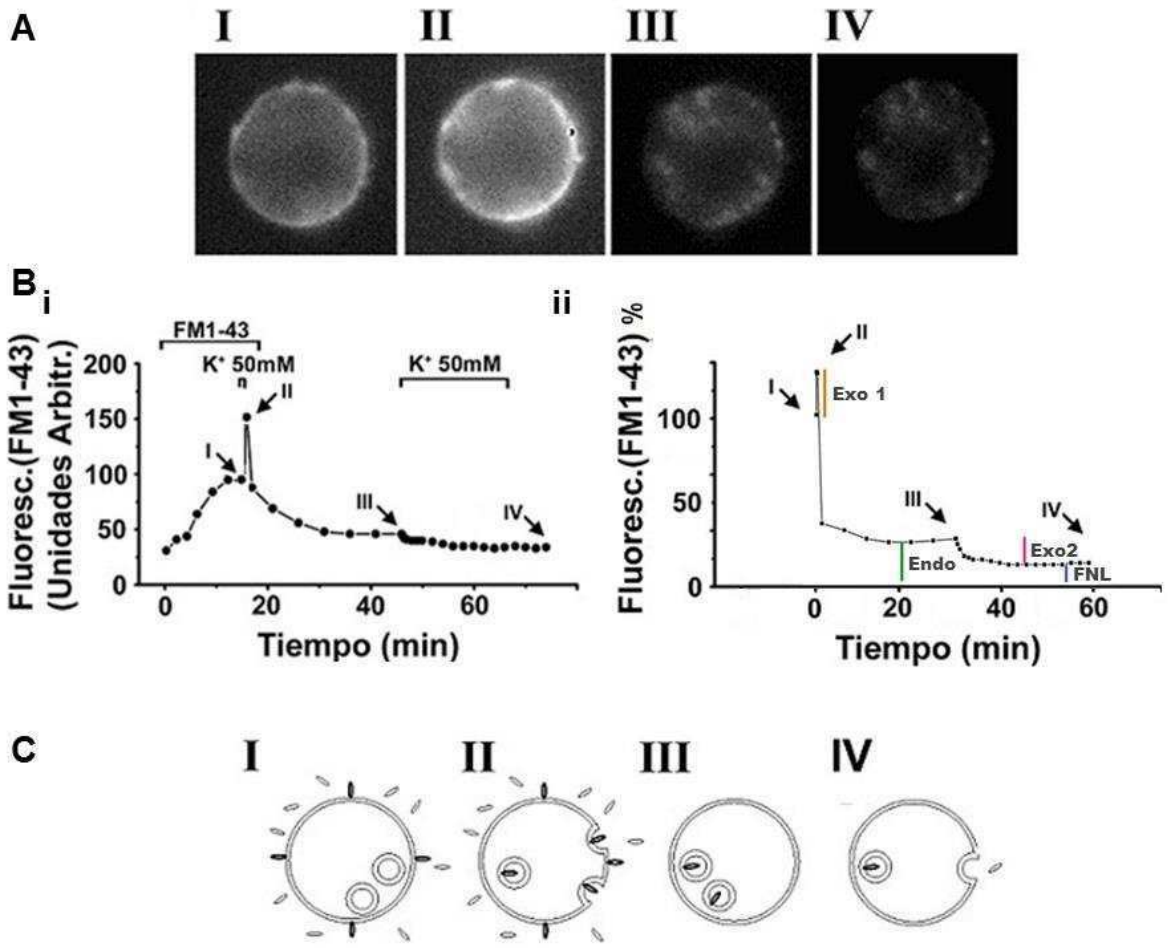

Figura 2.8 - ***Protocolo básico para la medición de exocitosis, endocitosis y ciclado vesicular en un mismo experimento y en la misma célula.*** **(A)** *Imágenes de microscopía de fluorescencia de una misma célula obtenidas al final de las siguientes etapas de un experimento típico:* ***I****: al terminar la incubación con solución estándar en presencia de FM1-43;* ***II****: al finalizar la estimulación de 30 seg con K^+50 mM en presencia del fluoróforo;* ***III****: al terminar el período de lavado realizado con solución estándar y en ausencia del fluoróforo;* ***IV****: luego de estimular por 30 min con K^+ 50 mM en ausencia del fluoróforo.* **(B)** ***(i)*** *Curso temporal de la fluorescencia asociada a FM1-43 durante el experimento mostrado en A. Las flechas indican el final de las diferentes etapas del experimento (explicadas en A).* ***(ii)*** *Curso temporal de la fluorescencia asociada a FM1-43 normalizada a los valores obtenidos al finalizar el período de incubación. Se indica con barras cada una de las cuatro fracciones de membrana estudiadas: Exo1 es la exocitosis disparada por el primer estímulo (K^+50 mM durante 30 seg), Endo corresponde a la endocitosis que se produce como consecuencia de Exo1, Exo2 representa a la exocitosis disparada por el segundo estímulo que sirve para estimar la fracción endocitada que se ha reciclado a vesículas liberables, y FNL es la fracción no liberable.* ***(C)*** *Esquema de las fracciones de membrana marcadas con FM1-43 durante las diferentes etapas del protocolo. Los óvalos representan a las moléculas de FM1-43, las cuales pueden estar en solución (línea fina) o insertadas en la membrana (línea gruesa). Figura extraída y modificada de Pérez Bay AE y col., 2007.*

2.3.4 Soluciones utilizadas

Solución Estándar (mM): 145 NaCl, 5.6 KCl, 1,2 $MgCl_2$, 10 HEPES, 2 $CaCl_2$, 10 dextrosa.

Solución de Estimulación (mM):95 NaCl, 55.6 KCl, 1,2 $MgCl_2$, 10 HEPES, 2 $CaCl_2$, 10 dextrosa.

El FM1-43 se adiciona a la Solución Estándar, a una concentración final de 5 µM, a fin de aplicarse en el período de incubación; y a la Solución de Estimulación, para utilizarse durante la estimulación 1.

2.4 Análisis de datos y estadística

2.4.1 Procesamiento de los experimentos electrofisiológicos

Los resultados fueron analizados con Microsoft Office Excel 2007, OriginPro8 (Microcal Software, Northhampton, MA) y SigmaPlot 11.0.

Solamente se tuvieron en cuenta las mediciones obtenidas en células cuya corriente de fuga (la que se mide en la configuración *whole cell* cuando la membrana está en el potencial de reposo) estuvo por debajo de los -30 pA. Esta corriente se debe en la mayoría de los casos, al flujo de iones que se produce a través del sello entre la micropipeta y la membrana, y ocurre normalmente cuando el sello es de baja calidad.

De los registros obtenidos se midieron por un lado el pico y la integral de la corriente de Ca^{2+} y por el otro, se analizó el trazado de capacitancia.

La medición del pico y el cálculo de la integral de la corriente de Ca^{2+} se realizaron de diferente forma según se tratara de un pulso cuadrado o de un PAs:

- En el caso del pulso cuadrado de 1 seg, el pico de la corriente corresponde al valor mínimo al que llega el registro, y la integral se calcula mediante la función de integración del programa Origin en el intervalo en que ocurre la corriente.

- En el caso de estimular con un PAs, con nuestro *set-up* no fuimos capaces de compensar totalmente los transitorios capacitivos celulares. En consecuencia, debido a que la corriente capacitiva es proporcional a dV/dt, se observa una corriente positiva que evoluciona durante la rampa creciente del estímulo, y una corriente negativa durante la

rampa descendente del estímulo. En presencia de Cd^{2+} en la solución externa (bloqueante general de los canales de Ca^{2+}) se obtiene una respuesta simétrica entre ambas fases de corriente capacitiva positiva y negativa. En condiciones normales (sin Cd^{2+}), la fase negativa es mucho mayor debido a la presencia de una corriente de Ca^{2+} que se activa durante ese período. La simetría mencionada entre ambas corrientes capacitivas fue utilizada para calcular las corrientes de Ca^{2+} en cada experimento, como la diferencia entre el módulo de la amplitud de la corriente descendente menos la ascendente.

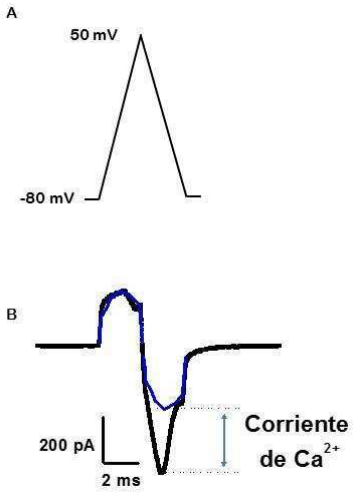

Figura 2.9 - *Análisis de la corriente de Ca^{2+} inducida por un PAs.* *En **(A)** se muestra el potencial de acción simulado (PAs) aplicado, utilizado como estímulo, que induce una **(B)** corriente compuesta (negro). En azul se muestra la corriente capacitiva positiva y negativa obtenida en presencia de Cd^{2+} en la solución externa. Para calcular la corriente de Ca^{2+} se le resta a la corriente total negativa su correspondiente corriente capacitiva.*

Del trazado de capacitancia se analizaron en primer lugar la exocitosis (***Exo***), la endocitosis (***Endo***) y la diferencia ***Endo-Exo***, que brinda información sobre si la endocitosis es compensatoria (Endo-Exo ≤ 0) o en exceso (Endo-Exo > 0); y en segundo lugar se estudiaron los parámetros cinéticos que definen la caída de capacitancia, es decir la endocitosis.

La exocitosis se obtuvo como la diferencia de capacitancia celular entre el valor máximo luego de la estimulación (ya sea por un pulso cuadrado o por un PAs) y el valor obtenido antes del estímulo, que representa el valor basal (ver barras en figuras 3.1.1 A y 3.1.2 A). Se tuvo en cuenta que después de un pulso despolarizante suele observarse un aumento de capacitancia transitorio muy veloz que no está relacionado con la fusión de vesículas, sino a las corrientes de compuerta asociadas a la desactivación de los canales de sodio (Horrigan F y Bookman R, 1994; Moser T y Neher E, 1997a). Debido a esto sólo

se midieron los cambios de capacitancia a partir de 64 mseg después de terminado el pulso.

Para calcular el valor de endocitosis se midió la amplitud entre el máximo alcanzado por la exocitosis y el mínimo alcanzado luego de completada la caída posterior (ver barras en figuras 3.1.1 A y 3.1.2 A). En los casos en los que la línea de base presentaba una pendiente, se realizó previamente un ajuste lineal en esta parte mediante el programa Origin utilizando la herramienta "*fit linear*", y se sustrajo la recta obtenida a toda la medición.

Los parámetros cinéticos de la endocitosis se obtuvieron realizando ajustes mono, o doble exponenciales (según lo que sea apropiado para el caso) de la caída de capacitancia luego de la estimulación.

La función ajustada fue la siguiente:

doble exponencial

mono exponencial

$$Y = Y_0 + A_1 e^{-(t)/\tau_1} + A_2 e^{-(t)/\tau_2}$$

Donde t es el tiempo, Y_0 es el valor asintótico de Y a tiempo infinito, A_i son las amplitudes de cada uno de los componentes, y τ_i son las constantes de tiempo.

Si bien no existe un consenso total en la bibliografía, se recurrió a los datos bibliográficos disponibles para poder clasificar en grupos bajo un criterio razonable a los parámetros cinéticos que definen el proceso de endocitosis. En general, todos los autores que estudiaron este proceso lo analizaron por medio de una suma de exponenciales simples de caída, definiendo por lo tanto un cierto número de constantes de tiempo. Artalejo (Artalejo CR y col., 1996) propone que el fenómeno de endocitosis rápida contiene tres componentes cinéticamente distinguibles, uno definido por una constante de tiempo de 0,3 seg, otro por una de 3 seg y por último uno con una constante de 13 seg aproximadamente. Sin embargo, otros autores (Engisch KL y Nowyky MC, 1998; y Smith C y Neher E, 1997) identificaron solamente dos componentes con constantes temporales de aproximadamente 0,7 y 6 seg. Por otro lado, se definió un proceso de endocitosis lenta que evoluciona con una constante temporal del orden de minutos (Artalejo CR y col.,

2002). Teniendo estos antecedentes como referencia, se realizó una clasificación de los datos en dos grupos, dependiendo del valor de τ_i:

Endocitosis ultra-rápida: entre 0 y 3,5 segundos,

Endocitosis rápida: mayor a 3,5 segundos,

Respecto del componente ultra-rápido, vale aclarar que en general, en condiciones controles, este presentó valores por debajo de 1 seg. Se toma el límite de 3,5 seg debido a que se observó que bajo ciertos tratamientos dicho componente se enlentece (llegando como máximo a un valor de 3,2 seg).

2.4.2 Procesamiento de los experimentos de imaging

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

Todos los valores experimentales se expresaron como porcentajes de la señal fluorescente registrada al final del período de incubación con FM1-43 (punto I, figura 2.8 Bi como ejemplo). Es decir, el punto I, que representa el final de la etapa de incubación con FM1-43 fue fijado como el 100%, y todos los cambios posteriores se representaron como modificaciones relativas a ese valor.

Los diferentes parámetros se determinaron de la siguiente manera:

<u>Exo1</u> se calculó mediante la diferencia de los niveles porcentuales de fluorescencia entre los puntos obtenidos al final de la etapa de estimulación (punto II, figura 2.8 Bii) y los del obtenido al final de la etapa de incubación (punto I, figura 2.8 Bii).

<u>Endo</u> fue determinado como la fluorescencia remanente al final del período de lavado (punto III, figura 2.8 Bii).

Exo2 fue determinado mediante la diferencia de los niveles porcentuales de fluorescencia entre los puntos obtenidos al final de la etapa de la segunda estimulación (punto IV, figura 2.8 Bii) y los del obtenido al final de la etapa de lavado (punto III, figura 2.8 Bii).

FNL fue determinado como la fluorescencia remanente al final de la etapa de la segunda estimulación (punto IV, figura 2.8 Bii).

2.4.3 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el programa estadístico SigmaPlot 11.0 y los resultados expresados como medias muestrales ± errores estándares. Para hacer comparaciones entre dos muestras de datos (independientes o pareadas) o entre una muestra y un valor fijo se utilizó el Test de Student correspondiente según el caso. Las comparaciones entre múltiples (más de dos) muestras independientes se realizaron mediante pruebas de análisis de varianza (ANOVA). A posteriori, se realizaron primero contrastes por el test de Holm-Sidak, que es una prueba muy potente. Para los casos que Holm-Sidak indicara la existencia de diferencias significativas, se realizaron contrastes por el método de Bonferroni, el cual es más exigente. En las leyendas se menciona explícitamente los test utilizados en cada caso. Alternativamente, cuando se compararon múltiples muestras independientes que no cumplían con los supuestos de normalidad o de homogeneidad de las varianzas, se realizó una prueba no paramétrica: prueba de Kruskal-Wallis más contrastes por el método de Dunn´s.

4.5 Reactivos y químicos

La poli-L-lisina, citosina-1-β-arabinofuranósido, papaína, albúmina sérica bovina, el ATP, GTP, la tapsigargina, rianodina, cafeína, 2-APB y Dynasore se compraron a Sigma (St Louis, MO, EEUU); el medio de cultivo Dulbecco (DMEM), el suero fetal bovino, la gentamicina, penicilina/estreptomicina, son de GIBCO® (Carlsbad, CA, EEUU). Pitstop2 es de ABCAM biochemicals®. Chlorpromazine es de Calbiochem®. El fluoróforo (FM1-43) fue adquirido a Molecular Probes® (Portland, OR, EEUU). La nitrendipina fue adquirida a Tocris Bioscience (park Ellsville, MO, EEUU) y la ω-Agatoxina IVA y TTX a Alomone Laboratories (Har Hotzvim Hi-Tech Park, Jerusalem, Israel).

1- OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Esta tesis doctoral está enmarcada en una línea de investigación de nuestro laboratorio que tiene como objetivo general el estudio de los mecanismos de endocitosis que se activan en la célula cromafín frente a las diferentes demandas generadas por la exocitosis previa. Cada mecanismo endocitótico implica una diferente velocidad de recuperación para los *pools* de vesículas liberables (Rizzoli SO y Betz WJ, 2005), y de esta recuperación depende la capacidad de la célula para responder a un nuevo estímulo. Nos interesa entender en qué contexto de estimulación se activa cada mecanismo, qué capacidad de recuperación de membrana posee cada uno de ellos, cuáles resultan en una recuperación rápida del *pool* de vesículas liberables, cuál es el papel regulador del Ca^{2+} en estos procesos, qué fuentes de Ca^{2+} pueden intervenir, y cuáles son los mecanismos moleculares intervinientes.

1.1 Objetivos particulares

En particular esta Tesis de Doctorado, se concentra en el estudio de la endocitosis rápida en células cromafines de ratón. Se pretenden evaluar los mecanismos involucrados, las fuentes de Ca^{2+} que participan en su regulación, y el reciclado vesicular asociado a la misma.

(1) El primer objetivo de esta tesis doctoral se focaliza en caracterizar el proceso de endocitosis rápida en células cromafines de ratón. Previamente al desarrollo de esta tesis doctoral, y como parte del seminario de Licenciatura en Ciencias Biológicas que realizó la autora de esta tesis, se realizó un primer abordaje al estudio de este proceso. Se utilizaron diferentes protocolos, variando tanto la duración como la cantidad de pulsos despolarizantes, con el objetivo de poder encontrar cuáles son los patrones de estimulación que desencadenan el proceso de endocitosis rápida. A partir de aquel trabajo se determinó que la aplicación de pulsos cuadrados de larga duración (0,5 seg o más) es efectiva en desencadenar este proceso. Luego, en dicho trabajo se realizó una primera clasificación de la endocitosis rápida en: (a) endocitosis compensatoria, que es cuando esta posee una magnitud similar a la exocitosis, por lo que tiende a recuperar los valores de capacitancia basales previos al estímulo; y (b) en endocitosis en exceso, que es

cuando esta es mayor a laexocitosis previa, por lo que se produce una caída de capacitancia por debajo de la línea de base inicial, lo que implica una reducción de la superficie de membrana. En este trabajo se realizó un análisis más exhaustivo de estos dos modos de endocitosis del que se había realizado en aquel momento, contando con una cantidad de datos superior, para de esta manera poder describir el comportamiento "control" de nuestras células en condiciones estándar. Logramos determinar un umbral de entrada de Ca^{2+} que cuando es superado la endocitosis pasa de "compensatoria" a "exceso".

(2) El segundo objetivo que nos propusimos fue estudiar la dependencia de la endocitosis rápida con la corriente de Ca^{2+} y la liberación de Ca^{2+} desde fuentes intracelulares.

En términos generales, se podría decir que la activación de los CCDV produce en primer lugar una señal de Ca^{2+} localizada en la región aledaña a la membrana plasmática, mientras que en un plazo de tiempo mayor (> 200 mseg), luego de que estos gradientes se han prácticamente disipado, prevalece una señal global aproximadamente homogénea en todo el citosol (Marengo FD y Monck JR, 2000). En principio, teniendo en cuenta que la duración del estímulo que hemos definido como necesario para inducir endocitosis rápida en nuestro preparado es de 1 seg, sería esperable que el disparador/modulador de la endocitosis rápida sea una señal de Ca^{2+} global. Para estudiar este punto se estudió el efecto de la aplicación de diferentes buffers intracelulares de Ca^{2+}.

Por otro lado, existen evidencias en células cromafines bovinas que muestran que los CCDV de tipo L estarían involucrados en la regulación de la endocitosis rápida (Rosa JM y col., 2007). Por otro lado, en algunos sistemas estos canales son eficientes en activar la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} a través de los receptores de rianodina del retículo endoplasmático (Lemmens R y col., 2001), pero la participación de esta organela en la endocitosis rápida no ha sido investigada hasta el momento. Considerando esta situación, utilizamos bloqueantes farmacológicos específicos para poder estudiar la dependencia de la endocitosis rápida con estas fuentes de Ca^{2+}, de modo de poder identificar si el Ca^{2+} que dispara a la endocitosis proviene de fuentes extracelulares o intracelulares, o de la suma de ambas.

(3) Otro de nuestros objetivos se centró en estudiar cuáles mecanismos específicos de endocitosis, ya sea dependiente o independiente de clatrina, intervienen en la endocitosis rápida registrada en nuestras condiciones experimentales. Clásicamente se consideró a la endocitosis clatrina dependiente como un proceso lento. Sin embargo

existen evidencias que indican que este mecanismo endocitótico, al igual que el *kiss & run* y la *bulk* endocitosis*,* puede evolucionar con una cinética rápida (He Z y col., 2008; Cecarelli B y col., 1973; Wu W y Wu LG, 2007). Desconocemos cuál/es de el/ellos están presentes en nuestras condiciones experimentales, aunque potencialmente los tres mecanismos endocitóticos podrían tener algún grado de participación en la endocitosis rápida observada en células cromafines de ratón. Para contestar a esta pregunta, en primer lugar se intervino sobre la dinamina, que es una proteína que modula el cierre del poro de fisión durante la endocitosis clatrina dependiente, el *kiss & run* y la *bulk* endocitosis. En segundo lugar, se realizaron experimentos para bloquear específicamente el ensamblado de la clatrina, y así bloquear la endocitosis clatrina dependiente.

(4) El siguiente objetivo fue evaluar el reciclado vesicular resultante en condiciones control y tras bloquear la endocitosis clatrina dependiente. Como se dijo anteriormente, la endocitosis no sólo mantiene la homeostasis de la membrana plasmática, sino que también puede contribuir a conservar los *pools* de vesículas secretorias. Frente a despolarizaciones con alto K^+ se activa un proceso de endocitosis en exceso, similar en magnitud y evolución temporal al observado por mediciones de capacitancia luego de aplicar despolarizaciones prolongadas por voltaje clamp (Pérez Bay AE y col., 2012). Una fracción mayoritaria de la membrana internalizada por esta endocitosis en exceso reside en vacuolas de aproximadamente 0,7 μm de diámetro que colocalizan con lisosomas, mientras que una fracción menor conlleva al reciclado de vesículas liberables en un tiempo relativamente corto (Pérez Bay AE y col., 2012). En esta sección de la tesis evaluamos si la inhibición de la endocitosis clatrina dependiente afecta el reciclado vesicular.

(5) Por último nos interesó caracterizar el mecanismo de endocitosis rápida que se produce frente a un estímulo aproximadamente fisiológico, como es la aplicación de despolarizaciones que simulan potenciales de acción. En células cromafines de vaca y de ratón, se ha observado que frente a despolarizaciones con forma de potencial de acción (PAs) (ver métodos) se evidencia una endocitosis rápida con una constante temporal similar a la del componente ultra-rápido observada para un pulso cuadrado despolarizante único de 1 seg. Por lo tanto planteamos como hipótesis de trabajo que se trataría del mismo proceso. Para poner a prueba esta posibilidad se aplicaron las dos intervenciones utilizadas anteriormente en el objetivo número 3. Es decir se intervino sobre la dinamina y la clatrina, y se compararon sus efectos con lo observado en condiciones controles.

3- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Dos modos de endocitosis rápida en células cromafines de ratón. Análisis comparativo.

A- RESULTADOS

A lo largo de esta tesis se realizaron mediciones de corrientes de Ca^{2+} y de capacitancia de la membrana celular en células cromafines de ratón en cultivo, mediante el dispositivo de *Patch Clamp* en configuración *whole cell* (descrito en la sección 2.2 de métodos experimentales). El potencial de mantenimiento o *holding* aplicado fue de -80 mV, y sobre este potencial se sumó un voltaje sinusoidal de amplitud ± 40 mV, que permite la estimación de la capacitancia. Los pulsos despolarizantes que se utilizaron como estímulo se aplicaron por encima del potencial de reposo mencionado, suspendiéndose durante estos períodos la aplicación de la sinusoide (sección 2.2.3 - Protocolos de estimulación utilizados y medición de la capacitancia celular).

Previamente al desarrollo de esta tesis doctoral, y como parte del seminario de Licenciatura en Ciencias Biológicas que realizó la autora de esta tesis, se realizó un primer abordaje al estudio de la endocitosis rápida en células cromafines de ratón. Se utilizaron diferentes protocolos, variando tanto la duración como la cantidad de pulsos despolarizantes, con el objetivo de poder encontrar cuáles son los patrones de estimulación que desencadenan el proceso de endocitosis rápida. A partir de aquel trabajo determinamos que tanto trenes de 20 pulsos de 50 mseg de duración a 4 Hz, como 100 pulsos de 5 mseg de duración a 20 Hz, utilizados por Artalejo y colaboradores en células cromafines bovinas (Artalejo CR y col., 1995), no resultaron efectivos para inducir endocitosis rápida. Por otro lado, la aplicación de pulsos cuadrados de larga duración, aplicados con el mismo objetivo por Engisch y Nowycky, y por Rosa y colaboradores (Engisch KL y Nowycky MC, 1998; Rosa JM y col., 2007), resultó efectiva sólo cuando estos pulsos fueron de 0,5 seg o más. Luego, en dicho trabajo se realizó una primera clasificación de la endocitosis rápida en endocitosis compensatoria, que es cuando esta tiende a recuperar los valores de capacitancia basales previos al estímulo; y endocitosis en exceso, que es cuando se produce una caída de capacitancia por debajo del valor basal, superando en magnitud a la exocitosis previa y generando una reducción de la superficie de membrana. En este trabajo de tesis doctoral se realiza un análisis más

exhaustivo de estos dos modos de endocitosis del que se había realizado en aquel momento, contando con una cantidad de datos superior. Éstos describen el comportamiento "control" de nuestras células en condiciones estándar. En las secciones siguientes se aplican tratamientos particulares sobre el mismo protocolo de estimulación, con el objetivo de poder estudiar mecanismos asociados a dichos procesos endocitóticos, particularmente relacionados al papel regulatorio del Ca^{2+} y al tipo de mecanismo molecular de endocitosis involucrado.

En este trabajo de tesis doctoral se utilizó como estímulo una despolarización cuadrada de 1 seg (exceptuando la sección 3.5, que está claramente identificada). El estímulo parte desde el potencial de *holding* de -80 mV hasta +10 mV, debido a que determinamos que a este potencial se alcanzaba el mayor valor para el pico de la corriente de Ca^{2+}. Se fijó una duración de 1 seg porque, como se explicó previamente, sólo se obtuvieron consistentemente procesos endocitóticos rápidos cuando los pulsos fueron de 0,5 seg o más. Esto nos permitió obtener con mayor probabilidad los registros esperados. Este pulso despolarizante genera la apertura de los CCDV, lo que permite que se disparen eventos de fusión vesicular (exocitosis) debido al aumento de Ca^{2+} citosólico, y en consecuencia se desencadene una posterior endocitosis rápida. Esto se observa en los trazados de la capacitancia celular como un aumento (exocitosis), seguido de una disminución de la misma variable (endocitosis) con respecto al valor basal (figuras 3.1.1 y 3.1.2).

Como se mencionó previamente, al analizar los trazados de la capacitancia celular resulta evidente la presencia de dos modos de endocitosis rápida cualitativamente distintas que se presentan en diferentes células: una **endocitosis compensatoria** y otra **endocitosis en exceso**. Estas dos modalidades de endocitosis también fueron identificadas previamente en células cromafines bovinas (Engisch KL y Nowycky MC, 1998; Smith C y Neher E, 1997). En términos generales, se considera estar en presencia de una endocitosis compensatoria, cuando ésta recupera una cantidad de membrana igual o inferior a la que fue exocitada a consecuencia de la estimulación. Es decir, cuando el valor de capacitancia celular absoluta (función a su vez de la superficie de membrana) que se mide al finalizar la endocitosis es similar o superior al observado antes del pulso. En cambio, la endocitosis en exceso está definida para los casos en los que el valor de capacitancia observado al final del proceso endocitótico está claramente por debajo del medido antes del pulso (línea de base). Es decir, cuando la endocitosis es mayor que la

exocitosis, y en consecuencia se genera una reducción neta en la superficie de la membrana. Por una cuestión práctica se definió estar en presencia de una endocitosis en exceso siempre que la resta entre la endocitosis y la exocitosis, definida por el parámetro Endo-Exo, resulte superior a 100 fF, tal como fue definido por Engisch y Nowycky (Engisch KL y Nowycky MC, 1998). Por lo tanto, la endocitosis compensatoria ocurre cuando Endo-Exo < 100 fF, y la endocitosis en exceso cuando Endo-Exo ≥ 100fF.

La figura 3.1.1 contiene una selección de cuatro trazados típicos de capacitancia de membrana de células que presentaron endocitosis compensatoria luego de la aplicación de despolarizaciones únicas de 1 seg, desde -80 a +10 mV (éstas se encuentran esquematizadas en la parte superior, alineadas temporalmente con los trazados). En todos ellos, el aumento de la capacitancia celular que se observa inmediatamente después del estímulo representa a la exocitosis, y la disminución posterior a la endocitosis. En el primero de los trazados (figura 3.1.1 A) la exocitosis y la endocitosis posterior están resaltadas con barras. Como bien puede observarse, la endocitosis (125 fF) y la exocitosis (135 fF) fueron casi de la misma magnitud. En consecuencia el parámetro Endo-Exo es cercano a cero (-10 fF), lo que indica que se trata de una endocitosis compensatoria. En el segundo ejemplo (figura 3.1.1 B) también puede observarse cómo después de la estimulación se produjo un aumento del valor de la capacitancia (exocitosis de 193 fF) y una posterior disminución (endocitosis de 185 fF) compensándose casi por completo ambos procesos (Endo-Exo de -8 fF). En la figura 3.1.1 C se muestra otro trazado típico de capacitancia que también presenta una endocitosis compensatoria. La exocitosis tuvo un valor de 164 fF y la endocitosis fue de 206 fF, obteniéndose una diferencia ahora levemente positiva (Endo-Exo = 42 fF) a favor de la endocitosis, que no alcanza valores suficientes para ser considerada en exceso. En el último ejemplo (figura 3.1.1 D) se observa con mayor detalle la evolución temporal de la cinética de la endocitosis rápida (270 fF), que aparece luego de la exocitosis (260 fF), y que la compensa por completo (Endo-Exo = 10 fF).

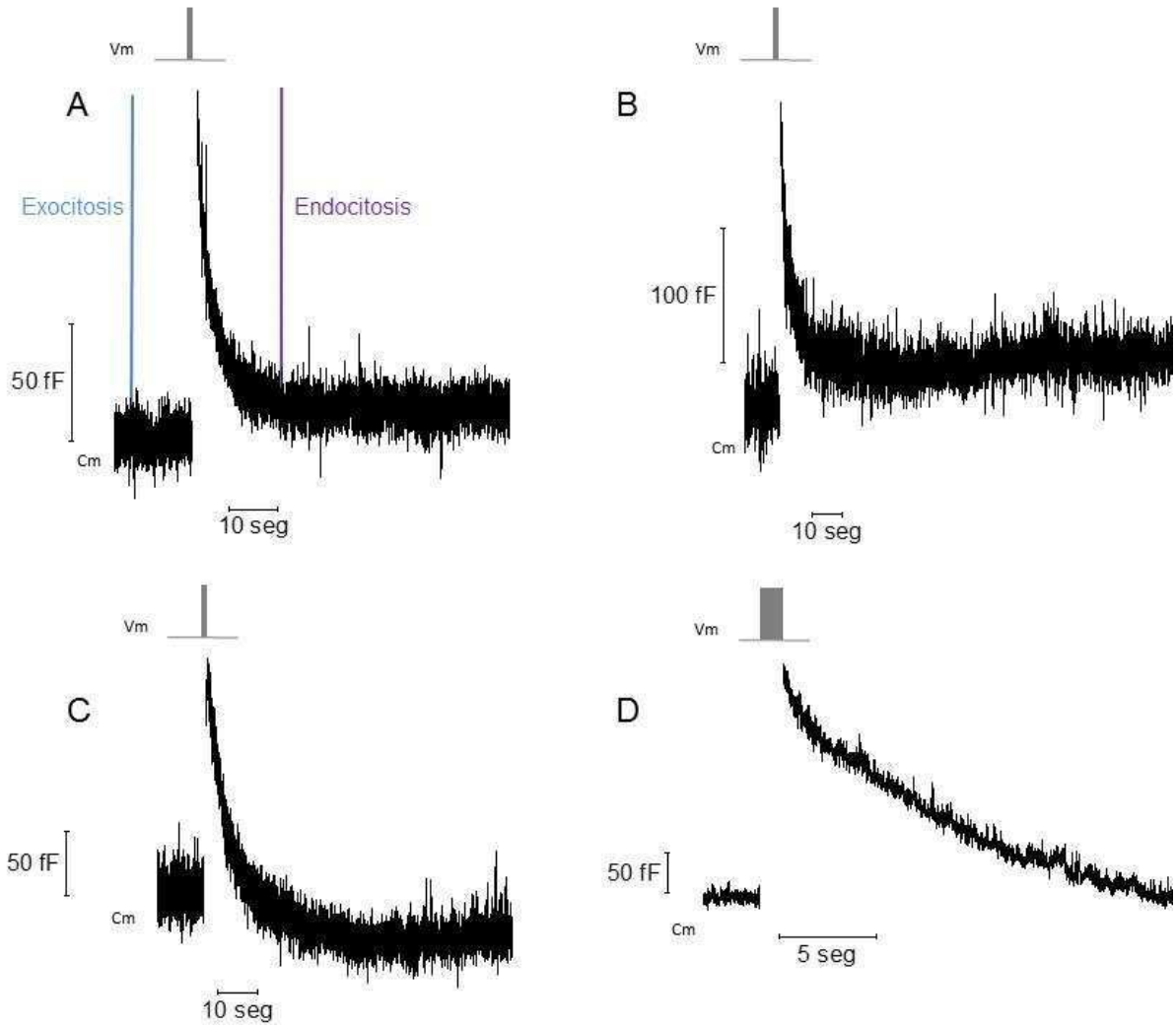

Figura 3.1.1 - Ejemplos de endocitosis compensatoria registrados como cambios en la capacitancia de membrana. (A) *Registro de capacitancia donde se observan la exocitosis y la endocitosis provocadas por un pulso de 1 seg (representado en la parte superior) que va desde -80 a 10 mV. Estos procesos se visualizan como un aumento y una disminución posterior del valor de capacitancia respectivamente, y están indicados en el trazado con una barra azul (exocitosis) y con una barra violeta (endocitosis).* ***(B) y (C)*** *En estos dos ejemplos, al igual que en el anterior, puede observarse cómo después de la estimulación se produjo un aumento del valor de la capacitancia (exocitosis) y una disminución (endocitosis) compensándose por completo ambos procesos.* ***(D)*** *En este trazado, mostrado a otra escala, puede observarse con mayor detalle la cinética de la endocitosis rápida, que también compensa por completo a la exocitosis previa. Nota: en la parte superior de la figura se observan representaciones del pulso despolarizante de 1 seg, alineados temporalmente con los trazados de capacitancia de abajo.*

La figura 3.1.2 contiene una selección de cuatro ejemplos de trazados típicos de capacitancia de membrana de células individuales que presentaron endocitosis en exceso.

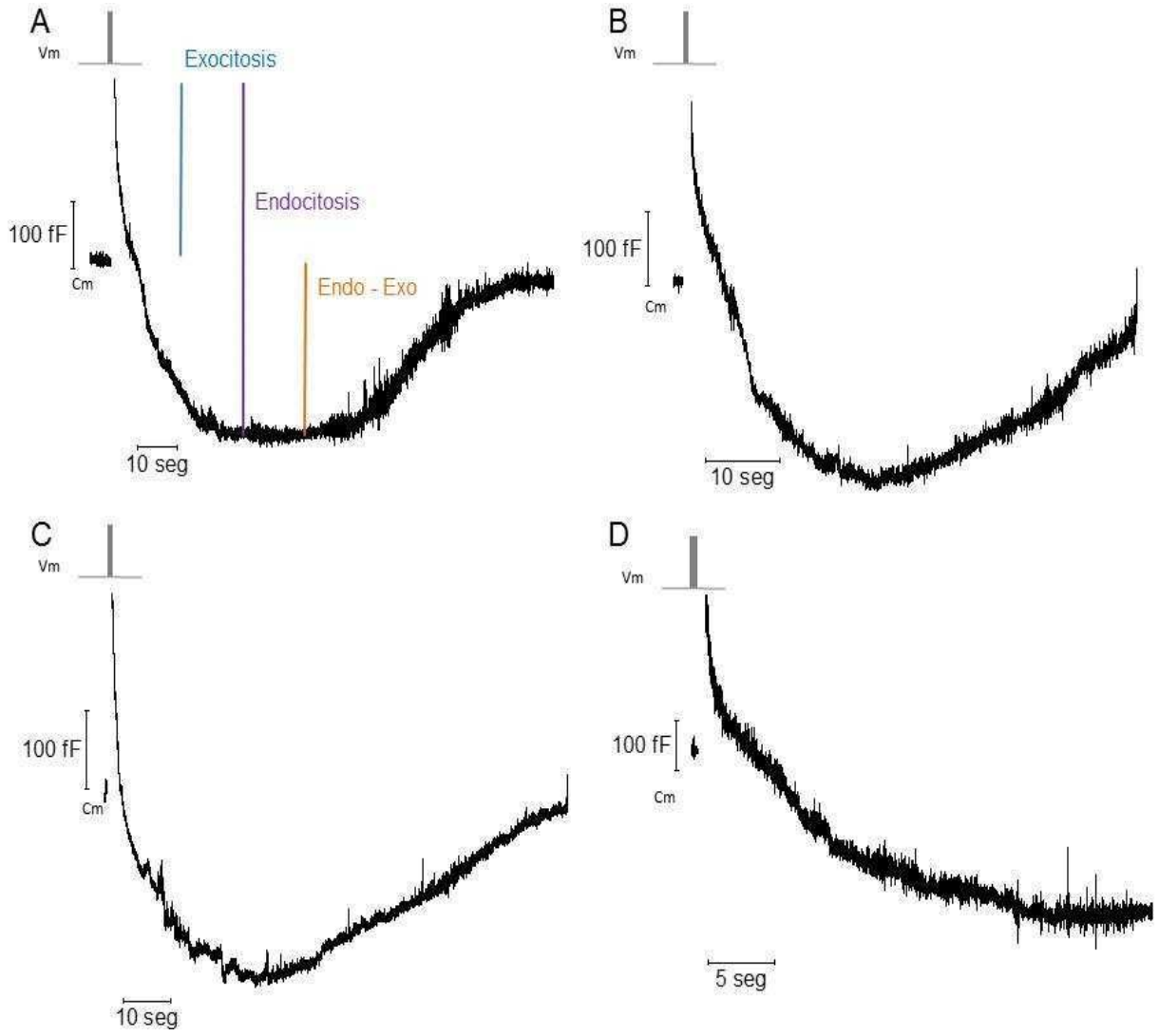

Figura 3.1.2 - Ejemplos de endocitosis en exceso registrados como cambios en la capacitancia de membrana. *Trazados de capacitancia de membrana de células individuales donde se observa la evolución temporal de la respuesta a un pulso de 1 seg (-80 a 10 mV). La exocitosis y la endocitosis se visualizan como un aumento o una disminución del valor de la capacitancia respectivamente. En el ejemplo* ***(A)*** *estos dos parámetros, como también la diferencia entre ambos valores, están indicados en el trazado con barras de color: azul (exocitosis), violeta (endocitosis) y naranja (endocitosis-exocitosis). En todos los ejemplos puede observarse cómo después de la estimulación se produjo un aumento del valor de la capacitancia (exocitosis) y una disminución (endocitosis) que supera el valor de capacitancia basal previa al estímulo en más de 100 fF, con lo cual se consideró que todos estos casos presentaban una endocitosis en exceso. En los ejemplos* ***(A)****,* ***(B)*** *y* ***(C)*** *además puede observarse claramente el fenómeno de "recuperación luego de la endocitosis en exceso", que se manifiesta cuando termina la endocitosis. En* ***(D)*** *no se llega a visualizar este fenómeno debido a que el registro se muestra en otra escala temporal, aunque igualmente el mismo parece insinuarse al final del trazado. Nota: en la parte superior del gráfico se observa una representación del pulso despolarizante de 1 seg, alineado temporalmente con los trazados de capacitancia por debajo.*

En todos ellos puede distinguirse claramente un aumento del valor de la capacitancia de la membrana celular al finalizar el pulso de 1 seg de estimulación debido a la fusión vesicular (exocitosis), y una posterior disminución (endocitosis) hasta superar el valor de capacitancia basal previa al estímulo. En la figura 3.1.2 A se indica con barras de color las magnitudes de la exocitosis, endocitosis y su respectiva resta (Endo-Exo) para ese registro en particular. En este ejemplo, dichas magnitudes fueron de 267 fF, 533 fF y 266 fF respectivamente. En los trazados de capacitancia de membrana de las figuras 3.1.2 A, B y C puede apreciarse de manera completa la presencia del fenómeno de "*recovery after excess retrieval*" ("recuperación luego de la endocitosis en exceso"), que se manifiesta cuando termina la endocitosis. Este fenómeno, observado previamente en nuestro laboratorio (Pérez Bay AE y col., 2012) y también por otros autores (Artalejo CR y col., 2002), consiste en que luego de una endocitosis excesiva de membrana, la célula regresa al valor de capacitancia presente antes del estímulo a través de un proceso de exocitosis asincrónica respecto del estímulo. En el ejemplo B (figura 3.1.2 B) la exocitosis sincrónica medida fue de 231 fF, la endocitosis de 508 fF y por consiguiente el parámetro Endo-Exo da un exceso de 277 fF. En el tercer ejemplo (figura 3.1.2 C), la exocitosis tuvo una magnitud de 260 fF, la endocitosis de 487 fF y la diferencia Endo-Exo dio como resultado unos 227 fF de exceso. En el último ejemplo (figura 3.1.2 D) la exocitosis presentó un valor de 300 fF, y fue seguida de una caída de 630 fF, dando como resultado una recuperación excesiva de membrana de unos 330 fF.

En células cromafines bovinas, se ha observado que la aparición de una u otra variante de endocitosis está favorecida por condiciones experimentales diferentes (ver introducción). Existen antecedentes que indican que la activación de la endocitosis en exceso requiere una mayor entrada de Ca^{2+} que la endocitosis compensatoria (Engisch KL y Nowycky MC, 1998; Smith C y Neher E, 1997). Por este motivo, se analizaron las corrientes de Ca^{2+} y sus integrales para estos dos grupos (figura 3.1.3).

La integral numérica de la corriente de Ca^{2+} producida por el pulso despolarizante cuadrado de 1 seg (*inset* figura 3.1.3 A) representa la entrada neta de Ca^{2+} a la célula. Al realizar la comparación de las corrientes de Ca^{2+} (pA) y de las integrales de la corriente de Ca^{2+} (pC) entre los grupos de endocitosis compensatoria y endocitosis en exceso (figura 3.1.3 A), se encontraron diferencias significativas, siendo mayores, tanto la corriente de Ca^{2+} como su integral, para los casos de endocitosis en exceso ($p<0,0005$ y $p<0,0001$ respectivamente).

Debido a que se observó que las células que habían respondido con una recuperación excesiva de membrana eran aquellas donde la entrada de Ca^{2+} había sido mayor, decidimos tratar de determinar un valor de integral de corriente de Ca^{2+} por encima del cual se produce este fenómeno de endocitosis en exceso, tal como ocurre en células cromafines bovinas (Engisch KL y Nowycky MC, 1998). Para ello, realizamos un gráfico de Endo-Exo en función de la integral de corriente de Ca^{2+} (figura 3.1.3 B). A continuación efectuamos un ajuste lineal de los datos según la ecuación $Y = a + b \cdot x$, obteniendo los siguientes parámetros: a = -122,47 fF y b = 2,83 fF/pC. Como bien quedó establecido previamente, la endocitosis es considerada en exceso cuando la diferencia entre la endocitosis y la exocitosis es mayor o igual a 100 fF. Para ese valor y según el ajuste lineal, encontramos que la endocitosis en exceso es disparada por entradas de Ca^{2+} mayores a 79 pC. Al observar el gráfico es posible notar una clara dependencia del exceso de endocitosis con el Ca^{2+}: cuanto mayor es la entrada de este ion, la magnitud del exceso es también mayor. Se deduce por lo tanto, una continuidad entre el aumento de la entrada de Ca^{2+} y la magnitud de la endocitosis, con los valores de menor entrada de Ca^{2+} y menor endocitosis abajo a la izquierda, y los de mayor entrada de Ca^{2+} y mayor endocitosis arriba a la derecha. Existen tres puntos (cada uno correspondiente a una célula individual distinta) donde el parámetro Endo-Exo fue < 100 fF y la entrada de Ca^{2+} apenas superior a los 79 pC. Vale la pena mencionar que esas 3 células tuvieron una corriente de fuga mucho más baja de la que normalmente se mide, lo cual puede explicar el registro de una corriente mayor. Además, el valor calculado a partir del cual se dispara la endocitosis en exceso no sería un límite estricto, sino más bien un rango aproximado. Por lo tanto, podemos decir que en nuestras condiciones experimentales, por arriba de un valor de entrada de Ca^{2+} de 79 pC se observa una endocitosis en exceso, y por debajo de este valor la endocitosis es compensatoria.

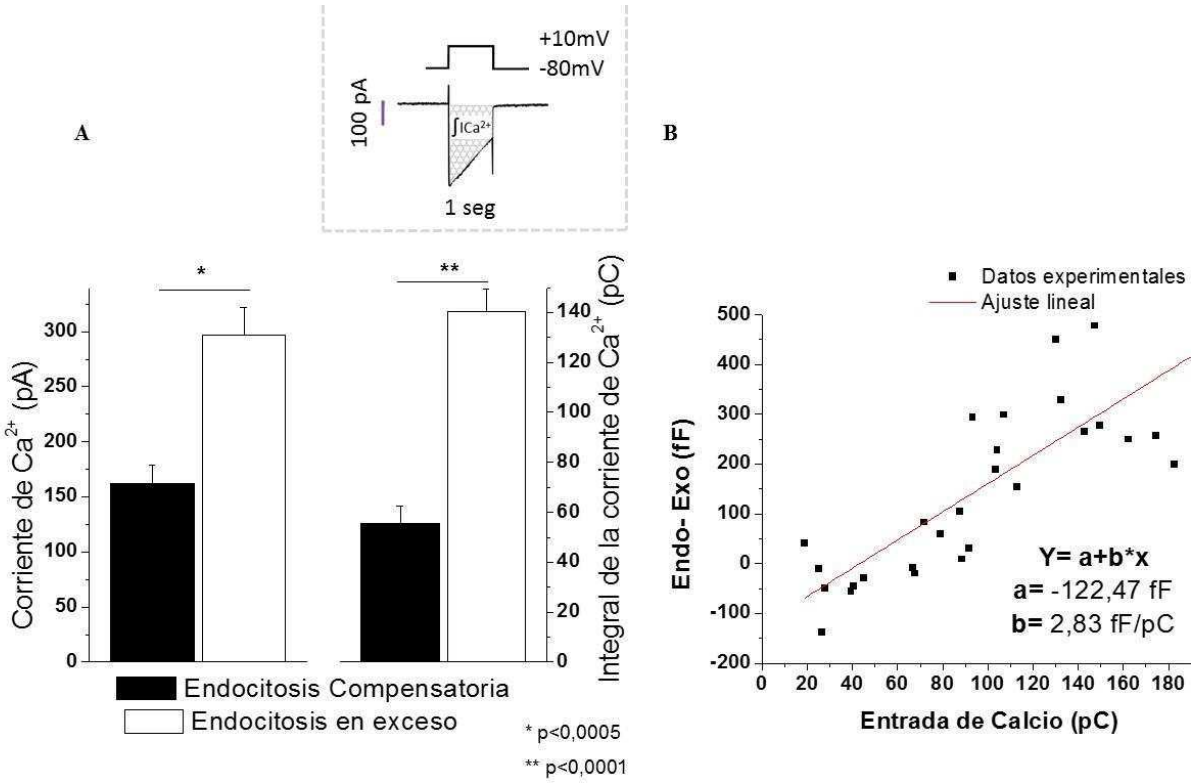

Figura 3.1.3 - *Umbral de entrada de calcio para la endocitosis en exceso.* (A) *Comparación de las corrientes e integrales de Ca^{2+} entre endocitosis compensatoria (n = 14) y endocitosis en exceso (n = 15). En el gráfico de barras se puede apreciar que tanto el pico de la corriente de Ca^{2+} como su integral fueron mayores para los casos de endocitosis en exceso (p<0,0005 y p<0,0001 respectivamente). El* inset *muestra un ejemplo de una corriente de Ca^{2+} producida por un pulso despolarizante cuadrado de 1 seg. El área bajo la curva de corriente representa a la integral numérica de la corriente de Ca^{2+}, la cual se tomó como una estimación de la entrada de Ca^{2+} a la célula.* **(B)** *Gráfico Endo-Exo versus entrada de Ca^{2+}. El ajuste lineal de Endo-Exo versus entrada de Ca^{2+} muestra que la endocitosis en exceso (Endo–Exo ≥ 100 fF) es disparada por entradas de Ca^{2+} mayores a 79 pC. Los experimentos que se presentan en esta figura provienen del agrupamiento de todos los experimentos realizados en condiciones control, tanto los incluidos en la sección 3.2 como en la sección 3.3.*

Seguidamente se agruparon los valores de los parámetros de endocitosis, exocitosis, y la diferencia entre ambos de acuerdo a si estos se ubicaban dentro del grupo de entrada de Ca^{2+} inferior o superior a 79 pC. De aquí en adelante llamaremos al primer grupo LCG, por *low current group*, y al último grupo lo llamaremos HCG, por *high current group.* Adoptamos esta nomenclatura porque ciertas intervenciones que se utilizan a lo largo de esta tesis generan disminuciones de los valores de endocitosis, pudiendo pasar estos de una situación de “exceso” a “compensatoria” en células cuyos valores de corrientes son similares al del grupo definido como HCG en condiciones control. Como

puede observarse en la figura 3.1.4 A, la exocitosis fue igual en los dos grupos. En un principio, hubiésemos esperado observar una exocitosis significativamente mayor para el caso en el que la entrada de Ca^{2+} es más grande, debido a la fuerte dependencia que existe entre la exocitosis y el Ca^{2+}. Sin embargo, los resultados podrían explicarse si consideramos que estos valores de capacitancia (246 ± 19 fF y 257 ± 24 fF, para LCG y HCG respectivamente) equivaldrían a aproximadamente 190 eventos de fusión vesicular (considerando que el tamaño promedio de una vesícula aporta 1,3 fF al valor de la capacitancia celular total - Moser T y Neher E, 1997b), un número que incluye al total de vesículas que conforman el RRP (*ready releasable pool*, o *pool* de vesículas preparadas para liberarse), más una fracción importante del pool que está secuencialmente río arriba, el SRP (*slowly releasable pool,* o pool de vesículas con una cinética de liberación más lenta) (Heinemann C y col., 1994; Voets T y col., 1999. Debido a lo expuesto, creemos que la razón por la cual la mayor entrada de Ca^{2+} del HCG no generó una mayor exocitosis que en el LCG, es que la respuesta exocitótica sincrónica con el estímulo del segundo grupo ya estaría próxima a su saturación. También hay que considerar la presencia de un componente lento de exocitosis asincrónica en el grupo HCG, cuya presencia se manifiesta en parte en la "recuperación luego de la endocitosis en exceso", y cuyo peso en la exocitosis total debería considerarse en las comparaciones para tener un valor más realista de la exocitosis total del HCG. Sin embargo es posible que una fracción de esta exocitosis asincrónica esté "enmascarada" por la endocitosis rápida, con lo cual es difícil tener una medida confiable de la misma. Este punto será discutido en más detalle en la discusión de esta sección.

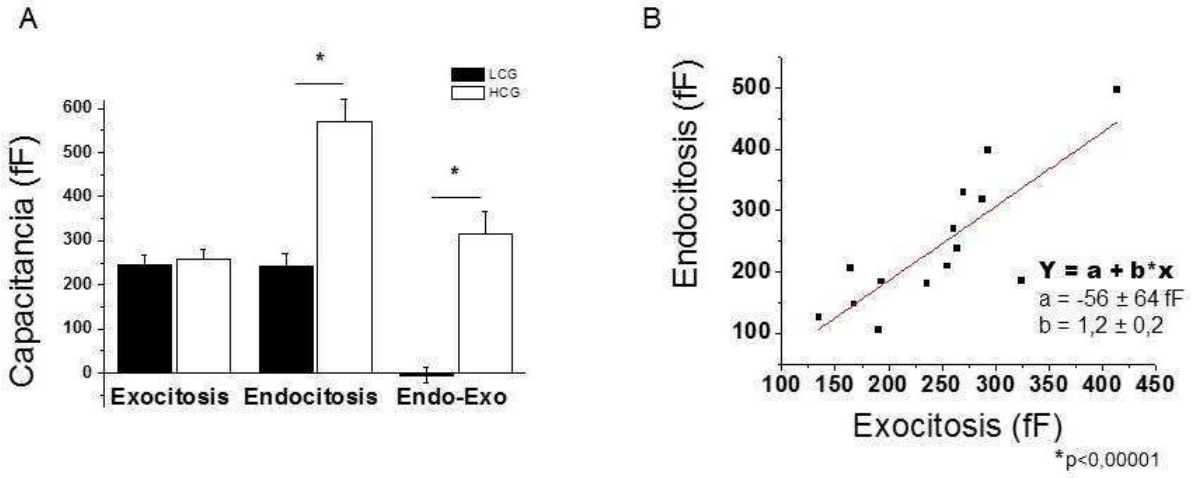

Figura 3.1.4 - *Comparación de distintos parámetros entre la endocitosis compensatoria y la endocitosis en exceso.* (A) *Comparación de los parámetros de exocitosis, endocitosis y la diferencia entre*

ambos (Endo–Exo) entre el LCG (n = 14) y el HCG (n = 15). La exocitosis tuvo una magnitud similar entre ambos grupos. Por otro lado, tanto la endocitosis como Endo-Exo fueron significativamente mayores para HCG (p<0,00001). ***(B)*** *Correlación entre la exocitosis y la endocitosis compensatoria en el grupo LCG. En la figura se representa la relación entre la exocitosis medida en cada experimento respecto de la endocitosis para el grupo LCG. Se realizó una regresión lineal por el método de cuadrados mínimos, obteniéndose los parámetros representados en el gráfico y un R de correlación de 0,7931.*

Tal como era de esperar, la magnitud de la endocitosis rápida fue significativamente mayor para el HCG (figura 3.1.4 A, p<0,00001). Además, el parámetro Endo-Exo para LCG resultó nulo, y significativamente menor que en HCG (p<0,00001). Lo cual es completamente lógico debido que este último presenta un exceso de endocitosis, mientras que el otro solamente una endocitosis que compensa la exocitosis previa.

Particularmente en el grupo LCG, la endocitosis compensatoria se correlacionó como sería esperable con la exocitosis, con una pendiente próxima a 1 (figura 3.1.4 B). Esto confirma que, en promedio, en el grupo LCG la endocitosis compensó completamente a la exocitosis, permitiendo el mantenimiento de una superficie de membrana constante. Contrariamente, en el grupo HCG, la endocitosis en exceso no se correlacionó con la exocitosis previa. Esto sugiere que el proceso de endocitosis responsable del exceso, el cual se dispara luego de superar un umbral en la entrada de Ca^{2+}, no guarda relación con la cantidad de membrana adicionada por la exocitosis precedente.

Otra propiedad que puede ser utilizada para comparar ambos grupos es la cinética de la respuesta endocitótica (sección 2.4.1 - Procesamiento de los experimentos electrofisiológicos). Pudimos identificar normalmente dos componentes exponenciales como máximo en cada una de las mediciones, cuya cinética queda definida por el valor de las constantes temporales (τ_i) estimadas para la caída de la capacitancia (endocitosis). Previamente otros autores, trabajando en células cromafines bovinas, definieron entre uno a tres componentes exponenciales para la endocitosis rápida (Artalejo CR y col., 1996; Engisch KL y Nowyky MC, 1998; Smith C y Neher E, 1997). Por otro lado, el grupo de Cristina Artalejo también definió un proceso de endocitosis lenta que evoluciona con una constante temporal del orden de minutos (Artalejo CR y col., 2002). Como bien mencionamos previamente, en nuestros experimentos se nos presentaron dos casos. En uno la endocitosis resultó ajustable a un solo componente exponencial, presentando este siempre un τ_i mayor a 3,5 seg. Mientras que en el otro fue ajustable a 2 exponenciales, con el τ_i más rápido siendo siempre menor a 3,5 seg y el más lento mayor a ese mismo

valor. Por lo tanto, definimos un componente endocitótico ultra-rápido con $\tau_{Ultra\text{-}Rápido}$ entre 0 y 3,5 seg, y uno rápido con $\tau_{Rápido}$ mayor a 3,5 seg. Vale la pena aclarar que en general, en condiciones controles, el $\tau_{Ultra\text{-}Rápido}$ presentó valores por debajo de 1 seg. Sin embargo, se toma el límite de 3,5 seg debido a que se observó que bajo ciertos tratamientos dicho componente se enlentece, llegando como máximo a un valor de 3,2 seg. Por otro lado, el menor $\tau_{Rápido}$ observado fue 3,5 seg. Se aceptó siempre el mínimo número de componentes que cumpliera o se aproximara lo más posible a los siguientes criterios: (i) ausencia de rachas que fueran obvias a simple vista, (ii) alto valor de R para la regresión, (iii) que no hubiera redundancia de componentes. Respecto a esta última condición, se consideró redundancia cuando dos componentes resultaron tener valores de τ_i que diferían en menos de tres errores estándares (< 3 ES).

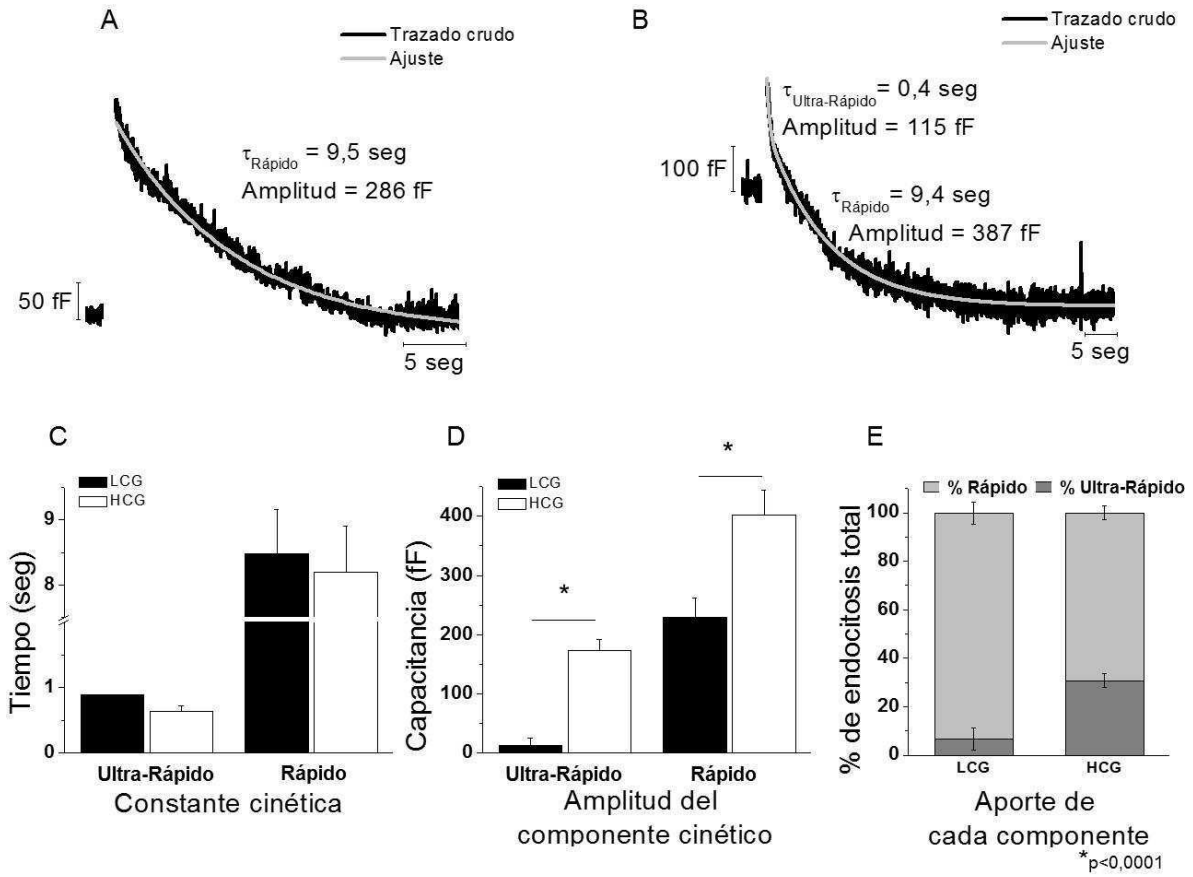

Figura 3.1.5 - ***Comparación cinética entre la endocitosis compensatoria y la endocitosis en exceso.*** **(A)** *Registro de capacitancia celular de una célula perteneciente al LCG, al cual se superpuso la curva del ajuste realizado en la zona de la caída de capacitancia. Los valores obtenidos en el ajuste se muestran en la figura.* ***(B)*** *Trazado de capacitancia de una célula del grupo HCG con la superposición de su correspondiente*

ajuste en la zona de la caída de la capacitancia luego del estímulo. Observar que mientras que el ejemplo mostrado en (A) se ajustó a un componente (definido como rápido), el ejemplo de (B) lo hizo a dos, los cuales fueron definidos como rápido y ultra-rápido. ***(C)*** *Comparación de las constantes cinéticas* $\tau_{Ultra\text{-}Rápida}$ *y* $\tau_{Rápida}$ *entre LCG y HCG. En el gráfico de barras se observa que las constantes cinéticas no difieren significativamente entre los dos modos de endocitosis. Sin embargo, debe notarse que para* $\tau_{Ultra\text{-}Rápida}$ *se contó solamente con un n =1 en el caso particular de LCG, ya que todos los demás casos se ajustaron solamente al componente rápido.* **(D)** *Comparación de las magnitudes de los componentes rápido y ultra-rápido entre los grupos LCG y HCG. Tanto el componente ultra-rápido como el rápido fueron significativamente mayores para el HCG (p<0,0001). Debe notarse que el componente ultra-rápido está prácticamente ausente en LCG. Ante la falta de un componente en un ajuste particular, la magnitud de éste se computó como cero.* **(E)** *Comparación del aporte, expresado de forma porcentual, de los componentes exponenciales a la endocitosis total observada en cada caso. Para LCG la mayoría de la endocitosis total presente se debe al* $\tau_{Rápido}$ *(el 5% que aporta el* $\tau_{Ultra\text{-}Rápida}$ *no difiere significativamente de cero, p>0,05), mientras que para HCG el* $\tau_{Ultra\text{-}Rápido}$ *es el responsable del 30 % de la endocitosis, y el restante 70 % se debe al* $\tau_{Rápido}$*. Los experimentos que se presentan en esta figura provienen del agrupamiento de todos los experimentos realizados en condiciones control, tanto los incluidos en la sección 3.2 como en la sección 3.3. El análisis estadístico entre estas dos muestras independientes se realizó mediante el Test de Student.*

Se evaluaron entonces las constantes de tiempo presentes en los dos grupos. En todos los casos medidos de endocitosis compensatoria (LCG, n = 14) y de endocitosis en exceso (HCG, n = 15) se comprobó la presencia del componente $\tau_{Rápido}$. Sin embargo el componente $\tau_{Ultra\text{-}Rápido}$ sólo se presentó en el grupo de endocitosis en exceso (100% de los casos), apareciendo solamente en un caso aislado de endocitosis compensatoria el cual estaba en el límite en cuanto a la entrada de Ca^{2+}. En la figura 3.1.5 A se muestra como ejemplo un trazado de endocitosis compensatoria (o sea perteneciente al grupo clasificado como LCG), con el ajuste exponencial superpuesto y sus respectivos valores de constante cinética y amplitud. En el panel B se muestra un ejemplo de un registro obtenido en otra célula, en este caso perteneciente al grupo HCG, que presenta una clara endocitosis en exceso, también con el ajuste exponencial superpuesto que muestra la presencia de los dos componentes exponenciales. Según el análisis estadístico realizado (ver sección 2.4.3 - Análisis estadístico), no existen diferencias significativas en los valores de $\tau_{Rápido}$ entre los dos grupos estudiados, los cuales fueron de 8,4 ± 0,6 seg y 8,2 ±0,7 seg, para LCG y HCG respectivamente. Por otro lado, para $\tau_{Ultra\text{-}Rápido}$, si bien no pudo realizarse una comparación estadística, el único valor obtenido para LCG (0,8 seg) tuvo un valor similar al promedio obtenido para HCG (0,63 ± 0,09 seg) (figura 3.1.5 C).

A continuación se comparó entre los dos grupos la magnitud absoluta de cada componente exponencial. Al hacerlo observamos que tanto el componente ultra-rápido

como el rápido fueron significativamente mayores para el HCG ($p<0,0001$- figura 3.1.5 D). Si un componente no estaba presente para un dado experimento se consideró que su amplitud correspondiente fuera igual a cero. Esto explica el casi nulo valor para el componente ultra-rápido en el grupo LCG. Por último, se analizó cuál es el aporte de cada uno de los componentes a la endocitosis total presente. Para esto los valores de la amplitud de cada componente se expresaron de manera porcentual al valor de la caída endocitótica total de cada experimento. Para LCG la totalidad de la endocitosis presente se debe al componente rápido (el 5 % que aporta el componente ultra-rápido no difiere significativamente de cero, $p>0,05$). Mientras que para HCG ambos componentes aportan de manera significativa a la endocitosis total: el componente ultra-rápido es el responsable del 30 % de la endocitosis, mientras que el componente rápido lo es del restante 70 % (figura 3.1.5 E).

B- DISCUSIÓN

Frente a un estímulo apropiado las células cromafines responden liberando adrenalina, noradrenalina y otros contenidos vesiculares a través de la fusión de sus vesículas secretorias con la membrana plasmática, proceso conocido como exocitosis. Este proceso es disparado por un aumento de Ca^{2+} producido por la activación de los CCDV (Augustine GJ y Neher E, 1992). A consecuencia de esta fusión se produce un aumento de superficie y una alteración en la composición lipoproteica de la membrana plasmática, como también una depresión de los *pools* de vesículas secretorias. Para mantener la homeostasis en estas variables la célula debe recurrir a mecanismos endocitóticos y postendocitóticos (Rizzoli SO y Betz WJ, 2005).

En esta tesis se ha medido la endocitosis rápida en células cromafines de ratón, utilizando la técnica de *Patch Clamp* en configuración *whole cell*. Este proceso ha sido estudiado previamente en una variedad de tipos celulares como ser corticotrofos (Lee AK y Tse A, 2001), melanotrofos (Thomas P y col., 1994), gonadotrofos, neuronas bipolares de la retina (von Gersdorff H y Matthews G, 1994), células β-pancreáticas (He Z y col., 2008), células ciliadas de oído de ratón (Neef J. y col., 2014), células del hipocampo (Watanabe S. y col., 2013), terminales nerviosas del lóbulo posterior de la hipófisis (Hsu SF y Jackson MB, 1996; He Z y col., 2008), células PC12 (Kasai H y col., 1996), células bastones de salamandra (Rieke F y Schwarz EA, 1996), cuerpos de células ganglionares de la raíz dorsal (Huang LYM y Neher E, 1996) y células cromafines bovinas tanto jóvenes como

adultas (Artalejo CR y col., 1995, 2002; Engisch KL y Nowycky MC, 1998; Rosa JM y col., 2007; Smith C y Neher E, 1997). En este último preparado se han utilizado con éxito trenes de despolarización (Artalejo CR y col., 1995) o pulsos despolarizantes únicos de entre 300 y 700 mseg de duración para inducir endocitosis rápida (Engisch KL y Nowycky MC, 1998 utilizaron pulsos de 0,32 y 0,64 seg; y Rosa JM y col., 2007 usaron pulsos de 0,5 seg). En nuestro trabajo se utilizó como estímulo un pulso cuadrado despolarizante de 1 seg, desde el potencial de holding de -80 hasta los +10 mV. En esta situación experimental se evidenció la presencia de dos modos de endocitosis rápida cualitativamente distintas: una **endocitosis compensatoria**, cuando la endocitosis recupera aproximadamente la misma cantidad de membrana que fue exocitada durante la estimulación (figuras 3.1.1 y 3.1.5 A); y una **endocitosis en exceso**, donde la endocitosis supera la cantidad de membrana exocitada en más de 100 fF (figuras 3.1.2 y 3.1.5 B). Procesos similares fueron identificados previamente en células cromafines bovinas (Smith C y Neher E, 1997; Engisch KL y Nowycky MC, 1998). La endocitosis en exceso es disparada por encima de un cierto valor de entrada de Ca^{2+}, ocurre a una tasa muy alta y su magnitud no tiene relación con la cantidad de membrana adicionada por la exocitosis precedente, como también observaron previamente para células cromafines bovinas Engisch y Nowycky y Smith y Neher (Engisch KL y Nowycky MC, 1998; Smith C y Neher E, 1997). Por otro lado, la endocitosis rápida compensatoria es de un orden de magnitud más lenta que el componente más rápido de la endocitosis en exceso (figura 3.1.5 C) y correlaciona con la exocitosis que ha sido previamente evocada por estimulación (figura 3.1.4 B) con una pendiente similar a 1, lo cual implica que en promedio la compensación sería aproximadamente total. Estos resultados son coherentes con lo observado previamente por esos mismos autores (Smith C y Neher E, 1997; Engisch KL y Nowycky MC, 1998).

Los resultados del primer capítulo de resultados de esta tesis muestran que las células cromafines de ratón presentan una clara dependencia en el modo de endocitosis rápida activado con el Ca^{2+} (figura 3.1.3). La endocitosis compensatoria se asoció a una entrada de Ca^{2+} promedio de 56 ± 5 pC, por lo que se denominó a este grupo LCG, por *low current group*. Por otro lado, la endocitosis en exceso fue disparada por entradas de Ca^{2+} mayores a 79 pC, alcanzando un promedio de 139 ± 8 pC. A este grupo se lo denominó HCG, por *high current group*. Por otro lado, previamente observamos que entradas de Ca^{2+} marcadamente menores a las asociadas a LCG (como las provocadas por despolarizaciones de menos de 0,5 seg) no inducen endocitosis rápida (resultados de la Tesis de Licenciatura de Belingheri AV, 2009).

En células cromafines bovinas se postuló que ambos tipos de endocitosis cumplen funciones celulares diferentes. Se propuso que la endocitosis en exceso se dispara frente a un evento exocitótico excesivamente grande, donde para la célula es más importante recuperar la membrana de forma rápida que la precisión con la que lo hace. Esto se daría, por ejemplo, cuando ocurre una gran entrada de Ca^{2+} con la consecuente brusca adición masiva de membrana. En otras palabras, sería una forma rápida de recuperar la superficie de la membrana celular frente a una situación de exocitosis masiva que pueda provocar un hinchamiento celular excesivo con posibles consecuencias negativas para la viabilidad celular (Betz WJ y Bewick GS, 1992; Pérez Bay AE y col., 2012). La endocitosis compensatoria sería por otro lado el mecanismo por el cual en cuestión de segundos se puede recuperar la membrana que fue adicionada por eventos de exocitosis fisiológicos normales (Engisch KL y Nowycky MC, 1998; Smith C y Neher E, 1997).

Es sabido que existe una fuerte dependencia entre la magnitud de la exocitosis y la entrada de Ca^{2+} a la célula. Por este motivo, es que en un principio podría haberse esperado observar una exocitosis significativamente mayor para el grupo HCG respecto del LCG. Sin embargo ambos grupos presentaron la misma magnitud de exocitosis (figura 3.1.4 A, 246 ± 19 fF y 257 ± 24 fF para LCG y HCG, respectivamente). Estos resultados podrían explicarse si consideramos que dichos valores de capacitancia equivaldrían a aproximadamente 190 eventos de fusión vesicular (considerando que el tamaño de una vesícula aporta 1,3 fF al valor de la capacitancia celular total (Moser T y Neher E, 1997b), un número que incluye al total de vesículas que conforman el RRP más una fracción importante del pool que está secuencialmente río arriba, el SRP (Heinemann C y col., 1994; Voets T y col., 1999). Estos dos *pools* contienen la totalidad de vesículas que están suficientemente maduras como para exocitarse frente a una señal de Ca^{2+} apropiada. Según datos bibliográficos obtenidos en rodajas de glándula adrenal de ratón, cuyas células cromafines fueron estimuladas por liberación de Ca^{2+} enjaulado por *flash photolysis* (Becherer U y Rettig J, 2006; Voets T y col., 1999), el tamaño de RRP y SRP correspondería a ~130 - 150 vesículas cada uno. En células cromafines bovinas en cultivo (Ashery U y col., 2000) estimuladas con la misma metodología, se estimó un tamaño de 40 vesículas para el RRP y de 105 vesículas para el SRP. Finalmente, en nuestro laboratorio se estimó un tamaño para el RRP de entre 75 y 107 vesículas para células cromafines de ratón en cultivo estimuladas mediante pulsos despolarizantes cuadrados (2 pulsos de 100 mseg separados por 300 mseg) (Tesis Doctoral de Álvarez YD, 2011; Álvarez YD y col., 2013). Frente a una estimulación eléctrica como se aplica en esta tesis,

es esperable inducir una liberación total del RRP (Sørensen JB, 2004; Voets T y col., 1999). Por otro lado, el SRP tiene una cinética muy lenta de liberación, que se manifiesta claramente frente a la liberación de Ca^{2+} enjaulado, pero no frente a estímulos eléctricos (Sørensen JB, 2004; Voets T y col 1999). Finalmente el RP se libera mucho más lentamente aún, no pudiéndose manifestar en el corto período en que se desarrolla la exocitosis sincrónica al estímulo que se registra en esta tesis (Sørensen JB, 2004). Todo esto sugiere que durante el pulso despolarizante de 1 seg se ha saturado la capacidad de la célula para sostener una exocitosis rápida acoplada al estímulo. Es posible sin embargo, que el proceso de "recuperación luego de la endocitosis en exceso", manifestado solamente en los casos de exceso, represente la exocitosis (asincrónica) de parte del RP. Si consideramos conjuntamente la exocitosis inicial sincrónica más la asincrónica que se desarrolla durante la "recuperación luego de la endocitosis en exceso", claramente la exocitosis total es mayor en el grupo HCG. Pérez Bay y colaboradores (Pérez Bay AE y col., 2012) incluso postularon que el proceso de endocitosis en exceso sería un mecanismo que, por medio del sensado de Ca^{2+} citosólico, sería capaz de anticiparse y por lo tanto compensar la exocitosis total (sincrónica + asincrónica) disparada por una señal de Ca^{2+} masiva.

Con la finalidad de caracterizar más finamente a la endocitosis rápida, se realizaron ajustes de la caída de la capacitancia celular que se evidencia luego del estímulo utilizando ecuaciones exponenciales decrecientes. Los datos experimentales en esta tesis arrojaron dos constantes temporales rápidas (τ_i): una $\tau_{Rápida}$ de 8 seg aproximadamente, presente tanto en el LCG (que presentó endocitosis compensatoria) como en el HCG (endocitosis en exceso), y una $\tau_{Ultra\text{-}Rápida}$ de aproximadamente 0,6 seg, presente solamente en el HCG. Cristina Artalejo (Artalejo CR y col., 1996), trabajando en células cromafines bovinas, ajustó la endocitosis rápida disparada por trenes de despolarizaciones a tres componentes cinéticamente distinguibles, uno definido por una constante de tiempo de 0,3 seg, otro de 3 seg y por último uno de 13 seg aproximadamente. Sin embargo, otros autores (Engisch KL y Nowycky MC, 1998; Smith C y Neher E, 1997), también en cromafines bovinas, identificaron solamente dos componentes. Engisch y Nowycky (Engisch KL y Nowycky MC, 1998) reportaron para el caso de endocitosis compensatoria una única constante de 6 seg aproximadamente, mientras que para la endocitosis en exceso dos constantes rápidas: 0,7 seg y de 6 seg respectivamente. Nuestros resultados se aproximan a los de las últimas autoras mencionadas. Debido a la presencia de un componente de igual cinética en ambas, y uno

agregado en el caso de la endocitosis en exceso, estas autoras sugirieron que el mecanismo responsable de la endocitosis compensatoria podría estar presente en ambos casos, mientras que el componente ultra-rápido sería el que generaría el exceso. Surge entonces la hipótesis de que la endocitosis en exceso sea un proceso complejo, compuesto por más de un mecanismo. El exceso endocitótico se podría entonces entender como una consecuencia de la activación de un mecanismo endocitótico adicional, que evoluciona en cientos de milisegundos, y cuyo disparador sería el aumento del Ca^{2+} citosólico por encima de un determinado valor (figura 3.1.3). Este mecanismo podría ser requerido para mantener la homeostasis de la membrana frente a un estrés exocitótico (Pérez Bay AE y col., 2007). Sin embargo, de acuerdo a los datos de la presente tesis, esta propuesta podría ser puesta en duda. Esto es debido a que el componente rápido también resulta muy potenciado en el grupo HCG (aproximadamente 400 fF), y de hecho por sí mismo duplica a la exocitosis (aproximadamente 200 fF) (ver figuras 3.1.4 A y 3.1.5 D). Se podría pensar alternativamente que podría existir un único proceso, que siendo fuertemente Ca^{2+} dependiente y ante a una entrada de Ca^{2+} importante, como la que se observa en HCG, se acelera durante los primeros cientos de milisegundos de finalizado el estímulo, y luego se desacelera a consecuencia de la caída del Ca^{2+} citosólico (Marengo FD y Monck JR, 2003). Sin embargo, en contra de esta hipótesis podemos citar la observación de que la endocitosis en exceso se correlaciona con eventos de *bulk* endocitosis (Pérez Bay y col., 2012Thomas P y col., 1994; Henkel AW y Almers W, 1996), mientras que para la endocitosis compensatoria no hay registro de dicho fenómeno. Una hipótesis intermedia sería que en el grupo HCG se activaría un proceso adicional, pero que esto no es reflejado por la cinética, la cual sería más una resultante de la velocidad que toman estos procesos como consecuencia del perfil temporal de la concentración de Ca^{2+} citosólico.

3.2 Dependencia de la endocitosis rápida con el calcio

A- RESULTADOS

3.2.1- Efectos de un buffer rápido de calcio

En la sección anterior describimos que la magnitud de endocitosis rápida depende de la entrada de Ca^{2+} a la célula, de modo que cuando la entrada de este ion supera cierto valor (79 pC) se genera una endocitosis en exceso, cuya magnitud supera a la exocitosis previa. Por otro lado, si la entrada de Ca^{2+} es inferior, la endocitosis resultante es de tipo compensatoria.

En términos generales, se sabe que la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV produce dos tipos de señales de Ca^{2+} en cuanto a su distribución espacial y temporal. Inicialmente, la activación de la corriente de Ca^{2+} genera en pocos milisegundos señales de Ca^{2+} localizadas en forma de gradientes próximos a la membrana plasmática (Marengo FD y Monck JR, 2000). Si el estímulo se mantiene durante un tiempo prolongado, la concentración de este catión se eleva en todo el citosol (Marengo FD y Monck JR, 2003). Finalmente, luego de aproximadamente 300 mseg de finalizado el estímulo, se disipan los gradientes, y permanece transitoriamente una concentración de Ca^{2+} elevada pero homogénea en todo el citosol, la cual desciende hasta los valores basales en el término de varios segundos (Marengo FD y Monck JR, 2000). En principio, teniendo en cuenta la duración del estímulo necesaria para inducir endocitosis rápida en nuestro preparado, sería esperable que el disparador/modulador de la endocitosis rápida sea una señal de Ca^{2+} no localizada en la membrana plasmática y alejada de los sitios de entrada. Sin embargo, debido a la cinética inicial del proceso en estudio, que evoluciona en el orden de cientos de milisegundos, creímos que correspondía investigar este punto.

Para abordar esta pregunta utilizamos como estrategia experimental el reemplazo del buffer exógeno intracelular EGTA (Ethylene Glycol Tetraacetic Acid) por BAPTA (1,2-Bis (o-Amino Phenoxy) ethane-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid) a una concentración equimolar (500 µM). Estos dos buffers se unen al Ca^{2+} entrante, reduciendo la cantidad de Ca^{2+} libre, con una constante de afinidad (Kd) similar, con valores entre 0,1 - 0,2 µM (Kits KS y col., 1999; Naraghi M y Neher E, 1997; Segura J y col., 2000). Sin embargo, EGTA y BAPTA se diferencian en su rapidez para quelar el Ca^{2+}. BAPTA es un buffer rápido, ya que tiene una tasa para ligarse al ion entre 50-160 veces mayor que el EGTA. Debido a esto, el

BAPTA agregado en la solución intracelular es capaz de ligar el Ca^{2+} entrante en tiempos muy breves luego del ingreso de este último al citosol, disminuyendo la concentración de Ca^{2+} libre en una región muy próxima a los CCDV. En consecuencia, si el fenómeno en estudio depende de una señal localizada de Ca^{2+}, es esperable ver una cierta inhibición del mismo si se utiliza BAPTA como buffer intracelular exógeno en lugar de EGTA. Si en cambio este fenómeno depende de una señal de Ca^{2+} no localizada, no se espera que existan diferencias entre los efectos de los dos buffers.

En presencia de BAPTA la entrada de Ca^{2+}, calculada como la integral numérica de la corriente de Ca^{2+}, resultó tener en todos los casos medidos valores que se ubican dentro del grupo HCG, tal como se lo definió en condiciones controles con EGTA (entrada de Ca^{2+} > 79 pC). Esto es razonable, ya que el BAPTA al quelar el Ca^{2+} más rápidamente que el EGTA, debería disminuir la inactivación por Ca^{2+} de los CCDV, provocando entonces entradas de Ca^{2+} mayores. Por este motivo, sería esperable que células que en condiciones control se hubiesen ubicado dentro del LCG, al inactivarse menos sus canales, puedan pasar al grupo HCG. Consecuentemente con lo dicho, la entrada de Ca^{2+} promedio en presencia de BAPTA no resultó diferente estadísticamente del grupo HCG control en presencia de EGTA (figura 3.2.1 A), y fue significativamente mayor que la entrada de Ca^{2+} del grupo LCG control ($p<0,001$). Debido a esto, los resultados de exocitosis y endocitosis obtenidos con BAPTA son comparados con los controles del grupo HCG únicamente.

La figura 3.2.1, partes B y C, muestra dos ejemplos de trazados típicos de capacitancia de membrana de células individuales donde el buffer exógeno intracelular utilizado fue BAPTA (trazado gris). La curva negra superpuesta en cada uno de los trazados representa al promedio obtenido para el HCG en la condición control. A simple vista se puede observar que la aplicación de BAPTA redujo el tamaño de la endocitosis en comparación con EGTA.

En cuanto a la magnitud de la exocitosis, no se observaron diferencias significativas al utilizar BAPTA (figura 3.2.1 B, C y D) respecto de EGTA. Esto seguramente se debe a que la entrada de Ca^{2+} en cada uno de estos dos grupos fue similar, y a que un pulso de larga duración como el que se utiliza no diferencia entre componentes exocitóticos altamente acoplados a canales (o IRP - formado por 20 vesículas aproximadamente) y componentes poco acoplados, ya que finalmente la célula tenderá a liberar todas las vesículas maduras independientemente de su localización.

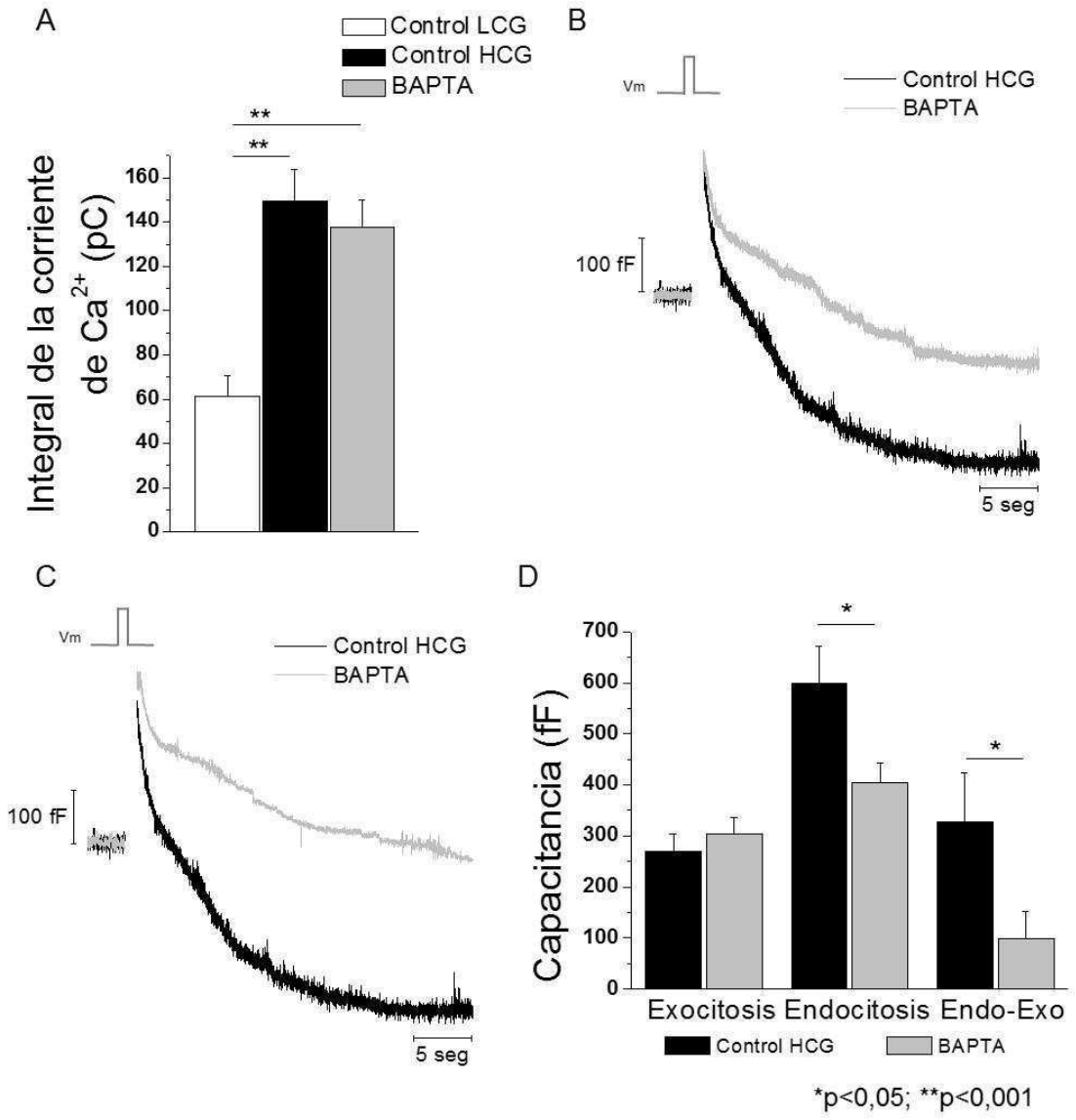

Figura 3.2.1 - La endocitosis rápida es parcialmente inhibida por el buffer rápido de Ca^{2+}, BAPTA. ***(A)*** *Comparación de las integrales de Ca^{2+} entre los grupos control LCG (n = 7), control HCG (n = 8), y otro en que se reemplazó en la solución intracelular el EGTA por una concentración equimolar de BAPTA (500 mM - n = 12). En el gráfico de barras se puede apreciar que existen diferencias significativas entre el grupo control LCG y los otros dos grupos (ANOVA, p<0,001; y contrastes de Bonferroni con un p<0,001 en ambos casos). Por otro lado los grupos control HCG y BAPTA no mostraron diferencias significativas entre ellos. Debido a esto, el grupo BAPTA se consideró, desde el punto de vista de la entrada de Ca^{2+}, comparable al control HCG, y todas las comparaciones de valores de endocitosis se realizaron respecto a dicho grupo.* ***(B y C)*** *Trazados de capacitancia celular de dos células individuales con BAPTA en la solución intracelular (trazado gris). Se puede observar a simple vista en estos trazados la presencia del componente ultra-rápido, típico del grupo HCG. En negro se muestra el trazado control promedio del HCG. Mientras que no se observan cambios en la exocitosis, la endocitosis se reduce con la aplicación de BAPTA. Arriba de los trazados se representó el pulso despolarizante aplicado (1 seg, desde -80 a +10 mV).* ***(D)*** *El gráfico de barras representa los valores obtenidos*

para la exocitosis, endocitosis y la diferencia de ambas (Endo-Exo) para las dos condiciones experimentales. Observamos que mientras que BAPTA no modificó la exocitosis, sí indujo una inhibición significativa de la endocitosis rápida y del exceso expresado como Endo-Exo (test de Student para muestras independientes, $p<0,05$).

Por otro lado, en coincidencia con lo observado en los trazados individuales, los promedios muestran que BAPTA provoca una inhibición parcial de la endocitosis rápida y una reducción marcada del exceso. Estos cambios se observaron sólo en la amplitud de la endocitosis, ya que el ajuste de la endocitosis según los dos componentes descriptos para HCG en el capítulo anterior no mostró diferencias cinéticas entre BAPTA y EGTA. Concluimos entonces que la endocitosis rápida sería activada al menos parcialmente por una señal de Ca^{2+} localizada (figura 3.2.1 D). Este punto es llamativo, ya que en general se considera a la endocitosis un proceso menos acoplado al estímulo que la exocitosis. Este efecto del BAPTA sugiere a su vez la existencia de fuentes de Ca^{2+} particulares, espacialmente asociadas a dicha endocitosis.

3.2.2- Fuentes de calcio

Una gran cantidad de procesos celulares están regulados por el Ca^{2+} citosólico. Este ion puede ingresar al citosol tanto desde el medio extracelular como desde reservorios intracelulares. En particular, la transmisión sináptica y la neurosecreción son disparadas fundamentalmente por la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular a través de los CCDV. Contrariamente, clásicamente se planteó que la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático no estaría eficientemente acoplada a la maquinaria exocitótica (Augustine GJ y Neher E, 1992). Sin embargo, tanto fuentes extracelulares como intracelulares podría participar de la regulación de procesos más lentos como la endocitosis y la movilización vesicular. Considerando esta situación, utilizamos bloqueantes farmacológicos específicos tanto para fuentes extracelulares como intracelulares de Ca^{2+}, con el objetivo de estudiar cuáles de estas vías de ingreso de Ca^{2+} al citosol están implicadas en la modulación de la endocitosis rápida.

a- Fuentes de Ca^{2+} extracelulares

Para estudiar el efecto de la entrada de Ca^{2+} desde fuentes extracelulares sobre la endocitosis rápida, utilizamos inhibidores farmacológicos específicos para los CCDV tipo L, Nitrendipina (10 µM) y los de tipo P/Q, ω-Agatoxina IVA (200 nM), ya que estos dos tipos de canales son los que lideran la mayor parte de la corriente de Ca^{2+} en el preparado celular utilizado bajo nuestras condiciones experimentales (tesis doctoral Álvarez YD, 2011; Álvarez YD y col., 2013). Las células se incubaron con los bloqueantes desde el comienzo de los experimentos, y los registros se clasificaron a posteriori en los grupos LCG y HGC según el criterio explicado previamente. La integral numérica de la corriente de Ca^{2+} (entrada de Ca^{2+}) en presencia de Nitrendipina tuvo una reducción del 42% y 38%, para LCG y HCG respectivamente con respecto al control de cada grupo. Por otro lado, ω-Agatoxina IVA generó una reducción de las integrales de la corriente de Ca^{2+} del 30% y 36%, para LCG y HCG respetivamente con respecto al control (figura 3.2.2 Bi y Ci).

La figura 3.2.2 A muestra ejemplos de trazados típicos de capacitancia de membrana de células individuales tratadas con Nitrendipina (trazado gris oscuro) y ω-Agatoxina IVA (trazado gris claro), tanto para el grupo LCG (figura 3.2.2 Ai) como para HCG (figura 3.2.2 Aii). La curva negra superpuesta corresponde al trazado promedio control para LCG y HCG, respectivamente. A simple vista se puede observar que la aplicación de ω-Agatoxina IVA no tiene efectos evidentes sobre la exocitosis ni sobre la endocitosis. Por otro lado, la Nitrendipina sí ejerce un efecto que es inhibitorio sobre la endocitosis rápida en ambos grupos.

Como puede observarse en la figura 3.2.2 Bii y Cii, para LCG y HCG respectivamente, el tratamiento con ambos bloqueantes no modificó la exocitosis en comparación con la condición control. Con respecto a la endocitosis rápida, el bloqueante de los canales P/Q tampoco modificó la magnitud de este parámetro, tanto para el LCG como para el HCG. Sin embargo, al bloquear los canales de tipo L, la endocitosis rápida quedó casi completamente inhibida en comparación a los controles en ambos grupos. Esto generó la falta casi completa de compensación de la exocitosis por parte de la endocitosis (Endo-Exo < 0) para ambos grupos en presencia de Nitrendipina.

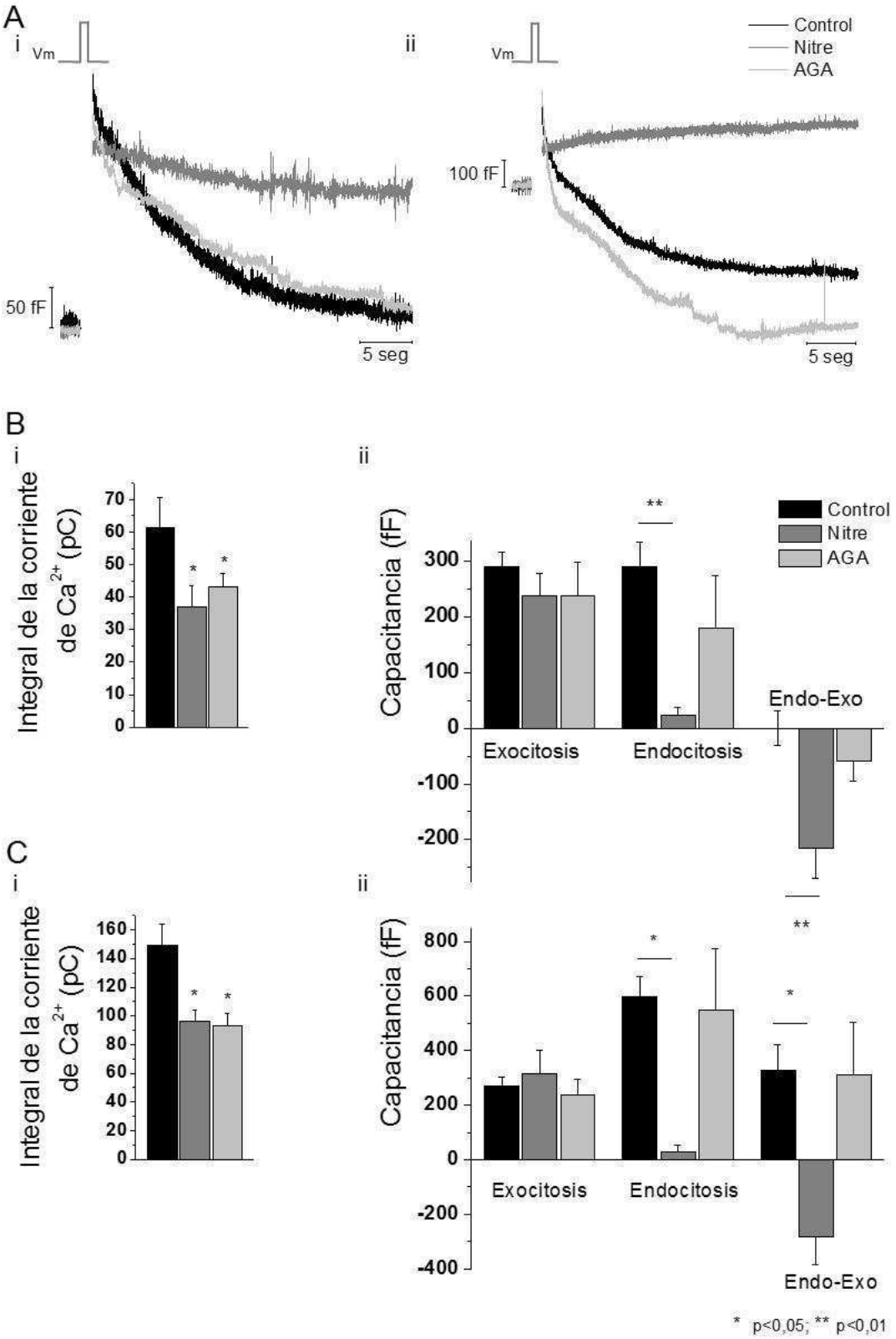

Figura 3.2.2 - Bloqueo de la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV tipo L y P/Q. Efecto sobre la endocitosis rápida. (A) *Evolución temporal de la capacitancia de membrana en respuesta a un pulso*

despolarizante de 1 seg. ***(i) y (ii)*** *Trazados de capacitancia de células individuales sometidas a la inhibición de los CCDV tipo L con 10 µM de Nitrendipina (Nitre, trazado gris oscuro) y de tipo P/Q por agregado de 200 nM de ω-Agatoxina IVA (AGA, trazado gris claro), para LCG y HCG respectivamente, comparadas con el trazado control promedio respectivo (negro). En ambos grupos la endocitosis se inhibe con la aplicación de Nitre.* ***(B)*** *Efectos de Nitre y Aga sobre LCG.* ***(i)*** *Promedios (con sus respectivos errores estándares) de las integrales de las corrientes de Ca^{2+} de la condición control (n = 7) y en presencia de Nitre (n = 5) o AGA (n = 5). Se encontraron diferencias significativas (ANOVA, p<0,05), con una reducción del 42 % para Nitre y del 30 % para AGA respecto del control (en ambos, p < 0,05). (ii) Promedios (con sus respectivos errores estándares) de los parámetros de exocitosis, endocitosis y la diferencia entre ambos (Endo-Exo). Se observa que ninguno de los dos bloqueantes afectó significativamente a la exocitosis respecto de los valores controles. Sin embargo, el bloqueante de canales L (Nitre) inhibió significativamente a la endocitosis rápida respecto del control (ANOVA, p<0,01; Bonferroni, p<0,01). En consecuencia, se anuló la compensación de la exocitosis previa, volviéndose la diferencia Endo-Exo significativamente negativa (p<0,01). Contrariamente, el bloqueante de los canales P/Q (AGA) no tuvo efectos significativos sobre ninguno de los dos parámetros.* ***(C)*** *Efectos de Nitre y Aga sobre HCG.* ***(i)*** *Se observan diferencias en la integral de la corriente de Ca^{2+} (ANOVA, p<0,01), con una reducción del 36 % y 38 % al aplicar Nitre (n = 4) y AGA (n = 5) en comparación con los controles (n = 8) (en ambos, Bonferroni p<0,05).* ***(ii)*** *Tampoco se observaron aquí efectos sobre la exocitosis. Por otro lado, Nitre redujo significativamente la endocitosis (ANOVA, p<0,05; Bonferroni, p<0,05), pero esta no fue afectada por AGA. Consecuentemente, el parámetro Endo-Exo resultó nuevamente afectado por Nitre (ANOVA, p<0,05; Bonferroni, p<0,05), pero no por AGA*

Por lo tanto, nuestros resultados muestran que en las células cromafines de ratón la endocitosis rápida es dependiente de la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV de tipo L, pero es insensible a la inhibición de los canales P/Q.

b- Fuentes de Ca^{2+} intracelulares:

El retículo endoplasmático acumula Ca^{2+} en su lumen por medio de una Ca^{2+} ATPasa de tipo SERCA (Mathiasen D y col, 1993), y puede liberarlo al citosol a través de canales activados por Ca^{2+} (receptores de rianodina) o por IP_3 (receptores de IP_3) (Berridge MJ, 1997). En general, esta organela es considerada la principal fuente fisiológica de liberación de Ca^{2+} en células eucariotas, y su participación en cromafines ha sido corroborada por diversos autores (Mathiasen D y col., 1993; Poulsen JC y col., 1995; Rigual R y col., 2002). Ha sido demostrado también que las vesículas secretorias poseen estos sistemas de acumulación y liberación de Ca^{2+}, y se propuso que pueden participar en la regulación del proceso secretorio (Borges R y col., 2012; Camacho M y col., 2008; Santo Domingo J y col., 2008). Está ampliamente demostrado que en ciertos tipos celulares existe un acoplamiento entre la entrada de Ca^{2+} vía los CCDV de tipo L y la

liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático vía los receptores de rianodina (Fabiato A, 1983; Lemmens R y col., 2001). Si bien los cardiomiocitos son el ejemplo más paradigmático para este mecanismo, la presencia del mismo también ha sido propuesta en células cromafines (Alonso MT y col., 1999). Debido a que, como ha sido presentado en el apartado anterior, nuestros resultados muestran que en las células cromafines de ratón la endocitosis rápida es dependiente de la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV de tipo L, pero es insensible a la inhibición de los canales P/Q (figura 3.2.2), se consideró la posibilidad de que la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático pueda intervenir en la generación de este proceso.

Para estudiar la posible regulación de la endocitosis rápida por la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplasmático se utilizaron tres estrategias experimentales. Vale aclarar que toda esta batería de tratamientos es válida para cualquier compartimiento intracelular que posea este mecanismo de liberación de Ca^{2+}, incluidas las vesículas. La primera de ellas fue el vaciamiento de Ca^{2+} del retículo endoplásmico mediante el pretratamiento con tapsigargina (1 μM) + cafeína (1 mM). La tapsigargina inhibe a la bomba de tipo SERCA (Thastrup O y col., 1990), que transporta Ca^{2+} desde el citosol hacia el interior del retículo. A su vez la cafeína promueve una apertura sostenida de los canales de Ca^{2+} asociados a los receptores de rianodina, generando una fuga de Ca^{2+} desde el retículo hacia el citosol. Este tratamiento combinado, induce por lo tanto un vaciamiento del contenido de Ca^{2+} del retículo, e inhibe consecuentemente la liberación de este catión a través de los receptores de rianodina e IP_3. Se pre-incubaron las células con estas drogas por 40 min, manteniéndolas durante la aplicación del estímulo. Como segunda estrategia, se bloqueó la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico pre-tratando con 100 μM de rianodina durante 15 min previos al estímulo, y manteniendo la droga durante el mismo (ZhuGe R y col., 2006). Por último, se realizó un pre-tratamiento por 15 minutos con 2-APB (2-aminoethoxydiphenyl borate, 10 μM), droga que bloquea a los receptores de IP_3 del retículo endoplasmático.

La figura 3.2.3 muestra ejemplos de trazados típicos de capacitancia de membrana de células individuales tratadas con tapsigargina + cafeína (T+C, trazado verde), rianodina (Ry, trazado azul) y 2-APB (trazado gris), tanto para el grupo LCG (figura 3.2.3 A) como para HCG (figura 3.2.3 B). La curva negra superpuesta corresponde al trazado promedio obtenido en la condición control para cada uno de los grupos, LCG y HCG. En ambos grupos se puede observar que los tratamientos farmacológicos muestran una tendencia a inhibir la endocitosis.

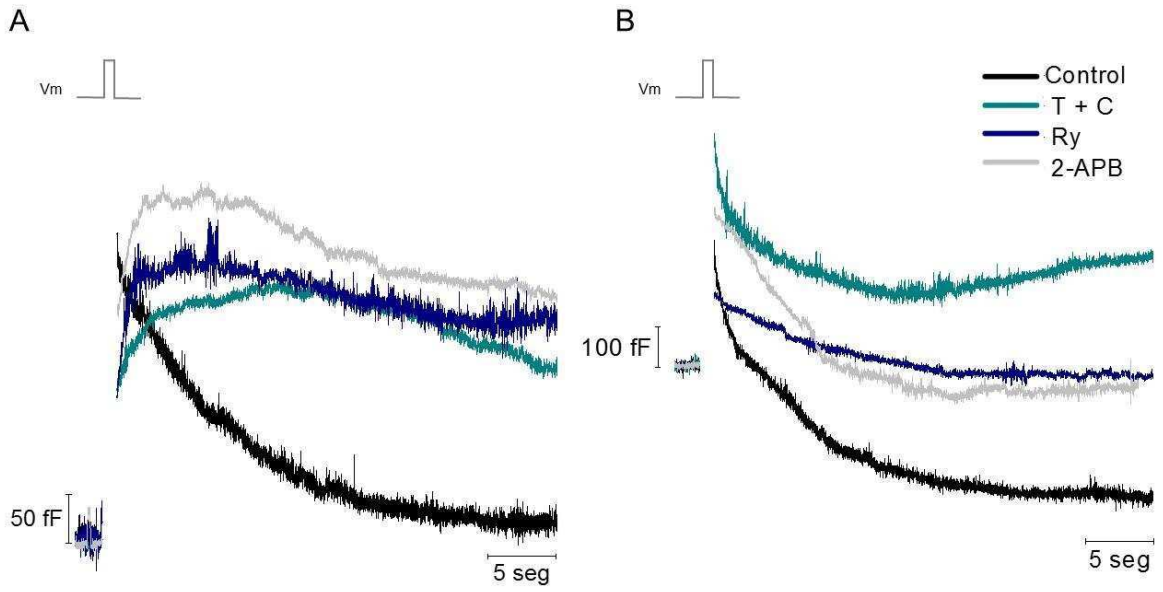

Figura 3.2.3 - Efecto de la inhibición de la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático sobre la endocitosis rápida. *Evolución temporal de los cambios de capacitancia celular en respuesta a un pulso despolarizante de 1 seg.* ***(A)*** *Trazados de capacitancia celular de tres células individuales pertenecientes al LCG sometidas a tratamientos dirigidos a inhibir la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático, ya sea por vaciamiento del mismo previamente a la aplicación del estímulo mediante el tratamiento con tapsigargina (1 μM) + cafeína (1mM) (T + C - trazado verde), por bloqueo de los receptores de rianodina con rianodina (Ry = 100 μM - trazado azul), o por bloqueo de los receptores de IP3 con 2-APB (10 μM - trazado gris). En negro se encuentra superpuesto el trazado control promedio del LCG.* ***(B)*** *Trazados de capacitancia celular de células del HCG sometidas a los tres tratamientos mencionados en (A), con el trazado control promedio del HCG superpuesto. En los tres trazados de las células tratadas de cada grupo se observa una reducción de la endocitosis rápida en relación al control.*

Estos grupos experimentales resultaron laboriosos porque muchas células no alcanzaron en condiciones óptimas la etapa de medición luego del período de pre-incubación con las drogas, y debieron ser descartadas por la presencia de una corriente de fuga mayor a nuestro límite aceptado (-30pA). A consecuencia de esto, en algunos casos el número de experimentos que se presenta es bajo. Por lo tanto, primero se analizaron los resultados dividiéndolos entre los grupos LCG y HCG, y luego estos se agruparon en un único *pool* para poder tener más confiabilidad estadística sobre las conclusiones extraídas. Se presentan ambos análisis.

Tal como puede observarse en la figura 3.2.4 Ai y Bi, las integrales de la corriente de Ca^{2+} en los tres tratamientos resultaron similares a las de las células control en el grupo

LCG, pero no fue así para T+C y Ry en el HCG ($p < 0,05$). Desconocemos el origen de este efecto inhibitorio, y no encontramos precedentes en la bibliografía.

En el grupo LCG (figura 3.2.4 Aii), los tres tratamientos aplicados no afectaron la exocitosis respecto al control, pero sí inhibieron parcialmente la endocitosis rápida (ANOVA, $p<0,01$). Como se explica en la sección 2.4.3 (Análisis Estadístico) del capítulo de Materiales y Métodos, luego de obtener un ANOVA significativo, se procedió a realizar contrastes por el método de Holm-Sidak. Este es un método muy sensible que permite obtener un primer panorama de la situación y, en el caso de haber encontrado diferencias significativas, se continúa el análisis mediante contrastes por el método de Bonferroni. Al aplicar Holm-Sidak sobre estos resultados se obtuvieron diferencias significativas entre el control y los tres tratamientos (Holm-Sidak, $p<0,05$). Sin embargo, Bonferroni sólo reportó diferencias significativas para las células tratadas con T+C (Bonferroni, $p<0,05$). Por otro lado, el parámetro Endo-Exo no presentó diferencias significativas en ningún caso (ANOVA, $p>0,05$), aunque mostró una tendencia a reducirse en los tres tratamientos aplicados.

Para el grupo HCG tampoco se observaron cambios en la exocitosis, pero sí hubo un efecto significativo de los tratamientos tanto sobre la endocitosis, como sobre el parámetro Endo-Exo (ANOVA, $p<0,01$; figura 3.2.4 Bii). El test post-ANOVA de Holm-Sidak indicó que existen diferencias significativas en la endocitosis rápida entre las células control y las células de los tres tratamientos utilizados para inhibir la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático ($p<0,05$). Al realizar el análisis estadístico mediante el test de Bonferroni vimos que tanto rianodina como 2-APB generaron una reducción significativa en la endocitosis rápida ($p<0,05$), aunque este test no mostró diferencias significativas para T+C. Por otro lado, el parámetro Endo-Exo resultó significativamente reducido (ANOVA $p<0,01$) en los tres casos (por Bonferroni, $p<0,05$ para T+C y para Ry, y $p<0,01$ para 2-APB), eliminándose por completo el exceso en la endocitosis.

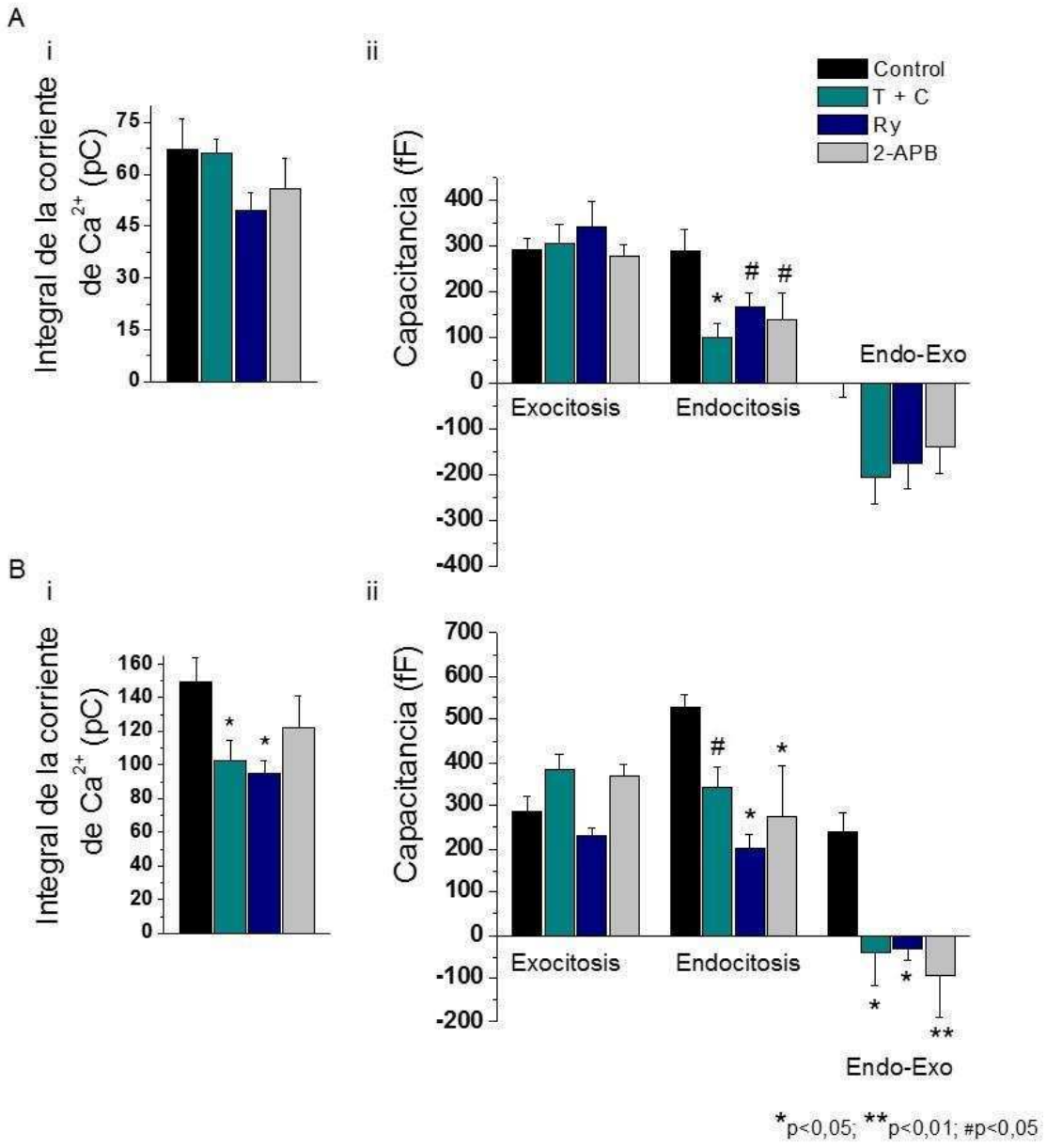

Figura 3.2.4 - Participación de la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático en la endocitosis rápida. (A) *Datos obtenidos en los experimentos del LCG (entrada de Ca^{2+} < 75 pC).* ***(i)*** *El diagrama de barras muestra las integrales de Ca^{2+} en la condición control (n = 7), en presencia de tapsigargina 1 μM + cafeína 1mM (T+C; n = 5), rianodina 100 μM (Ry; n = 10), y 2-APB 10 μM (n = 5). No se observan diferencias significativas entre el control y los tres grupos tratados.* ***(ii)*** *Mientras la exocitosis fue similar entre todos los grupos experimentales y el control, los tres tratamientos redujeron significativamente la endocitosis (ANOVA, p<0,01) según un contraste post-ANOVA muy sensible como Holm-Sidak (p<0,05, ver símbolo # en la figura Aii, sólo indicado para T+C y 2-APB). Sin embargo, al aplicar un test más exigente como Bonferroni, sólo la endocitosis de las células tratadas con T+C resultó significativamente menor que el control (p<0,05). Por otro lado, ninguno de los tres tratamientos utilizados generó una reducción significativa en el parámetro Endo-Exo, aunque mostraron una cierta tendencia.* ***(B)*** *Datos obtenidos en los experimentos del HCG (entrada de*

*Ca^{2+} > 75 pC). **(i)** La integral de la corriente de Ca^{2+} en presencia de T+C (n =8) y de Ry (n = 6) difirió respecto al control (n = 8) (ANOVA, p < 0,05; Bonferroni, p < 0,05). **(ii)** La exocitosis fue similar en todos los grupos experimentales, pero al igual que en LCG la endocitosis rápida mostró diferencias significativas entre los grupos (ANOVA, p<0,01). Ésta resultó ser menor que el control (n = 8) para Ry (n = 6) y para 2-APB (n =5) (test de Bonferroni, p<0,05). Además, al utilizar en el análisis el contraste post-ANOVA de Holm-Sidak se obtuvieron diferencias significativas con respecto al control para los tres grupos experimentales (particularmente para las células tratadas con T+C (n = 8), p<0,05, esto se expresa con el símbolo #). Finalmente, el parámetro Endo-Exo se redujo significativamente en los tres tratamientos respecto del control (contrastes de Bonferroni post-ANOVA, p<0,05 para T+C y Ry; y p<0,01 para 2-APB).*

Los tratamientos farmacológicos utilizados mostraron, en general, una clara tendencia, que sugiere que la inhibición de la liberación de Ca^{2+} por parte del retículo participaría de la regulación de la endocitosis rápida. Sin embargo, los resultados no son concluyentes, porque si bien algunos tratamientos dieron estadísticamente significativos con un test exigente como Bonferroni, otros dieron sólo significativos a partir de Holm-Sidak, y otros mostraron una clara tendencia pero que no resultó estadísticamente significativa. Por otro lado no se observó una clara correspondencia de los resultados entre LCG y HCG, ni tampoco entre la endocitosis y el parámetro Endo-Exo. Del comportamiento de los experimentos individuales se puede observar que si bien en algunos casos hay una reducción de la magnitud total de la endocitosis, en otros se observa más bien un enlentecimiento del proceso (figura 3.2.3 A). Por lo tanto, para reforzar nuestras conclusiones, en este caso particular decidimos evaluar la magnitud de la endocitosis rápida que ocurre a los 26 seg posteriores de finalizado el estímulo, lo que corresponde al tiempo en el que ocurre aproximadamente el 90% de la endocitosis rápida en la condición control. Decidimos realizar esta evaluación cinética en vez de los ajustes de los componentes rápido y ultrarrápido según se describió en el capítulo anterior, debido a que en muchos casos la aplicación de las drogas resultó en una endocitosis que no siguió un patrón de decaimiento exponencial, observándose claros retardos antes de comenzar la caída de la capacitancia (ver figura 3.2.3 A, a modo de ejemplo). Según puede verse en la figura 3.2.5 A y B, se encontraron diferencias significativas en la endocitosis medida a los 26 seg entre el control y los tres tratamientos (T+C, Ry y 2-APB), tanto en el LCG como en el HCG (ANOVA, p<0,05; contrastes por el método de Bonferroni, p<0,05 en todos los casos). Este resultado confirma que efectivamente los tres tratamientos generan una inhibición de la endocitosis, y que si bien en algunos casos la disminución de su amplitud

puede ser cuestionada porque no resiste un test estadístico exigente, al menos no quedan dudas de que resulta enlentecida.

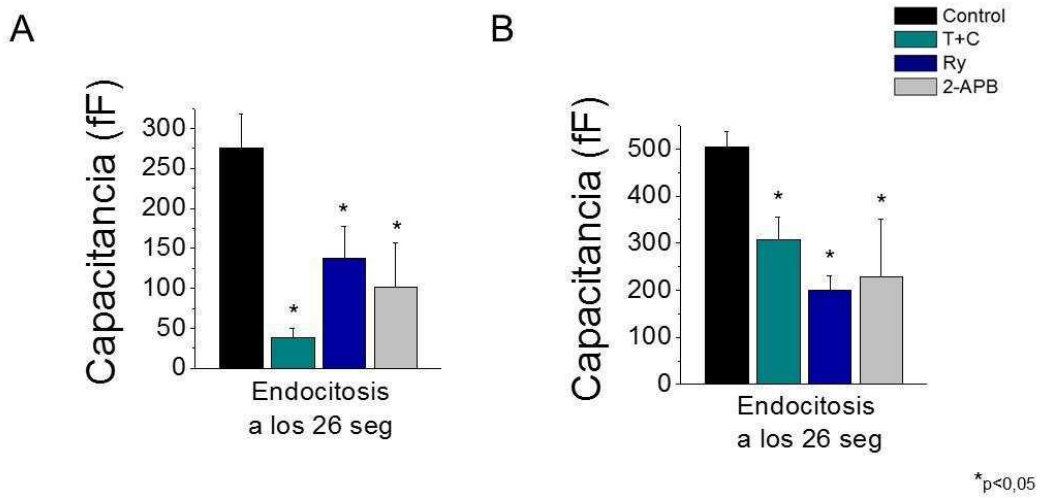

Figura 3.2.5 - La endocitosis rápida depende de la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático. *Endocitosis rápida medida a los 26 seg de terminado el pulso despolarizante de 1 seg.* ***(A)*** *Para LCG se encontraron diferencias significativas entre los grupos (ANOVA, p<0,05). Al realizar contrastes por Bonferroni, resultó que la endocitosis rápida medida a los 26 seg de terminado el estímulo fue significativamente menor (p<0,05) que el control (n=7) para los tres tratamientos (T+C, n=5; Ry, n=10; 2-APB, n=5).* ***(B)*** *Para HCG también se encontraron diferencias significativas entre los grupos (ANOVA, p<0,05). Al realizar contrastes por Bonferroni, la endocitosis rápida medida a los 26 seg de terminado el estímulo fue significativamente menor (p<0,05) que el control (n=8) para los tres tratamientos (T+C, n=8; Ry, n=6; 2-APB, n =5).*

Por último, agrupamos los datos de la figura 3.2.4 en un mismo *pool,* sin importar a qué grupo (LCG o HCG) pertenezcan (figura 3.2.6). Una vez agrupados los datos, las integrales de la corriente de Ca^{2+} y la exocitosis resultaron similares entre los tres tratamientos y el control. Vale aclarar que cuando se realizó el agrupamiento de los datos, estos no pasaron los criterios de normalidad por lo cual se aplicaron test estadísticos no paramétricos. Esto creemos, es razonable, ya que se están agrupando datos de dos poblaciones diferentes. El bloqueo de los receptores de rianodina con Ry o el bloqueo de los receptores de IP_3 con 2-APB generaron una reducción significativa de la endocitosis rápida (p<0,05, método de Dunn´s post-ANOVA no paramétrica (Kruskal-Wallis)).

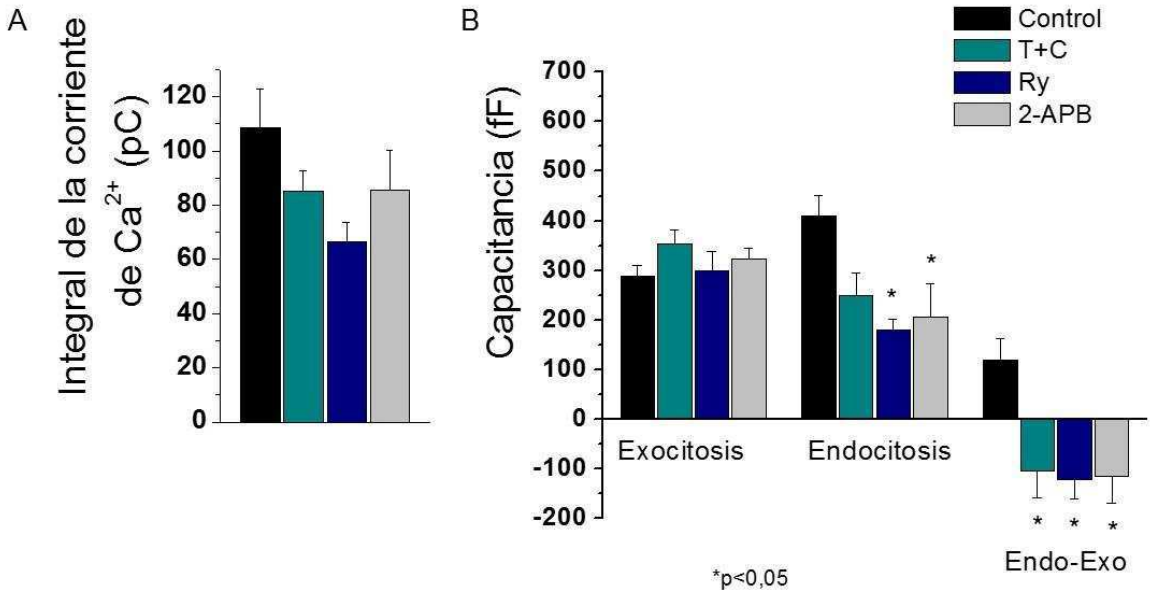

***Figura 3.2.6 - Datos agrupados de experimentos realizados con inhibidores de la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático**. **(A)** Comparación de las integrales de corrientes de Ca^{2+} entre la condición control (n = 14) y en presencia de T+C (n = 13), Ry (n = 16), o 2-APB (n = 10). No se observan diferencias significativas entre el control y los tres grupos tratados. **(B)** No se observaron diferencias entre la exocitosis de los grupos tratados y el control. Por otro lado, sí se encontraron diferencias en relación a la endocitosis (Kruskal-Wallis, p<0,01), ya que la aplicación de Ry y de 2-APB generaron una reducción en la endocitosis rápida (Dunn´s, p<0,05). Por otro lado, el vaciamiento del retículo endoplasmático con T+C no presentó diferencias al realizar los contrastes post ANOVA. Sí se observó una reducción significativa de Endo-Exo (Kruskal-Wallis, p<0,005) en los tres tratamientos respecto del control (Dunn´s, p<0,05).*

Contrariamente, el vaciamiento del retículo endoplasmático con tapsigargina + cafeína no llegó a generar una reducción significativa de este parámetro. Finalmente, el parámetro Endo-Exo resultó tener mayor sensibilidad, ya que los tres tratamientos descriptos lo redujeron muy significativamente respecto de la situación control (p<0,05).

Nuevamente evaluamos la magnitud de la endocitosis rápida que ocurre a los 26 seg posteriores de finalizado el estímulo, ahora para los datos agrupados. Según puede verse en la figura 3.2.7, se encontraron diferencias significativas en este parámetro entre el control y los tres tratamientos utilizados para inhibir la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático (tapsigargina + cafeína, rianodina y 2-APB). Este resultado nuevamente confirma que la inhibición de la liberación de Ca^{2+} por parte del retículo genera una inhibición de la endocitosis (p<0,05, método de Dunn´s post-ANOVA no paramétrica (Kruskal-Wallis)).

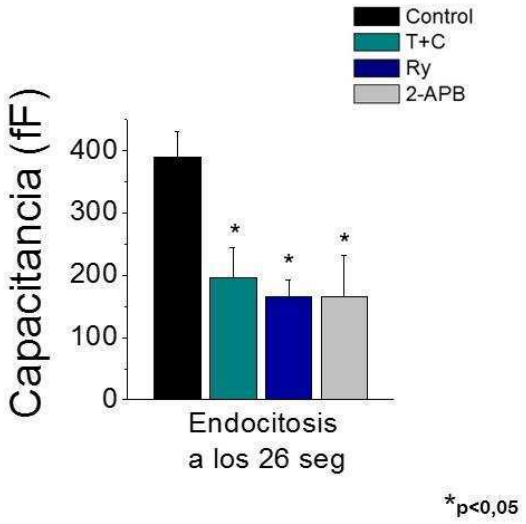

Figura 3.2.7 - Endocitosis rápida a los 26 seg del estímulo (datos agrupados). *Se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Kruskal-Wallis, p<0,01). Tanto el vaciamiento del retículo endoplasmático (T+C), como la aplicación de Ry o de 2-APB generaron una reducción en la endocitosis rápida (método de Dunn´s, p<0,05).*

Los experimentos de este capítulo, en su conjunto, apoyan la idea de que la endocitosis rápida está fuertemente regulada por Ca^{2+}, teniendo participación como fuentes de Ca^{2+} tanto los CCDV de tipo L de la membrana plasmática, como la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático.

B- DISCUSIÓN

El buffer rápido BAPTA ha sido ampliamente utilizado para estudiar el nivel de acoplamiento espacial entre las fuentes de Ca^{2+} y las vesículas sinápticas y secretorias (Kits KS y col., 1999; Neher E, 1998; Meinrenken CJ y col., 2002). Si estas últimas se ubicasen a distancias cercanas a los canales, un buffer rápido como el BAPTA, a diferencia de uno lento como el EGTA, tendría la capacidad de interceptar al Ca^{2+} antes de que este llegue al sensor en la vesícula (Neher E, 1998), y consecuentemente inhibiría la exocitosis de las mismas. Este concepto puede ser aplicado a cualquier proceso Ca^{2+} dependiente en el que se quiera analizar la localización del sensor de Ca^{2+} respecto de la fuente por donde ingresa este catión. Bajo esta lógica, se plantea que si se utiliza BAPTA en lugar de EGTA, es esperable ver una mayor inhibición relativa en el fenómeno que uno

está estudiando, siempre y cuando éste dependa de una señal localizada de Ca^{2+}. Caso contrario, se espera que no existan diferencias entre los efectos de los dos buffers.

En base a lo expuesto arriba podría esperarse en principio que el agregado de BAPTA inhiba parcialmente la exocitosis. Sin embargo, los resultados muestran que el reemplazo de EGTA con este buffer no afectó la magnitud de dicha variable (figura 3.2.1 D). Para poder entender este resultado debemos considerar que un pulso de larga duración como el que se utiliza en este trabajo no diferencia entre componentes exocitóticos altamente acoplados a canales y componentes poco acoplados, ya que la cantidad de Ca^{2+} entrante es suficiente para liberar todas las vesículas maduras independientemente de su localización (Álvarez YD y Marengo FD, 2011; Álvarez YD y col., 2013; Marengo FD, 2005; Voets T y col., 1999). Respecto a esto, observamos previamente que un doble pulso de 100 mseg induce una exocitosis de idéntica magnitud tanto en presencia de BAPTA o de EGTA, y que recién se observa un efecto significativo de BAPTA cuando las despolarizaciones fueron menores a 50 mseg (Álvarez YD y col., 2013).

Por otro lado, los datos presentados en este trabajo de tesis muestran una inhibición parcial de la endocitosis rápida y una reducción del exceso, cuando se reemplazó EGTA por BAPTA (figura 3.2.1 D). Por lo tanto, estos resultados podrían explicarse plateando la existencia de una colocalización entre la fuente y el/los sensor/es de Ca^{2+} que dispara/n la endocitosis rápida. Esto es particularmente llamativo, ya que en general se considera a la endocitosis un proceso menos acoplado al estímulo que la exocitosis. Una hipótesis alternativa es que la entrada de Ca^{2+} por los CCDV activaría a su vez la liberación de más Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático por el mecanismo de amplificación denominado "liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}" (Fabiato A, 1983; Lemmens R y col., 2001). Según esta segunda hipótesis el Ca^{2+} liberado desde el retículo podría generar una señal de Ca^{2+} amplificada que sería finalmente la que induce la endocitosis. Esta hipótesis implicaría una colocalización espacial entre los CCDV y los receptores de rianodina del retículo endoplasmático, pero no necesariamente entre estas fuentes de Ca^{2+} y el sensor que provoca la endocitosis.

Se cumpla la primera o la segunda hipótesis mencionadas arriba, resulta lógico plantear que el mecanismo de activación de la endocitosis se inicie por una entrada de Ca^{2+} a través de CCDV, ya que el estímulo aplicado consiste en una despolarización. Hemos demostrado previamente que la corriente de Ca^{2+} en nuestro preparado está fundamentalmente compuesta de una fracción asociada a canales tipo P/Q y otra

asociada a canales de tipo L (Álvarez YD y col., 2008). En este trabajo de tesis, observamos que en las células cromafines de ratón la endocitosis rápida es dependiente de la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV de tipo L, pero es insensible a la inhibición de los canales P/Q (figura 3.2.3). Esto es coherente con lo previamente reportado en células cromafines bovinas, donde las evidencias muestran que los CCDV de tipo L estarían involucrados en la regulación de la endocitosis rápida (Rosa JM y col., 2007 y 2011).

Por otro lado, el bloqueo de los CCDV de tipo L o P/Q no generó cambios en la exocitosis, tal como puede observarse en la figura 3.2.3 Aii y Bii. En un principio, podría esperarse una exocitosis significativamente menor cuando la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV esté inhibida, debido a la fuerte dependencia que existe entre la exocitosis y el Ca^{2+}. Sin embargo, los resultados podrían explicarse si consideramos que los valores de entrada de Ca^{2+} en presencia de los bloqueantes son suficientes para desencadenar la fusión de la totalidad de vesículas que están maduras para exocitarse (la totalidad de las vesículas del RRP). Esto último es coherente con lo observado respecto a las exocitosis de los grupos LCG y HCG en condiciones control, las cuales fueron similares pese a ser inducidas por corrientes de Ca^{2+} muy diferentes. En nuestro laboratorio, se ha estimado que en células cromafines de ratón en cultivo la mayor parte de las vesículas secretorias que componen el RRP pueden ser liberadas con dos pulsos consecutivos de 100 mseg (Tesis Doctoral Álvarez YD, 2011; Álvarez YD y col., 2013; Gillis K y col., 1996; Voets T y col., 1999). En dichos experimentos la densidad total de corriente obtenida fue de 23 ± 5 pA/pF. Considerando que la capacitancia de membrana celular promedio de las células es de 6 pF, e integrando la corriente, se puede estimar la entrada de Ca^{2+} a la célula en aproximadamente 28 ± 6 pC. Este valor es inferior a los 56 ± 5 pC que ingresan a la célula al estimularlas con un pulso cuadrado de 1 seg en el caso del LCG, y aún mucho menor a los 139 ± 8 pC obtenidos para las del HCG. Incluso, este valor sigue siendo menor que el que se obtiene al bloquear los CCDV tipo P/Q (43 ±4 pC y 99 ± 9 pC para LCG y HCG, respectivamente) o tipo L (37 ± 6 pC y 96 ± 8 pC para LCH y HCG, respectivamente). Por lo expuesto, en todos los casos mencionados la entrada de Ca^{2+} es superior a la necesaria para liberar todo el RRP. Esto tal vez sea la razón por la cual no vemos cambios significativos en la exocitosis.

El mecanismo propuesto para la regulación de la endocitosis por Ca^{2+} se basa en la formación del complejo Ca^{2+}-calmodulina, que a su vez activa a la fosfatasa calcineurina, que desfosforila a varias proteínas asociadas a la endocitosis activándolas (Wu LG y col., 2014). La dependencia observada de la endocitosis con la corriente de Ca^{2+}

de tipo L podría explicarse mediante una hipotética colocalización la maquinaria endocitótica con los canales de tipo L (Wu LG y col., 2014). Sin embrago, utilizando anticuerpos fluorescentes en células cromafines bovinas no se ha podido encontrar colocalización entre ninguno de los CCDV (tipo L, N o P/Q) y la clatrina, y sólo se encontró un 20-30% de colocalización entre ellos y dinamina. Lo que sería incompatible con la posibilidad que los canales L estén acoplados a la maquinaria endocitótica (Rosa JM y col., 2011). En ese mismo trabajo, Rosa y colaboradores propusieron que la mayor eficiencia de los canales de tipo L en activar la endocitosis se debería a su lenta inactivación en comparación a los canales P/Q o N. Esta hipótesis es razonable, ya que está aceptado que la endocitosis es un proceso lento en comparación a la exocitosis, y que necesita de un aumento menor, pero más sostenido en el tiempo, el cual sería provisto de mejor manera por los canales de tipo L (Rosa JM y col., 2011).

Una hipótesis alternativa a la planteada por Rosa y colaboradores, aunque ambas no son mutuamente excluyentes, sería que los canales de tipo L estuviesen acoplados a la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático. Este mecanismo generaría una señal de Ca^{2+} amplificada, global y sostenida en el tiempo, aunque poco acoplada a la exocitosis (Augustine GJ y Neher E, 1992). Una asociación espacial íntima entre los CCDV tipo L y los receptores de rianodina, que resulta en la activación de la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático fue ampliamente demostrada en otros sistemas (Lemmens R y col., 2001). El ejemplo más representativo es el músculo cardíaco, donde este tipo de proceso fue muy estudiado (Fabiato A, 1983). En células cromafines bovinas y de ratón, también se demostró la existencia de un mecanismo de amplificación de la señal de Ca^{2+} a través de los receptores de rianodina (Verkhratsky A, 2002; Wu PC y col., 2010). En los cardiomiocitos, la distancia entre el túbulo T de la membrana plasmática que contiene a los CCDV y la cisterna terminal del retículo, que contiene a los receptores de rianodina, es de aproximadamente 12 nm (Peskoff A y Langer GA, 1998). Como se mencionó previamente, los experimentos realizados con BAPTA en esta tesis sugieren la presencia de un acople espacial entre una fuente y un sensor de Ca^{2+}. De acuerdo con Naraghi y Neher (Naraghi M, Neher E, 1997), el BAPTA presenta una constante espacial (distancia media que recorre el Ca^{2+} antes de ser captado por el buffer) de 30 nm, lo cual implicaría que la distancia entre la fuente y el sensor debería ser menor a 100 nm. Por lo tanto, esta hipótesis sería compatible con los resultados obtenidos con BAPTA, y también con los bloqueantes de canales de Ca^{2+} utilizados. Respecto a los experimentos en los que se bloqueó la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático, nuestros resultados

indican que este proceso contribuye a la generación de la endocitosis rápida, y en principio parecería que tendrían participación tanto los canales de Ca^{2+} asociados a los receptores de rianodina como los de IP_3 (figuras 3.2.4 Aii y Bii, 3.2.5 y 3.2.7 B). Respecto a la posible participación de estos últimos, es importante notar que existen datos en la literatura que sugieren que el 2-APB podría tener un efecto inhibitorio sobre la SERCA (Bilmen JG y col., 2002). Por lo tanto, este efecto secundario del 2-APB podría generar un vaciamiento del retículo endoplasmático cualitativamente similar al que genera la tapsigargina. Por otro lado, si tanto los receptores de rianodina como los de IP_3 estuviesen contribuyendo a la generación de la endocitosis rápida, se esperaría que el vaciamiento del retículo por tapsigargina + cafeína genere una inhibición sobre la endocitosis mayor al producido por el bloqueo de uno u otro receptor en forma independiente. Los resultados obtenidos muestran que esto no es así. La especificidad de la rianodina en bloquear los receptores del mismo nombre, nos permite postular con un buen grado de confianza que esta vía de liberación de Ca^{2+} está involucrada en el proceso en estudio. Sin embargo, nuestros resultados no nos permiten concluir que la vía del IP_3 lo esté.

Resumiendo, una hipótesis coherente con el conjunto de nuestros resultados experimentales sería: (i) la entrada de Ca^{2+} por los CCDV tipo L en un espacio restringido próximo a los receptores de rianodina dispara la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplasmático; (ii) el Ca^{2+} liberado por el retículo, sumado probablemente al Ca^{2+} ingresado por canales de tipo L, generaría una señal de Ca^{2+} generalizada y sostenida en el citosol que sería la responsable de disparar la endocitosis; (iii) esta hipótesis lleva implícita la presencia de un sensor de Ca^{2+} para la activación de la endocitosis, no necesariamente localizado, pero sí sensible a las concentraciones moderadas de Ca^{2+} que se presentan en el citosol luego de la disipación de los gradientes localizados de este catión que son generados inmediatamente luego del estímulo (Marengo FD y Monck JR, 2000). De acuerdo con esta hipótesis, el agregado de BAPTA a la solución intracelular generaría que el aumento de Ca^{2+} que se produce debido a la entrada de Ca^{2+} por los CCDV de tipo L en una subregión próxima a los receptores de rianodina sea reducido, con lo que se anularía al menos parcialmente la liberación de más Ca^{2+} desde el retículo, y en consecuencia la endocitosis rápida que se observa sería menor, tal como ocurre.

3.3 Mecanismos moleculares que intervienen en la endocitosis rápida

A- RESULTADOS

La endocitosis es un proceso crucial que se produce en las células neuroendocrinas para mantener la homeostasis de la membrana, el reciclado vesicular, y la capacidad de secreción hormonal. En las células cromafines se han descripto diferentes mecanismos de endocitosis: la endocitosis clásica clatrina dependiente, que es un mecanismo universal de internalización de membrana de las células eucariotas (Artalejo CR y col., 2002; Chan SA y col., 2003; Koval LM y col., 2001; Smith SM y col., 2008); el *kiss & run* (Cecarelli B y col., 1973; Elhamdani A y col., 2006; Fulop T y Smith C, 2006), que es un mecanismo que involucra la formación transitoria de un poro de fusión entre la vesícula y la membrana plasmática, con liberación parcial del contenido vesicular y posterior recuperación de la vesícula intacta; y finalmente la endocitosis de tipo *bulk*, en la que se invaginan grandes áreas de membrana (Artalejo CR y col., 1995; Burgoyne RD, 1995; Pérez Bay AE y col., 2007; Pérez Bay AE y col., 2012). Como ya se explicó previamente en esta tesis, desde un punto de vista cinético la endocitosis se ha clasificado como lenta (Artalejo CR y col., 2002) y rápida (Artalejo CR y col., 1995; Artalejo CR y col., 2002; Burgoyne RD, 1995; Nucifora PG y Fox AP, 1999). Si bien tradicionalmente se ha considerado a la endocitosis clatrina dependiente un proceso lento (Artalejo CR y col., 2002) y al *kiss & run* uno rápido (Cecarelli B y col., 1973), existen hoy evidencias que indican que los tres mecanismos endocitóticos nombrados anteriormente (clatrina dependiente, *kiss & run*, *bulk*) pueden evolucionar con una cinética rápida (He Z y col., 2008; Cecarelli B y col., 1973; Wu W y Wu LG, 2007). En esta sección, utilizando herramientas farmacológicas, analizamos la participación de dos proteínas fundamentales en términos endocitóticos. En primer lugar se estudió el efecto de la inhibición de la dinamina, que modula el cierre del poro de fisión durante la endocitosis clatrina dependiente, el *kiss & run* y la *bulk* endocitosis (Clayton EL y col., 2009; Elhamdani A y col., 2006; Evans GJ y col., 2007; González-Jamett AM y col., 2014; Takei K y col., 2005). En segundo lugar se realizaron experimentos para bloquear específicamente el ensamblado de la clatrina y así bloquear la endocitosis clatrina dependiente.

3.3.1 Efecto de la inhibición de la dinamina sobre la endocitosis:

La dinamina es una GTPasa que se polimeriza ensamblándose alrededor del cuello de la vesícula. Luego de la hidrólisis del GTP su configuración cambia (ver sección 1.4.2 de la introducción), lo que provoca el cierre del poro de fisión o ruptura del cuello (Praefcke GJ y McMahon HT, 2004), dando como resultado la separación de la vesícula de la membrana plasmática. Este mecanismo interviene en la endocitosis clatrina dependiente (González-Jamett AM y col., 2014), en el mecanismo de *kiss & run* (Takei K y col., 2005; Elhamdani A y col., 2006) y hay trabajos que indican que participaría también en la *bulk* endocitosis (Clayton EL y col., 2009; Evans GJ y col., 2007). Utilizamos dynasore, un inhibidor no competitivo de la dinamina que la mantiene en su configuración relajada, para evaluar si la endocitosis rápida es dinamina dependiente. Este inhibidor de la endocitosis (Danino D y col., 2004) tiene como desventaja que produce un bloqueo parcial de las corrientes de Ca^{2+} (Tsai CC y col., 2009), por lo que se lo utilizó a una concentración moderada (80 µM) para poder obtener mediciones tanto del grupo de baja integral de corriente de Ca^{2+} como del de alta integral. En la figura 3.3.1 se pueden observar dos ejemplos representativos de trazados de capacitancia de membrana obtenidos en células cromafines tratadas con dynasore y estimuladas con un pulso despolarizante cuadrado de 1 seg. En A se representa un trazado correspondiente a una célula del grupo LCG, y en B uno del grupo HCG. En ambos casos (figura 3.3.1 Ai y Bi) se observa que todo el trazado está montado sobre una línea de base con pendiente positiva aproximadamente constante, a diferencia de lo que se observa en los trazados control, donde la pendiente en general es nula (ver los ejemplos presentados en la figura 3.1.1 y 3.1.2). Este fenómeno ya fue observado por otros autores (Tsai CC y col., 2009), y se debe a que la inhibición de la endocitosis constitutiva provocada por dyansore desenmascara el aumento continuo de capacitancia producido por la exocitosis constitutiva. Por este motivo, fue necesario restarle a cada trazado su respectiva pendiente previa a la estimulación, de modo de que los registros queden sobre una pendiente nula (figura 3.3.1 Aii y Bii). Una vez realizado este procedimiento, se continuó con el análisis y la cuantificación habitual de los parámetros de exocitosis y endocitosis, según lo explicado en secciones previas.

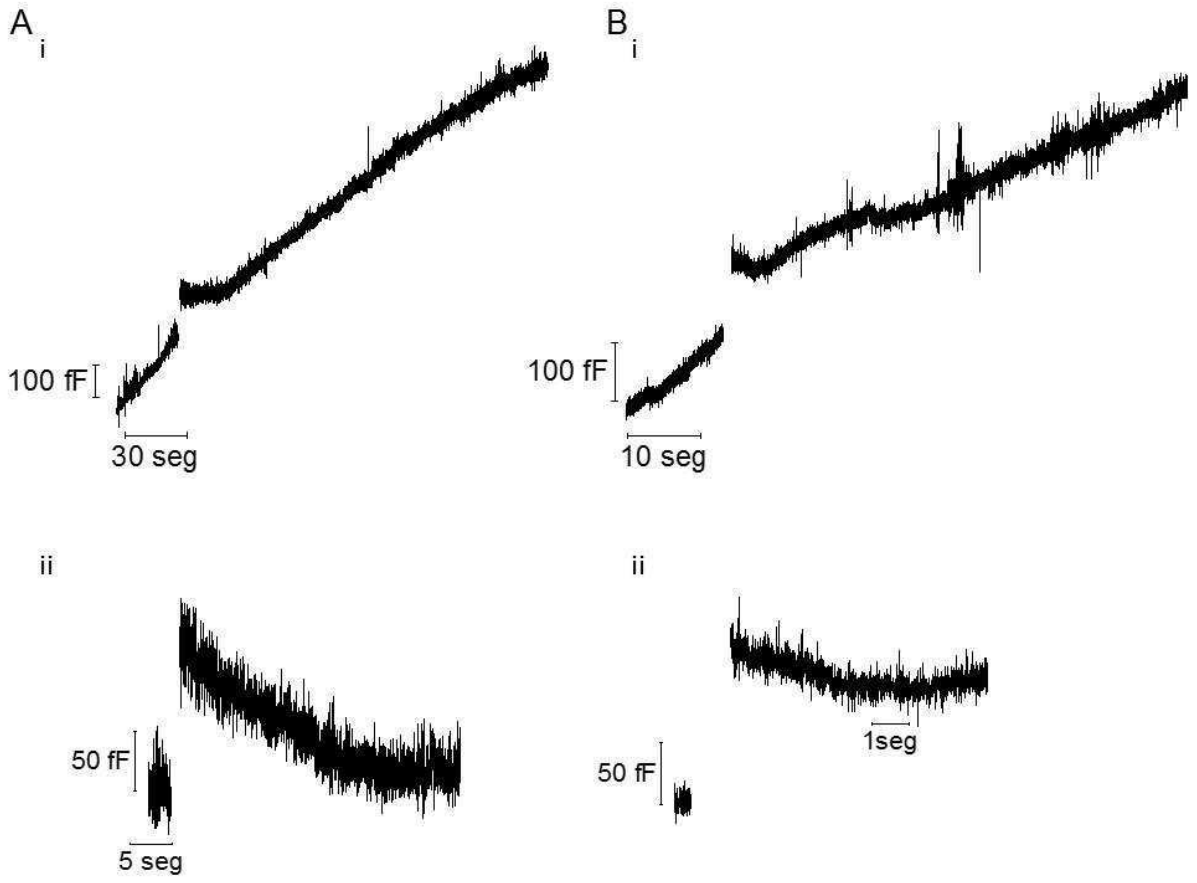

Figura 3.3.1 - *Ejemplos de trazados de capacitancia de membrana de células en las que se inhibió la endocitosis dinamina dependiente.* *Evolución temporal de los cambios de capacitancia celular en respuesta a un pulso de 1 seg que va desde -80 a +10 mV en células tratadas con dynasore (80 μM). Se muestran ejemplos de una célula perteneciente* ***(A)*** *al LCG y* ***(B)*** *al HCG. En* ***(i)*** *se muestran los trazados de capacitancia celular tal como se los registra desde el dispositivo de* Patch Clamp*, mientras que en* ***(ii)*** *se presentan los mismos trazados de (i) luego de haberles restado la pendiente positiva de la línea de base (trazados "corregidos").*

El agregado de dynasore, si bien redujo en algo el pico de las corrientes, no provocó cambios en las integrales de la corriente de Ca^{2+} en ninguno de los dos grupos, LCG o HCG, respecto del control (figura 3.3.2 Ai y Bi).

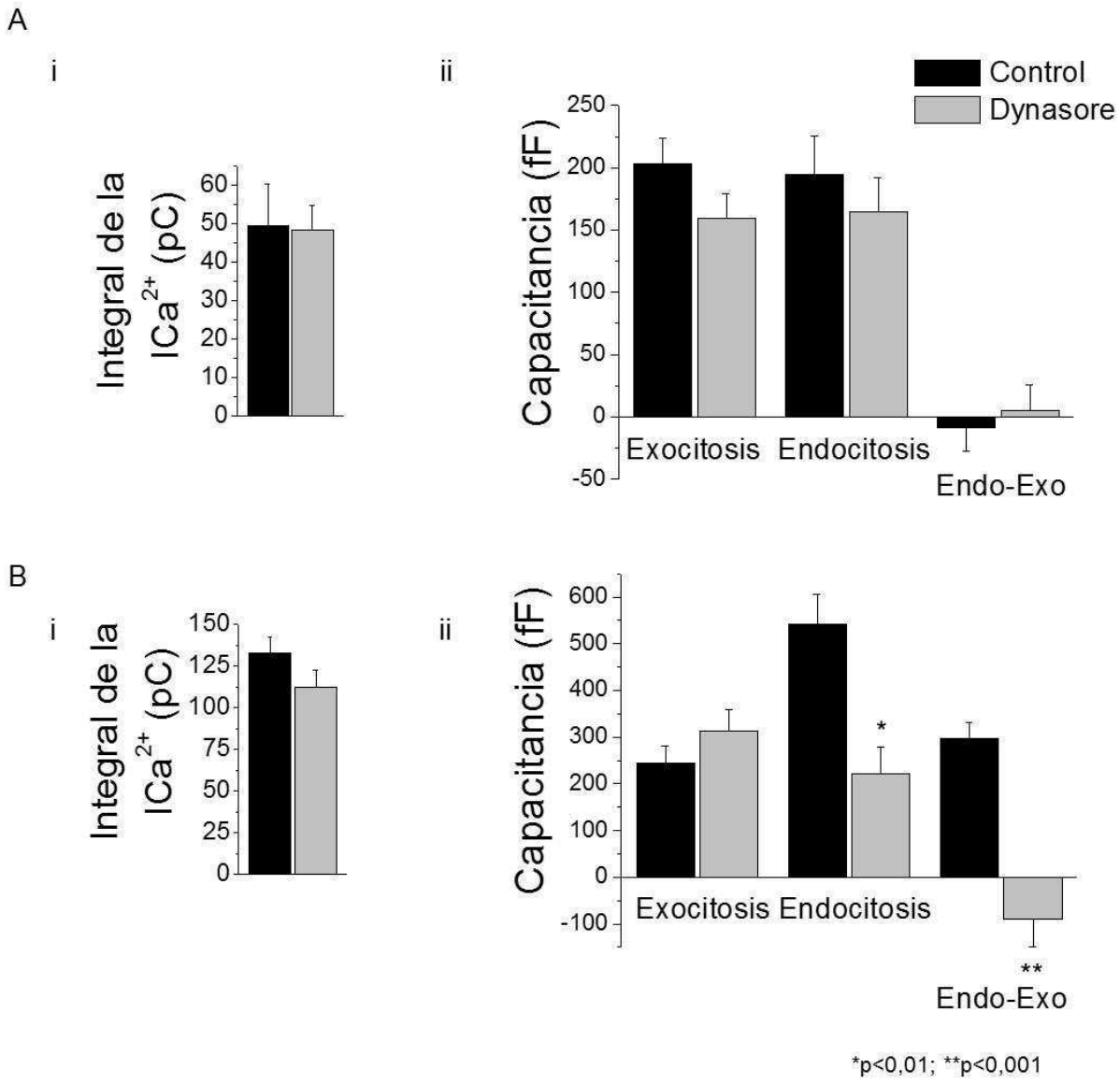

Figura 3.3.*2* - *La dinamina está involucrada en la endocitosis rápida.* (A) *Muestra los datos para el LCG.* ***(i)*** *Comparación de las integrales de Ca^{2+} entre las células control (n = 7) y las tratadas con dynasore (n = 6). No existen diferencias significativas entre ambos grupos.* ***(ii)*** *Cuantificación de los parámetros exocitosis, endocitosis y Endo-Exo. En el gráfico de barras se muestran los resultados promedio de las mediciones realizadas, donde se observa que no existen diferencias significativas entre las células control y las tratadas con dynasore en ninguno de los parámetros. En la parte* ***(B)*** *se muestran los resultados obtenidos en células pertenecientes al HCG.* ***(i)*** *Puede apreciarse que la integral de la corriente de Ca^{2+} no difiere entre ambos grupos (n = 7, en dynasore y control).* ***(ii)*** *Las células tratadas con dynasore respondieron con una exocitosis similar a las controles. Sin embargo, la endocitosis rápida fue significativamente menor en las células tratadas con la droga en comparación con las células control (p<0,01), y en consecuencia se perdió por completo el exceso reportado por Endo-Exo (p<0,001). El análisis estadístico entre estas dos muestras independientes se realizó mediante el Test de Student.*

Al realizar la comparación de la magnitud de los distintos parámetros que se extraen de los trazados de capacitancia de la membrana celular encontramos que para el LCG (figura 3.3.2 Aii), los valores medidos fueron similares a los controles (tanto la exocitosis, la endocitosis como la diferencia entre ambas: Endo-Exo). Contrariamente, en el HCG (figura 3.3.2 Bii) el tratamiento con dynasore redujo la endocitosis rápida total ($p<0,01$) sin modificar la exocitosis, lo que trajo como consecuencia la pérdida del exceso, reportado por el índice Endo-Exo ($p<0,001$).

Tras realizar el análisis cinético de la respuesta, encontramos que en el LCG (figura 3.3.3 A) la amplitud del componente rápido (el único presente en LCG) no difiere significativamente del control, lo cual es esperable según los resultados presentados en la figura 3.3.2 Aii. Por otro lado, sí puede observarse que la constante temporal de este componente, $\tau_{Rápido}$, resultó más lenta en comparación al control ($p<0,05$). En el caso del HCG, los dos componentes se vieron afectados con la inhibición de la dinamina. Los promedios indican que la amplitud del componente ultra-rápido se redujo respecto al control ($p<0,01$). Además este componente mostró una clara tendencia a enlentecerse, aunque el cambio en su constante temporal, $\tau_{Ultra\text{-}Rápido}$, no alcanzó significancia estadística respecto del control. Esto probablemente debido a la dispersión importante que tuvo y al bajo número de mediciones, ya que sólo fue detectado en 4 de los 7 experimentos obtenidos en esta condición (figura 3.3.3 Bi). Por otro lado, el componente rápido (figura 3.3.3 Bii) no sólo disminuyó su amplitud ($p < 0,05$), sino que también se endenteció, ya que $\tau_{Rápido}$ resultó mayor que el control ($p<0,05$). En conjunto, estos resultados sugieren que ambos componentes endocitóticos son dependientes de un proceso dinamina dependiente, tanto para LCG como para HCG.

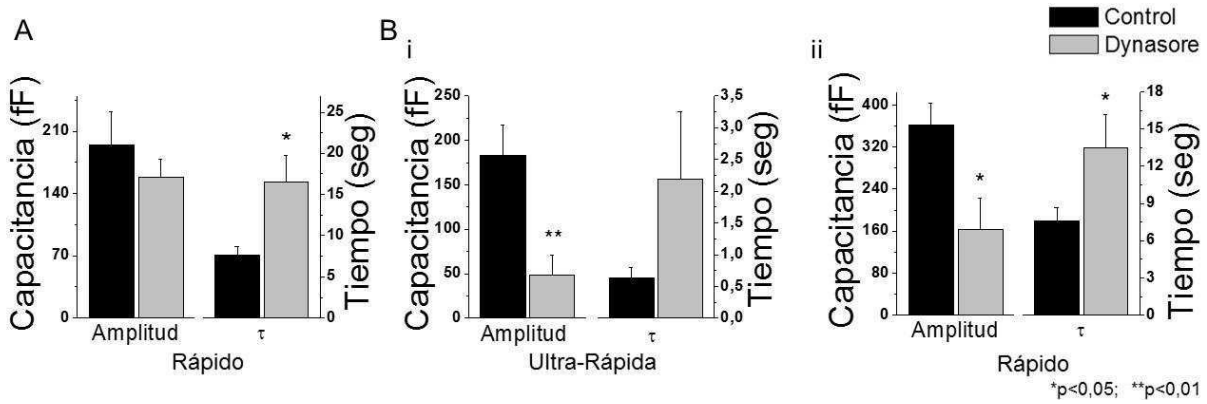

***Figura 3.3.3 - Los componentes ultra-rápido y rápido son dependientes de dinamina**. **(A)** Cuantificación del análisis cinético de la respuesta para el LCG. La amplitud del componente rápido (n = 6) no resultó estadísticamente diferente al control (n = 7), pero sí presentó una cinética más lenta, ya que $\tau_{Rápido}$ en esta condición (n = 6) fue significativamente menor al control (n = 7) (p<0,05). En **(B)** se muestran los datos de los ajustes exponenciales para el HCG**.** El análisis cinético indica que: **(i)** el componente ultra-rápido tuvo una amplitud menor (p<0,01, n = 7) que el control (n=7). Por otro lado, $\tau_{Ultra\ Rápido}$ sólo mostró una tendencia a enlentecerse en presencia de la droga (n =4), aunque esta no resultó significativa en comparación al control (n=7). **(ii)** el componente rápido no sólo disminuyó su amplitud (p<0,05, n = 7) respecto del control (n=7) sino que también su $\tau_{Rápido}$ se enlenteció (p<0,05, n = 4 y n=7 para dynasore y control, respectivamente). El número de datos para $\tau_{Rápido}$ y $\tau_{Ultra\text{-}Rápido}$ es menor que para la amplitud debido a que en tres casos la endocitosis no resultó significativa. En esos casos se computó a la amplitud como cero, mientras que el τ no pudo determinarse. El análisis estadístico entre estas dos muestras independientes se realizó mediante el Test de Student.*

3.3.2- Endocitosis clatrina dependiente:

Clásicamente en células cromafines se postuló que la endocitosis clatrina dependiente es un proceso lento, que necesita de varios minutos para completarse (Artalejo CR y col., 2002). Sin embargo, recientemente se ha identificado en células beta pancreáticas una fase de endocitosis clatrina dependiente que sigue una cinética muy similar a nuestro componente rápido (He Z y col., 2008). Por otro lado, en terminales presinápticas también se postuló una cierta contribución de la endocitosis clatrina dependiente a la endocitosis rápida (Wu LG y col., 2014). Por lo tanto, para estudiar si en la endocitosis rápida de células cromafines hay participación de un proceso clatrina dependiente, se evaluó el efecto de dos inhibidores de dicho tipo de endocitosis: la chlorpromazina (15 µM), que interfiere en el proceso de ensamblado-desensamblado de la

clatrina (Wang LH y col., 1993), y el pitstop2 (25 µM), que inhibe la interacción entre anfifisina y el dominio terminal de la clatrina (von Kleist L y col., 2011).

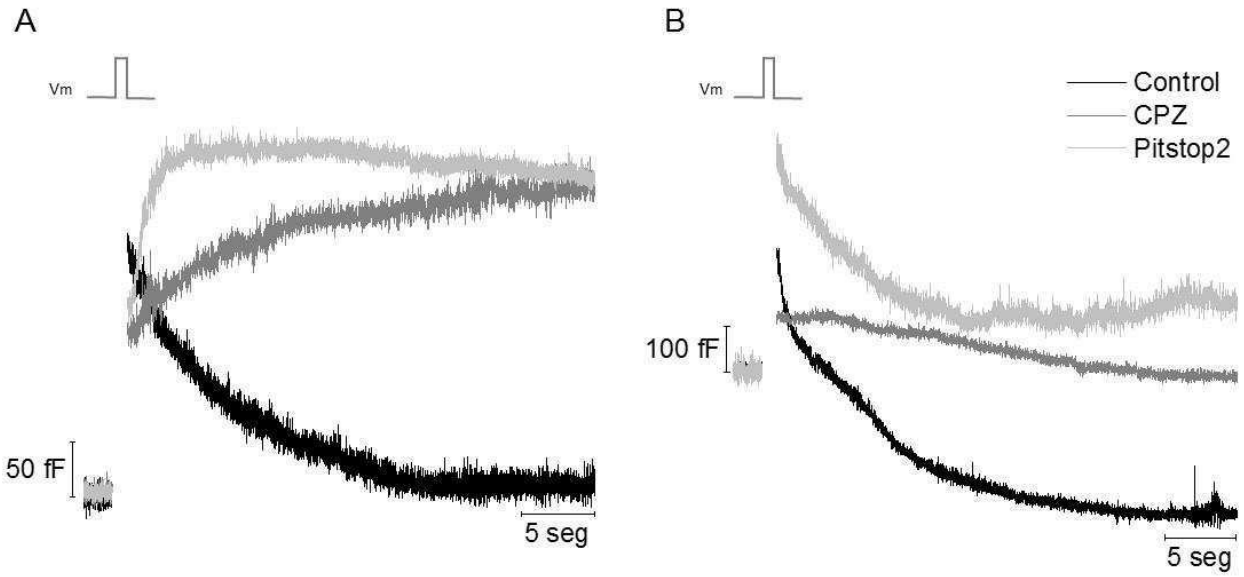

Figura 3.3.4 - ***Efecto de la inhibición de la endocitosis clatrina dependiente en la endocitosis rápida.*** *Trazados representativos de los cambios de la capacitancia celular de células individuales sometidas a la inhibición de la endocitosis clatrina dependiente, ya sea mediante la aplicación de 15 µM de chlorpromazina (CPZ, trazado gris oscuro) o 25 µM de pitstop2 (trazado gris claro). El estímulo fue, como a lo largo de casi toda esta tesis, un pulso despolarizante cuadrado de 1 seg. Se encuentra superpuesto en cada gráfico el trazado control promedio (trazado negro), tanto para el grupo LCG* ***(A)****, como para el HCG* ***(B)****. En ambos casos se puede observar que las drogas generan una inhibición de la endocitosis rápida en relación al control.*

Al observar los ejemplos representativos de trazados de capacitancia celular que se muestran en la figura 3.3.4, se puede notar una clara inhibición de la endocitosis rápida en relación a los trazados control, tanto en el grupo LGC como en el HCG.

La figura 3.3.5 muestra el promedio, con sus respectivos errores estándares, de la integral de la corriente de Ca^{2+} y de los parámetros obtenidos de los trazados de capacitancia de membrana celular, en particular la exocitosis, la endocitosis y Endo-Exo. Para ambos grupos, LCG y HCG (figura 3.3.5 Ai y Bi), se observa que la integral de la corriente de Ca^{2+} no difiere entre los grupos tratados y el control. Por otro lado, en el grupo LCG (figura 3.3.5 Aii) se observó un efecto positivo de pitstop2 sobre la exocitosis registrada ($p<0,05$). Pero lo más importante que debemos remarcar es que ambos inhibidores de la endocitosis clatrina dependiente anularon casi completamente a la endocitosis rápida ($p<0,001$), y consecuentemente se redujo significativamente el

parámetro Endo-Exo (p<0,05), perdiéndose totalmente la compensación. Del mismo modo, en el grupo HCG (figura 3.3.5 Bii), las células tratadas presentaron una disminución significativa de la endocitosis rápida (p<0,05), lo que generó una reducción en el exceso, representado por el parámetro Endo-Exo (p<0,05 y p<0,01, para chlorpromazina y pitstop2 respectivamente).

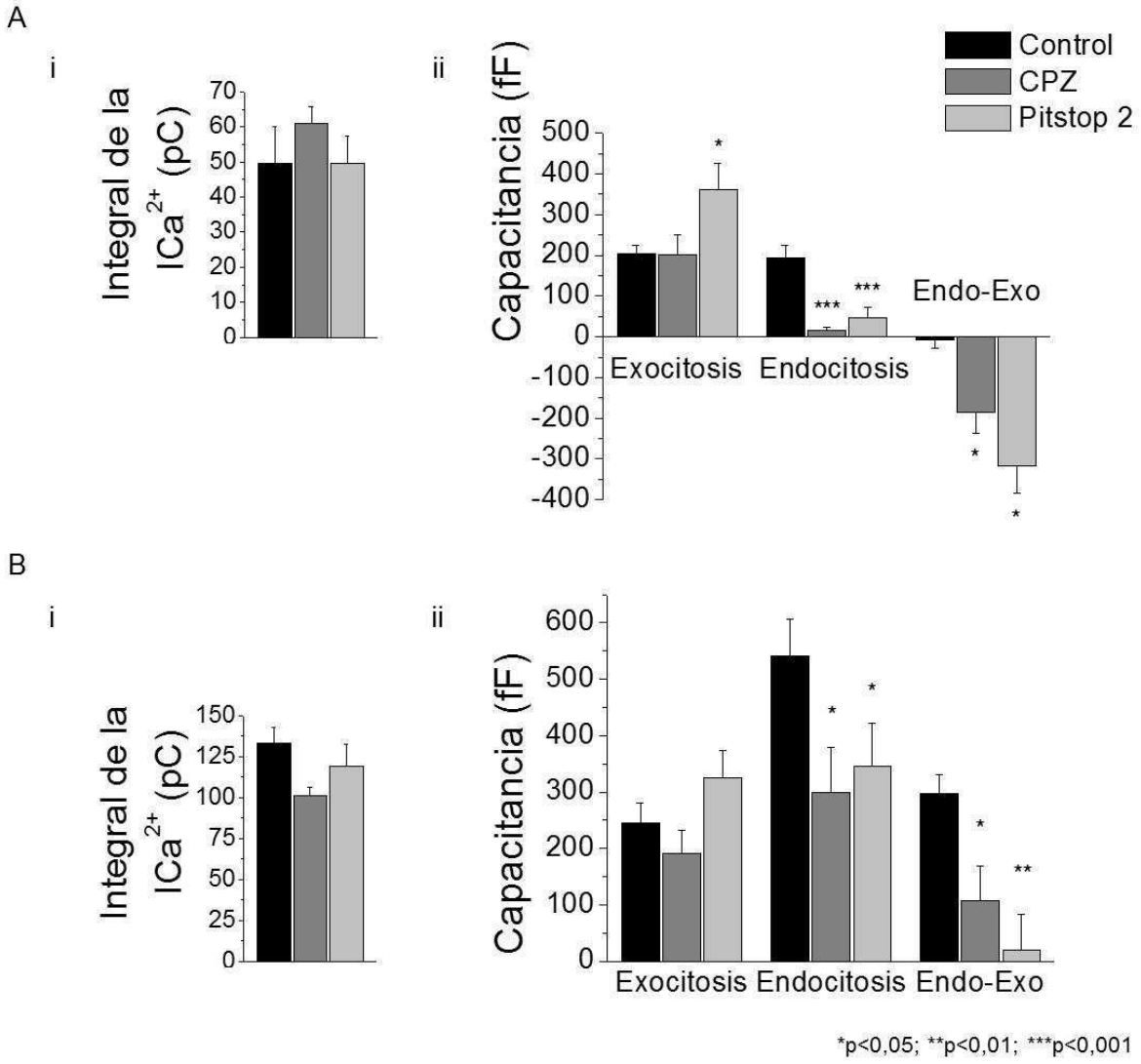

Figura 3.3.5 - La endocitosis rápida es dependiente de clatrina. (A) *Se muestran los datos de los experimentos del LCG.* ***(i)*** *El gráfico de barras muestra que los tratamientos con chlorpromazina (CPZ, 15µM; n = 5) o pitstop2 (25µM; n = 6) no modificaron las integrales de las corrientes de Ca^{2+} respecto a las células control (n = 7).* ***(ii)*** *En el gráfico de barras se muestran las magnitudes de los parámetros exocitosis, endocitosis y Endo-Exo. Se encontraron diferencias significativas para esos tres parámetros (exocitosis: ANOVA, p<0,05, endocitosis: ANOVA, p<0,001, Endo-Exo: Kruskal-Wallis, p<0,01). Se observa que ambos*

inhibidores de la endocitosis clatrina dependiente inhiben drásticamente la endocitosis rápida (contrastes por el método de Bonferroni, p<0,001 para ambos), y en consecuencia la compensación de la exocitosis previa se pierde por completo. Esto último se ve reflejado en el parámetro Endo-Exo, el cual toma valores negativos en los grupos tratados, significativamente menores al control (contrastes por el método de Dunn´s, p<0,05). Se observa también un efecto positivo de pitstop2 sobre la exocitosis registrada (contrastes por el método de Bonferroni, p<0,05). ***(B)*** *Se muestran los datos de los experimentos del HCG.* ***(i)*** *Las barras representan las integrales de la corriente de Ca^{2+} en presencia de ambos inhibidores (n = 8 y n = 6, para CPZ y pitstop2 respectivamente), las cuales resultaron iguales al control (n = 7).* ***(ii)*** *En el gráfico de barras se muestran las magnitudes de los parámetros exocitosis, endocitosis y Endo-Exo para los dos tratamientos y en condiciones control. Las células tratadas con CPZ y pitstop2 respondieron con una endocitosis rápida significativamente menor que en condiciones control (Kruskal-Wallis, p<0,05; contrastes por el método de Dunn´s, p<0,05), y en consecuencia el exceso, representado por el parámetro Endo-Exo, disminuyó (ANOVA, p<0,01; contrastes por el método de Bonferroni, p<0,05 y p<0,01, para CPZ y pitstop2, respectivamente).*

En resumen, nuestros resultados muestran que en las células cromafines de ratón, la inhibición del reclutamiento y/o ensamblado de la clatrina provoca una reducción de la endocitosis rápida. De aquí se deduce que un proceso clatrina-dependiente estaría contribuyendo a la endocitosis rápida en los dos modos endocitóticos estudiados. Los resultados, a su vez, sugieren que en el grupo LCG la endocitosis rápida estaría prácticamente dominada por el mecanismo clatrina-dependiente, mientras que en el grupo HCG se agregaría otro proceso adicional independiente de clatrina. Por lo tanto, se podría especular en principio que el agregado de dicho proceso traería como consecuencia el exceso.

A continuación se quiso identificar cuál/les de los dos componentes cinéticos exponenciales que se evidencian en la endocitosis rápida, el ultra-rápido y/o el rápido, es/son dependiente/s de clatrina. Para ello se realizó un análisis cinético de los trazados de las células tratadas con las drogas, y se las comparó con los controles. En el caso de LCG (figura 3.3.6 A), se observó una clara reducción de la amplitud del componente rápido, que es el único presente en este grupo, tanto al utilizar como inhibidor de la endocitosis clatrina dependiente a la chlorpromazina como al pitstop2 (ANOVA Kruskal-Wallis, p<0,05; contrastes por el método de Dunn´s, p<0,05 en ambos). Debido a que en 3 de la 6 células medidas en presencia de pitstop2 la endocitosis se anuló completamente (en esos casos la amplitud se computó como cero), la cinética de este componente sólo se pudo determinar en las 3 células restantes, donde se encontró enlentecida ($\tau_{Rápido}$ = 39 ± 20 seg), pero el escaso número de mediciones no nos permitió realizar un análisis estadístico. En el caso de chlorpromazina, sólo una célula presentó endocitosis, con un

$\tau_{Rápido}$ similar al control. En las células del HCG (figura 3.3.6 B), ambos componentes se vieron afectados. El componente ultra-rápido sólo se presentó en 2 de las 8 mediciones obtenidas con chlorpromazina, y sólo en 1 de las 6 células tratadas con pitstop2. Por lo tanto, en promedio la amplitud de este componente tuvo una muy marcada reducción respecto al control para ambas drogas (figura 3.3.6 Bi - ANOVA Kruskal-Wallis, p<0,01; contrastes por el método de Dunn´s, p<0,05 en ambos). Por otro lado, el componente rápido se manifestó en todas las mediciones realizadas para ambos tratamientos aplicados sobre el grupo HCG. Si bien la amplitud de este componente fue similar al control, la cinética ($\tau_{Rápido}$) resultó significativamente más lenta (p<0,05) con ambas drogas (figura 3.4.6 Bii - ANOVA, p<0,05; contrastes con el test de Bonferroni, p<0,05 en ambos).

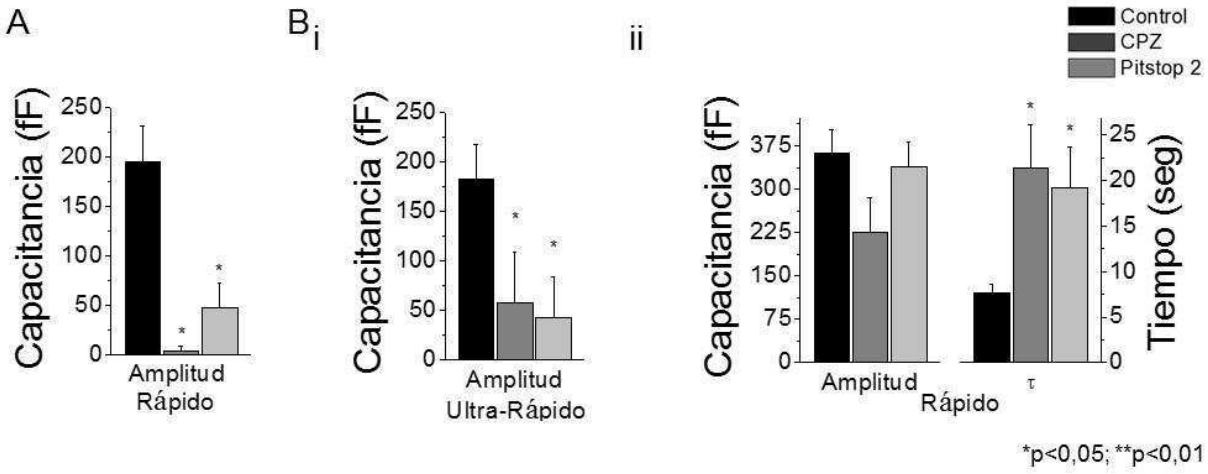

Figura 3.3.6. ***Los componentes ultra-rápido y rápido son dependientes de clatrina. (A)*** *Análisis cinético de la respuesta para el LCG. La amplitud del componente rápido, que es idéntica a la endocitosis mostrada en la figura anterior para este grupo, resultó dramáticamente disminuida al inhibir la endocitosis clatrina dependiente con chlorpromazina (CPZ) (n = 5), o con pitstop2 (n = 6) en comparación a los controles (n = 7) (ANOVA Kruskal-Wallis, p<0,05; contrastes por el método de Dunn´s, p<0,05 en ambos). Si bien no se pudo realizar un análisis estadístico con respecto a la velocidad del componente* $\tau_{Rápido}$*, debido a que éste sólo estuvo presente solamente en uno (CPZ) o en tres casos (pitstop2) de todas las células registradas, parece ser que con este último tratamiento se enlentece.* ***(B)*** *Análisis cinético de la respuesta para el HCG.* ***(i)*** *El componente ultra-rápido tuvo una amplitud menor en presencia de ambas drogas (n = 8 y n = 6, para CPZ y pitstop2, respectivamente) en comparación al control (n = 7) (ANOVA Kruskal-Wallis, p<0,01; contrastes por el método de Dunn´s, p<0,05 en ambos). No se pudo realizar un análisis estadístico con respecto a la velocidad del componente* $\tau_{Ultra\text{-}Rápido}$*, debido a que éste estuvo presente solamente en dos (CPZ) o en un caso (pitstop2) de todos los registrados.* ***(ii)*** *Por otro lado, el componente rápido se enlenteció con los dos inhibidores*

(ANOVA, p<0,05; contrastes con el test de Bonferroni, p<0,05 en ambos; n = 7, n = 8 y n = 6, para control, CPZ y pitstop2 respectivamente).

Resumiendo, los resultados indican que la reducción de la endocitosis rápida global inducida por inhibidores de la endocitosis clatrina-dependiente se debe a la disminución de la contribución tanto del componente ultra-rápido como del componente rápido. Por lo tanto, el mecanismo dependiente de clatrina contribuiría a ambos componentes cinéticos de la endocitosis. Es posible que frente a una entrada mayor de Ca^{2+}, como ocurre en HCG, se produzca una aceleración del mecanismo dependiente de clatrina, lo que permita la aparición del componente ultra rápido (Engisch y Nowicky, 1998; Wu LG y col., 2014).

3.3.3- DISCUSIÓN

Los resultados de esta sección indican que la endocitosis rápida medida bajo nuestras condiciones experimentales depende de dinamina y de clatrina. Estas dos proteínas intervienen en la endocitosis clatrina dependiente, con lo cual dicho mecanismo parecería participar significativamente en este proceso. Mientras que en el LCG la endocitosis rápida es inhibida completamente por los inhibidores de clatrina, en el HCG queda un remanente importante. Esto sugiere que en este último grupo se activa además otro mecanismo endocitótico, que sería clatrino independiente.

Es sabido que la dinamina participa en distintos mecanismos endocitóticos: (i) cataliza la separación de la vesícula de la membrana plasmática durante la endocitosis clatrina dependiente (González-Jamett AM y col., 2014), (ii) regula y promueve el cierre del poro de fusión/fisión durante el *kiss & run* (Elhamdani A y col., 2006), y (iii) hay trabajos que indican que también participa en la *bulk* endocitosis (Clayton EL y col., 2009; Evans GJ y col., 2007; Gormal RS y col., 2015), aunque otros autores sostuvieron lo contrario (Hayashi M y col., 2008). En consecuencia, no debe sorprender que la aplicación de dynasore (inhibidor no competitivo de la dinamina) inhiba los procesos endocitóticos observados. De hecho, esta droga tuvo un efecto inhibidor sobre la endocitosis en los dos grupos experimentales de este estudio. En particular, generó un enlentecimiento en la cinética del componente rápido (único presente) en el LCG, y una reducción en las amplitudes de los componentes ultra-rápido y rápido en el HCG, además de también

enlentecer el componente rápido en este último grupo. Lo que en todo caso puede llamar la atención es que el efecto no sea mayor al observado, dada la acción de la droga sobre los tres mecanismos mencionados. Es posible que este efecto moderado se deba a la concentración de fármaco utilizado, y que tal vez con concentraciones mayores de dynasore se podría haber obtenido una inhibición más completa de la endocitosis. Sin embargo, esta droga aplicada a concentraciones superiores a las utilizadas en este estudio inhibe las corrientes de Ca^{2+}, lo que a su vez afecta a la exocitosis y a la endocitosis, contaminando a los resultados con otros factores. Existen también otros factores que podrían en principio complicar la interpretación de los resultados obtenidos con dynasore. La dinamina no sólo participa en la fisión de las vesículas que se internalizan por endocitosis, sino que también cumple la función de fisionar la membrana de las vesículas que se regeneran desde los compartimientos intracelulares. De esta manera, al inhibir su acción, el reciclado de las vesículas podría verse afectado. Sin embargo, en nuestras manos, el agregado de dynasore no afectó la amplitud de la exocitosis, con lo cual este efecto secundario del dynasore no complicaría aparentemente nuestros resultados. Otro efecto secundario del dynasore es el de generar un aumento progresivo del valor de la capacitancia de membrana debido a la inhibición de la endocitosis constitutiva (Tsai CC y col., 2009), lo cual desenmascara la presencia de la exocitosis constitutiva. Esto debió ser corregido restando a los trazados las líneas de base previas a los mismos.

Como se mencionó más arriba, los inhibidores de clatrina generaron una inhibición prácticamente total de la endocitosis asociada al LCG. A su vez, en el HCG, dichos inhibidores disminuyeron marcadamente la amplitud del componente ultra-rápido, mientras que el rápido se enlenteció. Estos resultados son sorprendentes, porque en general se asocia a la clatrina con procesos endocitóticos lentos (Artalejo CR y col., 2002; Wu LG y col., 2014), o a lo sumo medianamente rápidos (He Z y col., 2008), pero nunca se determinó una participación de este mecanismo en una endocitosis con cinéticas temporales inferiores al segundo, como es el caso de nuestro componente ultra-rápido. Una posible explicación a esto sería que la endocitosis clatrina dependiente estuviera, durante los primeros cientos de milisegundos siguientes al estímulo, fuertemente regulada de manera positiva por la [Ca^{2+}] citosólica. Respecto a esto, ha sido demostrado que dicho mecanismo endocitótico es acelerado por Ca^{2+} a través de un mecanismo dependiente de calmodulina y calcineurina (Smith C y Neher E, 1997; Wu LG y col., 2014). Por otro lado, la endocitosis compensatoria (de cinética idéntica a nuestro componente rápido)

registrada por Engisch y Nowycky (1998), la cual resultó ser dependiente de calcineurina, mostró según estas autoras una marcada calcio dependencia. Sería posible entonces que en HCG, las probablemente altas concentraciones de Ca^{2+} alcanzadas durante los primeros cientos de milisegundos luego del estímulo, sean capaces de acelerar mucho la endocitosis clatrina dependiente, generando al componente ultra-rápido. Luego la velocidad de la endocitosis disminuiría, como consecuencia de la disminución en la concentración del Ca^{2+} citosólico, el cual es captado por buffers y extruido afuera de la célula (Marengo FD y Monck JR, 2000 y 2003). Esta hipótesis es sencilla, ya que evita invocar la participación de un mecanismo adicional para explicar la endocitosis ultra-rápida, y por otro lado es coherente con los resultados de este trabajo.

Si bien la endocitosis en el grupo LCG parece ser completamente dependiente de clatrina, es interesante notar que en el grupo HCG la endocitosis sólo disminuyó aproximadamente un 40% en presencia de chlorpromazina o pitstop2. Esto sugiere que en el HCG, la gran entrada de Ca^{2+} producida en este grupo activaría algún proceso endocitótico adicional independiente de clatrina. Se podría especular, en principio, que la activación de dicho proceso traería como consecuencia el exceso. Se ha postulado que, en condiciones de actividad intensa, la endocitosis clatrina dependiente está limitada en su capacidad de recuperar membrana, y que por lo tanto resultaría incapaz de lidiar con la rápida depleción de las vesículas y con el gran incremento de membrana que ocurre en la célula. En consecuencia se postuló que frente a una exocitosis masiva, que puede poner en riesgo la homeostasis de membrana, se podría activar una endocitosis de tipo *bulk* (Cárdenas AM y Marengo FD, 2010; Pérez Bay AE y col., 2007; Pérez Bay AE y col., 2012; Smith CB y Betz WJ, 1996). Este tipo de endocitosis tiene la capacidad de recuperar grandes cantidades de membrana por medio de la invaginación directa de porciones de membrana de gran tamaño que forman vacuolas y/o cisternas, que luego son escindidas y liberadas al interior celular. En nuestro laboratorio, demostramos que la endocitosis en exceso y la formación de endosomas que responden a características de la *bulk* endocitosis se disparan cuando la señal citosólica de Ca^{2+} global supera ciertos límites (Pérez Bay AE y col, 2012). Esta dependencia del exceso con la entrada de Ca^{2+} al citosol es coherente con lo observado por otros autores (Engisch KL y Nowycky MC, 1998). De acuerdo con esta posibilidad, en esta tesis se reportó que HCG presenta una integral de corriente de Ca^{2+} marcadamente mayor que LCG. Por todo lo mencionado, es posible que la *bulk* endocitosis podría estar contribuyendo a la endocitosis total en HCG. Teniendo en cuenta la cinética, se ve que este mecanismo parecería estar dominado

fundamentalmente por el componente rápido más que por el ultra-rápido. Un resultado que parecería contradecir a esta hipótesis es que la aplicación de dynasore sólo inhibió el 40% de la endocitosis rápida en HCG. Si bien existen datos previos que muestran que la dinamina estaría involucrada en la bulk endocitosis (Clayton EL y col., 2009; Evans GJ y col., 2007; Ferguson SM y De Camilli P, 2012; Nguyen TH y col., 2012), hay por otro lado resultados que contradicen esta observación. Por ejemplo, estudios de neuronas knock-out de dinamina 1 indican que la endocitosis de tipo bulk ocurre de manera robusta aún en ausencia de esa proteína (Hayashi M y col., 2008). Finalmente, es posible que la concentración de dynasore utilizada no sea suficiente para inhibir completamente la acción de la dinamina.

En trabajos previos de nuestro laboratorio, se observó por medio de la técnica de *imaging* con FM1-43 y también con dextranos fluorescentes, que la endocitosis de tipo *bulk* era responsable del exceso endocitótico en células cromafines (Pérez Bay AE y col., 2007; Pérez Bay AE y col., 2012). Esto es coherente con la incapacidad de pitstop2 y chlorpromazina de bloquear completamente a la endocitosis en HCG. En esos mismos trabajos, determinamos que dicha endocitosis de tipo *bulk* llevaba a la formación de una fracción de membrana internalizada no reciclable a vesículas (Pérez Bay AE y col., 2007; Pérez Bay AE y col., 2012). En la próxima sección se analizará en parte este tema.

Con los resultados expuestos hasta aquí, se podría especular la siguiente hipótesis: En el LCG, la membrana adicionada por exocitosis es moderada, y sería recuperada vía un mecanismo dependiente de clatrina en forma prácticamente total. En el HGC, la gran entrada de Ca^{2+} dispara una fusión vesicular más masiva. Parte de la recuperación de membrana se realizaría por endocitosis dependiente de clatrina, ahora acelerada debido a la mayor entrada de Ca^{2+}. Sin embargo, la capacidad de la endocitosis mediada por clatrina se vería sobrepasada por la gran demanda exocitótica. Simultáneamente, la superación de un dado umbral de Ca^{2+} (79 pC), provocaría la activación de un mecanismo adicional de recuperación de membrana, la *bulk* endocitosis, que sería responsable del exceso.

3.4 Evaluación del reciclado vesicular

A- RESULTADOS

La medición de la capacitancia celular por la técnica de *Patch Clamp* posee grandes ventajas, como ser su alta resolución temporal que permite estudiar los fenómenos de exocitosis y endocitosis en tiempo real, y su alta sensibilidad que permite detectar la fusión y fisión de unas pocas vesículas. Pero tiene además desventajas importantes. Por un lado, no permite aislar la endocitosis de la exocitosis cuando estas se producen simultáneamente. Esto toma importancia sobre todo en el caso de estímulos potentes como los estudiados, donde es esperable que se desarrolle una exocitosis asincrónica simultánea a la endocitosis. Por otro lado, esta técnica no brinda información del destino de la membrana endocitada. En otras palabras, luego de la endocitosis, la membrana internalizada puede reciclarse rápidamente a vesículas liberables (Harata NC y col., 2006; Pérez Bay AE y col., 2007), o integrarse a un endosoma de mayor tamaño desde donde nuevas vesículas son generadas en forma más lenta (Henkel AW y col., 2001), o bien entrar en la vía lisosomal (Pérez Bay AE y col., 2012). La técnica de microscopía de fluorescencia combinada con el fluoróforo FM1-43 resulta altamente complementaria a las mediciones de capacitancia, ya que si bien no tiene buena resolución temporal, ni una sensibilidad equivalente a la medición de la capacitancia de membrana, permite separar la endocitosis de la exocitosis, inclusive si ambos procesos se producen al mismo tiempo. Por otro lado, permite discriminar entre fracciones de membrana no liberables y la generación de nuevas vesículas liberables a partir de la membrana endocitada.

Resultados publicados por nuestro laboratorio, demostraron que despolarizaciones con alto K^+ durante 30 seg en presencia de FM1-43 inducen de manera consistente y repetible un proceso de endocitosis rápida en exceso (Pérez Bay AE y col., 2012), de magnitudes comparables a las obtenidas para el grupo HCG en esta tesis. En esta sección de la tesis se repitió este tipo de experimentos en condiciones control y en presencia de un inhibidor de la endocitosis clatrina dependiente, y se analizó el efecto de inhibir dicho proceso sobre la endocitosis y el reciclado vesicular. Una despolarización con alto potasio de 30 seg es un estímulo muy sostenido en el tiempo, y por lo tanto es una condición en la cual sería esperable que haya superposición temporal

de exocitosis y endocitosis. Sin embargo para la técnica de *imaging* combinada con el fluoróforo FM1-43 (Pérez Bay AE y col., 2007; Pérez Bay AE y col., 2012) esto no es un problema.

Para estos experimentos se utilizó el siguiente protocolo, el cual se explicó en mayor detalle en materiales y métodos (sección 2.3.3). (I) Se incuba a las células con FM1-43 durante 15 minutos, tiempo durante el cual la señal de fluorescencia alcanza un *plateau*. (II) Luego se despolariza a las células con K^+ 50 mM durante 30 seg en presencia del fluoróforo, lo que causa una exocitosis que es cuantificada como el aumento relativo de la señal fluorescente (Exo 1) respecto al *plateau* previamente establecido. (III) A continuación se lava el preparado con solución estándar sin FM1-43, por lo que el fluoróforo es removido de la membrana plasmática, pero no de la fracción de membrana internalizada por endocitosis durante el período de estimulación. De esta etapa, puede cuantificarse la endocitosis (Endo) a partir de la señal fluorescente que permanece dentro de la célula al final del lavado. (IV) Por último, se aplica una segunda despolarización, esta vez durante 30 minutos, nuevamente con K^+ 50 mM pero en ausencia del fluoróforo. De esta manera se induce un nuevo ciclo de exocitosis con la liberación resultante del FM1-43 incorporado a la fracción de membrana previamente internalizada, lo cual permite la evaluación de la fracción reciclada a vesículas liberables (Exo2). La fluorescencia remanente en el interior de la célula luego de esta etapa se asocia a la fracción no liberable (FNL). Utilizando este protocolo, se evaluó la exocitosis, la endocitosis y el reciclado vesicular producidos en condiciones control, y luego de inhibir la endocitosis clatrina dependiente mediante la incubación con chlorpromazina (CPZ - 15 µM). Se pre-incubó con esta droga durante 45 minutos antes de aplicar la estimulación que desencadena a Exo1. Dado que previamente se encontró una participación significativa de este mecanismo durante la endocitosis rápida registrada por la técnica de *Patch Clamp*, quisimos evaluar su posible participación en el reciclado vesicular.

En la figura 3.4.1 A se muestra el curso temporal de la fluorescencia relativa asociada a FM1-43 en condiciones control, obtenida del promedio de 19 células. Se indica la finalización de las cuatro etapas del protocolo: luego de la incubación (I) (valor al que se normalizan los datos en cada experimento, y por eso presenta un valor de 100%), primera estimulación (II), lavado (III) y segunda estimulación (IV). Además se muestra un esquema que representa la distribución esperada del FM1-43 en la célula al final de cada una de esas etapas. Sobre el trazado se marcan las magnitudes de las cuatro fracciones de membrana en estudio (en rayas verticales de distintos colores). En la parte B de la figura

se muestra el promedio (junto con sus respectivos errores estándares) de los valores correspondientes a cada una de las fracciones en estudio. Respecto a la condición control (barras negras), la endocitosis fue consistentemente mayor que la exocitosis en cada una de las células estudiadas, siendo la media de la primera significativamente mayor que la segunda ($p<0,001$). Esto confirma, por medio de una técnica diferente, la presencia de una endocitosis en exceso. Además, en estas condiciones, parte de la membrana internalizada se recicló a vesículas liberables, como puede observarse por la presencia de un valor significativo de Exo2. Por lo tanto, esta despolarización con K^+ 50 mM durante 30 seg induce una endocitosis en exceso, que se hizo liberable en un ~38 % en el marco temporal del experimento. Consecuentemente, en estas condiciones existe otra fracción de membrana internalizada que no fue reciclada a vesículas liberables (FNL) dentro de los tiempos de nuestros experimentos, y que corresponde al ~62 % de la membrana endocitada.

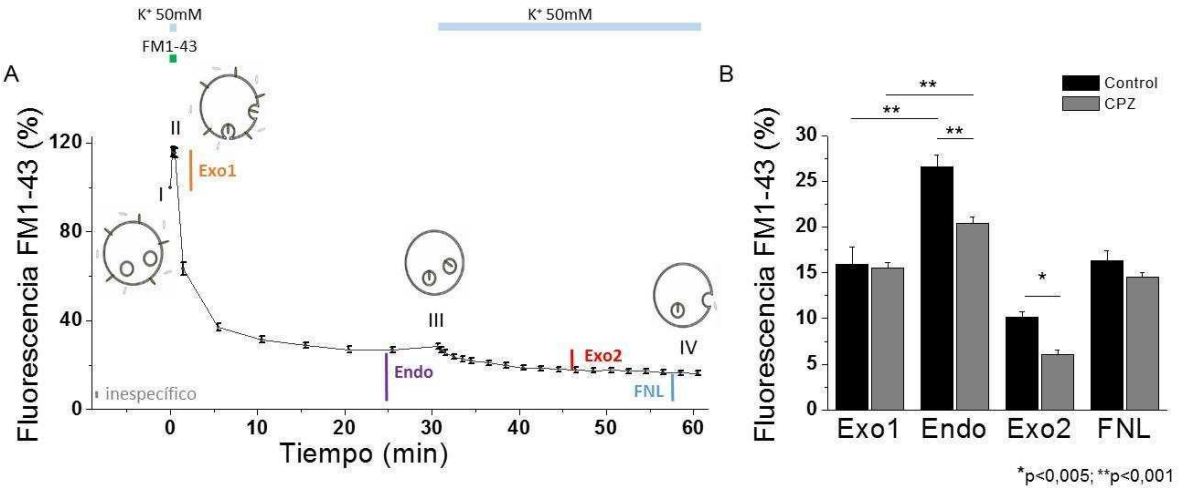

Figura 3.4.1 - *La endocitosis clatrina dependiente participa en la recuperación de una fracción de membrana que es transformada en vesículas liberables*. (A) *Curso temporal promedio (n = 19) de la fluorescencia asociada a FM1-43 normalizada (en cada experimento) respecto a los valores obtenidos al finalizar el período de incubación (I). Sobre dicho curso temporal se marcó la finalización de las cuatro etapas del protocolo: luego de la incubación (I), primera estimulación (II), lavado (III) y segunda estimulación (IV). Se indica con barras verticales cada una de las cuatro fracciones de membrana estudiadas: Exo1 (naranja), es la exocitosis disparada por el primer estímulo (K^+ 50 mM durante 30 seg); Endo (violeta), corresponde a la endocitosis que se produce luego de Exo1; Exo2 (rojo), representa a la exocitosis disparada por el segundo estímulo y es utilizada para estimar a la fracción endocitada que se recicla a vesículas liberables; y FNL (azul), es la fracción no liberable. Se muestra también una serie de esquemas que representan la distribución del FM1-43 respecto de la célula al final de cada una de las etapas del protocolo, donde los pequeños segmentos*

rectilíneos representan a las moléculas del fluoróforo incorporadas a la membrana (negro) o en solución (gris claro). ***(B)*** *Diagrama de barras que muestra los valores promedio (junto con sus respectivos errores estándares) de los parámetros Exo1, Endo, Exo2 y FNL evaluados a partir de estos experimentos, en condiciones control (n = 19) y en presencia de chlorpromazina (CPZ - n = 25). La endocitosis fue mayor que la exocitosis tanto para la condición control, como cuando se aplicó 15 µM de CPZ (p<0,001, para ambos*). Tanto la endocitosis (Endo) como la fracción de membrana internalizada que se recicló a vesículas liberables (Exo2) disminuyeron con la droga (p<0,001 y p<0,005, respectivamente), mientras que la exocitosis y fracción no liberable (FNL) no se vieron afectadas. *El análisis estadístico entre estas dos muestras independientes se realizó mediante el Test de Student. La comparación exo con endo* en control y CPZ, se realizó mediante un Test de Student pareado.

La aplicación de chlorpromazina no modificó la exocitosis. Sin embargo, como era de esperar, se observó una reducción significativa de la endocitosis (Endo, p<0,001). De este resultado, podemos concluir que al menos una parte de la endocitosis total corresponde a un mecanismo dependiente de clatrina. A pesar de esta reducción, el exceso de endocitosis persiste, ya que con este tratamiento la endocitosis resultó significativamente mayor a la exocitosis (p<0,001). Es particularmente interesante que la fracción liberable, Exo2, también disminuyó en comparación a la condición control (p<0,005). La reducción en Exo2 generada por la chlorpromazina resultó, en términos absolutos, similar a la inducida por la droga sobre la endocitosis (figura 3.4.1 B). Esto sugiere que la mayoría de la membrana endocitada vía clatrina sería transformada en vesículas liberables en el período en estudio. Esto último se ve reforzado por el hecho que la inhibición de la endocitosis clatrina dependiente con chlorpromazina no modificó a la fracción de membrana no liberable (FNL).

Resumiendo, los resultados obtenidos en esta sección confirman que la endocitosis clatrina dependiente interviene en la recuperación de una fracción de la membrana exocitada, y además agregan que dicha fracción es mayormente transformada en vesículas liberables en el curso temporal del experimento. Por otro lado, los resultados obtenidos con FM1-43, al igual que los provenientes del HCG en los experimentos electrofisiológicos, sugieren que durante la endocitosis en exceso interviene además un proceso clatrina independiente que es responsable de una fracción muy importante de la endocitosis total. Este proceso clatrina independiente no estaría asociado a un reciclado rápido de vesículas liberables.

B - DISCUSIÓN

Clásicamente, la endocitosis en exceso fue determinada por medio de registros de capacitancia obtenidos mediante la técnica de *patch clamp*. Esta técnica posee dos limitaciones: reporta la diferencia neta entre endocitosis y exocitosis, siendo incapaz de cuantificar los valores absolutos de estos procesos cuando ocurren simultáneamente; por otro lado no brinda información sobre el destino de la membrana endocitada, y en particular del reciclado vesicular. Por lo tanto se complementó este estudio con la utilización de la técnica de *imaging* de la distribución del fluoróforo FM1-43, la cual ofrece la oportunidad de adquirir información acerca de la exocitosis y la endocitosis en forma separada, aunque no posea la resolución temporal de milisegundos, y la sensibilidad que ofrece la medida de capacitancia. Luego de la aplicación de una despolarización con alto K^+ durante 30 seg de duración, se observó en promedio una exocitosis equivalente al 16% de la superficie de la membrana celular. Este estímulo indujo además, tal como se esperaba debido a que la entrada de Ca^{2+} es muy sostenida (Pérez Bay AE y col., 2012), un claro exceso de endocitosis. Hasta aquí, cualitativamente los resultados con FM1-43 no aportarían nada nuevo respecto a los ya descriptos a partir de los experimentos electrofisiológicos. Sin embargo, esta técnica de *imaging* nos permitió detectar en forma adicional la presencia de un reciclado parcial de la membrana internalizada en vesículas liberables. En términos cuantitativos, aproximadamente un 38% del total endocitado volvió a exocitarse (Exo2) luego de una segunda estimulación, aplicada 30 min luego de la primera. Además, quedó una fracción de un 62 % que no resultó liberable (FNL) dentro de los tiempos de nuestros experimentos.

Asumiendo un valor de capacitancia promedio para las vesículas secretorias de 1,3 fF (Moser T y Neher E, 1997b), y considerando que en el grupo HCG la capacitancia de la membrana celular al comienzo de los experimentos fue estimada en 6,6 ± 0,2 pF, se puede calcular fácilmente que una vesícula equivaldría al 0,02 % de la membrana plasmática. Por lo tanto, el parámetro Exo1, que correspondió a un 16 ± 2 % de aumento de fluorescencia de FM1-43, estaría asociado a la liberación de aproximadamente 800 vesículas secretorias. Este valor es superior a lo obtenido en electrofisiología, ya que se puede calcular que la despolarización de 1 seg en HCG libera aproximadamente 200 vesículas (257 ± 25 fF de exocitosis). Esta diferencia puede atribuirse parcialmente a la ya mencionada posible subestimación de los procesos de endocitosis y exocitosis que puede llevar aparejada la técnica de *patch clamp*, debido a que esta no provee cuantificaciones

independientes de los mismos fenómenos cuando estos se superponen temporalmente (Nucifora PG y Fox AP, 1999). Pero fundamentalmente debemos atribuir esta diferencia a la mayor duración de la despolarización, ya que una estimulación de 30 seg genera una señal de Ca^{2+} de suficiente duración (Pérez Bay AE y col., 2012) como para permitir que se exociten *pools* vesiculares no listos para liberarse, además del RRP. Es esperable que esta señal de Ca^{2+} sostenida permita la translocación y maduración de vesículas que pertenecen al RP (Voets T y col., 1999). Es sabido que los procesos de movilización vesicular a través del citoesqueleto, la aproximación de las vesículas a la membrana que antecede al anclado, y la activación vesicular, son todos procesos Ca^{2+} dependientes (Sørensen JB, 2004), los cuales conducen secuencialmente a las vesículas secretorias a través de etapas de maduración que las convierte en liberables. Es esperable que estos procesos contribuyan a aumentar la respuesta exocitótica en estos experimentos. Buscando una equivalencia en la magnitud de los valores de exocitosis obtenidos en esta sección de la tesis y experimentos donde se midió la capacitancia celular, podemos citar los trabajos de Artalejo y colaboradores. Estos autores, trabajando con células cromafines bovinas, obtuvieron en respuesta a trenes de despolarizaciones (Artalejo CR y col., 1995; Artalejo CR y col., 2002) un aumento del valor de la capacitancia de membrana celular de 600-860 fF, lo cual expresado como porcentaje de la superficie celular correspondería a 9-14%, un valor más aproximado al que obtuvimos nosotros con la despolarización con alto K^+ de 30 seg.

Seguidamente a la exocitosis, se registró un proceso de endocitosis en exceso que internaliza aproximadamente un 25% del total de la membrana. Al igual que lo que ocurrió con la exocitosis, estos valores son mayores a los obtenidos por medio de estimulación eléctrica en el grupo HCG, donde se observó una endocitosis de un poco menos de 600 fF, que equivale a menos del 10% de la membrana total. Estas diferencias son esperables, ya que, como se mencionó, en los experimentos de esta sección la despolarización de la membrana celular se mantuvo por un tiempo mucho más prolongado. Resultados publicados de nuestro laboratorio, muestran que una despolarización con alto K^+ similar a la aplicada aquí, provocó un aumento de la concentración de Ca^{2+} (medida con Fluo-4 AM) que se mantuvo por más de 4 min. De todas formas, estos resultados representan una confirmación, por medio de una técnica experimental alternativa al registro de capacitancia, del desarrollo de este tipo de endocitosis frente a grandes entradas de Ca^{2+} a la célula. Si consideramos que en los experimentos electrofisiológicos una despolarización de 1 seg fue capaz de desencadenar una endocitosis en exceso en la

mitad de los casos control estudiados, parecería lógico que el mantenimiento de la despolarización de la membrana, y consecuentemente de un Ca^{2+} citosólico elevado por un período mucho más largo, debería generar una respuesta mayor y más consistente, como la observada.

El bloqueo del mecanismo dependiente de clatrina con chlorpromazina disminuyó moderadamente, aunque significativamente, la endocitosis medida con FM1-43. Dicha reducción en la endocitosis (de aproximadamente un 25% respecto del control) es menor que el ~50 % de inhibición obtenido en los experimentos electrofisiológicos del grupo HCG bajo el mismo tratamiento farmacológico (figura 3.3.5 Bii). Incluso, la diferencia es mucho mayor si se la compara con el LCG, donde la inhibición de la endocitosis por chlorpromazina fue prácticamente del 100%. Estas observaciones, son coherentes con lo propuesto previamente respecto a las limitaciones de la endocitosis clatrina dependiente para compensar los cambios de superficie frente a una exocitosis masiva, y consecuentemente con la activación de un proceso clatrina independiente, responsable del exceso. Mientras que en el caso de LCG la endocitosis clatrina dependiente sería suficiente para compensar completamente a la exocitosis, en HCG y en las despolarizaciones con alto K^+ haría falta la activación del mencionado proceso independiente de clatrina en magnitudes relativas a la exocitosis generada. Trabajos previos sugieren que fuertes estímulos que inducen endocitosis en exceso se asocian a procesos de endocitosis de tipo *bulk* (Henkel AW y Almers W, 1996; Pérez Bay AE y col., 2012; Thomas P y col., 1994). Tanto en presinapsis, como en células cromafines, se observó que bajo condiciones de actividad muy intensa que generan exocitosis masiva, se desencadena una endocitosis de tipo *bulk*, probablemente debido a que los mecanismos convencionales de endocitosis tienen una capacidad limitada de recuperar la membrana adicionada, y de otra manera se pondría en peligro la homeostasis celular (Holt M y col., 2003; Pérez Bay AE y col., 2007; Pérez Bay AE y col., 2012; Smith CB y Betz WJ, 1996). La endocitosis de tipo *bulk* tiene la capacidad de compensar los efectos generados por una exocitosis masiva debido a su gran capacidad para recuperar membrana (Andersson F y col., 2008; Clayton EL y col., 2008; Paillart C y col., 2003). Thomas y colaboradores (Thomas P y col., 1994) mostraron en melanotrofos que, durante la endocitosis en exceso, la capacitancia de membrana decrece en escalones de más de 20 fF, lo que representaría vacuolas de un diámetro de aproximadamente 0,8 µm. Consistentemente con esto, en nuestro laboratorio se determinó que células cromafines sometidas a una estimulación idéntica a la de esta sección, internalizaban dextranos fluorescentes de 70 KDa, que se

distribuían en endosomas no liberables de 0,7 µm de diámetro (Pérez Bay AE y col., 2012). La formación de este tipo de endosomas de gran tamaño durante la endocitosis en exceso ha sido asociada por diferentes autores con la *bulk* endocitosis (Clayton EL y col., 2008; de Lange RP y col., 2003; Holt M y col., 2003; Pérez Bay AE y col., 2007; Richards DA y col., 2000). Este proceso endocitótico puede ser muy rápido (Wu W y Wu LG, 2007; Clayton EL y col., 2008), y por lo tanto sería totalmente compatible con los tiempos de nuestros experimentos.

En los experimentos de esta sección, la mayor parte de la membrana endocitada no se recicló a vesículas liberables. Previamente, en nuestro laboratorio hemos observado que los endosomas resultantes de la endocitosis de tipo *bulk* no colocalizaban con las fracciones de membrana asociadas al reciclado vesicular, mientras que sí lo hacían con la vía lisosomal (Pérez Bay AE y col., 2012). Esto último indica que la fracción de membrana que se internalizaría por la vía de la *bulk* endocitosis (en los experimentos de FM1-43 podría ser de hasta un 75% de la membrana total endocitada) no se reciclaría a vesículas liberables, por lo que estas últimas deberían ser regeneradas *de novo* desde el aparato de Golgi (Pérez Bay AE y col., 2012).

Finalmente, es importante remarcar el hecho de que la mayor parte de la fracción de endocitosis sensible a inhibidores de clatrina se recicló a vesículas liberables en los tiempos del experimento (aproximadamente 30 min). Esta observación, indica que el reciclado de vesículas liberables luego de una endocitosis clatrina dependiente se lleva a cabo en un tiempo menor a dicho período. Existen diferentes estimaciones respecto a estos tiempos en la literatura, que van desde horas (Patzak A y Winkler H, 1986) a aproximadamente 15 minutos (von Grafenstein H y Knight DE, 1992). Nuestros resultados están más de acuerdo con esta última estimación. En un trabajo previo de nuestro laboratorio, se ha determinado incluso que la fracción reciclable, obtenida en condiciones similares a las de esta tesis, se vuelve liberable en menos de 2 min luego de finalizada la estimulación (Pérez Bay AE y col., 2007). En relación con esto último, recientemente se ha reportado en células PC12, que proteínas endocitadas convergen en endosomas de reciclado con proteínas de secreción provenientes de Golgi en aproximadamente 30 seg, desde donde podrían generarse nuevas vesículas secretorias (Hoopmann P y col., 2010).

3.5 Caracterización de la endocitosis rápida que se produce frente a un estímulo que simula un potencial de acción (PAs)

A- RESULTADOS

Existen evidencias en varios sistemas, incluidas las células cromafines, de la presencia de un tipo de endocitosis muy rápida en respuesta a estímulos breves como lo es un potencial de acción único (Chan SA y col., 2005). Quisimos averiguar si dicho proceso estaba presente en nuestra preparación, y si el mismo respondía a un mecanismo similar o diferente al que se evidencia luego de un estímulo intenso como el estudiado previamente en esta tesis. Por lo tanto, para responder a esta pregunta, estudiamos este tipo de endocitosis rápida en condiciones control y en presencia de los mismos tratamientos farmacológicos que se aplicaron previamente para inhibir la participación de la dinamina y de la endocitosis clatrina dependiente. El estímulo elegido para disparar este tipo de endocitosis fue una despolarización única que se aproxima en amplitud y duración a un potencial de acción nativo de las células cromafines (Chan SA y col., 2005), a lo que denominamos PAs (potencial de acción simulado). Cada PAs está formado por una rampa ascendente que parte del potencial de *holding* (-80 mV) y llega hasta un pico de +50 mV en 2,5 mseg, esto seguido por una rampa descendente con la misma duración que retorna al potencial de *holding*. Este tipo de estímulo tiene el valor agregado de que representa una condición más fisiológica que los estímulos utilizados previamente en esta tesis, pudiéndose aproximar a lo que ocurre en estado de reposo, donde los potenciales de acción se disparan a frecuencias muy bajas, inferiores a 0,5 Hz.

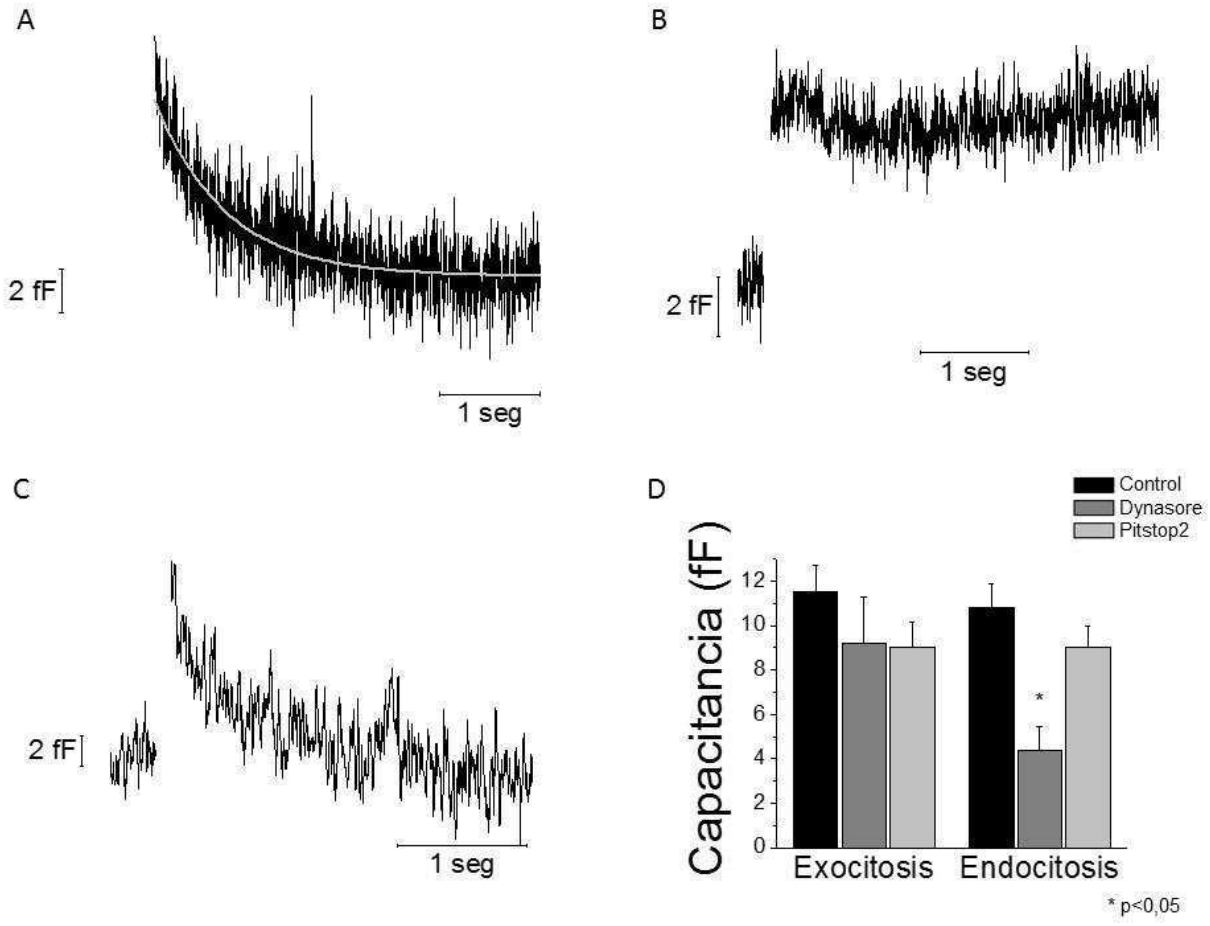

Figura 3.5.1 - Endocitosis frente a un PAs. (A) *Trazado promedio de los cambios de la capacitancia celular que se obtienen como respuesta a la aplicación de un PAs en células control (n = 16). A este trazado promedio se le superpuso la curva obtenida a partir del ajuste mono-exponencial descendente (τ_{PAs} = 0,64 ± 0,02 seg).* ***(B) y (C)*** *Trazados promedios de los cambios de capacitancia celular en respuesta a un PAs, utilizando el inhibidor dynasore (80 µM, n= 8) o pitstop2 (25 µM, n = 6), respectivamente.* ***(D)*** *El gráfico de barras representa los valores promedio de exocitosis y endocitosis en condiciones control (barras negras), dynasore (gris oscuro) y pitstop2 (gris claro). La comparación de ambos parámetros muestra que en condiciones control, la endocitosis no presenta diferencias significativas en comparación con la exocitosis producida por un PAs. La aplicación de los bloqueantes no generó cambios en la exocitosis respecto al control. Contrariamente, la endocitosis resultó parcialmente inhibida por la aplicación del bloqueante de dinamina dynasore (p<0,05), pero no fue modificada por el inhibidor de clatrina pitstop2. El análisis estadístico entre dos muestras (Exocitosis vs Endocitosis en condiciones control) se realizó mediante el* Test de Student *pareado, y las comparaciones de más de dos muestras independientes (exocitosis o endocitosis control vs tratamientos farmacológicos) se realizaron mediante pruebas de análisis de varianza (ANOVA) realizando a posteriori contrastes de* Bonferroni.

En la figura 3.5.1 A se muestra la curva resultante de promediar punto a punto los trazados de capacitancia obtenidos en células individuales al aplicar un PAs (n = 16). La aplicación de un PAs, produjo en condiciones control una exocitosis, medida como un aumento del valor de la capacitancia de membrana celular, de 11 ± 1 fF en promedio (figura 3.5.1 A y D). Luego de este aumento, se observa una clara disminución de la capacitancia que llega a compensar la exocitosis previa (figura 3.5.1 A y D). Tal como se explicó previamente en esta tesis, la cinética de decaimiento de la capacitancia (endocitosis) se evaluó utilizando un ajuste exponencial en cada experimento. Como en los casos previos, el ajuste se aplicó desde 64 mseg después de terminado el estímulo (para evitar el cambio de la capacitancia de membrana producido por las corrientes de compuerta de los canales de Na^+ - Moser T y Neher E, 1997a), y en este caso particular de estimulación con PAs hasta los 5 seg posteriores. A diferencia de lo ocurrido para la endocitosis desarrollada luego de despolarizaciones de 1 seg, en todos los casos de endocitosis inducida por PAs se requirió solamente un componente mono-exponencial para ajustar satisfactoriamente el proceso. El tiempo característico de decaimiento promedio de este proceso fue de τ_{PAs} = 0,64 ± 0,02 seg (n = 16).

En la figura 3.5.1 B se muestra el trazado promedio de 8 células a las que se las trató con dynasore (80 µM), las cuales presentaron una inhibición de la integral de la corriente de Ca^{2+} del ~30% (242 ± 50 pC) en comparación a las células control (360 ± 20 pC). Este tratamiento no afectó la respuesta exocitótica, pero sí redujo significativamente la magnitud de la endocitosis ($p<0,05$; ver figura 3.5.1 D barras grises) respecto a la condición control. El análisis cinético de la respuesta arrojó un τ_{PAs} promedio cercano al segundo de duración (0,9 ± 0,3 seg), pero hubo gran dispersión en estos datos, con lo cual dicho aumento no resultó significativo. Por otro lado, la aplicación de pitstop2 (25µM – n = 6), cuyo trazado de capacitancia celular promedio se muestra en la figura 3.5.1 C, no modificó ni la amplitud (ver figura 3.5.1 D barras grises claras) ni la cinética de esta respuesta observada (τ_{PAs}= 0,57 ± 0,04 seg).

Estos resultados sugieren que la endocitosis que se produce en respuesta a un PAs es dependiente de dinamina e independiente de clatrina. Por lo tanto, pese a que esta endocitosis posee una cinética similar al componente ultra-rápido que se manifiesta ante estímulos prolongados como los aplicados previamente, parecería responder a mecanismos diferentes.

B - DISCUSIÓN

Fisiológicamente, la liberación de catecolaminas desde las células cromafines es inducida por trenes de potenciales de acción de frecuencia variable, la cual es dependiente de la situación fisiológica del animal. Estos potenciales de acción se disparan en las células cromafines en respuesta a la estimulación ejercida por la acetilcolina liberada desde terminales nerviosos simpáticos preganglionares. En una situación de reposo (*feed and breed*), sin situaciones de estrés presentes, la frecuencia de potenciales de acción de las células cromafines es menor a 0,5 Hz, mientras que bajo situaciones de estrés (*fight or flight*) dicha frecuencia asciende por arriba de 10 Hz (Brandt BL y col., 1976; Fulop T y col., 2005; Holman ME y col., 1994). En nuestro preparado, observamos que frente a una estimulación que simula un potencial de acción individual se produce una exocitosis de 11 ± 1 fF y una posterior endocitosis compensatoria que evoluciona con una constante temporal de 0,64 ± 0,02 seg. Datos muy recientes de nuestro laboratorio (Moya Díaz J y col., 2016), muestran que dicha situación es muy similar a lo que ocurre bajo un régimen de baja frecuencia de PAs (0,2 – 0,5 Hz), equivalente a la situación basal mencionada arriba. El proceso de endocitosis rápida compensatoria frente a un PAs ha sido observado también por otros autores (Chan SA y Smith C, 2001; Chan y col., 2003), quienes lo asociaron con un proceso de *kiss & run*, que se activaría a bajas frecuencias de estimulación (Fulop T y Smith C, 2006).

Clásicamente, en células cromafines se postuló que la endocitosis clatrina dependiente era un proceso lento, que necesitaba varios minutos para completarse (Artalejo CR y col., 2002). Por el contrario, en terminales sinápticas (Wu LG y col., 2014), y en células beta del páncreas (He Z y col., 2008) se ha postulado que la endocitosis clatrina dependiente puede ser más rápida. En este trabajo, mostramos en un capítulo precedente que al estimular las células cromafines de ratón con un estímulo prolongado se dispara una endocitosis rápida, con una $\tau_{Rápida}$ de 8 seg aproximadamente (presente tanto en el LCG como en el HCG), y una $\tau_{Ultra\text{-}Rápida}$ de 0,6 seg aproximadamente (presente solamente en el HCG). Resulta llamativo que el componente ultra-rápido de endocitosis que se manifiesta luego de estímulos prolongados, tenga una similar cinética temporal que la endocitosis disparada frente a estímulos breves como un PAs. Esta similar cinética abriría en principio la posibilidad de que se tratase de procesos que responden al mismo mecanismo. Los resultados de esta sección y de la sección 3.3 muestran que ambos procesos son dependientes de dinamina. Por otro lado, dado que el componente ultra-

rápido de HCG resultó inhibido parcialmente por fármacos que afectan a la endocitosis dependiente de clatrina, nos preguntamos si esto también se cumpliría para la endocitosis que se desarrolla luego de PAs. En esta sección se muestra que esto no es así, ya que la endocitosis asociada a PAs no se vio afectada con la utilización de chlorpromazina, un inhibidor de la endocitosis clatrina dependiente. Este último resultado es coherente con lo hallado previamente por Chan y Smith (Chan SA y Smith C, 2003). Por lo tanto concluimos que el componente ultra-rápido de endocitosis que se dispara ante estímulos fuertes, como una despolarización de 1 seg, y la endocitosis rápida en respuesta a un PAs responden a mecanismos diferentes, siendo el primero dependiente de dinamina y clatrina, y el segundo dependiente de dinamina pero independiente de clatrina.

4 – DISCUSIÓN GENERAL

Frente a una situación de estrés, la liberación de acetilcolina desde las terminales simpáticas preganglionares que inervan a la médula adrenal provoca el disparo de potenciales de acción en las células cromafines a frecuencias de 10-15 Hz, induciendo un aumento importante del Ca^{2+} citosólico (Sørensen JB, 2004). Este aumento de Ca^{2+} dispara la liberación de adrenalina, noradrenalina y otros contenidos vesiculares a través de la fusión de vesículas secretorias con la membrana plasmática. Para mantener la fidelidad de la neurotransmisión y la homeostasis de la membrana plasmática, es importante que luego de la exocitosis, la membrana y las proteínas vesiculares sean recuperadas y recicladas de manera eficiente. Para ello la célula recurre a mecanismos endocitóticos y postendocitóticos (Rizzoli SO y Betz WJ, 2005).

En esta tesis doctoral se ha medido la endocitosis rápida en células cromafines de ratón en respuesta a estímulos despolarizantes sostenidos por 1 seg. Este tipo de estímulo es bastante demandante desde el punto de vista de la exocitosis, generando la fusión de aproximadamente 200 vesículas. En esta situación experimental se evidenció la presencia de dos modos de endocitosis rápida cualitativamente distintas: (i) Una **endocitosis compensatoria**, en la cual la endocitosis recupera aproximadamente la misma cantidad de membrana que fue exocitada durante la estimulación (figuras 3.1.1 y 3.1.4). Esta modalidad de endocitosis se asoció a una entrada de Ca^{2+} menor a 79 pC (promedio de 56 ± 5 pC), y evidenció una cinética mono-exponencial con una constante temporal $\tau_{Rápida}$ de 8,4 ± 0,6 seg (figura 3.1.5 C). (ii) Una **endocitosis en exceso**, donde la cantidad de membrana internalizada supera a la cantidad de membrana exocitada previamente (figuras 3.1.2 y 3.1.4). Este tipo de endocitosis se disparó por entradas de Ca^{2+} mayores a 79 pC (figura 3.1.3), alcanzando un promedio de 139 ± 8 pC, y evolucionó bi-exponencialmente, con una constante $\tau_{Rápida}$ de 8,2 ± 0,7 seg, y una $\tau_{Ultra\text{-}Rápida}$ de 0,6 ± 0,09 seg (figura 3.1.5 C). A diferencia de la endocitosis compensatoria, la magnitud de la endocitosis en exceso no guardó relación con la cantidad de membrana adicionada por la exocitosis precedente.

Los dos modos de endocitosis descriptos arriba fueron previamente identificados en células cromafines bovinas (Engisch KL y Nowycky MC, 1998; Smith C y Neher E, 1997). En trabajos realizados en ese preparado, se propuso que la endocitosis compensatoria representaría el normal mecanismo de recuperación de membrana frente a exigencias exocitóticas moderadas (Engisch KL y Nowycky MC, 1998). Por otro lado, se propuso que la

endocitosis en exceso sería una forma rápida de recuperar la superficie de la membrana celular frente a una situación de exocitosis masiva, que pueda provocar un hinchamiento celular excesivo con posibles consecuencias negativas para la viabilidad celular (Betz WJ y Bewick GS, 1992; Pérez Bay AE y col., 2012). Estas hipótesis parecerían contradecirse con el hecho de que, según nuestros experimentos, ambos tipos de endocitosis fueron antecedidas por exocitosis de similar amplitud (figura 3.1.4 A). Sin embargo debe tenerse en cuenta que, posteriormente a la endocitosis en exceso, se desarrolla un proceso de "recuperación luego de la endocitosis en exceso" ("*recovery after excess retrieval*"). Este último corresponde a un tipo de exocitosis que evoluciona en forma muy posterior al estímulo. Si se considera la suma de la exocitosis sincrónica al estímulo y la "recuperación luego de la endocitosis en exceso", el total resulta marcadamente más grande que la exocitosis que precede a la endocitosis compensatoria. Por ejemplo, en los trazados A, B y C de la figura 3.1.2, la suma de estos dos procesos aproximadamente duplica la exocitosis sincrónica que antecede la endocitosis, y podría representar casi el 10% de la superficie celular. Relacionado con esto, se propuso que la endocitosis en exceso es un mecanismo preventivo que, evaluando la magnitud de la entrada de Ca^{2+}, se anticipa en parte a procesos exocitóticos masivos (Pérez Bay AE y col, 2012).

Los resultados de esta tesis son coherentes con la hipótesis que postula que las células cromafines presentan una dependencia positiva de la endocitosis rápida con el Ca^{2+} (figura 3.1.3). Esto es coincidente con lo descripto previamente en células cromafines bovinas y de ratón (Chan SA y Smith C, 2003; Engisch KL y Nowycky MC, 1998; Smith C y Neher E, 1997). Sin embargo, se opone a lo descripto previamente por von Gersdorff y Matthews (1994) en células bipolares de la retina, donde la endocitosis resultó inhibida por el Ca^{2+}. Nuestros resultados muestran que esta dependencia positiva de la endocitosis con el Ca^{2+} en las células cromafines estaría asociada con la entrada de este catión por los canales de tipo L en particular (figura 3.2.2 Bii y Cii), y sería insensible a la corriente que entra a través de los canales de tipo P/Q. Esto también es coherente con lo previamente reportado en células cromafines bovinas (Rosa JM y col., 2007 y 2011). Según estos autores, esta dependencia se podría explicar por la lenta inactivación que presentan estos CCDV en comparación a los P/Q o a los N. Esta posible explicación es razonable y no podemos descartarla a partir de nuestros resultados. Sin embargo, los resultados de esta tesis apoyan una hipótesis alternativa, según la cual los canales de tipo L activarían la liberación de Ca^{2+} adicional del retículo endoplasmático. Esta hipótesis está apoyada por los siguientes resultados: (i) La aplicación de rianodina o tapsigargina + cafeína inhiben la

endocitosis rápida, tanto en el grupo LCG como en el grupo HCG (figuras 3.2.4 Aii y Bii). (ii) El reemplazo de un buffer de Ca^{2+} lento (EGTA) por uno rápido (BAPTA) en la solución intracelular provocó una inhibición parcial de la endocitosis rápida, y una reducción del exceso de endocitosis (figura 3.2.1 D). Esto último podría explicarse por una colocalización hipotética de dichos canales con un sensor de Ca^{2+}. Sin embargo, la endocitosis es un mecanismo más lento y menos acoplado al estímulo que la exocitosis (Wu LG y col., 2014), por lo que sería poco probable que el BAPTA lo afecte directamente. Una posibilidad alternativa sería que el BAPTA esté interfiriendo con la activación de un mecanismo altamente acoplado de liberación de Ca^{2+} activada por Ca^{2+} (Fabiato A, 1983). Se debe remarcar que, en otros sistemas, como es el caso del músculo cardíaco, este mecanismo está particularmente acoplado a canales de tipo L (Fabiato A, 1983). En dicho sistema se ha demostrado que existe una asociación espacial íntima entre CCDV de tipo L y los receptores de rianodina (Fabiato A, 1983), estando ambos a una distancia de aproximadamente 12 nm (Peskoff A y Langer GA, 1998). Una posible hipótesis, coherente con el conjunto de nuestros resultados experimentales, sería que la entrada de Ca^{2+} por los CCDV tipo L generase un aumento de la concentración de Ca^{2+} en un espacio restringido, próximo a los receptores de rianodina, lo que provocaría a su vez la liberación de más Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático. Este Ca^{2+} adicional, al difundir, generaría una señal de Ca^{2+} generalizada y sostenida en el citosol, responsable de disparar la endocitosis. El agregado de BAPTA a la solución intracelular, reduciría el aumento localizado de Ca^{2+} próximo a los receptores de rianodina, lo que anularía al menos parcialmente la liberación de más Ca^{2+} desde el retículo, y en consecuencia la endocitosis rápida que se observa sería menor, tal como ocurre. Debemos remarcar que el efecto observado de BAPTA se contradice con la explicación provista por Rosa y colaboradores (Rosa JM y col., 2007 y 2011), ya que si el disparador de la endocitosis fuera simplemente la entrada de Ca^{2+} vía los CCDV tipo L por un tiempo prolongado, no habría motivo para que el BAPTA interfiera con este fenómeno más de lo que podría hacerlo el EGTA. De cualquier manera, no podemos descartar que la endocitosis rápida sea el resultado de la suma de estos dos procesos (entrada de Ca^{2+} por CCDV tipo L sostenida y liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático), y que conjuntamente generen la señal global de Ca^{2+} que modula la endocitosis rápida.

En las células cromafines se han descripto diferentes mecanismos de endocitosis: endocitosis clásica clatrina dependiente, *kiss & run* y endocitosis de tipo *bulk* (Artalejo CR y col., 1995; Artalejo CR y col., 2002; Burgoyne RD, 1995; Chan SA y col., 2003; Cecarelli

B y col., 1973; Elhamdani A y col., 2006; Fulop T y Smith C, 2006; Koval LM y col., 2001; Pérez Bay AE y col., 2007; Pérez Bay AE y col., 2012; Smith SM y col., 2008). Los resultados de esta tesis indican que en células cromafines de ratón, la endocitosis rápida disparada por despolarizaciones prolongadas depende al menos en parte de dinamina y de clatrina. En particular, la inhibición de la dinamina con dynasore provocó un enlentecimiento o reducción de la endocitosis, según el grupo (HCG o LCG) o el componente endocitótico analizado (figura 3.3.3). Por su parte, los inhibidores de clatrina abolieron en forma prácticamente total la endocitosis asociada al LCG, disminuyeron marcadamente la amplitud del componente ultra-rápido del HCG, y enlentecieron al componente rápido de HCG (figura 3.3.5 Aii y figura 3.3.6 A). Estos resultados indican que la endocitosis compensatoria característica de LCG sería un mecanismo fundamentalmente dependiente de clatrina. Por otro lado, estos resultados están en desacuerdo con la extremadamente lenta cinética de la endocitosis clatrina dependiente reportada por Artalejo y colaboradores (Artalejo CR y col., 2002) en células cromafines bovinas. En cambio coinciden con los resultados de He (He Z y col., 2008) en células beta pancreáticas, donde se describió una endocitosis dependiente de clatrina que evoluciona con constantes temporales de pocos segundos, similar a lo aquí descripto. Más aún, los resultados obtenidos en HCG sugieren que la endocitosis clatrina dependiente puede incluso evolucionar a velocidades mucho más rápidas aún (figura 3.3.6 Bi), lo que no había sido reportado hasta el momento en la literatura. La constante temporal inferior al segundo, observada en el componente ultra-rápido de HCG, podría ser el resultado de una aceleración por Ca^{2+} de la endocitosis clatrina dependiente (Wu LG y col., 2014) durante los primeros cientos de milisegundos de finalizado el estímulo, cuando la concentración de Ca^{2+}, si bien se ha homogeneizado en el citosol, se mantiene aún alta (Marengo FD y Monck JR, 2003).

Mientras que los inhibidores de clatrina deprimen completamente la endocitosis en el grupo LCG, en el grupo HCG se observó un remanente importante, de aproximadamente el 55% del valor control (figura 3.3.5 Bii). Esto sugiere que la superación del umbral de Ca^{2+} de 79 pC (figura 3.1.3), provocaría la activación de un mecanismo adicional de recuperación de membrana que sería independiente de clatrina. Un candidato posible para dicho mecanismo clatrina independiente sería la endocitosis de tipo *bulk* (Kittelmann M y col., 2013; Wu Y y col., 2014). En células cromafines de ratón se observó que, frente a una estimulación intensa asociada a exocitosis masiva, se activa una endocitosis de tipo *bulk* (Holt M y col., 2003; Pérez Bay AE y col., 2007, 2012; Smith CB y

Betz WJ, 1996). Previamente, observamos en nuestro laboratorio que la endocitosis de tipo *bulk* es responsable del exceso endocitótico, que su magnitud es dependiente de la amplitud de la señal de Ca^{2+} citosólico, y que es causante de la formación de una fracción de membrana internalizada no reciclable a vesículas por un período de más de una hora (Pérez Bay AE y col., 2007; Pérez Bay AE y col., 2012). Debido a este antecedente, nos pareció oportuno estudiar el efecto del inhibidor de clatrina chlorpromazina sobre la fracción de endocitosis que se recicla a vesículas liberables, y sobre la fracción no liberable, por medio de la técnica de *imaging* combinada con el fluoróforo FM1-43. En estos experimentos la chlorpromazina disminuyó significativamente la endocitosis medida con FM1-43, y llamativamente esta reducción resultó similar en magnitud a la reducción de la fracción liberable Exo2. Como contrapartida, la fracción no liberable no resultó modificada por la droga (figura 3.4.1 B). Esto puede interpretarse de la siguiente manera: (i) la mayoría de la fracción de membrana que es endocitada en forma clatrina dependiente se recicla a vesículas capaces de ser liberadas nuevamente en un tiempo menor o igual a 30 min; (ii) por otro lado, la fracción insensible al inhibidor de clatrina está asociada a un mecanismo de endocitosis que genera una fracción de membrana no liberable en los tiempos del experimento, probablemente *bulk* endocitosis. Existen trabajos previos que sugieren que fuertes estímulos que inducen endocitosis en exceso se asocian a procesos de endocitosis de tipo *bulk* (Thomas P y col., 1994; Pérez Bay AE y col., 2012; Henkel AW y Almers W, 1996). Esto probablemente se debe a que los mecanismos convencionales de endocitosis tienen una capacidad limitada de recuperar la membrana adicionada, y que por lo tanto frente a una exocitosis masiva sea necesaria la activación de una endocitosis de tipo *bulk* para evitar que peligre la homeostasis celular (Holt M y col., 2003; Pérez Bay AE y col., 2007; Pérez Bay AE y col., 2012; Smith CB y Betz WJ, 1996). La endocitosis de tipo *bulk* podría cumplir esta función, debido a que tiene la capacidad para recuperar grandes cantidades de membrana (Andersson F y col., 2008; Clayton EL y col., 2008; Paillart C y col., 2003). El costo de activar este mecanismo sería, aparentemente, la imposibilidad de regenerar rápidamente la fracción de vesículas liberables que reemplace a las vesículas exocitadas. De hecho en nuestro laboratorio, hallamos que al menos una fracción de los endosomas internalizados por endocitosis de tipo *bulk* colocalizaban con la fracción lisosomal (Pérez Bay AE y col., 2012), lo cual implicaría que las vesículas correspondientes a dicha fracción deberían regenerarse completamente *de novo* a partir del Golgi.

Fisiológicamente, la secreción desde las células cromafines es inducida por potenciales de acción, cuya frecuencia es dependiente de la situación fisiológica del animal. En una situación de estrés, la frecuencia de disparo de potenciales de acción asciende por arriba de 10 Hz, mientras que en reposo es menor a 0,5 Hz (Brandt BL y col., 1976; Fulop T y col., 2005; Holman ME y col., 1994). Durante el estrés, la célula cromafín secreta catecolaminas y otros compuestos activos por medio de un mecanismo de fusión total (Fulop T y col., 2005), con lo cual recuperaría la membrana exocitada a través de una endocitosis dependiente de clatrina (Chan y col, 2001, Chan y col, 2003), aunque no se pueda descartar la participación de la *bulk* endocitosis (Pérez Bay AE y col., 2008). Contrariamente, a frecuencias basales, se secretan contenidos vesiculares a muy baja tasa, aparentemente por un mecanismo de fusión parcial, tipo *kiss & run* (Fulop T y col., 2005), lo cual implicaría una rápida recuperación de las vesículas intactas. Este mecanismo supondría una no dependencia con clatrina, pero sí con dinamina. En nuestro preparado, observamos que frente a una estimulación que simula un potencial de acción se produce una exocitosis de 11 ± 1 fF y una posterior endocitosis compensatoria que evoluciona con una constante temporal de 0,64 ± 0,02 seg (figura 3.4.5 A y D). Esta cinética es similar a la cinética temporal del componente ultra-rápido de HCG, lo cual es muy llamativo (figura 3.1.5 C), y abriría la posibilidad de que se tratase de procesos que responden al mismo mecanismo. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la endocitosis que se produce a consecuencia de un PAs, si bien se afectaba con el inhibidor de dinamina dynasore, no se alteró al inhibir la endocitosis clatrina dependiente. Este último resultado es coherente con lo hallado previamente por Chan y Smith (Chan SA y Smith C, 2003). Por lo tanto, concluimos que ambos procesos responden a mecanismos diferentes, siendo el primero dependiente de dinamina pero independiente de clatrina, y el segundo dependiente de dinamina y clatrina.

A continuación, se propone un modelo tentativo que incorpora los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis: Existirían en la célula cromafín diferentes modos de endocitosis que responden a un rango amplio de estímulos. Durante una estimulación muy tenue, como ocurre durante el estado de reposo, con frecuencias de potenciales de acción menores a 0,5 Hz, la tasa de fusión vesicular es muy baja, y la recuperación de membrana progresaría a través de un mecanismo muy rápido que es independiente de clatrina, pero dependiente de dinamina. Un candidato razonable para este mecanismo, considerando los trabajos del grupo de Corey Smith (Fulop T y col., 2005), sería el *kiss & run*. Resultados

de nuestro laboratorio indican claramente que la recuperación del *pool* de vesículas que se libera luego de este tipo de estímulos se completa en aproximadamente 2 seg (Moya Díaz J y col., 2016). Frente a estímulos más fuertes (grupo LCG), cuando la actividad exocitótica de las células es mayor, la forma dominante de recuperación de la membrana sería la endocitosis clatrina dependiente. Este mecanismo se activaría frente a un aumento del Ca^{2+} citosólico sostenido, generado en primer lugar por la apertura de los CCDV de tipo L, y seguido de la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático. A partir de dicho mecanismo endocitótico, las vesículas liberables se recuperarían en un tiempo moderado, menor a 30 min. Finalmente, cuando la célula se enfrenta a una mayor entrada de Ca^{2+} (HCG), esta debe incrementar su capacidad endocitótica a fin de recuperar mayores cantidades de membrana. La mayor entrada de Ca^{2+} que se genera en esta condición, por un lado aceleraría al mecanismo de endocitosis clatrina dependiente, y por el otro activaría a la endocitosis de tipo *bulk*. Esta última permite una recuperación eficiente de membrana, aunque comprometería la recuperación rápida de las vesículas.

5 – REFERENCIAS

Aguilar JS, Ballesta JJ, Reig JA, Palmero M, Viniegra S, Criado M. Muscarinic receptor subtypes in bovine adrenal medulla. *Neurochem Res* 17(12):1235-9, 1992.

Albillos A, Dernick G, Horstmann H, Almers W, Álvarez de Toledo G, Lindau M. The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature* 389(6650):509-12, 1997.

Albillos A, Garcia AG, and Gandia L. omega-Agatoxin-IVA-sensitive calcium channels in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett* 336: 259–262, 1993.

Alés E, Tabares L, Poyato JM, Valero V, Lindau M, Álvarez de Toledo G. High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nat Cell Biol* 1(1):40–44, 1999.

Aloe L, Levi-Montalcini R. Nerve growth factor induced transformation of immature chromaffin cells in vivo into sympathetic neurons: effect of anti-sense to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(3):1246–1250, 1979.

Alonso MT, Barrero MJ, Michelena P, Carnicero E, Cuchillo I, Garcia AG, Garcia Sancho J, Montero M, Álvarez J. Ca^{2+} induced Ca^{2+} release in chromaffin cells seen from inside the ER with targeted aequorin. *J Cell Biol* 144(2):241–254, 1999.

Alonso MT, Villalobos C, Chamero P, Álvarez J, Garcia-Sancho J. Calcium microdomains in mitochondria and nucleus. *Cell Calcium* 40:513–525, 2006.

Álvarez J, Montero M, Garcia-Sancho J. Subcellular Ca^{2+} dynamics. *News Physiol Sci* 14:161–168, 1999.

Álvarez YD. Acople del pool de vesículas inmediatamente liberable (IRP) con los canales de Ca2+ tipo P/Q y límites funcionales de este pool en células cromafines. Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas. *UBA*, 2011.

Álvarez YD, Ibañez L I, Uchitel, OD, Marengo FD.P/Q Ca^{2+} channels are functionally coupled to exocytosis of the immediately releasable pool in mouse chromaffin cells. *Cell Calcium* 43(2):155–164, 2008.

Álvarez YD, Marengo FD. The immediately releasable pool: Highly coupled secretion in chromaffin cells and others neuroendocrine cells. *Journal of Neurochemistry* 116:155–163, 2011.

Álvarez YD, Belingheri AV, Pérez Bay AE, Javis SE, Tedford W H, Zamponi G, Fernando D Marengo. 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(1): e54846, 2013.

Álvarez de Toledo G, Fernández JM. Compound versus multigranular exocytosis in peritoneal mast cells. *J Gen Physiol* 95(3):397–409, 1990.

Anggono V, Smillie KJ, Graham ME, Valova VA, Cousin MA, Robinson PJ. Syndapin I is the phosphorylation-regulated dynamin I partner in synaptic vesicle endocytosis. *Nat Neurosci* 9: 752–760, 2006.

Annaert WG, Llona I, Backer AC, Jacob WA, De Potter WP. Catecholamines are present in a synaptic-like microvesicle-enriched fraction from bovine adrenal medulla. *J. Neurochem* 60(5):1746-54, 1993.

Anderson DJ, Axel R. A bipotential neuroendocrine precursor whose choice cf cell fate is determined by NGF and glucocorticoids. *Cell* 47(6):1079-1090, 1986.

Andersson F, Jakobsson J, Low P, Shupliakov O, Brodin L. Perturbation of syndapin/PACSIN impairs synaptic vesicle recycling evoked by intense stimulation. *J Neurosci* 28(15):3925–33, 2008.

Artalejo AR, Garcia AG, Neher E. Small-conductance Ca^{2+}-activated K^{+} channels in bovine chromaffin cells. *Pflügers Arch* 423:97–103, 1993.

Artalejo CR, Henley JR, McNiven MA, Palfrey HC. Rapid endocitosis coupled to exocytosis in adrenal chromaffin cells involves Ca^{2+}, GTP, and dynamin but not clathrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(18):8328–32, 1995.

Artalejo CR, Elhamdani A, Palfrey HC. Calmodulin is a divalent cation receptor for rapid endocitosis, but not exocitosis, in adrenal chromaffin cells.*Neuron* 16(1):195-205, 1996.

Artalejo CR, Elhamdani A, Palfrey HC. Sustained stimulation shifts the mechanism of endocytosis from dynamin-1-dependent rapid endocytosis to clathrin and dynamin-2 mediated slow endocytosis in chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(9):6358-63, 2002.

Ashery U, Varoqueaux F, Voets T, Betz A, Thakur P, Koch H, Neher E, Brose N, Rettig J. Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *EMBO J* 19(14):3586-96, 2000.

Augustine GJ, Neher E. Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 450:247-71, 1992.

Aunis D. Exocytosis in chromaffin cells of the adrenak medulla. *Int Rev Cytol* 181:213-320, 1998.

Babcock DF, Herrington J, Goodwin PC, Park YB, Hille B. Mitochondrial participation in the intracellular Ca^{2+} network. *J Cell Biol* 136(4):833–44, 1997.

Banks P, Helle K. The release of protein from stimulated adrenal medulla. *Biochem J* 97(3):40C-41C, 1965.

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

Barg S, Eliasson L, Renstrom E, Rorsman P. A Subset of 50 secretory granules in close contact with L-Type Ca^{2+} channels cccounts for first-phase insulin secretion in mouse cells. *Diabetes* 51 Suppl 1:S74-82, 2002.

BargS, Machado JD. Compensatory endocytosis in chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* 192(2):195-201, 2008.

Becherer U, Rettig J. Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell Tissue Res* 326(2):393–407, 2006.

Belingheri AV. Caracterización de la endocitosis rápida compensatoria y en exceso en células cromafines de ratón. Tesina presentada para optar por el Título de Lic. en Ciencias Biológicas. *Universidad de Buenos Aires*, 2009.

Benedeczky I, Somogyi P. Cytochemical localization of exogenous peroxidase in adrenal medullary cells of hamster. *Acta Biol Acad Sci Hung* 29(9):155–63, 1978.

Bennett MK, Calakos N, Scheller RH. Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* 257(5067):255-9, 1992.

Berberian K, Torres AJ, Fang Q, Kisler K, Lindau M. F-actin and myosin II accelerate catecholamine release from chromaffin granules.*J Neurosci* 29(3):863-70, 2009.

Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 79(4):1127–55, 1999.

Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361(6410):315-25, 1993.

Berridge MJ. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol* 499(Pt2): 291–306, 1997.

Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1):11–21, 2000.

Berridge MJ. The versatility and complexity of calcium signalling. *Novartis Found Symp* 239:52-64; discussion 64-7, 150-9, 2001.

Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11–21, 2000.

Betz WJ, BewickGS. Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science* 255(5041):200-3, 1992.

Betz WJ, Mao F, Bewick GS. Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. *J Neurosci* 12(2):363-75, 1992.

Betz WJ, Mao F, Smith CB. Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr Opin Neurobio*l 6(3)365-71, 1996.

Biales B, Dichter M, Tischler A. Electrical excitability of cultured adrenal chromaffin cells. *J Physiol* 262(3):743–53, 1976.

Bilmen JG, Wootton LL, Godfrey RE, Smart OS, Michelangeli F. Inhibition of the tipe 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by 2-aminoethoxydiphenylborate. *Eur J Biochem.*269(15):3678-87, 2002.

Bilodeau ML, Boulineau T, Hullinger RL, Andrisani OM. Cyclic AMP signaling functions as a bimodal switch in sympathoadrenal cell development incultured primary neural crest cells. *Mol Cell Biol* 20(9):3004–14, 2000.

Bilodeau ML, Ji M, Paris, M, Andrisani OM. Adenosine signaling promotes neuronal, catecholaminergic differentiation of primary neural crest cells and CNS-derived CAD cells. *Mol Cell Neurosci* 29(3):394–404, 2005.

Bittner MA, Holz RW. Kinetic análisis of seretion from permeabilizad adrenal chromaffin cells reveals distinct components. *J Biol Chem* 267(23):16219-25, 1992.

Blaschko H, Welch AD. Localization of adrenaline in cytoplasmic particles of the bovine adrenal medulla. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmakol* 219(1-2):17-22, 1953.

Bonifacino JS, Traub LM. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 72:395–447, 2003.

Borges R, Domínguez N, Estévez-Herrera J, Pereda D, Machado JD. Vesicular Ca^{2+} mediates granule motion and exocytosis. *Cell Calcium* 51:338–341, 2012.

Borisovska M, Zhao Y, Tsytsyura Y, Glyvuk N, Takamori S, Matti U, Rettig J, Sudhof T, Bruns D. v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion. *EMBO J* 24(12):2114–26, 2005.

Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA. Morphological and functional studies of the paracrine interaction between cortex and medulla in the adrenal gland. *Microsc Res Tech* 36(6):520–33, 1997.

Bournaud R, Hidalgo J, Yu H, Jaimovich E, and Shimahara T. Low threshold T-type calcium current in rat embryonic chromaffin cells. *J Physiol* 537: 35–44, 2001.

Brandt BL, Hagiwara S, Kidokoro Y, Miyazaki S. Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *J Physiol* 263(3):417-39, 1976.

Bredderman PJ, Wasserman RH. Chemical composition, affinity for calcium, and some related properties of the vitamin D dependent calcium-binding protein. *Biochemistry* 13(8):1687-94, 1974.

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

Burgoyne, RD. Control of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Biochim biophys Acta* 1071:174-202, 1991.

Burgoyne, RD. Fast exocytosis and endocytosis triggered by depolarisation in single adrenal chromaffin cells before rapid Ca^{2+} current run-down. *Pflugers Arch* 430(2):213–9, 1995.

Burgoyne RD, Morgan A. Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 83(2):581-632, 2003

Buffa R, Mare P, Salvadore M, Solcia E, Furness JB, Lawson DE. Calbindin 28 kDa in endocrine cells of known or putative calcium-regulating function. Thyro-parathyroid C cells, gastric ECL cells, intestinal secretin and enteroglucagon cells, pancreatic glucagon, insulin and PP cells, adrenal medullary NA cells and some pituitary (TSH?) cells. *Histochemistry* 91(2):107-13, 1989.

Camacho M, Machado JD, Álvarez J, Borges R. Intravesicular calcium reléase mediates the motion and exocytosis of secretory organelles: a study with adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem* 283:22383-22389, 2008.

Cannon SD, Wilson SP, Walsh KB.A G protein-activated K+ current in bovine adrenal chromaffin cells: possible regulatory role in exocytosis. *Mol Pharmacol* 45:109–116, 1994.

Carabelli V, Marcantoni A, Comunanza V, Carbone E. Fast exocytosis mediated by T- and L-type channels in chromaffin cells: distinct voltage-dependence but similar Ca^{2+} dependence. *Eur Biophys J* 36(7):753–62, 2007.

Cárdenas AM, Marengo FD. Rapid endocytosis and vesicle recycling in neuroendocrine cells. *Cell Mol Neurobiol* 30(8):1365-1370, 2010.

Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-55, 2000.

Catterall WA. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(8):a003947, 2011.

Cecarelli B, Hurlbut WP, Mauro A. Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 57(2):499-524, 1973.

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

Chan SA, Smith C. Physiological stimuli evoke two forms of endocytosis in bovine chromaffin cells. *Journal of Physiology* 537.3, 871–885, 2001.

Chan SA, Smith C. Low frequency stimulation of mouse adrenal slices reveals a clathin independent, protein kinase C mediated endocytic mechanism. *J Physiol* 553, 707-717, 2003.

Chan SA, Polo-Parada L, Smith C. Action potential stimulation reveals an increased role for P/Q-calcium channel-dependent exocytosis in mouse adrenal tissue slices. *Arch Biochem Biophys* 435(1):65-73, 2005.

Chan SA, Chow R, Smith C. Calcium dependence of action potential-induced endocitosis in chromaffin cells. *Pflugers Arch* 445 (5):540-6, 2003.

Cheek TR, Barry VA. Stimulus secretion coupling in excitable cells: a central role for calcium. *J Exp Biol* 184:183-96, 1993.

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

Chernomordik LV, Melikyan GB, Chizmadzhev YA. Biomembrane fusion: a new concept derived from model studies using two interacting planar lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta*5:906(3):309-52, 1987.

Chow RH, von Rüden L, Neher E. Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenalchromaffin cells. *Nature* 356(6364):60-3, 1992.

Clayton EL, Evans GJ, Cousin MA. Bulk synaptic vesicle endocytosis is rapidly triggered during strong stimulation. *J Neurosci* 28, 6627–6632, 2008.

Clayton EL, Anggono V, Smillie KJ, Chau N, Robinson PJ, Cousin MA. The phospho-dependent dynamin- syndapin interaction triggers activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *J Neurosci* 29: 7706–7717, 2009.

Clayton EL, Cousin MA. The molecular physiology of activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *J Neurochem* 111: 901–914, 2009.

Cousin MA. Activity-dependent bulk synaptic vesicle endocytosis - a fast, high capacity membrane retrieval mechanism. *Mol Neurobiol* 39, 185–189, 2009.

Cousin MA, Robinson PJ. The dephosphins: dephosphorylation by calcineurin triggers synaptic vesicle endocytosis. *Trends Neurosci* 24: 659–665, 2001.

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

Croft W, Reusch K, Tilunaite A, Russell NA, Thul R, Bellamy TC. Probabilistic encoding of stimulus strength in astrocyte global calcium signals. *Glia* 64(4):537-52, 2016.

Csordas G, Hajnoczky G. Plasticity of mitochondrial calcium signaling. *J Biol Chem* 278:42273–42282, 2003.

Danino D, Moon KH, Hinshaw JE. Rapid constriction of lipid bilayers by the mechanochemical enzyme dynamin. *J Struct Biol* 147(3):259-67, 2004.

De Diego AMG, Gandıa L, Garcıa AG. A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta Physiol* 192:287–301, 2008.

de Lange RP, de Roos AD, Borst JG. Two modes of vesicle recycling in the rat calyx of Held. *J Neurosci* 23:10164–10173, 2003.

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

Dean GE, Nelson PJ, Rudnick G. Characterization of native and reconstituted hydrogen ion pumping adenosinetriphosphatase of chromaffin granules. *Biochemistry* 26:25(17):4918-4925, 1986.

Dernick G, Ávarez de Toledo G, y Lindau M. Exocitosis of single chromaffin granules in cell-free inside-out membrane patches. *Nat Cell Biol* 5:358-362, 2003.

Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Varela H, Valladares F, Álvarez -Argüelles H, Borges R. Histogenesis and morphofunctional characteristics of chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* 192:145-163, 2008.

Donald DE, Shepherd JT. Autonomic regulation of the peripheral circulation. *Annu Rev Physiol* 42:429-439, 1980.

Doreian BW, Fulop TG, Smith CB. Myosin II activation and actin reorganization regulate the mode of quantal exocytosis in mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 28, 4470–4478, 2008.

Duchen MR. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* 529:57-68, 2000.

Dutt S, Matasci M, Sommer L, Zimmermann DR. Guidance of neural crest cell migration: the inhibitory function of the chondroitin sulfate proteoglycan, versican. *Scientific World Journal* 6:1114–1117, 2006.

Endo M, Tanaka M, Ogawa Y. Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature* 3:228(5266):34-36, 1970.

Engisch KL y Nowycky MC. Compensatory and excess retrieval: two types of endocitosis following single step depolarizations in bovine adrenal chromaffin cells. *J Physiol* 1:506:591-608, 1998.

Elhamdani A, Azizi F y Artalejo CR. 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. *J Neurosci* 26: 3030–3036, 2006.

Elhamdani A, Palfrey HC, Artalejo CR. Quantal size is dependent on stimulation frequency and calcium entry in calf chromaffin cells. *Neuron* 31:819–830, 2001.

Erickson JD, Schafer MK, Bonner TI, Eiden LE, Weihe E. Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 14:93(10):5166-5171, 1996.

Evans GJ, Cousin MA. Activity-dependent control of slow synaptic vesicle endocytosis by cyclin-dependent kinase 5. *J Neurosci* 27: 401–411, 2007.

Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 245(1):C1-14, 1983.

Farsad K, De Camilli P. Mechanisms of membrane deformation. *Curr Opin Cell Biol* 15: 372–381, 2003.

Fernández-Chacón R, Álvarez de Toledo G. Cytosolic calcium facilitates release of secretory products after exocytotic vesicle fusion. *FEBS Lett* 363(3):221-5, 1995.

Fernando JC, Abdallah EA, Evinger M, Forray C, el-Fakahany EE. The presence of an M4 subtype muscarinic receptor in the bovine adrenal medulla revealed by mRNA and receptor binding analyses. *Eur J Pharmacol* 207:297-303, 1991.

Ferguson SM, De Camilli P. Dynamin, a membrane remodelling GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 75–88, 2012.

Ferguson SM, Brasnjo G, Hayashi M, Wölfel M, Collesi C, Giovedi S, Raimondi A, Gong LW, Ariel P, Paradise S, O'toole E, Flavell R, Cremona O, Miesenböck G, Ryan TA, De Camilli P. A selective activity-dependent requirement for dynamin 1 in synaptic vesicle endocytosis. *Science* 316: 570–574, 2007.

Fesce R, Grohovaz F, Valtorta F, Meldolesi J. Neurotransmitter release: fusion or 'kiss-and-run'?*Trends Cell Biol* 4(1): 1-4, 1994.

Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nature* 7:690-702, 2007.

Forsen S, Linse S, Thulin E, LindegArd B, Martin SR, Bayley PM, Brodin P, Grundstrom T. Kinetics of calcium binding calbindin mutants. *Eur J Biochem* 177:47-52, 1988.

Foskett JK, White C, Cheung K-H, Mak D-O D. Inositol Trisphosphate Receptor Ca^{2+} Release Channels. *Physiological Reviews* 87(2):593-658, 2007.

Fulop T, Radabaugh S, Smith C. Activity-dependent differential transmitter release in mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 25:7324–7332, 2005.

Fulop T, Smith C. Physiological stimulation regulates the exocytic mode through calcium activation of protein kinase C in mouse chromaffin cells. *Biochem J* 399:111–119, 2006.

Gad H, Low P, Zotova E, Brodin L, Shupliakov O. Dissociation between Ca^{2+}-triggered synaptic vesicle exocytosis and clathrin-mediated endocytosis at a central synapse. *Neuron* 21:607–616, 1998.

Galli T, Haucke V. Cycling of Synaptic Vesicles: How Far? How Fast! Sci STKE (264) re19, 2004.

Gandia L, Albillos A, Garcia AG. Bovine chromaffin cells possess FTX-sensitive calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 671–676, 1993.

Garcia, AG, Garcia-De-Diego AM, Gandia L, Borges R, Garcia-Sancho J. Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev* 86:1093–1131, 2006.

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

Giancippoli A, Novara M, de Luca A, Baldelli P, Marcantoni A, Carbone E, Carabelli V. Low-threshold exocytosis induced by cAMP-recruited CaV3.2 (alpha1H) channels in rat chromaffin cells. *Biophys J* 90(5):1830-41, 2006.

Gillis K, Mossner D, Neher E. Protein Kinase C enhance exocytosis from chromaffin cells by increasing the size of the readily releasable pool of secretory granules. *Neurosci* 16:1209-1220, 1996.

González-García C, Ceña V, Keiser HR, Rojas E. Catecholamine secretion induced by tetraethylammonium from cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta* 1:99-105, 1993.

González-Jamett AM, Báez-Matus X, Hevia MA, Guerra MJ, Olivares MJ, Martínez AD, Neely A, Cárdenas AM. The association of dynamin with synaptophysin regulates quantal size and duration of exocytotic events in chromaffin cells. J Neurosci 30(32):10683-91, 2010.

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. 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, 2013.

González-Jamett AM, Haro-Acuña V, Momboisse F, Caviedes P, Bevilacqua JA, Cárdenas AM. Dynamin-2 in nervous system disorders. *J Neurochem* 128(2):210-23, 2014.

Gormal RS, Nguyen TH, Martin XS, Papadopulos A, Meunier FA. An Acto-Myosin II Constricting Ring Initiates the Fission of Activity-Dependent Bulk Endosomes in Neurosecretory Cells. *The Journal of Neuroscience* 35(4):1380–1389, 2015.

Gulyás-Kovács A, de Wit H, Milosevic I, Kochubey O, Toonen R, Klingauf J, Verhage M, Sørensen JB. Munc18-1: sequential interactions with the fusion machinery stimulate vesicle docking and priming. *J Neurosci* 27(32):8676-86, 2007.

Gunter TE, Pfeiffer DR. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol Cell Physiol* 258:755–786, 1990.

Gunter TE, Gunter KK, Sheu SS, Gavin CE. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am J Physiol Cell Physiol* 267:313–339, 1994.

Hafez I, Stolpe A, Lindau M. Compound exocytosis and cumulative fusion in eosinophils. *J Biol Chem* 278:44921–28 37, 2003.

Hammarlund M, Palfreyman MT, Watanabe S, Olsen S, Jorgensen EM. Open syntaxin docks synaptic vesicles. *PLoS Biol* 2007;5:e1998.

Harata NC, Aravanis AM, Tsien RW. Kiss-and-run and full-collapse fusion as modes of exo-endocytosis in neurosecretion. *J Neurochem* 97: 1546–1570, 2006.

Hayashi M, Raimondi A, O'Toole E, Paradise S, Collesi C, Cremona O, Ferguson SM, De Camilli P. Cell- and stimulus- dependent heterogeneity of synaptic vesicle endocytic recycling mechanisms revealed by studies of dynamin 1- null neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 2175–2180, 2008.

He Z, Fan J, Kang L, Lu J, Xue Y, Xu P, Xu T, Chen L. Ca^{2+} triggers a novel clathrin-independent but actin-dependent fast endocytosis in pancreatic beta cells. *Traffic* 9:910–923, 2008.

He L, Wu LG. The debate on the kiss-and-run fusion at synapses. *Trends Neurosci* 30: 447–455, 2007.

He L, Xue L, Xu J, McNeil BD, Bai L, Melicoff E, Adachi R, Wu LG. Compound vesicle fusion increases quantal size and potentiates synaptic transmission. *Nature* 459:93–97, 2009.

Heinemann C, von Ruden L, Chow RH, Neher E. A two-step model of secretion control in neuroendocrine cells. *Pflugers Arch* 424:105-112, 1993.

Heinemann C, Chow R, Neher E. Kinetics of secretory response in bovine chromaffin cells following flash photolysis of caged Ca^{2+}. *Biophysical Journal* 67:2546-2557, 1994.

Henkel AW, Meiri H, Horstmann H, Lindau M, Almers W. Rhythmic opening and closing of vesicles during constitutive exo- and endocytosis in chromaffin cells.*EMBO J* 19:84-93, 2000.

Henkel AW, Horstmann H, Henkel MK. Direct observation of membrane retrieval in chromaffin cells by capacitance measurements. *FEBS Lett* 505: 414–418, 2001.

Henkel AW, Almers W. Fast steps in exocytosis and endocytosis studied by capacitance measurements in endocrine cells. *Curr Opin Neurobiol* 6:350–357, 1996.

Hernández-Guijo JM, de Pascual R, Garcia AG, Gandia L. Separation of calcium channel current components in mouse chromaffin cells superfused with low- and high-barium solutions. *PflügersArch* 436: 75–82, 1998.

Herrington J, Park YB, Babcock DF, Hille B. Dominant role of mitochondria in clearance of large Ca^{2+} loads from rat adrenal. *Neuron* 16:219-28, 1996.

Heuser JE, Reese TS. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 57:315–344, 1973.

Hille B. Axons, Ions, and Dons.*Science* 2: 258(5079):144-145, 1992.

Hille B. Ion channels of Excitable Membranes 3rd edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA, 2001.

Hirano T. Neural regulation of adrenal chromaffin cell function in the mouse-stress effect on the distribution of [3H]dopamine in denervated adrenal medulla. *Brain Res* 22:238:45-54, 1982.

Hikita T, Bader MF, Trifaró JM. Adrenal chromaffin cell calmodulin: its subcellular distribution and binding to chromaffin granule membrane proteins. *J Neurochem* 43(4):1087-97, 1984.

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

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

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

Holman ME, Coleman HA, Tonta MA, Parkington HC. Synaptic transmission from splanchnic nerves to the adrenal medulla of guinea-pigs. *J Physiol*478 (Pt 1), 115-24, 1994.

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

Holz RW, Bittner MA, Peppers SC, Senter RA, Eberhard DA. MgATP-independent and MgATP-dependent exocytosis. Evidence that MgATP primes adrenal chromaffin cells to undergo exocytosis. *J Biol Chem*264:5412-5419, 1989.

Hoopmann P, Punge A, Barysch SV, Westphal V, Bückers J, Opazo F, Bethani I, Lauterbach MA, Hell SW, Rizzoli SO. Endosomal sorting of readily releasable synaptic vesicles.*Proc Natl Acad Sci USA* 107(44):19055–19060, 2010.

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

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

Hsu SF, Jackson MB. Rapid exocytosis and endocytosis in nerve terminals of the rat posterior pituitary. *J Physiol* 494(Pt 2): 539–553, 1996.

Huang LYM y Neher E. Ca^{2+}-dependent exocytosis in the somata of dorsal root ganglion neurons. *Neuron* 17:135-145, 1996.

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

Huh YH, Yoo JA, Bah SJ, Yoo SH. Distribution profile of inositol 1,4,5–trisphosphate receptor isoforms in adrenal chromaffin cell. *FEBS Lett* 579:2597-2603, 2005.

Ichikawa A. Fine structural changes in response to hormonal stimulation of the perfused canine pancreas. *J Cell Biol* 24:369–85, 1965.

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

Iino M. Biphasic Ca^{2+} dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+}release in smooth muscle cells of the guinea pig taenia caeci. *J Gen Physiol* 95:1103–1122, 1990.

Inoue M, Imanaga I. G protein-mediated inhibition of inwardly rectifying K+ channels in guinea pig chromaffin cells. Am J Physiol 265: 946-956, 1993.

Inoue M, Sakamoto Y, Fujishiro N, Imanaga I, Ozaki S, Prestwich GD, Warashina A. Homogeneous Ca^{2+} stores in rat adrenal chromaffin cells. *Cell Calcium* 33(1):19-26.

Itoh T, De Camilli P. BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim Biophys Acta* 1761: 897–912, 2006.

Itoh T, Erdmann KS, Roux A, Habermann B, Werner H, De Camilli P. Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by bar and F-bar proteins. *Dev Cell* 9: 791–804, 2005.

Jahn R, Lang T, Sudhof TC. Membrane Fusion. *Cell* 112,519-533, 2003.

Jena BP. 'Porosome' discovered nearly 20 years ago provides molecular insights into the kiss-and-run mechanism of cell secretion. *J Cell Mol Med* 19(7):1427-40, 2015.

Kaplan y Ellis Davies. Photolabile chelators for rapid photolytic release of divalent cations. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6571-6575, 1988.

Kasai H, Takagi H, Ninomiya Y, Kishimoto T, Ito K, Yoshida A, Yoshioka T, Miyashita Y. Two components of exocytosis and endocytosis in phaeochromocytoma cells studied using caged Ca^{2+} compounds. *J Physiol* 494:53-65, 1996.

Kasai H, Kishimoto T, Nemoto T, Hatakeyama H, Liu TT, Takahashi N. Two-photon excitation imaging of exocytosis and endocytosis and determination of their spatial organization. *Adv Drug Deliv Rev*58:850-77, 2006.

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

Kessels MM, Qualmann B. The syndapin protein family: linking membrane trafficking with the cytoskeleton. *J Cell Sci* 117:3077–86, 2004.

Kibble AV, Barnard RJ, Burgoyne RD. Patch-clamp capacitance analysis of the effects of alpha-SNAP on exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J Cell Sci* 109:2417–2422, 1996.

Kidokoro Y, Ritchie AK. Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. *J Physiol* 307:199-216, 1980.

Kits KS, de Vlieger TA, Kooi BW, Mansvelder HD. Diffusion barriers limit the effect of mobile calcium buffer on exocytosisof large dense cored vesicles. *Biophys J* 76:1693–1705, 1999.

Kittelmann M, Liewald JF, Hegermann J, Schultheis C, Brauner M, Steuer Costa W, Wabnig S, Eimer S, Gottschalk A. In vivo synaptic recovery following optogenetic hyperstimulation. *Proc Natl Acadf Sci USA* 110:E3007–E3016, 2013.

Koenig JH, Ikeda K. Synaptic vesicles have two distinct recycling pathways. *J Cell Biol* 135:797–808, 1996.

Korteweg N, Maia AS, Thompson B, Roubos EW, Burbach JP, Verhage M. The role of Munc18-1 in docking and exocytosis of peptide hormone vesicles in the anterior pituitary. *Biol Cell* 97(6):445-55, 2005.

Koval LM, Yavorskaya EN, Lukyanetz EA. Electron microscopic evidence for multiple types of secretory vesicles in bovine chromaffin cells. *Gen Comp Endocrinol* 121:261–277, 2001.

Kozlov MM, Markin VS. Possible mechanism of membrane fusion. *Biofizika Russian* 28:242-7, 1983.

Lagnado L, Gomis A y Job C. Continuous vesicle cycling in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *Neuron* 17: 957-967; 1996.

Lancaster B, Adams PR. Calcium-dependent current generating the afterhyperpolarization of hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 55(6):1268-82, 1986**.**

Lancaster B, Nicoll RA, Perkel DJ. Calcium Activates Two Types of Potassium Channels in Rat Hippocampal Neurons in Culture. *The Journal of Neuroscience* 1(1):23-30, 1991.

Lang DG, Ritchie AK. Large and small conductance calcium-activated potassium channels in the GH3 anterior pituitary cell line.*Pflügers Arch* 410:614–622, 1987.

Lang DG, Ritchie AK. Tetraethylammonium blockade of apamin-sensitive and insensitive Ca^{2+}-activated K' channels in a pituitary cell line.*J Physiol* 425:117–132, 1990.

Langer GA, Peskoff A. Calcium concentration and movement in the diadic cleft space of the cardiac ventricular cell. *Biophys J* 70(3): 1169–1182, 1996.

Lara B, Zapater P, Montiel C, de la Fuente MT, Martínez-Sierra R, Ballesta JJ, Gandía L, García AG. Density of apamin-sensitive Ca^{2+}-dependent K^+ channels in bovine chromaffin cells: relevance to secretion. *Biochem Pharmacol*49:1459-1468, 1995.

Laude AJ, Simpson AWM. Compartmentalized signalling: Ca^{2+} compartments, microdomains and the many facets of Ca^{2+} signalling. *FEBS Journal* 276:1800–1816, 2009.

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

Lee AK, Tse A. Endocytosis in identified rat corticotrophs. *J Physiol*533:389-405, 2001.

Lee SY, Voronov S, Letinic K, Nairn AC, Di Paolo G, De Camilli P. Regulation of the interaction between pipki gamma and talin by proLine directed protein kinases. *J cell Biol* 168:789-79, 2005.

Lemmens R, Larsson O, Berggren PO, Islam MS. Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum amplifies the Ca^{2+} signal mediated by activation of voltage-gated L-type Ca^{2+} channels in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*276:9971-9977, 2001.

Lewis RV, Stern AS, Rossier J, Stein S, Udenfriend S. Putative enkephalin precursors in bovine adrenal medulla. *Biochem Biophys Res Commun* 89:822-829, 1979.

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

Linse S, Johansson C, Brodin P, Grundström T, Drakenberg T, Forsén S. Electrostatic contributions to the binding of Ca^{2+} in calbindin D9k. *Biochemistry* 8:30(1):154-62, 1991.

Livett BG. Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol Rev* 64:1103–1161, 1984.

Livett BG. Chromaffin cells. Roles for vesicles proteins and Ca^{2+} in hormone secretion and exocytosis. *Trends Pharmacol Sci* 14:345:348, 1993.

Liu L, Liao H, Castle A, Zhang J, Casanova J, Szabo G, Castle D. SCAMP2 interacts with Arf6 and phospholipase D1 and links their function to exocytotic fusion pore formation in PC12 cells. *Mol Biol Cell*16:4463-4472, 2005.

Llinas R, Sugimori M, Silver RB. Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science*, 1992.

Lodish H, BerK A, Zipursky SL. Molecular Cell Biology. 4th edition, section 17.9 New York. Freeman WH, 2000.

MacDonald PE, Obermüller S, Vikman J, Galvanovskis J, Rorsman P, Eliasson L. Regulated exocytosis and kiss-and-run of synaptic-like microvesicles in INS-1 and primary rat beta-cells. *Diabetes*54:736-743, 2005.

Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Developmental cell* 10: 839–850, 2006.

Maeda N, Kawasaki T, Nakade S, Yokota N, Taguchi T, Kasai M, Mikoshiba K. Structural and functional characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel from mouse cerebellum. *J Biol Chem* 266: 1109–1116, 1991.

Mak DOD, McBride S, Foskett JK. Inositol 1,4,5-trisphosphate activation of inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} channel by ligand tuning of Ca^{2+} inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 15821–15825, 1998.

Marengo FD, Monck JR. Development and dissipation of Ca^{2+} gradients in adrenal chromaffin cells. *Biophys J* 79:1800-1820, 2000.

Marengo FD, Monck JR. Spatial Distribution of Ca^{2+} Signals during Repetitive Depolarizing Stimuli in Adrenal Chromaffin Cells. *Biophysical Journal* 85 3397–3417 3397, 2003.

Marchant JS, Taylor CW. Cooperative activation of IP_3 receptors by sequential binding of IP_3 and Ca^{2+}safeguards against spontaneous activity.*Curr Biol* 7:510–518, 1997.

Marty A, Neher E. Potassium channels in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *J Physiol* 367:117–14, 1985.

Mathiasen D, Røssum LM, Robinson IM, Burgoyne RD, East JM, Møller M, Rasmussen HN, Treiman M. Isolation of chromaffin cell thapsigargin-sensitive Ca2+ store in light microsomes from bovine adrenal medulla. *Int J Biochem* 25: 641-652, 1993.

Matthews G, Sterling P. Evidence that vesicles undergo compound fusion on the synaptic ribbon. *J Neurosci* 28:5403–11 44, 2008.

Maxfield FR, McGraw TE. Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:121–132, 2004.

Meinrenken Christoph J., Borst J. Gerard G., Sakmann Bert. Calcium Secretion Coupling at Calyx of Held Governed by Nonuniform Channel–Vesicle Topography. *The Journal of Neuroscience* 22(5):1648–1667, 2002.

Meldolesi J, Pozzan T. The endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: a view from the lumen. *Trends Biochem. Sci.*23:10–14, 1998.

Miller TM, Heuser JE. Endocytosis of synaptic vesicle membrane at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 98, 685–698, 1984.

Mishra SK, Hermsmeyer K. Selective inhibition of T-type Ca^{2+} channels by Ro 40-5967. *Circ Res* 75(1):144-8, 1994.

Monck JR, Robinson IM, Escobar AL, Vergara JL, Fernandez JM. Pulsed laser imaging of rapid Ca^{2+} gradients in excitable cells. *Biophys J* 67:505–514, 1994.

Monck JR, Oberhauser AF, Álvarez de Toledo G, Fernandez JM. Is swelling of the secretory granule matrix the force that dilates the exocytotic fusion pore? *Biophys J* 59:39-47, 1991.

Monck JR, Fernández JM. The exocytotic fusion pore.*J Cell Biol*119:1395-404, 1992.

Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibanez I, Albillos A, Garcia AG, Garcia- Sancho J, Álvarez J. Chromaffin cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol* 2:57–61, 2000.

Montero, M, Álvarez J, Scheenen WJ, Rizzuto R, Meldolesi J, Pozzan T. Ca^{2+} homeostasis in the endoplasmic reticulum. Coexistance of high and low [Ca^{2+}] subcompartments i intact HeLa cells. *J Cell Biol*, 139, 601-611, 1997.

Montiel C, López MG, Sánchez-García P, Maroto R, Zapater P, García AG. Contribution of SK and BK channels in the control of catecholamine release by electrical stimulation of the cat adrenal gland. *J Physiol* 486:427-437, 1995.

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

Moser T, Neher E. Rapid Exocytosis in Single Chomaffin Cells Recorded from Mouse Adrenal Slices. *J Neurosci* 17:2314-2323, 1997A.

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

Moya-Díaz J; Álvarez YD; Montenegro MN; Bayonés L; Belingheri AV; González-Jamett AM; Cárdenas AM; Marengo FD. Sustained exocytosis after action potential-like stimulation at low frequencies in mouse chromaffin cells depends on a dynamin-dependent fast endocytosis process. *Frontiers in Cellular Neurosci*, 2016.

Muhlberg AB, Warnock DE, Schmid SL. Domain structure and intermolecular regulation of dynamin GTPase. *EMBO J* 16:6676-83, 1997.

Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6181–6186, 1998.

Murthy VN, De Camilli P. Cell biology of the presynaptic terminal. *Annu Rev Neurosci* 26:701–728, 2003.

Nanavati C, Markin VS, Oberhauser AF, Fernandez JM. The exocytotic fusion pore modeled as a lipidic pore. *Biophys J* 63:1118-1132, 1992.

Naraghi M, Neher E. Linearized buffered Ca^{2+} diffusion in microdomains and its implications for calculation of [Ca^{2+}] at the mouth of a calcium channel. *J Neurosci*17:6961-6973, 1997.

Nassar-Gentina V, Pollard HB, Rojas E. Electrical activity in chromaffin cells of intact mouse adrenal gland. *Am J Physiol* 254:675–683, 1988.

Neef J, Jung S, Wong AB, Reuter K, Pangrsic T, Chakrabarti R, Kügler S, Lenz C, Nouvian R, Boumil RM, Frankel WN, Wichmann C, Moser T. Modes and regulation of endocytic membrane retrieval in mouse auditory hair cells. *J Neurosci*34:705-716, 2014.

Neher E, Marty A. 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, 1982.

Neher E. Usefulness and limitations of linear approximations to the understanding of Ca^{2+} signals. *Cell Calcium* 24:345–357, 1998.

Neher, E. Vesicle pools and Ca^{2+} microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* 20,389-399, 1998.B

Neher E, Augustine GJ. Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 450: 273–301, 1992.

Neher E, Sakmann B. Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature* 260:779-8026, 1976.

Neher E, Zucker RS. Multiple calcium dependent process related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron* 10:21-30, 1993.

Newcomb R, Szoke B, Palma A, Wang G, Chen Xh, Hopkins W, Cong R, Miller J, Urge L, Tarczy-Hornoch K, Loo JA, Dooley DJ, Nadasdi L, Tsien RW, Lemos J, Miljanich G. Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula Hysterocrates gigas. *Biochemistry*37:15353-15362, 1998.

Newton AJ, Kirchhausen T, Murthy VN. Inhibition of dynamin completely blocks compensatory synaptic ves- icle endocytosis. *Proc Natl Acad Sci* 103: 17955–17960, 2006.

Nguyen TH, Maucort G, Sullivan RK, Schenning M, Lavidis NA, McCluskey A, Robinson PJ, Meunier FA. Actin- and dynamin-dependent maturation of bulk endocytosis restores neurotransmission following synaptic depletion. *PLoS ONE* 7: e36913, 2012.

Njus D, Radda GK. Bioenergetic processes in chromaffin granules a new perspective on some old problems. *Biochim Biophys Acta* 463(3-4):219-44, 1978.

Novara M, Baldelli P, Cavallari D, Carabelli V, Giancippoli A, Carbone E. Exposure to cAMP and beta-adrenergic stimulation recruits Ca(V)3 T-type channels in rat chromaffin cells through Epac cAMP-receptor proteins. *J Physiol* 558(Pt 2):433-49, 2004.

Nucifora PG, Fox AP. Barium triggers rapid endocytosis in calf adrenal chromaffin cells. *J Physiol* 508:483-94, 1998.

Nucifora PG, Fox AP. Tyrosine phosphorylation regulates rapid endocytosis in adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 19, 9739–9746, 1999.

Oberholtzer JC, Buettger C, Summers MC, Matschinsky FM. The 28-kDa calbindin-D is a major calcium-binding protein in the basilar papilla of the chick. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(10): 3387–90, 1988.

O'Connor DT, Frigon RP. Chromogranin A, the major catecholamine storage vesicle soluble protein. Multiple size forms, subcellular storage, and regional distribution in chromaffin and nervous tissue elucidated by radioimmunoassay. *J Biol Chem* 10:259(5):3237-3247, 1984.

Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J, Adams ME. Calcium channel diversity and neurotransmitter release. The omega conotoxinas and omega agatoxins. *Annu Rev Biochem* 63:823-867, 1994.

Olivos L, Artalejo AR. Muscarinic excitation-secretion coupling in chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* 192(2):213-20, 2008.

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

Otsu H, Yamamoto A, Maeda N, Mikoshiba K, Tashiro Y. Immunogold localization of inositol 1, 4, 5-trisphosphate ($InsP_3$) receptor in mouse cerebellar Purkinje cells using three monoclonal antibodies. *Cell Struct Funct* 15: 163–173, 1990.

Paillart C, Li J, Matthews G, Sterling P. Endocytosis and vesicle recycling at a ribbon synapse. *J Neurosci* 23, 4092–4099, 2003.

Pan CY, Kao LS. Catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells: the role of the Na/Ca exchanger. *J Neurochem* 69:1085–1092, 1997.

Park YB, Herrington J, Babcock DF, Hille B. Ca^{2+} clearance mechanisms in isolated rat adrenal chromaffin cells. *J Physiol* 492:329–346, 1996.

Parmer RJ, Mahata M, Mahata S, Sebald MT, O'Connor DT, Miles LA. 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, 1997.

Paton JFR, Boscan P, Pickering AE, Nalivaiko E. The yin and yang of cardiac autonomic control: Vago-sympathetic interactions revisited. Brain Research Reviews 49(3):555-565, 2005.

Patzak A, Winkler H. Exocytotic exposure and recycling of membrane antigens of chromaffin granules: ultraestructural evaluation after immunolabeling. *J Cell Biol* 102:510–515, 1986.

Patzak A, Aunis D, Langley K. Membrane recycling after exocytosis: an ultrastructural study of cultured chromaffin cells. *Exp Cell Res* 171:346–356, 1987.

Pérez Bay AE, Ibañez LI, Marengo FD. Rapid recovery of releasable vesicles and formation of nonreleasable endosomes follow intense exocytosis in chromaffin cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 293(5):1509-22, 2007.

Pérez Bay AE, Belingheri AV, Álvarez YD, Marengo FD. Membrane cycling after the excess retrieval mode of rapid endocytosis in mouse chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)*. 204:403-418, 2012.

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

Peskoff A, Langer GA. Calcium concentration and movement in the ventricular cardiac cell during an excitation-contraction cycle. *Biophys J* 74(1):153-74, 1998.

Phillips JH, Burridge K, Wilson SP, Kirshner N. Visualization of the exocytosis/endocytosis secretory cycle in cultured adrenal chromaffin cells. *J Cell Biol* 97:1906–1917, 1983.

Pickett JA, Edwardson JM. Compound exocytosis: mechanisms and functional significance. *Traffic* 7:109–16, 2006.

Poulsen JC, Caspersen C, Mathiasen D, East JM, Tunwell RE, Lai FA, Maeda N, Mikoshiba K, Treiman M. Thapsigargin-sensitive Ca^{2+}-ATPases account for Ca^{2+} uptake to inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive and caffeine-sensitive Ca^{2+} stores in adrenal chromaffin cells. *Biochem J* 1(307):749-758, 1995.

Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores.*Physiol Rev* 74(3):595–636, 1994.

Praefcke GJ, McMahon HT. The dynamin superfamily: Universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 133–147, 2004.

Purves D, George J, Augustine, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, McNamara JO, White LE. Neuroscience 3ra edición. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts USA. 2004.

Qualmann B, Roos J, DiGregorio PJ, Kelly RB. Syndapin I, a synaptic dynamin-binding protein that associates with the neural wiskott-aldrich syndrome protein. *Mol Biol Cell* 10: 501–513, 1999.

Ramachandran R, Surka M, Chappie JS, Fowler DM, Foss TR, Song BD, Schmid SL. The dynamin middle domain is critical for tetramerization and higher –order self-assembly. *EMBO J* 26:559-66, 2007.

Rettig J, Neher E. Emerging roles of presynaptic proteins in Ca2+ triggered exocytosis. *Science* 298: 781-785, 2002.

Richards DA, Guatimosim C, Betz WJ. Two endocytic recycling routes selectively fill two vesicle pools in frog motor nerve terminals. *Neuron* 27:551–559, 2000.

Rieke F, Schwartz EA. Asynchronous transmitter release: control of endocytosis from single mouse pancreatic b-cells. *Journal of physiology* 493, 1-8, 1996.

Rigual R, Montero M, Rico AJ, Prieto-Lloret J, Alonso MT, Alvarez J. Modulation of secretion by the endoplasmic reticulum in mouse chromaffin cells. *Eur J Neurosci* 16(9):1690-6, 2002.

Rizzoli SO, Betz WJ. Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci* 6: 57–69, 2005.

Rizzoli SO, Jahn R. Kiss-and-run, collapse and 'readily retrievable' vesicles. *Traffic*8:1137-1144, 2007.

Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 566–578, 2012.

Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA, Pozzan T. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca2+ responses. *Science* 280:1763–1766, 1998.

Rizzuto R, Pozzan T. Microdomains on intracellular Ca^{2+}: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev* 86:369–408, 2006.

Robinson IM, finnegan JM, Monck JR, Wightman RM, Fernández JM. Colocalization of calcium entry and exocytotic release sites in adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(7): 2474–2478, 1995.

Rosa JM, de Diego AM, Gandia L, Garcia AG. L-type calcium channels are preferentially coupled to endocytosis in bovine chromaffin cells. *Biochem Biophys Res Commun* 357, 834–839, 2007.

Rosa JM, Torregrosa-Hetland CJ, Colmena I. Calcium entry through slow-inactivating L-type calcium channels preferentially triggers rather tan exocytosis in bovine chromaffin cells endocitosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 301 C86–C98, 2011.

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

Ryan TA, Smith SJ, Reuter H. The timing of synaptic vesicle endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5567–5571, 1996.

Saheki Y, De Camilli P. Synaptic vesicle endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(9):a005645, 2012.

Sala F, Nistri A, Criado M. Nicotinic acetylcholine receptors of adrenal chromaffin cells. *Acta Physiol* 192:203-212, 2008.

Santo Domingo J, Vay L, Camacho M, Hernandez San Miguel E, Fonteriz RI, Lobaton CD, Montero M, Moreno A, Álvarez J. Calcium dynamics in bovine medulla chromaffin cell secretory granules. *European Journal of neuroscience* 28, 1265-1274, 2008.

Scepek S, Coorssen JR, Lindau M. Fusion pore expansion in horse eosinophils is modulated by Ca^{2+} and protein kinase C via distinct mechanisms. *EMBO J* 17:4340-4345, 1998.

Scepek S, Lindau M. Focal exocytosis by eosinophils compound exocytosis and cumulative fusion. *EMBO J.* 12:1811–17, 1993.

Schikorski T, Stevens CF. Morphological correlates of functionally defined synaptic vesicle populations. *Nat Neurosci* 4:391–395, 2001.

Schlüter OM, Khvotchev M, Jahn R, Südhof TC. Localization versus function of Rab3 proteins. Evidence for a common regulatory role in controlling fusion. *J Biol Chem* 277(43):40919-29, 2002.

Schumm MA, Castellanos DA, Frydel BR, Sagen J. Improved neural progenitor cell survival when cografted with chromaffin cells in the rat striatum. *Exp Neurol*185:133-142, 2004.

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

Shpetner HS, Vallee RB. Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell*1989 59:421-32, 1989.

Slepnev VI, De Camilli P. Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci* 1: 161–172, 2000.

Smirnova E, Schurland DL, Newman-Smith ED, Pishvaee B, van der Bliek AM. A model for dynamin self-assembly based on binding between three different protein domains. *J Biol Chem* 274:14942-7, 1999.

Smith CB, Betz WJ. Simultaneous independent measurement of endocytosis and exocytosis. *Nature* 380: 531–534, 1996.

Smith C, Neher E. Multiple forms of endocytosis in bovine adrenal chromaffin cells. *J Cell Biol* 17;139(4):885-94, 1997.

Smith SM, Renden R, von Gersdorff H. Synaptic vesicle endocytosis: fast and slow modes of membrane retrieval. *Trends Neurosci* 31(11):559-68, 2008.

Solaro CR, Lingle CJ. Trypsin-sensitive, rapid inactivation of a calcium-activated potassium channel. *Science* 257:1694-1698, 1992.

Solaro CR, Prakriya M, Ding JP, Lingle CJ. Inactivating and noninactivating Ca^{2+}- and voltage-dependent K^{+} current in rat adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 15:6110-6123, 1995.

Solaro CR, Ding JP, Li ZW, Lingle CJ. The cytosolic inactivation domains of BKi channels in rat chromaffin cells do not behave like simple, open-channel blockers. *Biophys J*73:819-830, 1997.

Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE. A protein assembly disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75:409–418,1993.

Sørensen JB, Nagy G, Varoqueaux F, Nehring RB, Brose N, Wilson MC, Neher E. Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23. *Cell* 11:114(1): 75-86, 2003.

Sørensen JB. Formation, stabilization and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflugers Arch Eur J Physiology* 448:347-362, 2004.

Sørensen JB, Katrin Wiederhold, Müller ME, Milosevic I, Nagy G, de Groot BL, Grubmüller H, Fasshauer D. Sequential N- to C-terminal SNARE complex assembly drives priming and fusion of secretory vesicles. *EMBO J* 25(5): 955–966, 2006.

Spruce BA, Curtis R, Wilkin GP, Glover DM. A neuropeptide precursor in cerebellum: proenkephalin exists in subpopulations of both neurons and astrocytes. *EMBO J* 9(6):1787-95, 1990.

Sugita S. Mechanisms of exocytosis. *Acta Physiol. (Oxf)* 192(2): 185-93, 2008.

Sun JY, Wu XS, Wu LG. Single and multiple vesicle fusión induce different rates of endocitosis at a central synapse. *Nature* 417: 555-559, 2002.

Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 A resolution. *Nature* 24:395(6700):347-353, 1998.

Tabares L, Ales E, Lindau M, Álvarez de Toledo G. Exocytosis of catecholamine (CA)-containing and CA-free granules in chromaffin cells. *J Biol Chem*, 276, 39974-39979, 2001.

Takei K, Yoshida Y, Yamada H. Regulatory mechanisms of dynamin-dependent endocytosis. *J Biochem*137:243-247, 2005.

Tanner VA, Ploug T, Tao-Cheng JH. Subcellular localization of SV2 and other secretory vesicle components in PC12 cells by an efficient method of preembedding EM immunocytochemistry for cell cultures. *J Histochem Cytochem* 44:1481-1488, 1996.

Taraska JW, Perrais D, Ohara-Imaizumi M, Nagamatsu S, Almers W. Secretory granules are recaptured largely intact after stimulated exocytosis in cultured endocrine cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2070-75, 2003.

Thastrup O, Cullen PJ, Drøbak BK, Hanley MR, Dawson AP. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(7):2466-2470, 1990.

Taylor CW, Laude AJ. IP3 receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca^{2+}. *Cell* Calcium 32(5-6):321-34, 2002.

Teng H, Wilkinson RS. Clathrin-mediated endocytosis in snake motor terminals is directly facilitated by intracellular Ca^{2+}. *J Physiol* 565:743–750, 2005.

Teng H, Lin MY, Wilkinson RS. Macroendocytosis and Endosome Processing in Snake Motor Boutons. *J Physiol* 582, 243–262, 2007.

Tischler AS. Chromaffin cells as models of endocrine cells and neurons. *Ann N Y Acad Sci* 971:366–370, 2002.

Thomas P, Lee AK, Wong JG, Almers W. A triggered mechanism retrieves membrane in seconds after Ca^{2+}-stimulated exocytosis in single pituitary cells. *J Cell Biol* 124: 667–675, 1994.

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

Torri-Tarelli F, Haimann C, Ceccarelli B. Coated vesicles and pits during enhanced quantal release of acetylcholine at the neuromuscular junction. *J Neurocytol* 16: 205–214, 1987.

Trifaró JM, Lee R. Morphological characteristics and stimulus-secretion coupling in bovine adrenal chromaffin cultures. *Neuroscience* 5(9):1533-1546, 1980.

Tsai Chia-Chang, Chih-Lung Lin, Tzu-Lun Wang, Ai-Chuan Chou,2 Min-Yi Chou, Chia Hsueh Lee, I-Wei Peng, Jia-Hong Liao, Yit-Tsong Chen, and Chien-Yuan Pan. Dynasore inhibits rapid endocytosis in bovine chromaffin cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 297: 397–406, 2009.

Tsien RW, Ellinor PT, Home WA. Molecular diversity of voltage-dependent Ca^{2+} channels. *Trends Pharmacol Sci* 12(9): 349-354, 1991.

Unsicker K, Krisch B, Otten U, Thoenen H. Nerve growth factor - induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells - impairment by glucocorticoids. *Proc Nati Acad Sci USA* 75:3498-3502, 1978.

Unsicker K, Krieglstein K. Growth factors in chromaffin cells. *Progress in Neurobiol*48:307-324, 1996.

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

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

Verdugo P. Hydration kinetics of exocytosed mucins in cultured secretory cells of the rabbit trachea: a new model. *InMucus and Mucosa*109:212-234, 1984.

Verdugo P. Goblet cells secretion and mucogenesis. *Annu Rev Physiol*52:157-176, 1990.

Verdugo P. Mucin exocytosis. *Am Rev Respir Dis*144:S33-7, 1991.

Verdugo P, Aitken M, Langley L, Villalon MJ. Molecular mechanism of product storage and release in mucin secretion.The role of extracellular Ca^{2+}. *Biorheology* 24:625-33, 1987A.

Verdugo P, Deymp-Olsen L Aitken M, Villalon MJ, Johnson D. Molecular mechanism of mucin secretion: the role of intragranular charge shielding. J *Dent Res* 665068, 1987B.

Verkhratsky A. The endoplasmic reticulum and neuronal calcium signaling. *Cell Calcium* 32:393-404, 2002.

Villalobos C, Nuñez L, Montero M, Garcia AG, Alonso MT, Chamero P, Álvarez J, Garcia-Sancho J. Redistribution of Ca^{2+} among cytosol and organella during stimulation of bovine chromaffin cells. *FASEB J* 16:343–353, 2002.

Vitale N, Mawet J, Camonis J, Regazzi R, Bader MF, Chasserot-Golaz S. The Small GTPase RalA controls exocytosis of large dense core secretory granules by interacting with ARF6-dependent phospholipase D1. *J Biol Chem* 280(33):29921-8, 2005.

Viveros OH, Diliberto EJ, Hazum E, Chang KJ. Opiate-like materials in the adrenal medulla: Evidence for storage and secretion with catecholamines. *Mol Pharmacol* 16:1101-1108, 1979.

Voets T, Neher E, Moser T. Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *J Neurosc*i 23:607-615, 1999.

Voets T, Tobias Moser, Per-Eric Lund, Robert H. Chow, Martin Geppert, Thomas C. Sudhof, and Erwin Neher. Intracellular calcium dependence of large dense-core vesicle exocytosis in the absence of synaptotagmin I. *PNAS* 98(20) 11680–11685, 2001.

Von Gersdorff H, Matthews G. Inhibition of endocytosis by elevated internal calcium in a synaptic terminal. *Nature* 370: 652–655, 1994.

Von Grafenstein H, Knight DE. Membrane recapture and early triggered secretion from the newly formed endocytotic compart- ment in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 453:15–31, 1992.

von Kleist L, Stahlschmidt W, Bulut H, Gromova K, Puchkov D. Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell* 146:471–84, 2011.

Wallace DJ, Chen C, Marley PD. Histamine promotes excitability in bovine adrenal chromaffin cells by inhibiting an M-current. *J Physiol* 540:921–939, 2002.

Wang LH, Rothberg KG, Anderson RG. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol*123:1107-1117, 1993.

Weinstein H, Mehler EL. Ca^{2+} -binding and structural dynamics in the functions of calmodulin. *Annu Rev Physiol* 56:213-236, 1994.

Weston JA. The migration and differentiation of neural crest cells. *Adv Morphol*. 8:41–114, 1970.

Wightman RM[1], Jankowski JA, Kennedy RT, Kawagoe KT, Schroeder TJ, Leszczyszyn DJ, Near JA, Diliberto EJ Jr, Viveros OH. Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells.*Proc Natl Acad Sci USA* 88(23):10754-8, 1991.

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

Winkler H. The proteins of catecholamine-storing organelles. *Scand J Immunol Suppl*9:75-96, 1982.

Winkler H. The adrenal chromaffin granule: a model for large dense core vesicles of endocrine and nervous tissue. *J Anat*183:237-252, 1993.

Winkler H, Fischer-Colbrie R. The chromogranins A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience* 49:497-528, 1992.

Wu LG, Hamid E, Shin W, Chiang HC. Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms. *Annu Rev Physiol* 76:301-331, 2014.

Wu M, Huang B, Graham M, Raimondi A, Heuser JE, Zhuang X, De Camilli P. Coupling between clathrin-dependent endocytic budding and F-BAR-dependent tubulation in a cell-free system. *Nat Cell Biol* 12: 902–908, 2010.

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

Wu Y, O'Toole ET, Girard M, Ritter B, Messa M, Liu X, McPherson PS, Ferguson SM, De Camilli P. A dynamin 1-, dynamin 3- and clathrin independent pathway of synaptic vesicle recycling mediated by bulk endocytosis. *eLife* 3:e01621, 2014.

Xue J, Graham ME, Novelle AE, Sue N, Gray N. Calcineurin selectively docks with the dynaminIxbsplicevarianttoregulateactivity-dependentbulkendocytosis.*J Biol Chem*286:30295–303, 2011.

Xu T, Naraghi M, Kang H, Neher E. Kinetic studies of Ca^{2+} binding and Ca^{2+} clearance in the cytosol of adrenal chromaffin cells. *Biophys J* 73:532–545, 1997.

Xu-Friedman MA, Harris KM, Regehr WG. Three-dimensional comparison of ultrastructural characteristics at depressing and facilitating synapses onto cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 21:6666– 6672, 2001.

Wu W, Wu LG. Rapid bulk endocytosis and its kinetics of fission pore closure at a central synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 10234–10239, 2007.

Wu XS, Wu LG. Rapid endocytosis does not recycle vesicles within the readily releasable pool. *J Neurosci* 29:11038–42, 2009.

Wu XS, Wu LG. The yin and yang of calcium effects on synaptic vesicle endocytosis. *Neurosci* 34(7):2652-9, 2014.

Wu Y, O'Toole ET, Girard M, Ritter B, Messa M, Liu X, McPherson PS, Ferguson SM, De Camilli P. A dynamin 1-, dynamin 3- and clathrin-independent pathway of synaptic vesicle recycling mediated by bulkendocytosis. *Elife* 3:e01621, 2014.

Xu Z, Sato K, Wickner W. LMA1 binds to vacuoles at Sec18p (NSF), transfers upon ATP hydrolysis to a t-SNARE (Vam3p) complex, and is released during fusion. *Cell* 26;93(7): 1125- 34, 1998.

Xue H, Wang C, Bai J, Chapman ER, Jackson MB. Transmembrane Segments of Syntaxin Line the Fusion Pore of Ca^{2+}-Triggered Exocytosis. *Science* 304: 289-292, 2004

Yamashita T, Hige T, Takahashi T. Vesicle endocytosis requires dynamin-dependent GTP hydrolysis at a fast CNS synapse. *Science* 307: 124–127, 2005.

Yoo SH, You SH, Huh YH. Presence of syntaxin 1A in secretory granules of chromaffin cells and interaction with chromogranins A and B. *FEBS Lett* 579(1):222-8, 2005.

Zhang Z, Jackson MB. Temperature Dependence of Fusion Kinetics and Fusion Pores in Ca^{2+}-triggered Exocytosis from PC12 Cells.*J Gen Physiol* 131(2):117–124, 2008.

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

Zhou Z, Misler S, Chow RH. Rapid fluctuations in transmitter release from single vesicles in bovine adrenal chromaffin cells. *Biophys J*70(3):1543-52, 1996.

Zhou Z, Neher E. Mobile and immobile calcium buffers in bovine adrenal chromaffin cells. *J Physiol* 469:245–273, 1993.

ZhuGe R, DeCrescenzo V, Sorrentino V, Lai FA, Tuft RA, Lifshitz LM, Lemos JR, Smith C, Fogarty KE, Walsh JV Jr. Syntillas release Ca2+ at a site different from the microdomain where exocytosis occurs in mouse chromaffin cells.*Biophys J* 15:90(6):2027-2037, 2006.