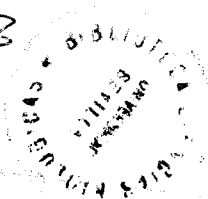


R.16.738

TD 139



AL SEÑOR  
CORRESPONDIENTE  
Sevilla

1

38

15 SET. 1988

*Recebo*

**DESARROLLO Y APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE  
AMPEROMETRÍA EN PARCHE AL ESTUDIO DE LA  
EXOCITOSIS EN CÉLULAS AISLADAS: MASTOCITOS Y  
CROMAFINES**

Eva M<sup>a</sup> Alés González de la Higuera

Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Biología por la  
Universidad de Sevilla

Sevilla, 1998



UNIVERSIDAD DE SEVILLA. FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA MÉDICA Y BIOFÍSICA


Avda. Sánchez Pizjúan, 4. 41009 Sevilla. ESPAÑA  
Tlfn.: 95 4 55 17 68 y 95 4 55 17 70. FAX: 95 4 55 17 69.

---

Don Guillermo Alvarez de Toledo Naranjo, Profesor Titular de  
Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla

**CERTIFICA:**

Que Doña Eva M<sup>a</sup> Alés González de la Higuera, ha realizado  
bajo su dirección el trabajo titulado " Desarrollo y aplicación de la  
técnica de amperometría en parche al estudio de la excitosis en  
células aisladas: mastocitos y cromafines", que presenta para optar  
al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Sevilla.

  
DPTO. DE FISIOLÓGIA MÉDICA  
Y BIOFÍSICA  
FACULTAD DE MEDICINA

Fdo.: Guillermo Alvarez de Toledo Naranjo

Sevilla, a 10 de Septiembre de 1998

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero hacer constar mi agradecimiento al Dr. Guillermo Alvarez de Toledo, director de esta tesis, quien me enseñó no sólo los conocimientos científicos y técnicos que he adquirido, sino también las actitudes y valores personales para formarme como investigadora. Su gran ilusión, dedicación y fe en el trabajo bien hecho, hicieron realidad la técnica de amperometría en parche en nuestro laboratorio, con los resultados que en este trabajo se exponen. Mi agradecimiento también a la Dra. Lucia Tabares, por sus enseñanzas, su estímulo y la confianza que en todo momento me mostró. Sin sus ideas, buen criterio y directa colaboración, gran parte de este trabajo no hubiera sido posible.

A mis "hermanos" de ciencia, Vicente Valero, excelente compañero y amigo, quien no dudó en gastar generosamente su poco tiempo conmigo, explicándome y ayudándome con cuestiones de física y programación. Y a Juan Manuel Poyato, gran médico y amigo, por los pequeños detalles que tanto agradezco y porque supo recetar y compartir siempre la mejor medicina: su eterna sonrisa.

Deseo también expresar mi agradecimiento a la Dra. Andrade, "Pepi", quien me demostró su amistad a pesar de la distancia y a la Dra. Manuela García, por su amabilidad y siempre bien acertados consejos. Y al resto de doctores y compañeros de este departamento, quienes no dudaron en contestar a todas preguntas y crear un ambiente muy agradable en el que me sentí muy gusto. También, a José Luis Romero y Antonio León, por la ayuda prestada en la preparación de los cultivos celulares y a Irene y Fernando por su colaboración en las labores administrativas.

A Juan Alés, mi padre, porque me animó y apoyó a hacer ciencia y a Concepción González de la Higuera, mi madre, por saber escuchar y comprender y por no saberme decir no. A Mari, mi tía y a Inmaculada, Virginia y Juan Ignacio, mis hermanos, porque sé que puedo contar con ellos. Y a "Chito", mi pequeño Yorkshire, por sus alegres y entusiastas manifestaciones de cariño.

Al D.G.Y.C.I.T. por la concesión de la beca predoctoral de la que he disfrutado durante la realización de este trabajo.

*A mis padres*

# CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. LA EXOCITOSIS</b> .....	1
1.1. Liberación vesicular constitutiva y regulada.....	2
1.2. La exocitosis es un proceso rápido.....	2
<b>2. VESÍCULAS SECRETORAS</b> .....	3
2.1. Tipos de vesículas secretoras.....	3
2.2. Almacenamiento de los productos de secreción.....	4
<b>3. FUSIÓN DE MEMBRANAS</b> .....	5
3.1. Mecanismos de fusión.....	5
3.2. Complejo proteico de fusión.....	6
<b>4. EL PORO DE FUSIÓN EXOCITÓTICO</b> .....	8
4.1. Apertura del poro de fusión.....	9
4.2. Expansión del poro de fusión.....	10
4.3. Cierre del poro de fusión.....	11
<b>5. LIBERACIÓN DEL TRANSMISOR</b> .....	11
5.1. La expansión lenta del poro de fusión y las fusiones reversibles.....	12
5.2. La matriz del gránulo secretor.....	13
<b>6. ENDOCITOSIS Y RESTABLECIMIENTO DE LA MEMBRANA CELULAR</b> .....	16
<b>OBJETIVOS</b> .....	18
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	20
<b>1. PREPARACIÓN CELULAR</b> .....	20
1.1. Tipos de células.....	20
1.2. Método de extracción de células cebadas.....	21

1.2.1. Obtención de células.....	21
1.2.2. Mantenimiento de células .....	22
1.3. Método de extracción de células cromafines.....	22
1.3.1. Obtención de glándulas suprarrenales.....	22
1.3.2. Dispersión celular.....	23
1.3.3. Siembra y mantenimiento del cultivo celular.....	24
1.3.4. Preparación de soportes para la siembra celular.....	24
2. SOLUCIONES.....	25
2.1. Soluciones externas.....	25
2.1.1. Soluciones de extracción, incubación y dispersión.....	25
2.1.2. Solución externa de registro.....	26
2.2. Soluciones internas.....	28
2.2.1. Soluciones con distinta concentración de calcio libre.....	28
3. TÉCNICAS ELECTROFISIOLÓGICAS PARA EL ESTUDIO DE LA EXOCITOSIS.....	30
3.1. Modelo eléctrico de la membrana.....	30
3.2. Capacidad de la membrana.....	30
3.3. La técnica de "patch-clamp" para el estudio de la exocitosis.....	32
3.3.1. Métodos de medida de capacidad en células exocitóticas.....	35
3.3.1.A. Técnicas de dominio en el tiempo.....	35
3.3.1.B. Técnicas de dominio de la frecuencia.....	37
3.3.2. Detección de fase.....	39
3.3.2A. Separación de los componentes resistivo y capacitivo por un detector de fase.....	39
3.3.2B. Cuantificación de los valores de $G_m$ , $G_s$ , y $C_m$ mediante un detector de fase.....	44

3.3.3. Medida de la conductancia del poro de fusión exocitótico.....	46
3.4. Detección electroquímica de secreción en células aisladas.....	51
3.4.1. Introducción.....	51
3.4.2. Detección electroquímica.....	52
<b>4. AMPEROMETRÍA EN PARCHE.....</b>	<b>57</b>
4.1. Introducción.....	55
4.2. Dispositivo experimental.....	59
4.2.1. Equipo experimental.....	59
4.2.1.1. Amplificador de amperometría.....	61
4.2.2. Microelectrodos de registro de “patch-clamp”.....	63
4.2.3. Microelectrodos de registro de señales amperométricas.....	66
4.2.4. Sistema de conexión del electrodo al amplificador.....	69
4.3. Proceder experimental.....	73
4.3.1. Preparación del experimento.....	73
4.2.2. Formación del sello.....	74
4.3.3. Calibración y registro.....	74
4.3.4. Análisis de los eventos exocitóticos.....	78
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>80</b>
<b>1. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE “PATCH-CLAMP” EN LA CONFIGURACIÓN DE CÉLULA COMPLETA Y LA AMPEROMETRÍA AL ESTUDIO DE LA SECRECIÓN EN CÉLULAS CEBADAS DE RATA</b>	
1.1. Exocitosis a nivel de gránulo secretor único.....	81



1.2. El calcio intracelular en la regulación de la expansión del poro de fusión.....	85
1.3. Factores que afectan a la liberación del transmisor.....	88
1.3.1. Efecto del pH.....	88
1.3.2. Factores que afectan al hinchamiento de la matriz.....	91
1.3.2.1. Efecto de la osmolaridad.....	91
1.3.2.2. Efecto de la histamina.....	92
<b>2. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPEROMETRIA EN PARCHE AL ESTUDIO DE LA EXOCITOSIS EN CÉLULAS CEBADAS DE RATA</b>	
2.1. Exocitosis de pequeñas vesículas y gránulos secretores específicos.....	94
2.2. La secreción de gránulos específicos produce señales amperométricas.....	97
2.3. Fases en la expansión del poro de fusión.....	100
2.4. Endocitosis en configuración de célula adherida.....	105
<b>3. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPEROMETRÍA EN PARCHE AL ESTUDIO DE LA SECRECIÓN EN CÉLULAS CROMAFINES DE RATA</b>	
3.1. Tipos de exocitosis.....	108
3.2. Fusiones unitarias de vesículas secretoras y liberación de catecolaminas.....	111
3.3. Características de los eventos unitarios con fusión irreversible.....	113
3.3A. Relación entre el salto de capacidad y la espiga amperométrica.....	114
3.3B. Dimensiones de un gránulo cromafín.....	113

3.3C. Cantidad y concentración de catecolaminas de un gránulocromafín.....	116
3.4. Fusiones reversibles de los gránulos cromafines de rata.....	117
3.5. Características de los eventos de liberación con fusión reversible.....	117
3.5A. Curso temporal de la liberación durante una fusión reversible.....	119
3.5B. Dimensiones y carga de un gránulo cromafín con fusión transitoria.....	122
3.5C. Características cinéticas de las espigas amperométricas de fusiones transitorias.....	123
3.5D. Duración de los eventos de fusión transitoria.....	125
3.6. Poros de fusión durante una fusión transitoria.....	127
3.6.1. Poros de fusión con liberación total y rápida.....	128
3.6.2. Poros de fusión con liberación de cinética lenta.....	131
3.7. Transferencia de membrana durante una fusión transitoria.....	134
3.8. Regulación de los eventos de fusión exocitótico.....	136
3.9. Endocitosis en células cromafines de rata .....	137
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>139</b>
1. REGULACIÓN DE LA LIBERACIÓN TRÁS LA FUSIÓN VESICULAR.....	140
1.1. La dilatación del poro refleja una etapa limitante en la liberación.....	141
1.2. Etapas en el proceso de expansión del poro de fusión.....	142
1.3. La matriz del gránulo secretor en la liberación.....	146

<b>2. LA RESPUESTA SECRETORA DE VESÍCULAS AISLADAS EN CÉLULAS CROMAFINES DE RATA.....</b>	<b>150</b>
<b>3. FUSIONES TRANSITORIAS EN CÉLULAS CROMAFINES DE RATA.....</b>	<b>154</b>
3.1. Fusiones transitorias con liberación total y rápida.....	155
3.2. Fusiones transitorias con liberación lenta.....	160
3.3. Papel del calcio y sodio en los eventos de fusión reversible.....	161
3.4. Implicaciones de las fusiones transitorias en el ciclo vesicular.....	162
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>168</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>169</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>172</b>

## **INTRODUCCIÓN**

### **1. LA EXOCITOSIS**

Todas las células eucarióticas contienen vesículas secretoras destinadas a transportar sustancias. Estas vesículas son llevadas desde el interior celular hasta la membrana plasmática por motores moleculares. Cuando la vesícula se aproxima a unos cuantos nanómetros de la superficie celular puede sufrir exocitosis, es decir la membrana que delimita la vesícula se funde con la membrana plasmática, y cualquier material dentro de la vesícula difunde al espacio extracelular. Las células eucarióticas sufren exocitosis bien para insertar nuevos componentes a la membrana plasmática o para expulsar sustancias impermeables a la membrana, almacenados dentro de las vesículas.

### **1.1. Liberación vesicular constitutiva y regulada**

La exocitosis se puede subdividir en dos grandes categorías. En la exocitosis constitutiva (Ma y col.,1995), las vesículas se funden con la membrana celular tan pronto como entran en contacto con ésta, y ningún mecanismo conocido controla el proceso de fusión. En la exocitosis estimulada o regulada las vesículas se agrupan junto a la membrana celular (a una distancia inferior a los 100 nm) y permanecen esperando, hasta que una señal que llega a la membrana celular causa la aparición de un mensajero citosólico, el cual dispara la exocitosis de las vesículas. Tanto en células neuroendocrinas como en neuronas, la secreción regulada es disparada por una elevación del  $Ca^{2+}$  citosólico (Douglas,1968; Katz y Miledi,1965c), ante la llegada de un potencial de acción, que despolariza la membrana y abre canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje. En ocasiones, como en las células cebadas, el calcio es meramente un cofactor.

### **1.2. La exocitosis es un proceso rápido**

La eficacia en la transmisión de información reside en la rapidez con que se activan los mecanismos implicados para que se produzca la liberación de neurotransmisor. En el sistema nervioso, la velocidad es esencial. Después de que el estímulo alcanza a la célula, existe un retraso antes de que se produzca la exocitosis, que se debe fundamentalmente al tiempo que tarda en activarse la maquinaria secretora. En células cebadas, el retraso desde la aplicación del estímulo ( $GTP-\gamma s$ ) es de 50 s (Fernández y col.,1984), en células cromafines el retardo es menor de 200 ms (Neher y Marty,1982), mientras que en la placa neuromuscular es de tan sólo 0.5 ms (Katz y Miledi,1965b).

En la exocitosis se distinguen varias etapas cinéticas. Cuando las vesículas han completado su síntesis y están cargadas de neurotransmisor se acumulan constituyendo el contingente de vesículas de reserva. Estas vesículas no experimentan exocitosis, sino que permanecen inmovilizadas unidas al citoesqueleto hasta que llega la señal que indica que deben aproximarse a la membrana plasmática. Una proteína kinasa C parece estar implicada en eliminar la barrera cortical de filamentos de actina permitiendo el tráfico de vesículas a la membrana plasmática (Vitale y col., 1995) para constituir el contingente de vesículas listas para fundirse (Neher y Zucker, 1993). El proceso de atraque o "docking" de las vesículas a la membrana plasmática requiere ATP (Parsons y col., 1995) y es seguido por una etapa inhibida por bajas temperaturas (Bittner y Holz, 1992) y un paso dependiente de pH (Thomas y col., 1993b). En esta fase permanecen las vesículas en espera de que llegue el estímulo. Entonces, la exocitosis finalmente es disparada por la unión de 3-4 iones  $Ca^{2+}$  (Heinemann y col., 1994; Thomas y col., 1993; Thomas y col., 1994).

Por lo tanto, la mayor parte del retraso en la exocitosis desde que llega el estímulo se debe al curso temporal del  $Ca^{2+}$  submembrana, que refleja la distancia que separa las vesículas de los canales de  $Ca^{2+}$  (Chow y col., 1994) y el grado de tamponamiento del calcio por tampones fijos y móviles intracelulares; en segundo lugar se debe a la cinética de acción del  $Ca^{2+}$  en el aparato secretor y en tercer lugar, al tiempo finito entre la fusión de la vesícula y la liberación del contenido.

## **2. VESÍCULAS SECRETORAS**

### **2.1. Tipos de vesículas secretoras**

Clásicamente, las vesículas de secreción se han clasificado en función de la apariencia al microscopio electrónico de transmisión, en claras

y densas. Las vesículas claras son las responsables de la neurotransmisión rápida y el agente inductor de la exocitosis es el calcio. Se encuentran colocalizadas con canales de calcio en zonas activas donde se va a producir la fusión (Neher,1986; Stern,1992). Las vesículas densas son de estructura similar a los gránulos de células cromafines o mastocitos y pueden estar sujetas, además del calcio a un control añadido de mensajeros intracelulares. Se sitúan en una posición más alejada de los canales de calcio (Augustine y Neher,1992; Neher y Marty,1982). La diferente organización espacial de vesículas y canales tiene importantes consecuencias funcionales. Para canales y vesículas colocalizadas, la secreción está fuertemente acoplada a los potenciales de acción, ya que en la proximidades del canal fácilmente se alcanzan los niveles de calcio requeridos para inducir la exocitosis, mientras que en distribuciones más aleatorias de las vesículas, sería esperable un menor acoplamiento y un mayor número de potenciales de acción serían necesarios para alcanzar los niveles necesarios de calcio para disparar la secreción. Las vesículas claras están presentes en neuronas (De Camilli y Jahn,1990; Verhage y col.,1991) donde la velocidad de secreción es crítica para la función celular.

## **2.2. Almacenamiento de los productos de secreción**

Las vesículas secretoras están muy bien caracterizadas y entre los distintos tipos de proteínas que poseen, presentan proteínas implicadas en la carga y almacenaje de neurotransmisor, como son los transportadores específicos que dependen de la actividad de una bomba de protones, que acidifica el interior granular. Se conocen 4 tipos de transportadores diferentes: uno para monoaminas, uno para acetilcolina, uno para glutamato y otro para GABA y glicina (McIntire y col., 1997; Peter y col., 1995; Erickson y col., 1994; Kanner, 1993).

Un evento fundamental en la secreción regulada es el empaquetamiento de neurotransmisores y otros productos secretores por condensación dentro de los gránulos secretores (Griffiths y Simons, 1986; Kelly, 1985). La vacuola de condensación, una forma inmadura del gránulo secretor, procedente del aparato de Golgi, sufre un proceso de progresiva acidificación y condensación de los productos hasta que adquiere la densidad de un gránulo secretor maduro. En las células cebadas, los gránulos secretores contienen una molécula altamente cargada e hidrofílica constituida de proteoglicano de heparina (Rabenstein, 1987) donde están condensados en altas concentraciones, histamina, serotonina, ATP y  $Ca^{2+}$  (Nicaise y col., 1992). Igualmente, proteínas de la familia de la cromogranina /secretogranina forman la matriz de varios gránulos secretores neuronales y neuroendocrinos, con gran abundancia de cargas negativas.

### **3. FUSIÓN DE MEMBRANAS**

#### **3.1. Mecanismos de fusión**

Aunque aún se desconoce cómo las membranas se funden, existen dos hipótesis de cómo la fusión puede tener lugar: Los modelos de proximidad (Monck y Fernández, 1994) defienden que el poro es exclusivamente lipídico. Las bicapas de lípidos de ambas membranas se aproximan por la acción de una serie de proteínas motoras que tiran de ellas. La fusión es precedida por una hemifusión de bicapas, es decir, una estructura trilaminar producida por la mezcla de fosfolípidos procedentes de la membrana plasmática y de la vesícula de secreción. En este modelo, la rotura de la membrana de hemifusión crea un poro de fusión lipídico que puede cerrarse nuevamente o expandirse irreversiblemente. Durante este proceso, la membrana está bajo tensión, causando un flujo de lípidos a través del poro y en la membrana del gránulo (Monk y col., 1990). Los modelos del poro de fusión (Almers, 1990; Almers y Tse, 1990; Pfenninger y



col.,1972) proponen que inicialmente al menos, el poro es proteico. Tras la activación, un canal acuoso formado por un complejo proteico, conecta la vesícula y el medio extracelular como una unión tipo gap conecta dos células. Posteriormente se produce la migración de lípidos en el poro formado.

### **3.2. Complejo proteico de la fusión**

Las vesículas cargadas de transmisor se anclan a zonas específicas de la membrana plasmática ("docking") y por un proceso de fusión parcial ("priming") se hacen competentes para la fusión final disparada por calcio. La rapidez del acoplamiento entre la entrada de calcio exterior y la fusión (<1ms en las sinapsis rápidas) sugiere la existencia de un aparato de fusión preformado para activarse con la entrada del ión. Recientemente, ha sido aislado un complejo proteico de alto peso molecular, compuesto por varias proteínas y que podrían llevar a cabo esta tarea (O'Connor y col.,1994; Südhof y col.,1993). Una proteína de la membrana vesicular, la sinaptobrevina (VAMP) y dos proteínas de la membrana plasmática, la syntaxina y la SNAP-25, forman un complejo proteico muy estable que es esencial para la exocitosis. La syntaxina y la VAMP se unen entre si, a lo largo de una longitud de 60-70 aminoácidos, con SNAP-25 estabilizando esta interacción. Estas regiones tienen una alta probabilidad de formar estructuras de  $\alpha$ -hélice que se unen entre si formando una estructura enrollada (Lupas y col.,1991), la cual parece jugar un papel importante en el anclaje y fusión de la vesícula con la membrana plasmática. El complejo proteico sirve de receptor para unas proteínas solubles (SNAPs) que crean un sitio de alta afinidad para una ATPasa llamada NSF (factor sensible a N- etil-maleimida) (Hayashi y col.,1994; Söllner y col.,1993). Como el NSF provoca el desamblaje del complejo proteico se pensó que mediaba la fusión de membranas (Whiteheart y col.,1993). Datos recientes indican que el NSF no

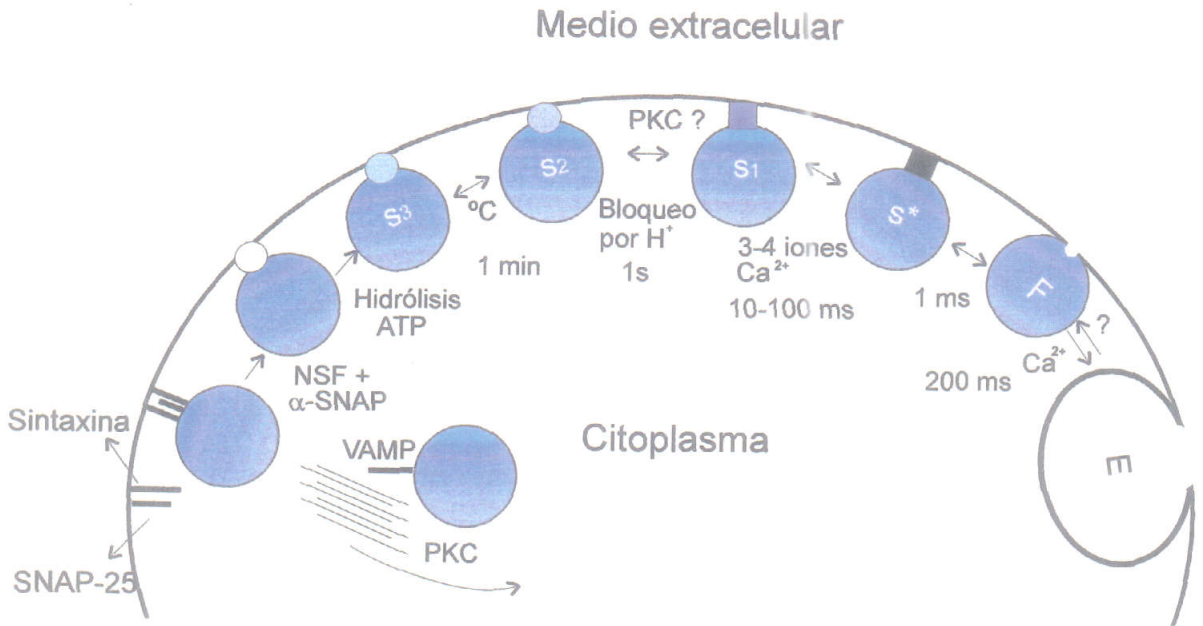


Figura 1. Secuencia de reacciones posibles para la exocitosis en células endocrinas. Durante el atraque ("Docking") del gránulo a la membrana plasmática, la sinaptobrevina (VAMP) se combina con la syntaxina y SNAP-25 para formar el complejo de fusión, que crece al reclutar  $\alpha$ -SNAP y NSF. La hidrólisis de ATP, seguida por una serie de cambios conformacionales en reacciones subsiguientes, prepara al gránulo antes de la fusión disparada por calcio. La expansión del poro de fusión es también un proceso regulado por calcio.

es necesario antes de la fusión (Mayer y col.,1996; Nichols y col.,1997). Actualmente, se cree que durante el ensamblaje proteico se libera gran cantidad de energía que es directamente utilizada para producir la conexión de las dos membranas. Energía adicional proporcionada por la unión del calcio con una proteína de la vesícula: la sinaptotagmina, provoca la fusión de membranas (Lin y Scheller,1997). Esta proteína parece ser el sensor de la concentración de calcio. La sinaptotagmina entra a formar parte del complejo de fusión y parece que debe salir del lugar donde se va a generar el poro de fusión para que este pueda formarse. La sinaptotagmina requiere de la unión de varios iones de calcio para que se pueda realizar esta transición (Südhof,1995).

#### **4. EL PORO DE FUSIÓN EXOCITÓTICO**

Los productos secretores son almacenados dentro de las vesículas secretoras en solución o condensados formando agregados o precipitados (Gerdes y col.,1989). Cuando se produce la fusión de la vesícula con la membrana plasmática se forma el poro de fusión y el precipitado se solubiliza permitiendo la liberación de los productos por simple difusión (Alvarez de Toledo y col., 1993).

El poro de fusión es la estructura que transitoriamente une el lumen de la vesícula secretora y el medio extracelular y actúa como conexión eléctrica o elemento resistivo entre estos dos compartimentos. Se forma inmediatamente después de la fusión de las membranas y desaparece antes de la expansión completa de la membrana de la vesícula en la membrana plasmática. El poro de fusión se observó por primera vez en células cebadas, con la utilización de técnicas de congelación rápida y microscopía electrónica de criofactura (Chandler y Heuser,1980). El desarrollo de las técnicas de medida de capacidad con "patch-clamp", permitió por primera vez, la

observación directa de la actividad y tamaños de poros de fusión únicos en células aisladas que sufren exocitosis (Breckenridge y Almers, 1987a; Zimmerberg y col., 1987). El "patch-clamp" (Hamill y col., 1981) tiene una alta resolución, permitiendo la monitorización de la fusión de las vesículas secretoras individuales con la membrana plasmática y la caracterización del poro de fusión en términos comparables al de canales iónicos (Neher y Marty, 1982). Esta técnica consiste en la medida de la capacidad de la membrana celular, que es directamente proporcional al área de superficie celular. De manera que, cuando se funde una vesícula secretora, el área de la membrana celular (y la capacidad de la membrana) se incrementa en una cantidad igual al área de la membrana de gránulo (Neher y Marty, 1982; Fernández y col., 1984; Lindau y Neher, 1988). Al mismo tiempo se produce un incremento transitorio en la conductancia de la membrana como consecuencia de la formación del poro de fusión. Estas medidas revelaron que la existencia del poro de fusión exocitótico se puede dividir en varias fases. Primero, el poro se abre abruptamente y es inicialmente pequeño (diámetro: 1 ó 2 nm). Después de abrirse, sigue la fase de expansión, caracterizada por amplias fluctuaciones en la conductancia del poro. Estas fluctuaciones denominadas parpadeos ("flickers"), pueden ser breves (ms) o prolongadas (s). El poro termina por expandirse completamente (fusión irreversible), aunque en ocasiones se cierra de nuevo completamente (fusión transitoria) (Fernández y col., 1984; Spruce y col., 1990).

#### **4.1. Apertura del poro de fusión**

El poro de fusión se abre abruptamente con una conductancia similar a la de un canal iónico de alta conductancia (Breckenridge y Almers, 1987a; Spruce y col., 1990). Esta observación apoya la hipótesis de que el poro inicialmente es de naturaleza proteica, similar a un canal iónico que atraviesa las bicapas lipídicas del gránulo secretor y la membrana plasmática

(Almers, 1990; Almers y Tse, 1990). De acuerdo con esto, el poro de fusión resultaría de una estructura en forma de canal iónico preformado que se abre en respuesta a mensajeros celulares.

#### **4.2. Expansión del poro de fusión**

Después de la fusión, el poro comienza a expandirse. Esta expansión respondería al reclutamiento de lípidos en la circunferencia del poro (Spruce y col., 1990; Almers y Tse, 1990) y es dependiente de la temperatura (Spruce y col., 1990). Esta expansión puede ser lenta o rápida y está caracterizada por fluctuaciones rápidas y de gran amplitud en la conductancia del poro (Alvarez de Toledo y Fernández, 1988; Spruce y col., 1990; Monk y col., 1991a). Estas fluctuaciones usualmente finalizan con la expansión irreversible del poro de fusión hasta una conductancia de gran valor, que está por encima del límite detectable de las medidas de conductancia. El valor límite es típicamente de ~ 10 nS, correspondiente a un poro de 20 nm. Una vez que el poro se expande hasta este tamaño, raramente o nunca se cierra. La vida media de los poros de fusión tempranos pudo ser medida en células cebadas de ratón "beige" (mutante con gránulos anormalmente gigantes) y resultó en ~ 200 ms (Monk y col., 1991a).

Después de que la exocitosis es disparada, las vesículas se hinchan debido al flujo osmótico de agua dentro del lumen de la vesícula. Esto hizo pensar que este fenómeno podía ser la fuerza dilatadora del poro. Sin embargo, se ha observado que el hinchamiento osmótico se produce después de que el poro se ha dilatado completamente y por tanto no puede ser la fuerza responsable de la expansión (Monk y col., 1991a). Los factores que determinan la expansión del poro no son conocidos aunque se sabe del papel de los iones  $Ca^{2+}$  a este nivel (Fernández Chacón y Alvarez de Toledo, 1995; Hartmann y Lindau, 1995).

### **4.3. Cierre del poro de fusión**

Un poro de fusión no siempre se expande irreversiblemente sino que a veces se cierra dejando intacta la vesícula secretora dentro de la célula (Fernández y col., 1984). Eventos de fusión transitorios se han observado en células cebadas de ratón "beige" y silvestres (Zimmerberg y col., 1987; Breckenridge y Almers 1987b; Spruce y col., 1990; Monk y col., 1990). A veces, una vesícula puede sufrir muchas fusiones transitorias antes de que se produzca la fusión irreversible final (Breckenridge y Almers 1987b; Alvarez de Toledo y Fernández, 1988; Spruce y col., 1990).

Durante las fusiones transitorias, cuando un poro de fusión conecta un gránulo secretor con la membrana plasmática, hay un flujo de lípidos desde la membrana celular a la membrana del gránulo secretor (Monk y col., 1990). Esta transferencia lipídica a través del poro de fusión, indica que el poro cuando se cierra, es parcial o totalmente lipídico.

## **5. LIBERACIÓN DEL TRANSMISOR**

El desarrollo reciente de nuevas técnicas ha mostrado que la liberación de los productos secretores después de la fusión de membranas es un proceso regulado y tiene un curso temporal complejo. La liberación por exocitosis de gránulos únicos puede ser detectada por amperometría. La amperometría, mide la corriente producida cuando las moléculas de transmisor liberadas son oxidadas por la superficie expuesta de un microelectrodo de fibra de carbono. Esta técnica tiene una sensibilidad y resolución temporal extraordinaria y fácilmente capta la liberación de productos secretores durante eventos exocitóticos únicos. Medidas amperométricas en células cromafines y células cebadas muestran que un

evento de fusión único produce una corriente amperométrica en forma de espiga (Leszczyszyn y col., 1990; Chow y col., 1992; Alvarez de Toledo y col., 1993).

La liberación está retrasada con respecto a la fusión vesicular (Alvarez de Toledo y col., 1993). Este retraso entre la fusión de la vesícula (medida por capacidad) y la aparición del transmisor en el espacio extracelular (medida por amperometría) indica liberación regulada del contenido de la vesícula. El curso temporal de la liberación está afectado por varios procesos: la velocidad de apertura y cierre del poro de fusión y la disociación del transmisor de la matriz del gránulo y su difusión en el medio extracelular.

### **5.1. La expansión lenta del poro de fusión y las fusiones reversibles**

La expansión lenta del poro de fusión puede retrasar el momento en que la vesícula y la membrana se funden completamente y enlentecer la liberación del contenido de la vesícula. Así, aunque la mayor parte del contenido del gránulo se libera de forma sincrónica, con frecuencia la liberación explosiva en forma de espigas va precedida por una fase más lenta de liberación llamada "pie" (foot) de la espiga (Chow y col., 1992; Alvarez de Toledo y col., 1993). El calcio citosólico en células cebadas acorta el periodo de liberación lenta del transmisor al facilitar la expansión del poro de fusión (Fernández Chacón y Alvarez de Toledo, 1995).

Se ha propuesto que un poro de fusión podría abrirse, permitir la descarga del contenido de la vesícula, cerrarse de nuevo y recargarse con transmisor sin fundirse con la membrana plasmática (Ceccarelli y Hulburt, 1980). Este mecanismo de fusión transitoria se denominó "Kiss-and-run" y evita la necesidad de captar nueva membrana por endocitosis para el subsiguiente reciclaje de vesículas (Valtorta y col., 1990). Sin embargo, no

existen datos experimentales concluyentes sobre la existencia de “Kiss-and-run” como el mecanismo fundamental de la liberación de neurotransmisores. Hasta la fecha los resultados más significativos que apoyan esta teoría, han sido obtenidos en células cebadas (Alvarez de Toledo y col.,1993) y cromafines bovinas (Albillos y col.,1997), donde los gránulos secretores pueden transitoriamente fundirse con la membrana plasmática y liberar parte o todo el contenido a través del poro de fusión. Sin embargo, la liberación durante estos eventos es lenta (del orden de varios segundos) debido a las estrechas dimensiones del poro de fusión (Albillos y col.,1997; Alvarez de Toledo y col.,1993; Zhou y col.,1996).

El retraso en la liberación no crea problemas con hormonas que actúan lentamente, por ejemplo a través de proteínas G. En la sinapsis, sin embargo, la velocidad es esencial y las vesículas sinápticas deben liberar su neurotransmisor en fracciones de milisegundos. Parte de esta necesidad se solventa haciendo las vesículas pequeñas, ya que la cinética de la salida de neurotransmisor en una vesícula está determinada por el coeficiente de difusión de la molécula liberada, por la conductancia del poro de fusión y por el tamaño de la vesícula. Así, las vesículas sinápticas, donde las distancias de difusión son pequeñas, podrían vaciarse con una constante de 250  $\mu$ S incluso si un poro de 300 pS no se dilatase del todo (Almers y Tse,1990).

## **5.2. La matriz del gránulo secretor**

La velocidad de secreción también está determinada por los mecanismos que determinan el almacenamiento del transmisor en la vesícula. Los productos de secreción están almacenados de una forma osmóticamente inactiva, condensada en el gel o matriz de proteoglicano (Alvarez de Toledo y col.,1993; Helle,1990). Se han propuesto dos soluciones para explicar el almacenamiento y liberación de transmisores en

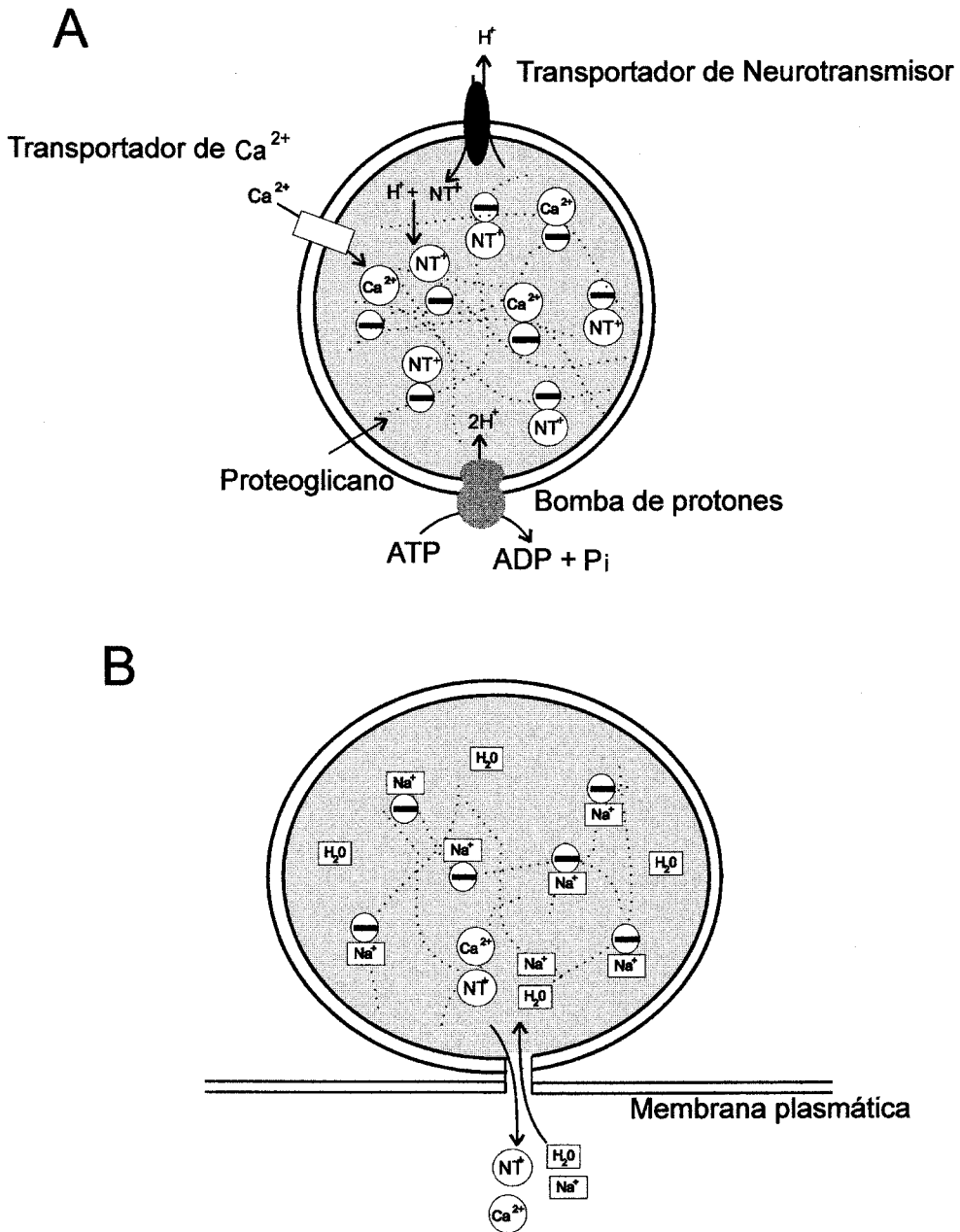


los gránulos secretores.

Uvnäs y Aborg en 1989 propusieron que la matriz del gránulo secretor funciona como una resina de intercambio iónico, donde el almacen y liberación de los productos de secreción se produce por intercambio estequiométrico de los productos de secreción por contraiones. Durante el almacenamiento de los productos secretores (a través de transportadores específicos en la membrana del gránulo), cationes divalentes (como por ejemplo el calcio, la histamina y la serotonina) tienden a neutralizar las cargas negativas fijas de la matriz del grano, provocando un cambio de fase, mientras que durante la liberación, cationes monovalentes del medio extracelular, como el sodio, actúan como contraiones, y tienden a causar expansión al acelerar la disociación de los productos divalentes de la matriz (Uvnäs y Aborg, 1989).

Verdugo (1991) propuso otra solución para almacenar los productos de secreción. Un hidrogel es capaz de responder a pequeños cambios medioambientales (iones, campos eléctricos, luz, temperatura, etc) con grandes cambios en volumen causados por un mecanismo de transición de fase (Tanaka, 1981). El hidrogel podría atrapar los productos secretores, como en una jaula molecular. Se comportaría como una única partícula sin crear gradiente osmótico. De tal manera, que cuando se dispara una transición de fase, una descondensación explosiva fácilmente liberaría los productos de secreción de forma inmediata (Verdugo, 1991).

Es probable que ambos mecanismos contribuyan a la liberación de los productos secretores que están almacenados en el interior de las vesículas.



*Figura 2. Mecanismos de almacenamiento (A) y liberación (B) de transmisor en el interior de vesículas secretoras. Las cargas negativas fijas de la matriz de proteoglicano son compensadas por un número igual de productos secretores catiónicos que se introducen en el interior de la vesícula a través de transportadores y canales iónicos. La apertura del poro de fusión dispara el intercambio iónico con nuevos cationes que arrastran agua y producen la expansión de la matriz.*



## 6. ENDOCITOSIS Y RESTABLECIMIENTO DE LA MEMBRANA CELULAR.

La estimulación de la exocitosis conlleva un aumento de la superficie de la membrana plasmática. Tras este cambio, la célula tiene que restaurar nuevamente la membrana a su estado inicial y reciclar el exceso de membrana para sintetizar nuevas vesículas. Luego, son recargadas con nuevo transmisor presente en el citoplasma circundante, a través de transportadores específicos en la membrana. Entonces están listas para una nueva ronda de exocitosis. Se distinguen dos tipos de sistemas de reciclaje dependiendo del tipo de vesículas de secreción implicadas: el reciclaje mediante endosomas, que experimentan las vesículas sinápticas claras, y el reciclaje mediante el Golgi que llevan a cabo vesículas de núcleo denso. Así, en células cromafines, la exocitosis de catecolaminas a través de vesículas densas es seguida por endocitosis específica de componentes de membrana (Benchimol y Cantin, 1982; Kobayashi y col., 1978; Lingg y col., 1983; Patzak y Winkler, 1986; Phillips y col., 1983). En ambos sistemas de procesamiento, las vesículas son internalizadas mediante la formación de vesículas revestidas de clatrina. Estos sistemas son lentos y tardan en concluir entre varios minutos y algunas horas.

Cuando la membrana vesicular se funde con la membrana celular, las proteínas y los lípidos de ambas proteínas difunden lateralmente y tienden a mezclarse entre sí. Las proteínas difunden 1000 veces más rápido que los lípidos. El tiempo medio que una proteína vesicular tardaría en pasar a la membrana celular desde una vesícula de 25 nm de radio sería 100 ms. Esto quiere decir que si una vesícula sináptica permaneciese fundida más de 100 ms perdería sus proteínas de membrana. Esto implica que un sistema de reciclaje efectivo ha de ser discriminativo a la hora de reciclar membranas para re-sintetizar nuevas vesículas (Uvnäs y Aborg, 1989) y ser capaz de diferenciar las proteínas específicas de las vesículas de aquéllas que no lo son.

Existen dos tipos distintos de endocitosis (Smith y Neher, 1997) que coexisten en células cromafines intactas: una forma denominada captación compensatoria (“compesatory retrieval”) (Engisch y Nowycky, 1998) que secuestra en segundos, una cantidad de membrana equivalente a la añadida durante el estímulo previo, con una constante de tiempo de varios segundos. El otro tipo de endocitosis, más rápida, denominada captación de exceso (“excess retrieval”), requiere de un estímulo muy fuerte, no está mediada por clatrina y es dependiente de calcio y calmodulina (Artalejo y col., 1995; Henkel y Almers, 1996).

Un sistema de endocitosis rápida sería muy útil para restaurar la integridad de la membrana y para rellenar el contingente de vesículas secretoras evitando la etapa posterior de reconocimiento y clasificación molecular de membranas. La formación transitoria de un poro de fusión puede sostener la liberación cuántica de neurotransmisor durante una fusión reversible suficientemente corta ( $500\mu\text{S}$ ) como para evitar la mezcla de proteínas entre dos membranas. Este podría ser el mecanismo subyacente a la endocitosis rápida.

Betz y colaboradores desarrollaron un método óptico para estudiar el tráfico de vesículas en terminales nerviosos (Betz y Henkel, 1994; Betz y Wu, 1995). Un colorante fluorescente FM1-43 de naturaleza lipofílica tiñe la superficie celular del terminal nervioso. Cuando las vesículas son recicladas, la membrana es internalizada y el colorante es una parte de la membrana de la vesícula. Las vesículas internalizadas no se comunican con los compartimentos endosomales para su reciclado sino que mantienen su identidad como sugiere la pérdida de fluorescencia en forma cuantal y no gradual que se esperaría ver si el colorante se repartiese en el interior del endosoma (Murthy y Stevens, 1998).

## **OBJETIVOS**

Un problema aún por resolver en biología celular es cómo se produce la liberación del contenido de vesículas secretoras al espacio extracelular. Este mecanismo es fundamental para la comunicación química entre células. La exocitosis, proceso por el cual, la liberación tiene lugar, comprende una secuencia bien definida. La última y más desconocida etapa de esta secuencia es la fusión de la membrana de la vesícula con la membrana plasmática, la cual da vía libre a los productos secretores contenidos dentro de la vesícula.

En los últimos años, dos nuevas técnicas han proporcionado significativos avances en este campo: métodos electrofisiológicos, para monitorizar cambios en la capacidad de la membrana, cuando se funden las vesículas con la membrana plasmática, y métodos electroquímicos, para detectar los productos secretores liberados. Estas técnicas han contribuido con información única y complementaria, avanzando en el conocimiento

sobre la cinética de fusión y captación de membranas y en la identificación y liberación de productos secretores. En este trabajo nos hemos propuesto utilizar estas dos técnicas simultáneamente sobre la misma célula, lo cual pensamos, nos aportaría información múltiple y complementaria. Además, también quisimos desarrollar y aplicar una nueva técnica, que denominamos **amperometría en parche** y que combina la medida de capacidad en la configuración "in situ" de la técnica de "patch-clamp" con la detección electroquímica por amperometría de los productos secretados. Esta técnica ha resultado ser una herramienta muy poderosa por su alta resolución, para poder estudiar fusiones de vesículas de tamaño de hasta 60 nm de radio, permitiendo por vez primera, el estudio de la etapa final de la exocitosis en células neuroendocrinas a nivel de vesícula única.

Los objetivos específicos del presente trabajo son:

- 1) Estudio de la regulación de la liberación de los productos de secreción, a nivel de las propiedades del poro de fusión y a nivel de la disociación de los productos secretores de la matriz o gel intravesicular.
- 2) Estudio de las características cinéticas del poro de fusión exocitótico hasta etapas muy avanzadas de su expansión.
- 3) Identificación y caracterización de la exocitosis de vesículas únicas en células cromafines de rata.
- 4) Estudio de los eventos de fusión reversibles y su regulación.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. PREPARACIÓN CELULAR**

#### **1.1. Tipos de células**

Para la obtención de los dos tipos celulares utilizados en este estudio se han empleado ratas Wistar macho adultas, de 200-300 gramos de peso.

Los dos tipos celulares utilizados en este estudio han sido las células cebadas peritoneales y las células cromafines. Aunque son muy diferentes en cuanto a origen y función ambas comparten la característica de ser células secretoras, capaces de responder ante un estímulo y liberar el contenido de sus gránulos por exocitosis.

Las células cebadas, también llamadas mastocitos, se originan de las células madre hematopoyéticas y juegan un papel crucial en la inflamación, liberando mediadores que dirigen la acción de neutrófilos, macrófagos y linfocitos. También pueden actuar como mediadores en reacciones alérgicas dependientes de Inmunoglobulinas E. Son fácilmente identificables al

microscopio óptico por su aspecto granuloso y núcleo diferenciado. El diámetro medio de las vesículas secretoras es de  $0,70 \pm 0,23 \mu\text{m}$  (media  $\pm$  desviación estándar) (Helander y Bloom, 1974) lo cual permite una buena resolución de la fusión de las vesículas secretoras usando la técnica de "patch-clamp", así como la determinación de la apertura y expansión de poros de fusión exocitóticos.

Las células cromafines residen en la glándula adrenal y en muchos aspectos parecen neuronas. Derivan de la cresta neural y generan potenciales de acción que disparan la secreción dependiente de la entrada de calcio. Además, estudios morfológicos sugieren un fenotipo polarizado (Carmichael, 1986), donde la entrada sináptica ocurre en el polo neural, y la exocitosis tendría lugar preferentemente en el polo capilar (Carmichael y col., 1989). En cultivo aparecen junto con células de la corteza suprarrenal. Son fáciles de diferenciar de las células corticales por su menor tamaño y superficie lisa, debida a sus diminutas ( $\varnothing \sim 0,25 \mu\text{m}$ ) y numerosas (varios miles) vesículas cargadas de catecolaminas. Estas características convierten a las células cromafines en un modelo excelente para el estudio de la exocitosis en células excitables utilizando la técnica de "patch-clamp" en sus diferentes configuraciones.

## **1.2. Método de extracción de células cebadas**

### **1.2.1. Obtención de células cebadas**

Se utilizó una sola rata por preparación. Los animales se anestesiaron con cloroformo (Panreac), se decapitaron y se desangraron para evitar la presencia de eritrocitos en el lavado peritoneal. Se inyectó en la cavidad peritoneal ~10-20 ml de la solución de extracción. Se realizó un suave masaje manual durante unos minutos de la pared abdominal para ayudar al desprendimiento de las células cebadas peritoneales. Una



pequeña incisión en la cavidad peritoneal permitió el acceso con una pipeta Pasteur para aspirar el líquido peritoneal, que fue centrifugado a temperatura ambiente a 800 r.p.m. durante 2 minutos. Se aspiró el sobrenadante y el "pellet" que debe estar libre de eritrocitos, se resuspendió en solución de extracción.

### **1.2.2. Mantenimiento de células cebadas**

Las células obtenidas se sembraron en camaritas de vidrio. Cada camarita contiene un pocillo cuyo fondo es un cubreobjeto y en donde se deposita ~200 µl de la suspensión celular. Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C , 5% CO<sub>2</sub> y 95% de aire . Tras una hora, las células están firmemente adheridas al fondo de la cámara, realizándose los experimentos electrofisiológicos hasta ocho horas después de la siembra.

### **1.3. Método de extracción de células cromafines**

#### **1.3.1 Obtención de glándulas suprarrenales**

Se utilizaron 2 ratas por preparación. Los animales se anestesiaron con cloroformo en campana de cristal, se sacrificaron con guillotina y se desangraron. Se sujetaron a un corcho por sus extremidades y se les abrió la cavidad peritoneal dejando al descubierto los órganos internos. En primer lugar, se procedió a perfundir al animal para evitar eritrocitos en la dispersión celular, los cuales acortan el tiempo de vida del cultivo probablemente al difundir sustancias tóxicas durante la hemólisis. Se mantuvo el corazón al descubierto con la ayuda de unas pinzas separadoras y se le dió un corte a nivel de la aurícula derecha para permitir la salida de la sangre (puede usarse una bomba de succión para mantener el campo limpio) mientras, con jeringa de 50 ml y aguja se inyectó lentamente solución salina 0,9% (4°C) a

través del ventrículo izquierdo. Se produjo un aclaramiento del color de los pulmones, hígado y riñones. Generalmente de 75-100 ml fue suficiente para conseguir una buena perfusión de las glándulas adrenales.

Las glándulas, fácilmente localizables por su posición suprarrenal y recubierta de tejido adiposo, se sujetaron con pinza curva o mosquito. Una incisión superficial y longitudinal con una hoja de bisturí permitió que la glándula completa salga de su cápsula con facilidad al estrangularla con unas pinzas finas y rectas por su base. Las glándulas recién extraídas se depositaron sobre una placa de Petri (35 mm  $\varnothing$ ) con solución de extracción a 4°C.

### **1.3.2. Dispersión celular**

El tratamiento de las glándulas comenzó con digestión enzimática con colagenasa. Las glándulas se depositaron en 2 ml de medio de dispersión y se incubaron en un baño (Unitronic 320 OR, Selecta, España) a 37°C durante 20 minutos en suave agitación. Una pipeta Pasteur se usó para dispersar mecánicamente el tejido glandular durante unos minutos mediante una suave secuencia de aspiración y eyección. Después, una nueva etapa enzimática de 10 minutos en las mismas condiciones permitió que el tejido se disgregara casi completamente. Se recuperó la solución de dispersión evitando tomar los fragmentos de tejido sin digerir, y se depositó en un tubo de centrifuga de 15 ml que se rellenó hasta 10-14 ml con solución de extracción. Se centrifugó 10 minutos a 800 r.p.m. a 4°C de temperatura (centrifuga refrigerada Sorvall RT6000B) y tras eliminar el sobrenadante se resuspendió en otros 10-14 ml de solución de extracción. Se centrifugó nuevamente otros 10 minutos en las mismas condiciones. El "pellet" resultante se resuspendió en 2 ml de medio de cultivo.

El medio de cultivo empleado fue DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) sin glutamina y con 4.5 G/L Glucosa (Bio-Whittaker). Como suplementos se utilizaron penicilina (50 u.i./ml), estreptomicina (50 u.i./ml), 10% de suero bovino fetal y 1% de v/v l-glutamina.

### **1.3.3. Siembra y mantenimiento del cultivo celular**

La suspensión celular se sembró en cubres cubiertos con poli-L-lisina contenidos en placas de Petri de poliestireno estéril. Se mantuvieron 30-60 minutos a 37°C, 95% aire y 5%CO<sub>2</sub> en una cámara de incubación (Hucöa-Erloss) para que las células se fijaran al soporte. Finalmente, se añadió medio de cultivo a las placas de Petri hasta completar un volumen final de unos 2 ml. Veinticuatro horas después de la siembra, se hizo un cambio (~75% del volumen) de medio de cultivo. Las células permanecieron en condiciones de cultivo hasta su empleo en los experimentos electrofisiológicos generalmente entre el segundo y el sexto día después de la dispersión.

La dispersión y siembra celular se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar (Gelaire VB85, Gelman Instruments, Italia) y utilizando material estéril de un sólo uso.

### **1.3.4. Preparación de soportes para la siembra celular**

La preparación de soportes consistió en el revestimiento de cubreobjetos con un polímero de alto peso molecular (>300.000 D) que favorece la adhesión celular. Para ello, cubreobjetos de vidrio (nº 1) fueron cortados con una punta de diamante en trozos rectangulares y sumergidos en etanol (Panreac) al 90%, durante al menos 10 minutos, para eliminar impurezas. A continuación, se lavaron con agua desionizada, se secaron en

campana de flujo laminar y se flamearon en un mechero bunsen. Después, se depositaron en una solución con 1 mg/ml de poli-L-lisina (sal hidrobromuro, P-1524, Sigma) y 19 mg/ml de tampón tris(hidroximetil)aminoetano, pH: 8,5. Transcurridos al menos 30 minutos en esta solución los cubreobjetos se lavaron con agua desionizada y se dejaron secar. Por último se depositaron en placas de Petri de 35 mm listos para la siembra.

## **2. SOLUCIONES**

El agua utilizada para la preparación de las soluciones fue tratada mediante ósmosis inversa (Milli-Ro 6 Plus, Millipore) y desionizada en resina de intercambio iónico (Milli-Q Plus, Millipore), con una resistividad de 18.2 M $\Omega$  cm<sup>-1</sup>. Los reactivos químicos fueron adquiridos a Sigma. Durante la preparación de las soluciones se fue monitorizando el pH con pHmetro (MicroPH 2002 Crison). La osmolaridad de las soluciones fue medida con un osmómetro de presión de vapor (Wescor 5500, Utah, EE.UU.). Las soluciones fueron almacenadas a 4°C y filtradas con filtros de 0.2  $\mu$ m de  $\phi$  (Acrodisc, GelmanSciences). La glucosa fue añadida a las soluciones previo a su uso.

### **2.1. Soluciones externas**

#### **2.1.1 Soluciones de extracción, incubación y dispersión.**

La composición de las soluciones de extracción se detalla en la Tabla I. Para la preparación de **células cebadas** la solución de extracción es también la solución de incubación. A la solución externa se le añadió 6 mM de glucosa y se mantuvo una hora a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire. En estas condiciones la presión parcial de dióxido de carbono es de 38 mm Hg y el pH final esperado de la solución carbonatada es ligeramente básico

(7,69). El pH se ajustó con NaOH a 7.25 y la osmolaridad osciló entre 335-350 mmol.Kg<sup>-1</sup>.

Par la preparación de **células cromafines**, el pH de la solución de extracción, se ajustó a 7,4 con NaOH y la osmolaridad osciló entre 300-310 mmol.Kg<sup>-1</sup>. Se añadió 5,6 mM de glucosa, se filtró e incubó a 37°C antes de usar. La solución de dispersión de células cromafines es la misma solución de extracción filtrada a la que se le añade 1,5 mg/ml de colagenasa tipo A y 3 mg/ml de albúmina bovina. La solución de sembrado e incubación se compone de medio DMEM, 10% de suero bovino fetal, 1% de penicilina-estreptomicina y 1% de l-glutamina.

La tabla siguiente muestra la composición (en mM) de las soluciones de extracción de células cromafines y cebadas:

**Tabla I**

Solución de extracción (en mM)								
	ClNa	HEPES	KOH	Cl <sub>2</sub> Mg	Cl <sub>2</sub> Ca	CO <sub>3</sub> HNa	HPO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub>	ClK
Mastocitos	140	10	3	2	1	45	0,4	-
Cromafines	154	10	-	-	-	3,6	-	5,6

### 2.1.2. Solución externa de registro

La siguiente tabla muestra la composición (en mM) de las soluciones externas de registro para ambos tipos celulares.

**Tabla II**

Solución externa (en mM)							
	ClNa	HEPES	KOH	Cl <sub>2</sub> Mg	Cl <sub>2</sub> Ca	KCl	Glucosa
Cromafines	140	10	-	1	10	2,7	10
Mastocitos	140	10	3	2	1	-	10

El pH se ajustó a 7,25 con NaOH y la osmolaridad fue de 310 mmol.Kg<sup>-1</sup>

En los experimentos de amperometría en parche, la **solución de la pipeta** tuvo la siguiente composición (en mM):

**Tabla III**

Solución de la pipeta (en mM)							
	Cl <sub>2</sub> Ba	Cl <sub>2</sub> Ca	CITEA	ClNa	Cl <sub>2</sub> Mg	FNa	HEPES
Mastocitos	5	-	100	30	1	20	10
Cromafines ("bajo calcio")	-	5	100	50	1	-	10
Cromafines ("alto calcio")	-	90	40	-	-	-	10

En cromafines se utilizaron dos soluciones de la pipeta distintas. Una solución de "bajo calcio" y otra de "alto calcio". En algunas ocasiones, en la solución de "alto calcio" se sustituyó el calcio por bario y en otras se utilizó una concentración intermedia de calcio (20 mM Ca<sup>2+</sup> y 35 mM Na<sup>+</sup>).

## 2.2. Soluciones internas

La composición de la solución interna estandar para dializar las **células cébadas** durante los experimentos de célula completa, queda reflejada en la tabla IV. La desgranulación de las células fue inducida por GTP $\gamma$ -S (sal tetralítica de 3-tiotrifosfato de guanosina), un análogo no hidrolizable del GTP.

**Tabla IV**

Solución interna (en mM)						
Glutamato Potásico	Cl <sub>2</sub> Ca	HEPES	KOH	Mg-ATP	EGTA-K <sub>2</sub>	GTP $\gamma$ -S
125	7	10	3	0,2	0,07	0,005-0,1

### 2.2.1. Soluciones con distinta concentración de calcio libre

Las distintas concentraciones de calcio libre empleadas en las soluciones internas de los experimentos realizados en la configuración de célula completa de la técnica de "patch-clamp", se obtuvieron con la combinación de tampón de EGTA (N,N,N', N', ácido tetraacético etilen-glicol bis ( $\beta$ - aminoetil eter)) y Ca<sup>2+</sup>. Se prepararon dos soluciones, una de tampón de EGTA-K<sub>2</sub> y otra de EGTA-Ca<sup>2+</sup> y la combinación de ambas en determinada proporción resulta en la concentración de calcio deseada (Neher, 1988).

El protocolo para preparar los tampones de EGTA parte de una solución de EGTA , 200 mM, titulada con KOH hasta un pH de 6,5. La mitad de esta solución se diluyó a 100 mM, llevada hasta un pH de 7,2 y

almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  como la sal de potasio. La otra mitad de la solución sirvió para la elaboración de la sal de calcio. El proceso se monitorizó en un pHmetro. Se añadieron volúmenes pequeños de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  y para cada adición se tituló el pH hasta 6,5 con KOH. Cuando el EGTA estuvo cercano a su saturación que es cuando un mol de KOH neutraliza la modificación de pH producida por un mol de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , la solución se diluyó a 100 mM y almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

En los experimentos donde se estudió el efecto de la concentración del calcio sobre la exocitosis en células cebadas se utilizaron distintas combinaciones de las soluciones tampones de EGTA. La constante de disociación ( $K_D$ ) del EGTA a  $25^{\circ}\text{C}$  y pH: 7,2 es de  $0.15\ \mu\text{M}$  (Grynkiewicz y col., 1985). Las concentraciones de calcio libre de las soluciones internas se determinaron por microfluorimetría, mediante la emisión de fluorescencia de un indicador fluorescente, el fura-2 (Molecular Probes, EE.UU), que es sensible a la concentración de calcio. Se siguió el protocolo descrito por Marín, 1995.



### **3. TÉCNICAS ELECTROFISIOLÓGICAS PARA EL ESTUDIO DE LA EXOCITOSIS**

Los estudios electrofisiológicos han permitido un avance considerable en el conocimiento de fenómenos que transcurren a nivel celular y molecular, mediante el registro de corrientes eléctricas que fluyen a través de las membranas biológicas. La secreción, un fenómeno celular básico que, clásicamente se ha estudiado con métodos bioquímicos a partir de una población celular, es un ejemplo de ello. Hoy en día, el empleo de técnicas electrofisiológicas permite visualizar en tiempo real y con alta resolución la fusión de vesículas secretoras individuales con la membrana plasmática.

#### **3.1. Modelo eléctrico de la membrana**

La membrana plasmática está compuesta de una bicapa molecular de lípidos en la cual están insertadas proteínas integrales de membrana a través de las cuales permean los iones, los canales iónicos. La electrofisiología aprovecha la cualidad de las membranas biológicas de comportarse desde el punto de vista eléctrico como un circuito RC en paralelo. Los canales iónicos inmersos en la bicapa lipídica se comportan como una resistencia eléctrica y la bicapa como un dieléctrico impermeable al paso de iones, separadora de los medio intra y extracelular, constituyendo el componente capacitativo de la célula.

#### **3.2. Capacidad de la membrana**

La membrana plasmática es capaz de generar ante un cambio de voltaje, una corriente capacitativa y comportarse como un condensador eléctrico, en la cual los medios intra y extracelular son las placas del

condensador y la propia bicapa lipídica, el dieléctrico. Por tanto, la capacidad de una célula viene dada, al igual que en un condensador, por la siguiente expresión:

$$C = \epsilon \epsilon_0 \times \frac{S}{d} \quad (1)$$

donde  $\epsilon$  es la constante dieléctrica del material aislante que separa los medios intra y extracelular, es decir la bicapa fosfolipídica, su valor es de  $18,6 \times 10^{-12} \text{ CV}^{-1}\text{m}^{-1}$ . La constante dieléctrica del espacio ( $\epsilon_0$ ) vale  $8,85 \times 10^{-12} \text{ CV}^{-1}\text{m}^{-1}$ .  $d$  es la distancia que separa las placas del condensador, es decir el grosor del dieléctrico que en el caso de una bicapa lipídica es de unos 5 nm. Al ser estos, parámetros constantes, existe una relación directa entre la superficie de la membrana celular ( $S$ ) y la capacidad eléctrica de la membrana celular ( $C$ ). Modelando la membrana biológica como un condensador, la capacidad específica de la membrana pudo ser calculada (y experimentalmente medida) en un valor de  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  (Cole, 1968).

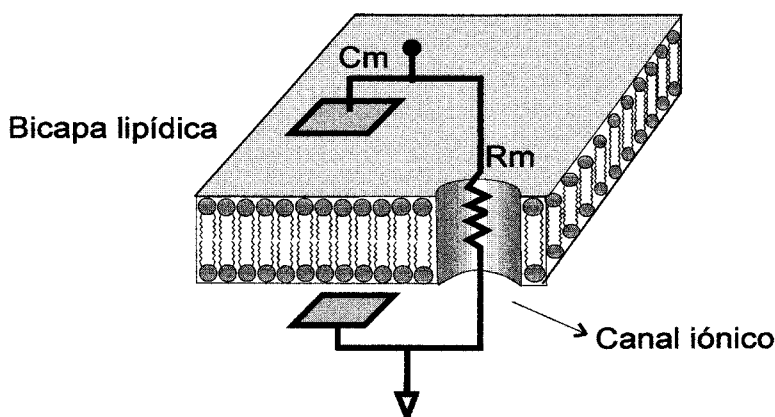


Figura 3. La membrana plasmática representada por un circuito eléctrico equivalente constituida por una resistencia ( $R_m$ ) y una capacidad ( $C_m$ ) en paralelo.

### 3.3. La técnica de “patch-clamp” para el estudio de la exocitosis

La técnica de “patch-clamp” (Neher y col., 1978 Hamill y col., 1981) permite monitorizar cambios en los parámetros eléctricos celulares. Así, es posible resolver la corriente que fluye a través de un canal iónico único y registrar las corrientes iónicas generadas en la totalidad de la membrana celular mediante fijación de voltaje. Alternativamente, se pueden monitorizar los cambios en el potencial de membrana de una célula en respuesta a corrientes que fluyen a través de canales iónicos, mediante fijación de corriente. El otro parámetro eléctrico que puede ser monitorizado es la capacidad de la membrana celular que, al ser indicativa del área de la superficie de la membrana plasmática, puede ser usada para detectar la actividad exocitótica y endocitótica de células secretoras (Neher y Marty, 1982; Lindau y Neher, 1988).

La técnica de “patch-clamp” consiste en el aislamiento de un área o parche de membrana celular circunscrito por una micropipeta de vidrio. La pipeta, estirada y pulida con calor, se acerca a la superficie celular. Se aplica una ligera presión negativa al interior de la pipeta que hace que parte de la superficie de la membrana se invagine en la pipeta y se produzca un sello eléctrico ( $>1\text{G}\Omega$ ) que permite registrar la corriente eléctrica de la membrana fijando el potencial a su través. La corriente generada en la membrana se amplifica en un conversor corriente-voltaje que tiene una resistencia de retroalimentación muy alta ( $5\text{G}\Omega$ ). Mediante esta técnica se puede medir la corriente total que fluye a través de la membrana que es corriente iónica y corriente capacitativa.

Existen diferentes configuraciones de la técnica “patch-clamp”. Cuando se obtiene un gigasello entre la pipeta y la membrana plasmática obtenemos la configuración de “cell-attached” o registro “in situ”, que es

la configuración de partida para las demás configuraciones de “patch-clamp”. Si una vez establecido el sello de alta resistencia se aplica succión es posible romper el parche de membrana aislado y acceder al interior de la célula, sin que la resistencia del sello entre la membrana y la pipeta se deteriore, esta configuración se llama registro de **célula completa** o “**whole-cell**”.

La figura 4 representa el circuito equivalente de una célula en la configuración de “whole-cell”.  $C_p$  representa la suma de la capacidad de la pipeta y otras fuentes de capacidad a la entrada del amplificador de registro y suele ser del orden de varios picofaradios, puede ser cancelada usando el circuito de compensación de la pipeta del amplificador.  $R_s$  es la resistencia de acceso o resistencia en serie, que se debe a la geometría de la pipeta y a cualquier obstrucción de la pipeta por membrana adherida. El valor  $R_s$  es típicamente del orden de  $10\text{ M}\Omega$ . Su recíproco en términos de conductancia se denota como  $G_s$ .  $C_M$  es la capacidad de la membrana y  $R_M$  es la resistencia de la membrana y viene determinada por las propiedades de los canales iónicos dentro de la membrana.  $R_M$  no es lineal a potenciales que activen los canales dependientes de voltaje en células excitables.  $R_M$  es del orden de  $1\text{ G}\Omega$ . Su recíproco se denota como  $G_M$ .

Cuando se aplica un voltaje a la membrana aislada por la pipeta se genera una corriente eléctrica. Esta corriente es suma de los componentes resistivo ( $I_R$ ) y el capacitativo ( $I_C$ ) de la membrana,

$$I = I_R + I_C \quad (2)$$

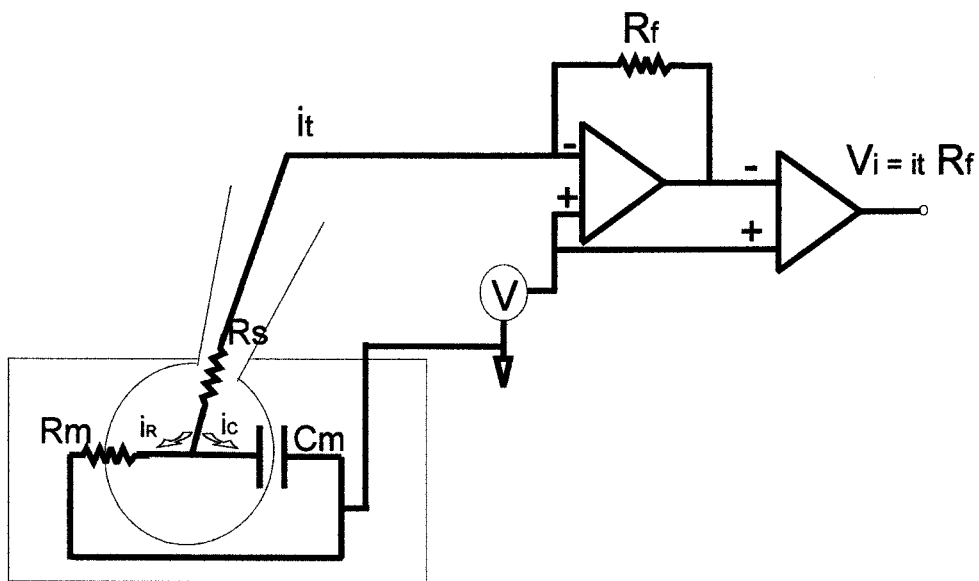


Figura 4. La técnica de "patch-clamp". La pipeta en la configuración de célula completa está conectada a la entrada inversora del convertidor I/V. El voltaje  $V$  es aplicado a la entrada no inversora del amplificador operacional. La corriente  $i_t$  fluye por la pipeta. La corriente total ( $i_t$ ) generada tiene dos componentes, el componente resistivo ( $i_R$ ) y el componente capacitativo ( $i_c$ ).

En términos de voltajes, considerando que la corriente en la rama del condensador es proporcional a la derivada del cambio de potencial a través del condensador, puede escribirse de la siguiente forma:

$$I = C_m \frac{dV}{dt} + \frac{V}{R_m} \quad (3)$$

La técnica de “patch-clamp” permite registrar tanto corriente iónica resultado de un incremento en la conductancia de la membrana celular, por ejemplo, un canal iónico que se abre, como corriente capacitativa resultado de un incremento de la superficie de la membrana plasmática.

Existen distintos métodos para detectar y cuantificar cambios en la corriente total de la célula que sean debidos única y exclusivamente a incrementos de capacidad eléctrica.

### **3.3.1. Métodos de medida de capacidad en células excitóticas**

Las técnicas de medida de capacidad eléctrica se clasifican atendiendo al tipo de estímulo empleado. La **técnica de dominio temporal** utiliza como estímulo un pulso cuadrado. Las técnicas más usadas por su alta resolución en la medida de capacidad son las que utilizan una excitación sinusoidal, son las llamadas de **dominio de la frecuencia**.

#### **3.3.1.A) Técnicas de dominio del tiempo**

En condiciones de fijación de voltaje, Lindau y Neher (1988) aplicaron un pulso de voltaje cuadrado ( $V_o$ ) como señal comando a una célula en la configuración “in situ” de la técnica de “patch-clamp”. La respuesta de

corriente ( $I$ ) es la suma de una corriente de estado estacionario ( $I_{ss}$ ) y un transiente que decae en forma exponencial, según la ecuación:

$$I(t) = (I_o - I_{ss}) \cdot (e^{-t/\tau}) \pm I_{ss} \quad (4)$$

$$I_o = \frac{V_o}{R_s}, I_{ss} = \frac{V_o}{(R_s + \frac{1}{G_M})}, \tau = \frac{C_M}{(G_M + \frac{1}{R_s})}$$

$C_M$ ,  $G_M$  y  $R_s$  pueden obtenerse fácilmente a partir de  $I_o$  (amplitud de la corriente),  $I_{ss}$  y  $\tau$  (constante de tiempo), simplemente haciendo un ajuste exponencial de acuerdo a la ecuación anterior. Esta técnica permite determinar cambios de capacidad y conductancia usando pulsos repetidos pero tiene una muy pobre resolución temporal (una medida de capacidad cada 100 ms). La resolución en la medida de capacidad es del orden de 0.1 pF lo que únicamente permite realizar medidas de capacidad en la modalidad de célula completa, sin que se puedan resolver eventos únicos de excitosis

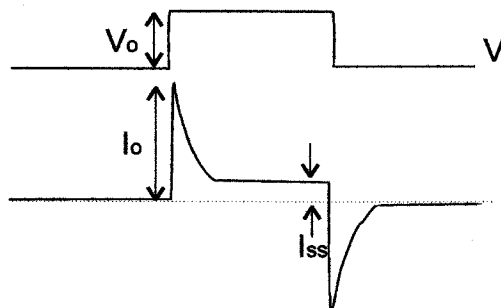


Figura 5. Respuesta de corriente frente a un pulso de voltaje cuadrado

### 3.3.1.B) Técnicas de dominio de la frecuencia

Las técnicas de **dominio de frecuencia**, de medida de capacidad no intentan determinar los tres parámetros  $C_M$ ,  $G_M$  y  $R_S$  sino que asumen que a una determinada frecuencia pequeños cambios en  $G_M$  y  $R_S$  tienen poco efecto en la determinación de los cambios en  $C_M$ . De entre éstas, se empleó en nuestros registros la técnica de Neher y Marty (Neher y Marty, 1982) por su alta resolución en la medida de capacidad.

En condiciones de fijación de voltaje, se aplica a la célula una onda sinusoidal, superpuesta sobre un nivel constante de voltaje y se mide la corriente resultante.

Para un circuito equivalente de tres elementos de una célula en la configuración de célula completa, la corriente ( $I$ ) debida a un estímulo de voltaje sinusoidal, viene dada por:

$$I = V \cdot Y = V \cdot \frac{G_M + j\omega C_M}{G_M/G_S + j\omega C_M/G_S + 1} \quad (5)$$

Donde  $V$  es el voltaje aplicado ( $V = V_{\text{com}}(\omega t)$ ) e  $Y$  es la admitancia (inversa de la impedancia) total de la célula, suma de la admitancia resistiva y la capacitativa\*.

(\* Ver Apendice I)



A nosotros, nos interesa aislar el componente de la corriente total que sea proporcional sólo a cambios de capacidad. Sin embargo, cambios en cualquiera de los parámetros  $C_M$ ,  $G_M$  y  $G_S$  producirán cambios en la corriente a través de la membrana celular. A partir de la ecuación 4, matemáticamente no es posible aislar el componente de la corriente proporcional a la capacidad. El cambio total en corriente  $\Delta I$  puede ser separado en los siguientes componentes:

$$\Delta I = \Delta I_{Gm} + \Delta I_{Cm} + \Delta I_{Gs} \quad (6)$$

Donde  $\Delta I_{Cm}$ ,  $\Delta I_{Gs}$  y  $\Delta I_{Gm}$  son los cambios que ocurren debido a pequeños cambios en  $Cm$ ,  $Gs$  y  $Gm$  respectivamente. Los componentes relevantes de la corriente de  $\Delta I$  vienen dados por sus derivadas parciales:

$$\Delta I_{Gm} = \frac{\partial I}{\partial Gm} \cdot \Delta Gm = V \cdot B^2(\omega) \cdot \Delta Gm \quad (7)$$

$$\Delta I_{Cm} = \frac{\partial I}{\partial Cm} \cdot \Delta Cm = V \cdot j\omega \cdot B^2(\omega) \cdot \Delta Cm \quad (8)$$

y

$$\Delta I_{Gs} = \frac{\partial I}{\partial Gs} \cdot \Delta Gs = V \cdot \frac{(Gm + j\omega Cm)^2}{Gs^2} \cdot B^2(\omega) \cdot \Delta Gs \quad (9)$$

donde,

$$B(\omega)^2 = \frac{1}{(1 + G_m/G_s + j\omega C_m/G_s)^2} \quad (10)$$

La aproximación lineal establece que pequeños cambios en cada uno de los tres parámetros induce cambios en la corriente sinusoidal dada por:

$$\Delta I \approx \left[ \frac{\partial I}{\partial G_s} \cdot \Delta G_s + \frac{\partial I}{\partial G_m} \cdot \Delta G_m + \frac{\partial I}{\partial C_m} \cdot \Delta C_m \right] \quad (11)$$

La ecuación 11 es válida para pequeños cambios en los parámetros. Cuando los cambios son acumulativos, las derivadas parciales pueden ser redeterminadas. Grandes cambios de cualquiera de los parámetros, sin embargo, cambia los valores de las derivadas parciales. En la práctica, es necesario que un cambio en la corriente sinusoidal pueda relacionarse con un cambio en la capacidad y distinguir cambios de  $C_M$  de los que se originan por desviaciones en  $G_M$  y  $G_S$ . Para ello, se usa un detector de fase.

### 3.3.2. Detección de fase

El detector de fase separa el componente capacitativo del resistivo de la corriente y determina los valores de  $G_M$ ,  $G_S$  y  $C_M$ . Estas operaciones las puede realizar un amplificador Lock-in.

#### 3.3.2. A) Separación de los componentes resistivo y capacitativo por un detector de fase

El detector suministra una onda sinusoidal (señal de referencia) que

es una señal comando ( $V_{com}$ ) a la célula, y recibe una corriente sinusoidal que esta en desfase con respecto a  $V_{com}$ .

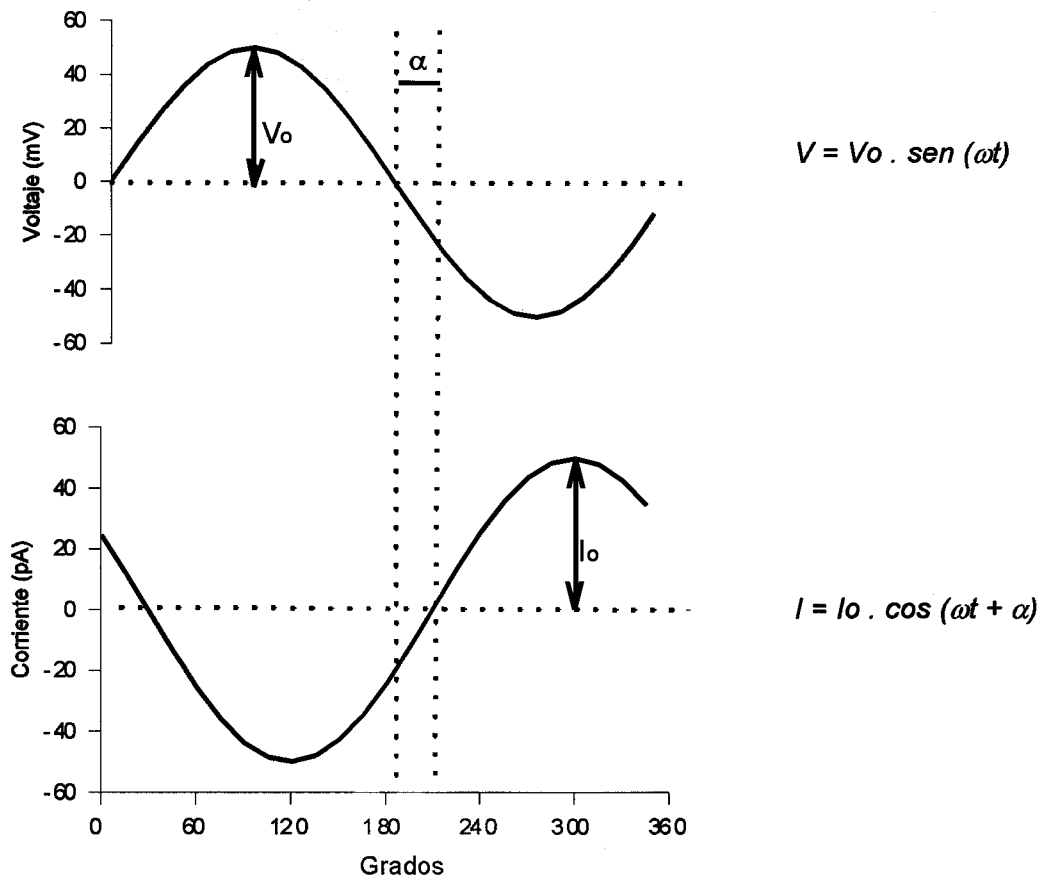


Figura 6. Las dos señales sinusoidales del voltaje y de la corriente resultante están desfasadas entre si un cierto ángulo que depende de los valores de  $C_M$ ,  $G_M$  y  $G_S$  de la célula.

Señales que varían en el tiempo con periodicidad sinusoidal se suelen representar en el plano complejo de forma vectorial. Cada vector consta de dos partes : la parte real y la parte imaginaria.

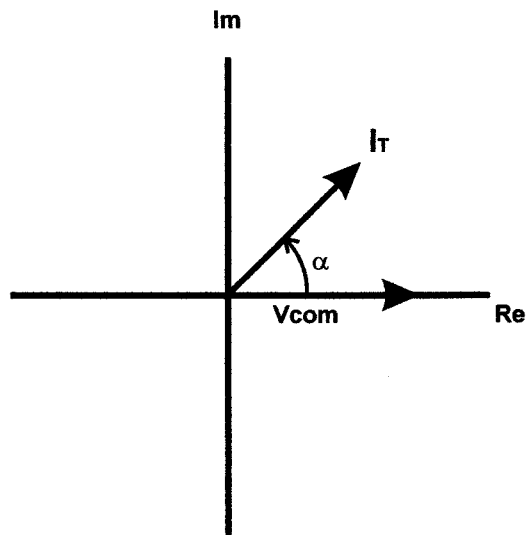


Figura 7. La corriente podemos representarla en el plano complejo como un vector definido por dos parámetros: una magnitud y un ángulo de fase. Los ejes de ordenada y abcisa representan el eje imaginario y real respectivamente.  $V_{com}$  está definido por tener un ángulo de fase de  $0^\circ$  y sirve como señal de referencia para  $I_T$ .

El componente resistivo de la corriente vendrá dado por la ecuación:

$$I_R = \frac{V}{R} = V_o \cdot \frac{\text{sen}(wt)}{R} \quad (12)$$

y el componente capacitativo:

$$I_C = C \cdot \frac{\partial V}{\partial t} = \frac{\partial (V_o \cdot \text{sen}(\omega t))}{\partial t} \quad (13)$$

luego,

$$I_t = V_o \cdot \frac{\text{sen}(\omega t)}{R} + C V_o \cdot \cos(\omega t) =$$

$$I_t = V_o \cdot \frac{\text{sen}(\omega t)}{R} + C V_o \cdot \text{sen}(\omega t + 90^\circ) \quad (14)$$

El vector de corriente total se puede descomponer en suma de dos vectores:  $I_C$  e  $I_R$ . Según la última ecuación el componente de la corriente proporcional a la capacidad está adelantado  $90^\circ$  con respecto al componente proporcional a la resistencia y el voltaje. En el plano complejo  $I_C$  está sobre el eje imaginario e  $I_R$  en el eje real.

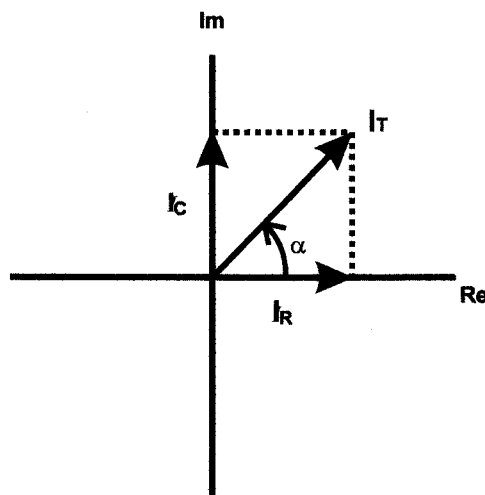


Figura 8. Representación en el plano complejo de los componentes vectoriales ( $I_C$  e  $I_R$ ) de la corriente total. El vector  $I_R$  está en fase con el voltaje.

La corriente capacitativa y resistiva es electrónicamente compensada antes de aplicar la señal de voltaje sinusoidal en el amplificador de “patch-clamp” sustrayendo una señal ajustable antes del paso de amplificación final. El detector capta sólo señales debidas a incrementos de corriente total ( $\Delta I$ ) y las separa en sus componentes ( $\Delta I_C$  e  $\Delta I_R$ ). Esta separación se hace digitalmente al multiplicar la corriente total por dos señales sinusoidales desfasadas entre si  $90^\circ$  e integrar un ciclo completo. Estas dos señales son el  $\sin(\omega t)$  y  $\cos(\omega t)$ .

$$I = I_R + I_C = V_o \cdot \frac{\sin(\omega t)}{R} + C V_o \omega \cdot \cos(\omega t) \quad (15)$$

$$I_C = \int \frac{1}{R} \cdot V_o \cdot \sin(\omega t) \cdot \cos(\omega t) + \int C V_o \cdot \omega \cdot \cos(\omega t) \cos(\omega t) = C V_o \quad (16)$$

$$I_R = \int \frac{1}{R} \cdot V_o \cdot \sin(\omega t) \cdot \sin(\omega t) + \int C V_o \cdot \omega \cdot \cos(\omega t) \sin(\omega t) = \frac{1}{R} V_o \cdot dt \quad (17)$$

En la ecuación 16 el término  $1/R \cdot V_o \cdot \sin(\omega t) \cdot \cos(\omega t) = 0$ , por lo que  $I_C$  viene dado por el componente capacitativo, mientras que  $I_R$  viene dado por el componente resistivo ya que el término  $C V_o \cdot \omega \cdot \cos(\omega t) \sin(\omega t) = 0$  en la ecuación 17.

### 3.3.2.B) Cuantificación de los valores de $G_M$ , $G_S$ y $C_M$ mediante un detector de fase

La derivada parcial de  $Y$  respecto a  $C_M$  viene dada por la expresión:

$$\Delta I_C = V \cdot \frac{\partial Y}{\partial C_M} \Delta C_M = \frac{1}{(1 + G_M/G_S + j\omega C_M/G_S)^2} \quad (18)$$

El paso más crítico para medir la capacidad de la membrana celular con la técnica de detección de fase es determinar el ángulo de fase del vector  $\Delta I_C$ . De la última expresión, el vector  $\Delta I_C$  se puede separar matemáticamente en su parte real e imaginaria y calcular su módulo y argumento:

$$\theta = \arg(\Delta I_C) = \arctan \frac{\text{Im}(\Delta I_C)}{\text{Re}(\Delta I_C)} = 180^\circ - 2 \tan^{-1} \left( \frac{\omega C_M}{G_M} \right) \quad (19)$$

Respecto al componente resistivo de la corriente, el vector proporcional a los cambios en la conductancia de la membrana plasmática  $\Delta I_{Rm}$  puede despreciarse puesto que en las células cebadas no hay canales dependientes de voltaje y contribuye muy poco a los cambios que experimenta la corriente y en las células cromafines los canales iónicos dependientes de voltaje no se activan a las altas frecuencias de estimulación utilizadas.

Al argumento del vector  $\Delta I_C$  le llamaremos ángulo de fase ( $\theta$ ) y en el plano complejo se sitúa sobre el eje imaginario y está a  $90^\circ$  del vector de referencia o voltaje, mientras que el argumento del vector  $\Delta I_R$  ( $\theta - 90^\circ$ ) está

a  $90^\circ$  coincidente con el eje real. Un amplificador Lock-in descompone la admitancia total en sus dos componentes real e imaginario que son proporcionales a  $\Delta I_R$  e  $\Delta I_C$ . Así, la fusión de una vesícula producirá un cambio en la corriente que sólo se observará en el trazo del componente imaginario mientras que el real permanecerá inalterable.

Sin embargo, en el inicio de un experimento, la posición de los vectores  $\Delta I_R$  e  $\Delta I_C$  en el plano complejo respecto a nuestra referencia (V) es desconocida y luego durante su transcurso puede también variar significativamente, provocando que un cambio en capacidad se refleje no sólo en el componente imaginario sino en el real. Hace falta detectar cuál es el ángulo de fase respecto al voltaje y mover los ejes de referencia hasta hacer que el vector  $\Delta I_R$  esté en fase sobre el eje real y el vector  $\Delta I_C$  sobre el eje imaginario.

La detección del ángulo de fase se lleva a cabo utilizando una técnica conocida como "phase tracking" (Fidler y Fernández, 1989). La técnica del "phase tracking" es una técnica que permite ajustar la fase al conectar una resistencia en serie conocida con la célula, entre el electrodo del baño y la tierra. Un interruptor conectado en paralelo con la resistencia y la tierra puede ser transitoriamente abierto, causando un cambio proporcional y conocido de  $\Delta I_R$ . A partir del cuál se determina el módulo y argumento, y como está  $90^\circ$  desfasado de  $\Delta I_C$ , se puede localizar también éste. Se elimina el desfase de forma aritmética con una simple sustracción de ángulos para llevar los vectores en fase con el voltaje. En nuestro sistema un pulsador provoca un cambio de 100 fF de capacidad a partir del cual se localiza la posición del vector  $\Delta I_C$ . Además este cambio provocado y conocido nos permite tener una calibración para convertir el cambio en corriente en un cambio equivalente de capacidad.



para la medida de capacidad es del orden de 1 fF y permite la identificación de eventos de fusión de gránulos únicos de un diámetro de hasta 300 nm (Neher y Marty 1982; Nüsse y Lindau 1988).

### 3.4. Medida de la conductancia del poro de fusión excitotóxico

Cuando una vesícula se funde con la membrana celular se produce por una parte, un incremento en la superficie celular y por tanto en la capacidad eléctrica y por otra, una conexión eléctrica entre el lumen de la vesícula con la membrana celular que es lo que se denomina poro de fusión.

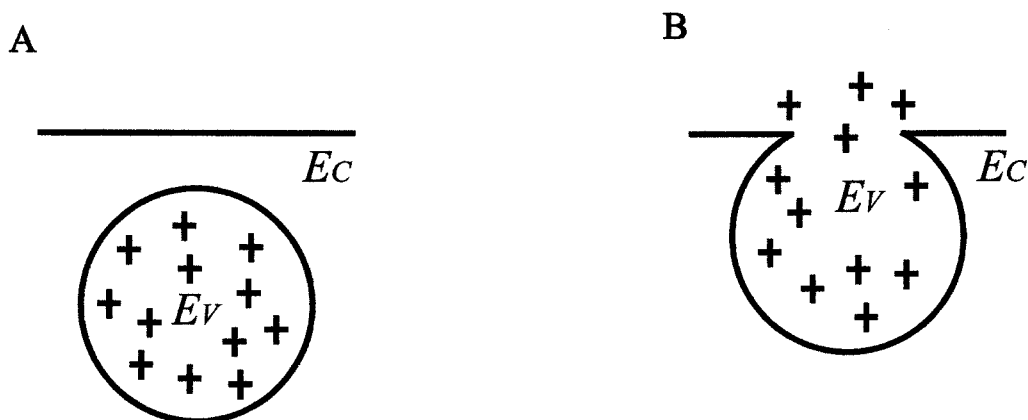


Figura 9. El poro de fusión es una conexión eléctrica entre el lumen de la vesícula y el medio extracelular, con características similares a un canal iónico.  $E_v$  y  $E_c$ , los potenciales de la vesícula y la membrana celular respectivamente, difieren inicialmente (A). Una vez que la conexión se ha formado (B),  $E_v$  y  $E_c$  se igualan, cambiando la carga de la capacidad de la vesícula ( $C_v$ ) una cantidad  $Q$ , ( $Q = C_v (E_c - E_v)$ ). El movimiento de carga aparece como una corriente transitoria cuya amplitud ( $I_o$ ) se relaciona con la conductancia ( $G_o$ ) por  $G_o = I_o / (E_c - E_v)$  (Breckenridge y Almers 1987).

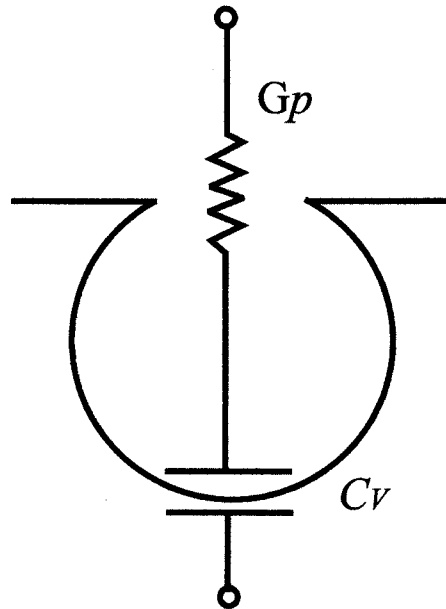


Figura 10. Circuito equivalente del poro de fusión excitotóxico. Una vesícula secretora fundiéndose con la membrana plasmática se puede representar eléctricamente por la conductancia del poro de fusión ( $G_p$ ) en serie con la capacidad de la membrana de la vesícula ( $C_v$ ).

La admitancia del circuito equivalente del poro de fusión viene dado por:

$$Y = \frac{i\omega C_v}{1 + i\omega C_v} G_p \quad (20)$$

Matemáticamente se pueden obtener a partir de esta expresión los componentes real e imaginario:

$$Im = \frac{\omega C_v}{(1 + (\omega C_v / G_p)^2)} \quad (21)$$

$$Re = \frac{(\omega C_v)^2 / G_p}{(1 + (\omega C_v / G_p)^2)} \quad (22)$$

Durante la fusión de una vesícula se espera una combinación en la contribución de ambos componentes, el real y el imaginario. La teoría predice que mientras la conductancia del poro crece desde 0 a infinito, el componente  $I_M$  debe crecer hasta su valor final (y éste valor es proporcional al incremento de  $C_M$ , es decir a la superficie de la membrana de la vesícula), mientras que el componente  $Re$  debe crecer y luego disminuir a 0 (Figura 11).

A partir del componente imaginario y real se puede calcular por derivaciones matemáticas  $C_v$  y  $G_p$  (Lindau, 1991):

$$C_v = (Re^2 + Im^2) / Im / \omega \quad (23)$$

$$G_p = (Re^2 + Im^2) / Re \quad (24)$$

$$\frac{Im}{Re} = \frac{G_p}{\omega C_v} \rightarrow G_p = \left( \frac{Im}{Re} \right) \cdot \omega C_v \quad (25)$$

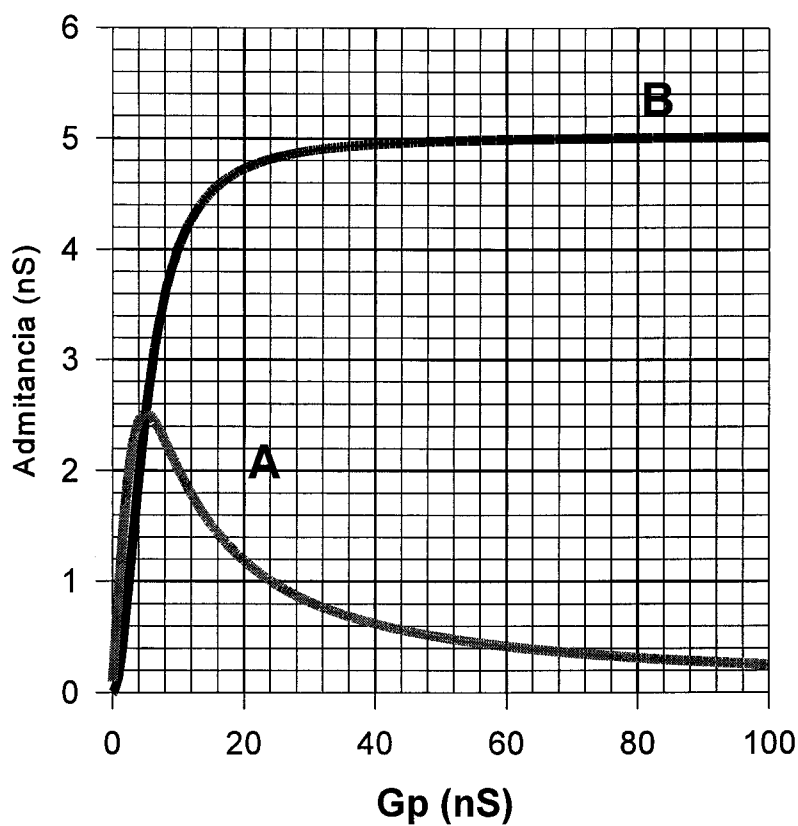


Figura 11. Representación teórica de la variación del componente real (A) e imaginario (B) de la admittance de un poro de fusión excitotico conforme la conductancia del poro ( $G_p$ ) crece. (capacidad de la vesícula: 40 fF; frecuencia de estimulación: 20 KHz).

El análisis de los trazos de Im y Re de los registros permite determinar la conductancia eléctrica del poro de fusión. El curso temporal de conductancia muestra dos componentes cinéticos (Lollike y col., 1995). Primero, la conductancia se incrementa abruptamente, como la conductancia de un canal iónico cuando el canal se abre y luego se incrementa gradualmente como si el poro se expandiera. El valor medio de la conductancia inicial es similar al de canales iónicos grandes (canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  : 100-200 pS, canales aniónicos dependientes de voltaje de mitocondria : 400 pS). Las células cebadas de ratón "beige" tiene una conductancia inicial de ~ 200 pS, eosinófilos ~100 pS y neutrófilos ~100 pS.

De la ecuación 25 se deduce por qué para medir conductancias de poro se ha venido utilizando hasta ahora, células con vesículas secretoras grandes, como células cebadas de ratón beige ( $\varnothing$  : 1-5  $\mu m$ ) o eosinófilos ( $\varnothing$  : 0.5 -2  $\mu m$ ). La conductancia del poro de fusión sólo se ha podido medir durante las etapas iniciales del mismo desde 100 a ~ 20 nS, posteriormente se expande rápidamente y el nivel del ruido del modo de registro de célula entera impide seguir midiendo durante más tiempo las proyecciones de los vectores Im y Re y por tanto el tamaño del poro. Utilizando pequeños parches de membrana, es decir utilizando la técnica de "patch-clamp" en la configuración de "in situ", Lollike y col. consiguieron medir poros de vesículas secretoras pequeñas ( $\varnothing$  : 60-165 nm) en neutrófilos. También el uso del amplificador Lock-in en vez de un sistema basado en software permite utilizar frecuencias de estimulación mayores con lo que la resolución en la medida de la conductancia del poro es mayor.

### **3.4. Detección electroquímica de secreción en células aisladas**

#### **3.4.1. Introducción**

Los métodos electroquímicos se basan en la reducción y/u oxidación de sustancias específicas y permiten estudiar la exocitosis en células aisladas. Se han usado desde hace años para estudiar *'in vivo'* cambios de la concentración de neurotransmisor en el cerebro pero recientemente se han aplicado a células aisladas (Alvarez de Toledo y col.,1993; Chow y col.,1992; Jankowski y col.,1992; Leszczyszyn y col.,1990; Tatham y col.,1991; Wightman y col.,1991).

Es un método no invasivo ya que las células no se someten a diálisis de componentes citosólicos como en la medida de capacidad en la configuración de célula completa y los productos liberados son directamente monitorizados. Muchos productos secretados son fácilmente oxidables, entre éstos están la noradrenalina, adrenalina, dopamina y serotonina. Derivados de estas sustancias, como el óxido nítrico (Iravani y col.,1993; Malinski y Taha,1992), ácido ascórbico y ácido úrico son también oxidables. Proteínas que contengan los aminoácidos tirosina, triptófano y cisteína pueden en teoría oxidarse, por ejemplo la encefalina (Armstrong-James y Fox,1981) y la somatostatina (Crespi,1991), aunque la escasa cantidad secretada y su lenta difusión dificulta su detección.

La primera medida electroquímica de secreción de células únicas fue en células cromafines (Millar y Williams,1990). Posteriormente se han detectado eventos de secreción cuántica no sólo en células cromafines (Chow y col., 1992; Wightman y col., 1992), sino también en células cebadas (Alvarez de Toledo y col., 1993;Duchen, 1993), células  $\beta$ -pancreáticas (Kennedy y col.,1993), células del glomus del cuerpo carotídeo (Ureña y

col., 1994) y células del ganglio cervical superior (Zhou y Misler, 1995).

### **3.4.2. Detección Electroquímica**

Esta técnica consiste en la detección de productos secretados que son capaces de oxidarse o reducirse. La detección de los productos secretados oxidables requiere de un detector apropiado, un “electrodo polarizable”. Cuando moléculas oxidables (o reducibles) difunden hacia la superficie del electrodo, los electrones son transferidos, produciendo un flujo de corriente. El potencial redox es el potencial referido al electrodo de hidrógeno estándar, en el que la mitad de las moléculas están en el estado oxidado y la otra mitad en el estado reducido, en el equilibrio. Para favorecer la conversión de todas las moléculas a la forma oxidada se debe aplicar un voltaje que exceda al potencial redox. Los materiales típicos usados para los electrodos incluye el carbón, platino y oro. Sin embargo, el carbón tiene propiedades electroquímicas más estables.

Basado en los fenómenos de óxido-reducción existen diferentes protocolos experimentales para la detección y cuantificación de sustancias. El método empleado en nuestro caso requiere de un detector apropiado el cual sometido a un potencial fijo es capaz de oxidar una sustancia y los electrones liberados son transferidos a su través produciendo un flujo de corriente. A éste método se le llama amperometría. El voltaje elegido debe exceder al del potencial redox del compuesto a oxidar en al menos 200 mV, para aumentar la velocidad de oxidación. Este método no permite la identificación de las sustancias que han sido oxidadas, para ello hay que previamente construir voltamogramas. Los voltamogramas son curvas corriente-voltaje. Se aplica una rampa de voltaje y se adquiere la corriente de oxidación resultante para una determinada sustancia. Existe un pico máximo de oxidación a un voltaje que es diferente para cada sustancia y que

permite su identificación. Actualmente se conocen los voltamogramas para muchas sustancias. En nuestros experimentos medimos serotonina como transmisor en células cebadas y catecolaminas en células cromafines. La serotonina tiene un pico de oxidación a 500 mV y las catecolaminas a 600 mV a pH 7.25. Esta técnica tiene muy buena resolución temporal y permite monitorizar la dinámica de la secreción a nivel de un único gránulo secretor. Una limitación de la técnica es que el potencial de oxidación o reducción de la sustancia que se quiera detectar debe encontrarse o por encima de -1 V o por debajo de +1 V ya que fuera del intervalo existen interferencias con las corrientes producidas por la electrolisis del agua.

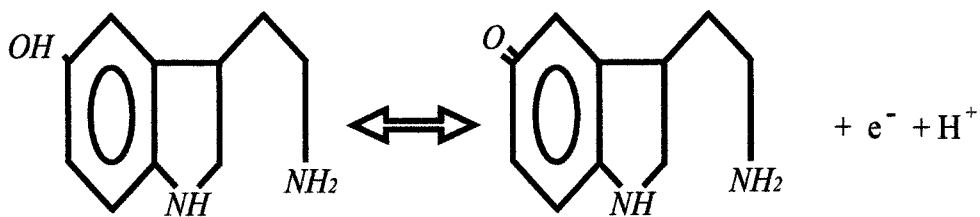


Figura 12. En la oxidación de la serotonina, el anillo bencénico tiene 1 grupo OH que al oxidarse produce 1 H<sup>+</sup> y 1 e<sup>-</sup>.

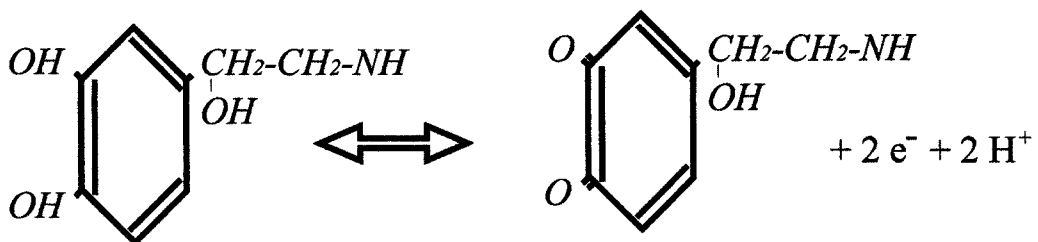


Figura 13. La oxidación de la noradrenalina produce la pérdida de dos protones y dos electrones.



Es posible cuantificar el número de moléculas que han sido oxidadas o reducidas por métodos electroquímicos, siempre que sólo una especie reactiva esté implicada y el número de electrones reactivos por molécula sea conocido, basta aplicar la ley de Faraday :

$$Q = \int I dt = \frac{zFM}{N_A} = zeM \quad (26)$$

donde M es el número de moléculas que han reaccionado, z es el número de e<sup>-</sup> transferidos por molécula, F es la constante de Faraday: 96.485 C/mol; N<sub>A</sub> es el número de avogadro : 6.023 × 10<sup>23</sup> y e<sup>-</sup> la carga elemental del electrón (1,6 × 10<sup>-19</sup> culombios).

## **4. AMPEROMETRÍA EN PARCHE**

### **4.1. Introducción**

La amperometría en parche es una técnica nueva, creada y montada en nuestro laboratorio en colaboración con el Prof. Manfred Lindau (MPI, Heidelberg, Alemania). Esta técnica combina la medida de capacidad en registro "in situ", con la detección electroquímica del transmisor oxidable por amperometría, al insertar un electrodo de fibra de carbono en el interior de la micropipeta de registro. Básicamente, consiste en la medida conjunta en un pequeño parche de membrana de la fusión de gránulos secretores y de la liberación del contenido de los mismos.

En la configuración de registro de célula entera, una célula que es internamente perfundida con la solución de una pipeta produce un lavado de factores citosólicos que pueden ser necesarios para ciertas funciones celulares. Así, en ésta configuración, las células cebadas no desgranulan en respuesta a estimulación directa sobre el receptor de inmunoglobulina E (Lindau y Fernández, 1986). Estas funciones celulares se pueden observar en registros de parche permeabilizados, donde la composición citosólica no está alterada. La configuración en registro 'in situ' sí permite registrar en células intactas.

Neher y Marty (1982) mostraron que registros 'in situ' incrementaban la resolución de la medida de capacidad. Utilizando un amplificador Lock-in y aumentando la frecuencia de la onda sinusoidal a 8 kHz la resolución se incrementaba en más de un orden de magnitud comparado con los registros en célula entera y permitía la detección de incrementos de 0.1 fF de capacidad asociado con exocitosis y endocitosis de vesículas de 60 nm. Para aumentar la resolución de los cambios en capacidad hay que minimizar

las fuentes de ruido. Las fuentes de ruido que limitan la resolución de la medida de capacidad se deben a la apertura de canales iónicos en la membrana celular, como las fuentes de origen termal (Jonhson). Mientras que  $C_M$  como un sistema que almacena energía no tiene ruido térmico (Jonhson) asociado a él, las resistencias  $R_M$  y particularmente  $R_s$  contribuyen al ruido Johnson, limitante en la medida de capacidad. La densidad del ruido térmico viene determinada por la frecuencia de estimulación y por la capacidad de la membrana aislada. Así, siguiendo el algoritmo de Gillis (1995), la figura 15 presenta el ruido en la medida de capacidad en función de la frecuencia en dos modelos eléctricos distintos que representan un circuito de membrana en la configuración de célula entera y otro en registro 'in situ'. Para los valores de los parámetros dados en el modo de célula entera, la frecuencia de estimulación óptima es de 1 kHz y el poder de resolución máximo en la medida de capacidad es superior a 3 fF, mientras que para los considerados en el modo de registro 'in situ', la frecuencia de estimulación óptima es de 25 kHz y el ruido para la misma tan sólo es de 0.05 fF. La mayoría de las vesículas endocíticas y exocíticas son mayores, por lo que la técnica de "patch-clamp" en la configuración en registro "in situ" permitiría incluso detectar eventos de fusión de vesículas sinápticas. Las principales desventajas de la configuración 'in situ' es que se desconoce el potencial de reposo de la membrana y no es posible controlar y cambiar las soluciones a ambos lados de la membrana del parche durante el registro.

En nuestros experimentos, el área de membrana aislada tiene una capacidad de  $\sim 0.2$  pF. Durante la fusión de vesículas cambia  $C_p$  y  $C_M$ . Sin embargo  $C_M$  es 10-50 veces mayor que  $C_p$  por lo que la capacidad que se mide es aproximadamente igual a  $C_p$ .

$$\frac{1}{C_T} = \frac{1}{C_p} + \frac{1}{C_M} \qquad C_T = \frac{C_p \cdot C_M}{C_p + C_M} \approx C_p \qquad (27)$$

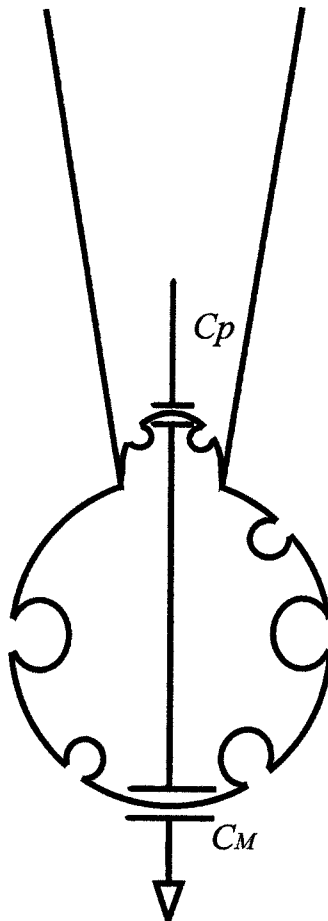


Figura 14. La configuración 'in situ' de la técnica de "patch-clamp" se puede representar en un circuito equivalente como dos capacidades  $C_p$  (capacidad del parche) y  $C_M$  (capacidad de la membrana celular) en paralelo.

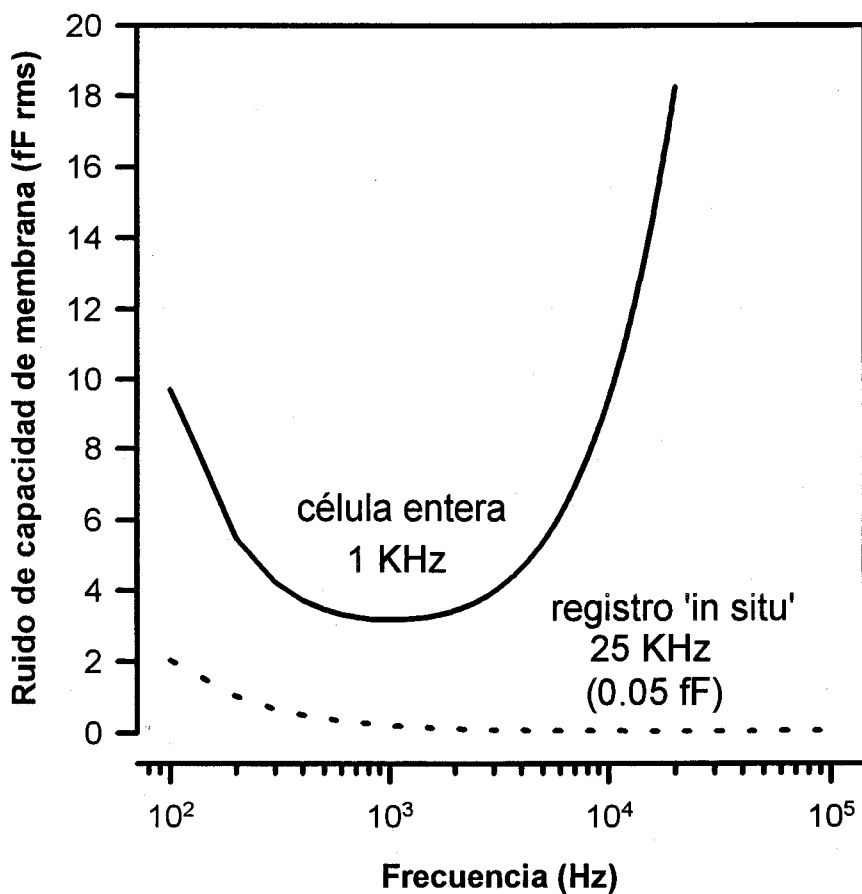


Figura 15. Ruido de  $C_M$  frente a frecuencia, usando dos circuitos modelos. Las curvas fueron calculadas siguiendo la ecuación de Gillis, 1995. Para la configuración de registro en célula entera los valores fueron:  $R_s = 5 M\Omega$ ,  $R_M = 0.5 G\Omega$ ,  $C_M = 10 pF$ ; y para la configuración de registro "in situ":  $R_s = 5 m\Omega$ ,  $R_M = 0.5 G\Omega$ ,  $C_M = 0.2 pF$  y  $V = 10 mV$  (rms).

La amperometría en parche es una herramienta muy poderosa y versátil, puesto que: 1) Mantiene inalterable el citoplasma celular respetando sus funciones e incrementa la resolución en la medida de capacidad, posibilitando la detección de la exocitosis de vesículas muy pequeñas y la medida de poros de fusión en sus últimas etapas de expansión. 2) Permite la detección de la liberación del transmisor durante una fusión transitoria o durante la etapa inicial de apertura del poro de fusión o incluso detectar cuando una vesícula aún fundiéndose no libera ningún contenido. Además, el empleo de ésta técnica para la medida de corriente de canal único junto con la de corriente capacitativa abre nuevas vías para el estudio de la señal de calcio y el proceso secretor.

## **4.2. Dispositivo experimental**

### **4.2.1. Equipo experimental**

El dispositivo experimental (figura 16) constó de:

a) jaula de Faraday conectada a tierra para evitar interferencias electromagnéticas.

b) mesa antivibratoria (TMC, Massachussets, EE.UU) con dos torretas verticales de aluminio (Newport, EE.UU) que sirven de apoyo a micromanipuladores y cámara de registro.

c) un microscopio invertido (Axiovert 35, Zeiss, Alemania)

d) un micromanipulador con avance manual en los ejes xy y control remoto en el eje z (MDC-3 remote, Klingner Scientific, EE.UU), que desplaza la micropipeta de registro. En los experimentos de célula entera, adaptado al preamplificador ("head-stage") del amplificador EPC7 y en los experimentos de amperometría en parche al preamplificador ("head-stage") de amperometría.

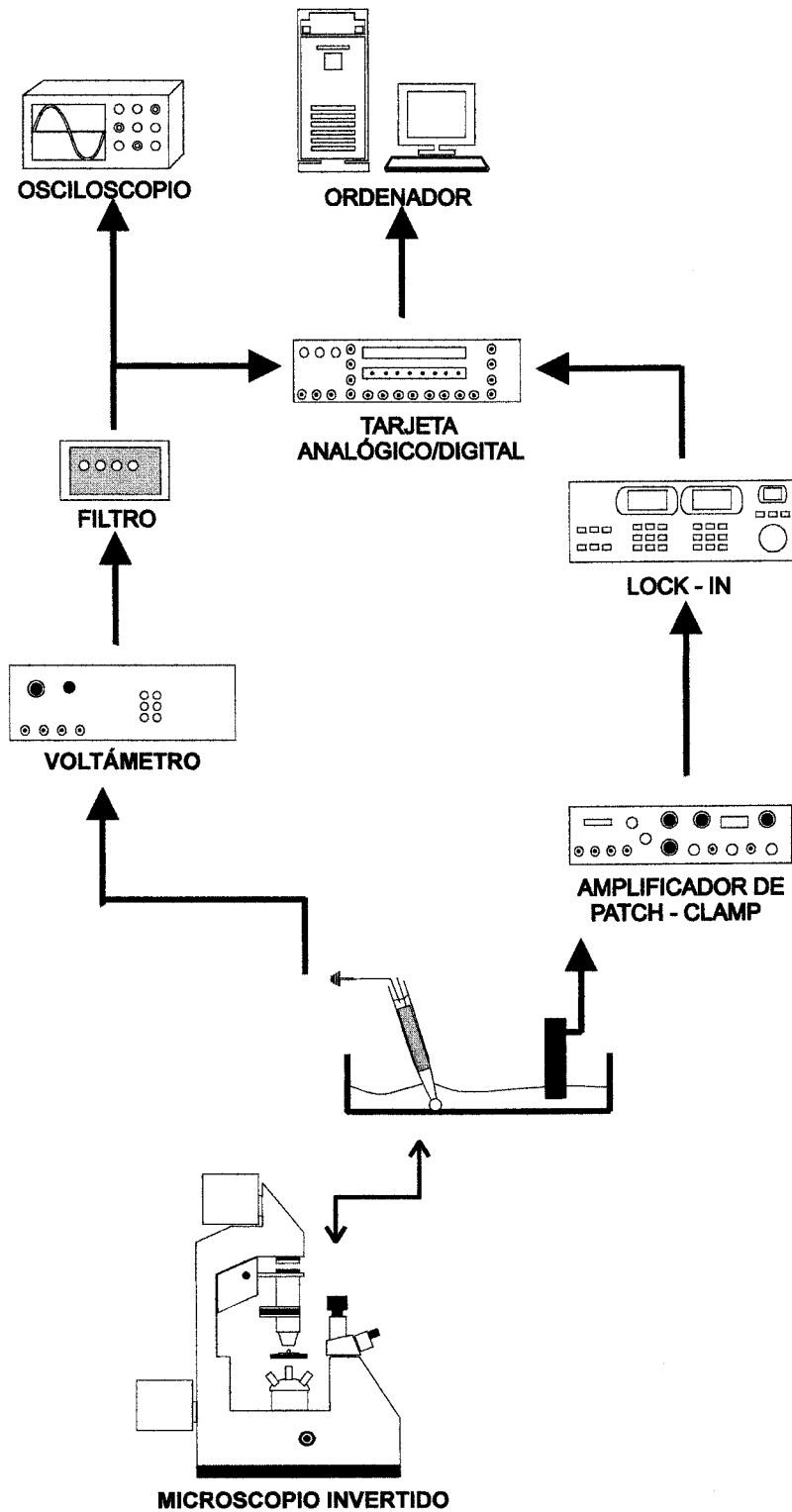


Figura 16. Esquema de los principales componentes del dispositivo experimental utilizado

e) un micromanipulador (Narishige) de avance manual en sus tres ejes, destinado a desplazar el electrodo de la fibra de carbono en los experimentos de célula entera.

f) sistema CCD (Spectrasource, MCD 400S) destinado a la captura de imágenes de los cambios morfológicos celulares y características geométricas de los electrodos de amperometría en parche y parches de membrana durante el transcurso de un experimento.

g) amplificador de "patch-clamp" (EPC 7, List Electronics, Alemania)

h) amplificador de amperometría construido en nuestro laboratorio.

i) interfase analógico-digital (IDA 15125, Indec systems, Inc. EE.UU.), con 8 canales de entrada y 2 de salida para conversión A/D y D/A respectivamente con resolución de 15 Bits y 125 kHz de frecuencia de muestreo y 8 canales de salida digital (TTL)

j) amplificador Lock-in (SR830 DSP, Stanford Research System, EE.UU). Genera una señal de voltaje sinusoidal con control manual de fase, frecuencia (rango entre 0.001Hz y 102 KHz) y amplitud, y adquiere una señal que descompone en dos componentes usando la técnica de detección de fase.

k) osciloscopio de 60 Mhz ( PM 3050, Philips)

l) filtro Bessel (Frequency Devices, 902, EE.UU)

m) ordenador personal Pentium, 133 MHz, 16 Mbytes de RAM.

#### **4.2.1.1. Amplificador de Amperometría**

El amplificador fabricado para la detección electroquímica de la secreción en los experimentos de célula entera y amperometría en parche es el mismo. Físicamente, consta de dos partes:

a) el preamplificador, cajita metálica sostenida sobre la cámara de registro mediante el sistema de micromanipulación, que consiste básicamente en un conversor corriente-voltaje.



b) una unidad exterior con panel frontal y placa base que contiene el circuito eléctrico que permite la generación del estímulo y la salida y amplificación de la corriente amperométrica.

Electrónicamente, el amplificador de amperometría consta de una serie de módulos:

- 1) módulo de estimulación
- 2) convertidor corriente-voltaje
- 3) restador
- 4) etapa de ganancia

#### 1) Módulo de estimulación

Un cable conector desde el amplificador EPC7 proporcionaba la alimentación (+15 V, -15V, GND) de los dispositivos electrónicos, por lo que los registros de amperometría y capacidad estaban al mismo sistema de referencia.

Este módulo consiste en un potenciómetro que permite seleccionar un voltaje desde 0 a 1 voltios. Un interruptor permite cambiar la polaridad a través de dos resistencias variables alimentadas a +15V y -15V. El voltaje seleccionado es el voltaje al cual se fija el microelectrodo ( $V_{com}$ ) de la fibra de carbono a través del conversor corriente-voltaje

#### 2) Conversor corriente-voltaje

Consiste en un amplificador operacional de bajo ruido (AD547) que recibe a través de su entrada no inversora el potencial de oxidación, seleccionado para la sustancia que se quiere detectar y es capaz de convertir la corriente ( $i$ ) captada por la fibra de carbono en un voltaje de

salida ( $V_o$ ) amplificado por un factor de ganancia de  $10^{10}$  que es el valor de la resistencia de retroalimentación utilizada.

$$V_o = i \cdot R_f + V_{com}$$

### 3) Restador

Es una etapa que sustrae al valor  $V_o$  procedente de la corriente electrónica de los productos oxidados por el detector el valor  $V_{com}$  de estimulación, con lo que a la salida del restador:

$$V_o = i \cdot R_f$$

### 4) Etapa de ganancia

Es una etapa de amplificación de la señal. Esta amplificación viene dada por un factor que resulta de la resistencia de retroalimentación seleccionada (mediante un conmutador en el panel externo) para un amplificador operacional en la configuración de inversor con ganancia. La ganancia puede ser de 5, 10, 20 y 50 mV/pA.

#### 4.2.2. Microelectrodos de registro de “patch-clamp”

Para la preparación de las micropipetas se utilizaron capilares de vidrio.

En los experimentos de célula entera los capilares (Kimax-51, EE.UU.), de 100 mm de longitud, 0.8 mm de  $\varnothing$  interno y 1.10  $\varnothing$  de externo fueron estirados por calor en dos fases mediante un estirador vertical comercial con un solenoide alimentado por una fuente de corriente (L/M-3P-A, List-Medical, Alemania). Durante el primer estirado el solenoide fue

sometido a 20 amperios de corriente y a ~15.8 amperios en el segundo. Cuando el vidrio se fundía por el calor desprendido, éste se estiraba por acción del contrapeso de una columna de tracción. Las pipetas tuvieron una resistencia de 2 a 4 M $\Omega$ , al ser rellenas con la solución interna.

En los experimentos de amperometría en parche los capilares de vidrio (Hilgenberg, Alemania), de 85 mm de longitud, 2 mm de  $\varnothing$  externo y 1.4 mm de  $\varnothing$  interno fueron estirados en tres fases mediante un estirador horizontal programable (P-97, Sutter). La siguiente tabla muestra los valores utilizados para la fabricación de las micropipetas en cada fase para cada una de las parámetros ajustables del estirador:

Etapa	Calor	Tracción	Velocidad	Tiempo
1°	630	0	15	20
2°	555	0	15	20
3°	488	20	50	20

Una vez conseguido el perfil de pipeta (figura 17) deseado para nuestros experimentos la programación elegida es almacenada en la memoria del instrumento. Las micropipetas de 1 a 3 M $\Omega$  se caracterizan por una garganta pequeña en forma de embudo, que permite el acercamiento de la fibra de carbono a la punta de la micropipeta de vidrio.

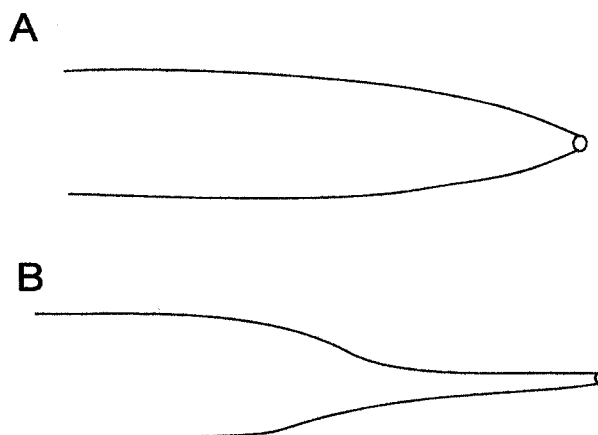


Figura 17. Ilustración de perfiles de micropipetas. En A, el utilizado para los experimentos de amperometría en parche y en B, para los realizados en la configuración de célula entera.

A continuación la micropipetas fueron modificadas con el objeto de reducir su capacidad eléctrica. Al engrosar la pared del vidrio del capilar ( $d$ ), la capacidad disminuye, según la expresión:  $C = \varepsilon \times A/d$ . Se han utilizado dos procedimientos, el primero consiste en cubrir la pipeta con un elastómero de silicona (Sylgard 184, Dow Corning Corp., EE.UU). Es una resina semifluida que con calor se cura rápidamente. Se aplica una capa de la resina a la punta de la pipeta sin tocar la boca de la misma y con el calor proporcionado por un flujo de aire caliente o un filamento incandescente se solidifica en pocos segundos. El segundo procedimiento consiste en introducir la punta de cada pipeta en cera caliente (M.Y.S.A., Madrid, España) ( $\sim 70^{\circ}\text{C}$ ) utilizando un calentador de cera comercial modificado para controlar la temperatura final. En pocos segundos a temperatura ambiente la cera sobre la pipeta se solidifica. Finalmente, la micropipeta es pulida en una microforja durante unos segundos con el doble objetivo de alisar la superficie de vidrio y disminuir el diámetro de la punta. La cera contenida en la boca de la pipeta desaparece por efecto de calor. Ambos procedimientos son igualmente eficaces para micropipetas de baja resistencia. Con cera el

procedimiento es más rápido y simple, pero la cera dificulta el llenado de la solución de las micropipetas de alta resistencia.

#### 4.2.3. Microelectrodos de registro de señales amperométricas

Los electrodos de amperometría se construyeron con fibras de grafito sintética de 5 y 8  $\mu\text{m}$  de diámetro (AMOCO; EE.UU.). La fibra de carbono es aislada eléctricamente y sostenida firmemente en un electrodo para que un extremo pueda ser expuesto y colocado cerca de una célula mientras que el otro sea fácilmente conectado al amplificador.

Se han utilizado dos variantes en el proceso de fabricación atendiendo al tipo de experimento al que se destinaban: electrodos para la detección electroquímica en el modo de célula entera y electrodos para la detección electroquímica en un parche de membrana, es decir electrodos de amperometría en parche.

##### Materiales:

- a) fibras de carbono
- b) tubos de polietileno ( $\varnothing$ externo :0.8 mm,  $\varnothing$ interno : 0.4 mm)
- c) capilares de vidrio ( L : 100 mm,  $\varnothing$  externo :1.10 mm,  $\varnothing$  interno :0.8 mm)
- d) pinzas enguantadas (nº 5)
- e) lupa de disección
- f) acetona
- g) hojas de bisturí

##### Procedimiento:

El electrodo de fibra de carbono se preparó canulando una fibra (de 8  $\mu\text{m}$  de  $\varnothing$  en los experimentos de célula entera y de 5  $\mu\text{m}$  de  $\varnothing$  en los

experimentos de amperometría en parche) en un tubo de polietileno. Las fibras de carbono son rígidas pero muy frágiles transversalmente, por eso es conveniente manejarlas con unas pinzas cuyas puntas esten recubiertas con plástico o goma suave.

El tubo de polietileno se introduce en acetona y se llena por capilaridad. El solvente reduce la atracción electrostática entre el plástico y la fibra de carbono durante el siguiente paso de canulación. Con una lupa de disección y bajo luz brillante la fibra de carbono es introducida totalmente por un extremo del segmento de polietileno. La acetona se elimina con suaves toques sobre papel absorbente y los restos, por evaporación.

Para aislar la fibra sobre el polietileno se utilizó un dispositivo que consistió en una resistencia de tungsteno conectada a una fuente de voltaje constante montado bajo la lupa de disección. Un procedimiento manual se utilizó para aislar mediante calor el polietileno sobre la fibra (figura18). La región central del tubo, cargado con la fibra, se dispone a través de la resistencia, la cual se calienta hasta una temperatura controlada y el polietileno en esta zona se funde sobre la fibra, tomando una apariencia transparente y en ambos extremos se forman unas expansiones en forma de bola. En este estado se puede aplicar tracción para estrechar el tubo hasta un diámetro de varias decenas de micras. Un corte en la mitad de este segmento resulta en dos fibras de carbono aisladas con polietileno. Cada una de ellas sufre una modificación posterior. La punta es calentada brevemente con la resistencia, ahora a una temperatura inferior y como resultado el polietileno se retrae sobre la fibra formando una región finamente aislada de varias decenas de micras de longitud. La punta se cortó hasta una longitud final de 10-50  $\mu\text{m}$  para los experimentos en célula entera y de  $\sim 500 \mu\text{m}$  en los experimentos de amperometría en parche con una hoja de bisturí. Este corte es adecuado porque el ruido de la fibra

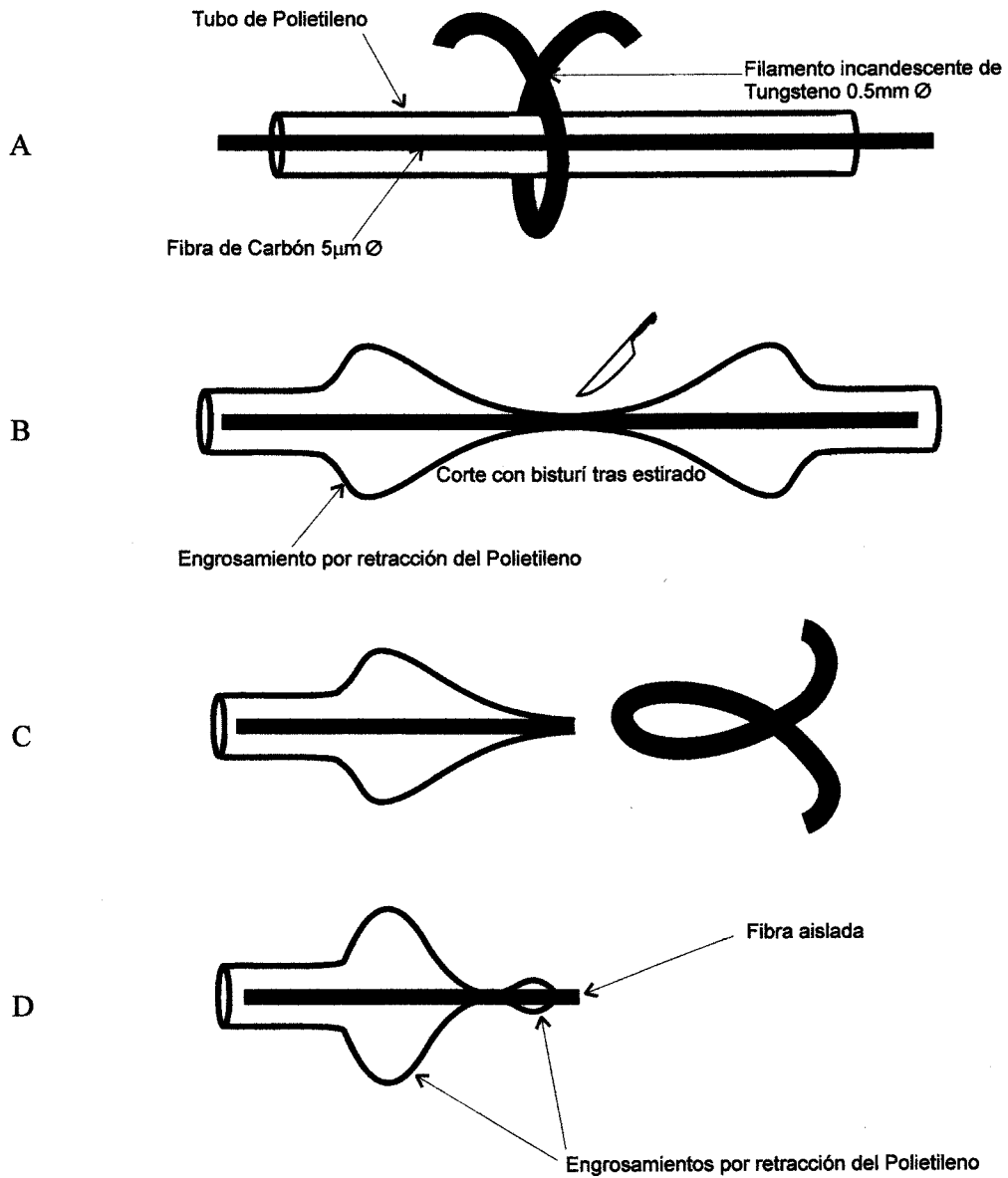


Figura 18. Esquema ilustrativo de las diferentes fases del proceso de fabricación de los electrodos de fibra de carbono. A) Aislamiento de una fibra de carbono por calor, con el tubo de polietileno que la contiene. B) Corte por la zona aislada. C) Retracción por calor del polietileno de uno de los extremos aislados. D) Aspecto final del electrodo.

depende significativamente de su capacidad, que es proporcional a la longitud de la fibra aislada y porque el intenso calor sobre la punta de la fibra de carbono parece causar pérdida de la sensibilidad de la fibra como detector.

Cada fibra de carbono aislada es introducida en un capilar de vidrio, que en el caso de los experimentos de amperometría en parche es el propio electrodo de registro pero que en los experimentos de célula entera tiene la función de sostén. En éste caso, un pegamento de secado rápido (Araldit, Ciba-Geyge) es aplicado a la unión entre el capilar y el tubo de polietileno.

Es posible reutilizar la misma fibra de carbono recortándola muchas veces. Recortar la fibra tiene la importancia adicional de asegurar que la superficie sensora esté libre de cualquier detritus celular que podría actuar como barrera para la difusión.

#### **4.2.4. Sistema de conexión del electrodo al amplificador.**

El sistema de conexión del electrodo de registro o de amperometría al amplificador, conocido como "holder" o portaelectrodos, usualmente más usado consiste en un dispositivo constituido por una pieza que a través de un conector tipo BNC conecta al preamplificador del amplificador y por otra, que sirve como elemento de ajuste de la pipeta mediante un sistema de rosca. El portaelectrodos utilizado para la técnica de amperometría en parche es un sistema más complejo ya que requiere de dos electrodos diferentes, un electrodo activo y un electrodo de referencia, y un dispositivo que permite el acercamiento de la pipeta al extremo de la fibra de carbono.

El portaelectrodos está constituido por tres piezas que se adaptan entre sí mediante un sistema de roscas (figura 19). La primera porción se



compone de conector tipo BNC que conecta mediante un vástago al electrodo activo por un lado y por el otro, al preamplificador de amperometría, un tubo de succión de acero. Un pequeño tornillo que lleva la toma de tierra al electrodo de referencia y una pieza fija con rosca exterior hecha de bronce (CuZn) sobre la que se desplaza una pieza móvil con rosca interior de aluminio (AlCuMgPb) y que permite el acercamiento de la punta de la pipeta al extremo de la fibra. La última porción del portaelectrodos es la pieza que ajusta la pipeta (figura 20).

La fibra de carbono aislada con polietileno de unos ~ 7 cm de longitud se conecta al hilo de plata clorurado. Una solución de 3 M KCl se usó como solución de llenado para hacer contacto entre la fibra de carbono y el hilo de plata de entrada al amplificador. A continuación el electrodo de amperometría es introducido junto con el electrodo de referencia en la pipeta llena con solución. La pieza de ajuste permite la fijación de la pipeta al portaelectrodos. La pieza móvil de rosca inferior permite el movimiento controlado de la pipeta hacia el interior, desplazándola y aproximándola al extremo de la fibra de carbono.

Las corrientes amperométricas fueron registradas con el amplificador fabricado en nuestro laboratorio y fueron filtradas a 2000 Hz con un filtro de paso bajo. La fibra fue mantenida a un voltaje de + 650-700 mV para la detección de serotonina en células cebadas y de +700-800 mV para la detección de catecolaminas en células cromafines de rata.

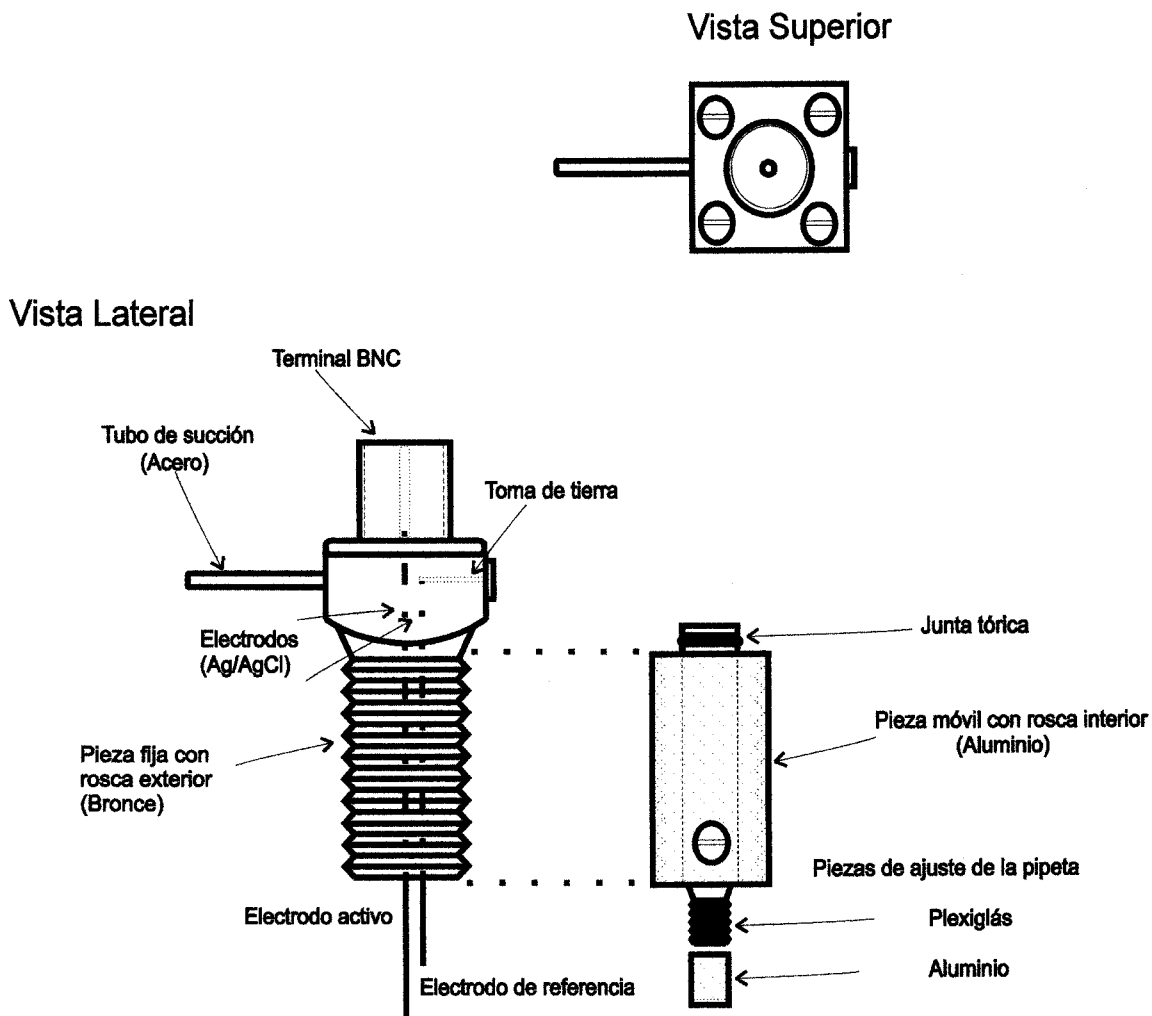


Figura 19. Vista lateral y superior del portaelectrodos utilizado para los experimentos de amperometría en parche.

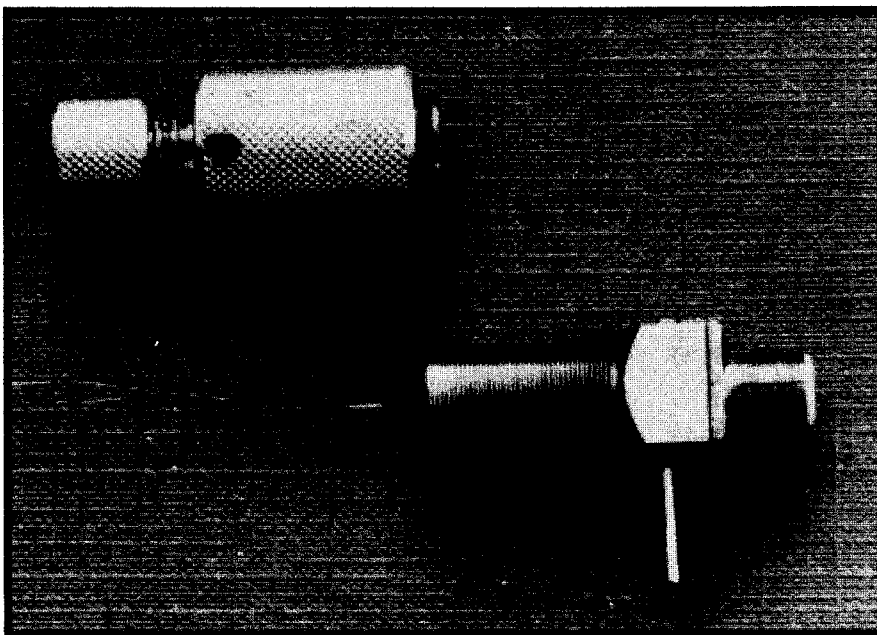
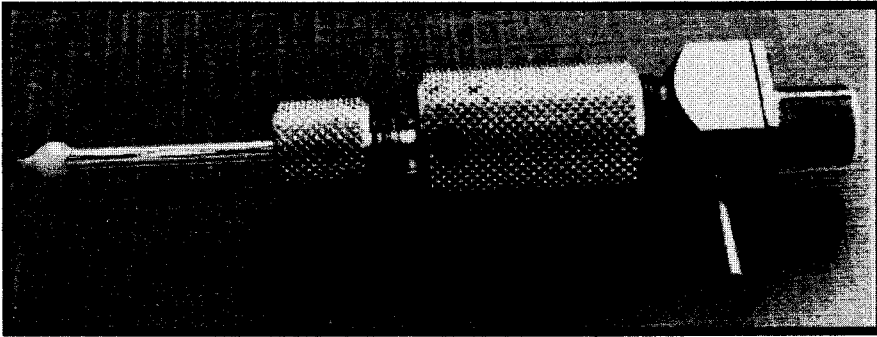


Figura 20. Fotografía de un portaelectrodos de amperometría en parche.

### **4.3. Proceder experimental**

#### **4.3.1. Preparación del experimento**

En registros de amperometría en parche, las camaritas sembradas con células cebadas fueron lavadas con solución externa para eliminar el bicarbonato sódico que dificulta los sellos de alta resistencia. Las células cromafines sembradas en cubres cubiertos con poli-L-lisina fueron colocadas en una camarita con solución externa. Tras realizar el ajuste Koehler al microscopio se procedió a la identificación y evaluación de las células. En muchas ocasiones, las células cromafines suelen aparecer aisladas o en grupos de 2 o más células.

El electrodo de medida de capacidad se colocó en el baño con solución externa. Para disminuir el ruido eléctrico, se utilizó un hilo de plata clorurado de corta longitud, soldado a un pin conectado al BNC del preamplificador. El montaje del microelectrodo de amperometría y la pipeta en el portaelectrodos de amperometría en parche es como sigue: una fibra de carbono aislada con polietileno y llena con solución de ClK 3M se colocó en el electrodo activo. Después, una micropipeta recubierta con cera o elastómero de silicona, para disminuir la capacidad rápida y cargada con solución se introdujo en el portaelectrodos, conteniendo en su interior el electrodo de referencia y la fibra de carbono. El tubo de polietileno que recubre la fibra sirve como aislante entre ambos electrodos. La colocación de la pipeta ha de hacerse cuidadosamente bajo la lupa de disección y luz brillante, debido a la fragilidad de la fibra en su extremo final y para evitar la formación de burbujas de aire durante el proceso. Cuando la fibra está cercana a la garganta de la pipeta, ésta se ajusta firmemente al portaelectrodo. La pieza móvil de rosca permite acercarse suave y lentamente la punta de la pipeta a la fibra (figura 21), éste paso, se termina de hacer bajo el microscopio invertido donde la resolución visual es mayor.

#### 4.3.2. Formación del sello

Cuando se conecta el portaelectrodos al amplificador se visualiza en la pantalla del osciloscopio la corriente de base de la fibra de carbono, pues ya lleva la conexión a tierra. Si las características de las mismas eran correctas ( $\tau \sim 500$  ms, resistencia: 20-60 G $\Omega$ ) se procedía a introducir la pipeta en el baño de registro y a monitorizar en el osciloscopio, tras aplicar un pulso cuadrado de 2 mV, la resistencia de la micropipeta. Seguidamente, se compensaba el potencial de unión formado entre la punta de la pipeta y la solución externa. Con el micromanipulador de control remoto acercamos la punta de la pipeta a la célula seleccionada. Al tocarla, un descenso en la corriente se reflejó en el osciloscopio, debido a un incremento en la resistencia. La aplicación de una suave succión incrementó aún más la resistencia (normalmente de forma lenta y gradual) y resultó en la formación de un gigasello. Los circuitos de compensación C-SLOW y G-SERIES del amplificador se prefijaron a 0.2 pF y 0.02  $\mu$ S respectivamente. Estos valores son una buena estimación de la constante de tiempo de carga en la modalidad de registro 'in situ'.

#### 4.3.3. Calibración y registro

A través del programa de ordenador (Lockin) escrito en lenguaje Visual Basic en nuestro laboratorio y que controla los parámetros del amplificador Lock-In, se aplicó a la célula a través del electrodo de medida de capacidad una señal de voltaje sinusoidal de 25 mV (rms) superpuesta sobre un nivel de voltaje de 0 mV y 20 KHz de frecuencia. La corriente sinusoidal resultante es descompuesta por el amplificador Lock-In en sus componentes: imaginario y real. El filtro de salida del Lock-In fue de 1 ms, 24dB. Aumentamos la ganancia del EPC7 a 50 mV/pA y compensamos completamente la capacidad de la pipeta visualizando la señal de corriente

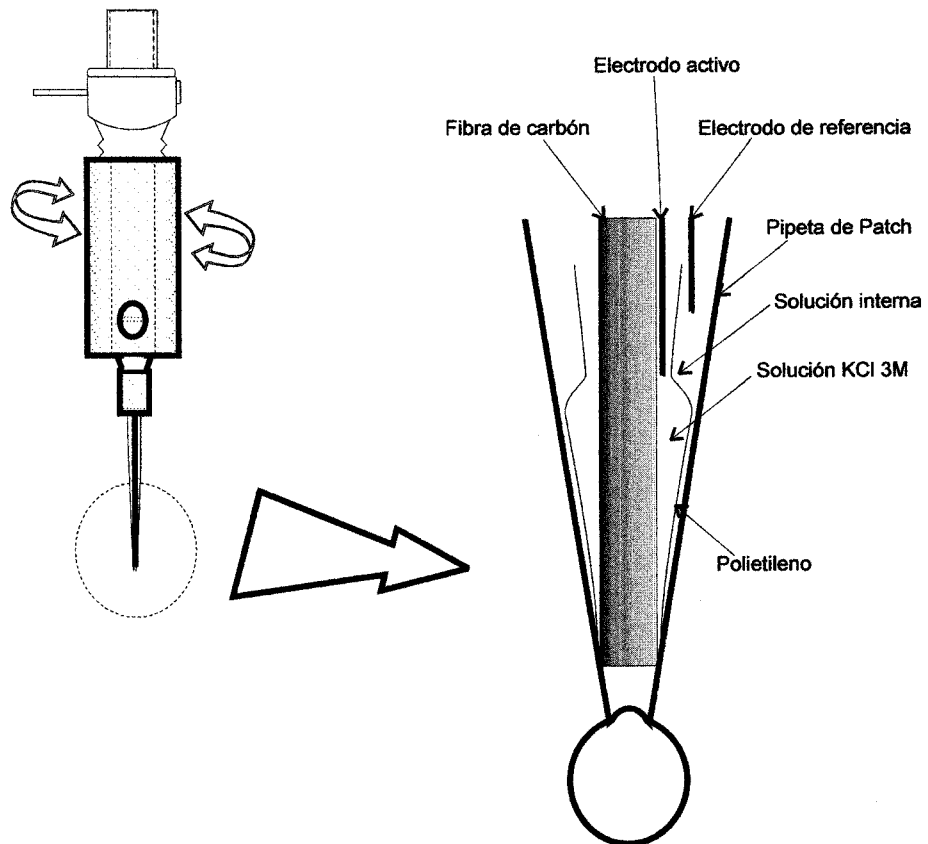


Figura 21. Sistema de ajuste fino del electrodo de la fibra de carbono en la pipeta de registro, mediante el portaelectrodos de amperometría en parche.

sinusoidal en el osciloscopio. Con el estímulo escalado 1/1000 se introdujo desde el amplificador un cambio de capacidad de valor conocido (100 fF). Esta señal de calibración sirvió para comprobar si la fase estaba bien ajustada. Cuando no era así, cada pulso de calibración produjo una proyección en el componente imaginario (señal proporcional a la capacidad) y en el componente real (señal proporcional a la conductancia). A través del selector manual del amplificador Lock-in se seleccionaba el ángulo que corrige el desfase, de tal manera que el cambio de capacidad sólo se proyecta en el componente imaginario. Durante el transcurso del experimento la fase suele permanecer constante. A continuación, aumentamos la amplitud del estímulo aplicado reduciendo la escala hasta 1/20 ó 1/10 , con lo cual, la señal que fue aplicada inicialmente de 100 fF pudo ser considerada a efectos prácticos como una señal de calibración de 2 ó 1 fF respectivamente, calibración adecuada para la resolución y medida del tipo de eventos que se pretendían medir. En el amplificador de amperometría se seleccionó un voltaje constante de 700 mV en células cebadas y de 800 mV en células cromafines para la oxidación de serotonina y catecolaminas respectivamente, utilizando una ganancia de 50 mV/pA. En el programa de ordenador una ventana representa los trazos del componente real e imaginario de la corriente y otra el trazo de amperometría permitiendo la monitorización conjunta en tiempo real de dos etapas de un mismo proceso: la exocitosis (figura 22).

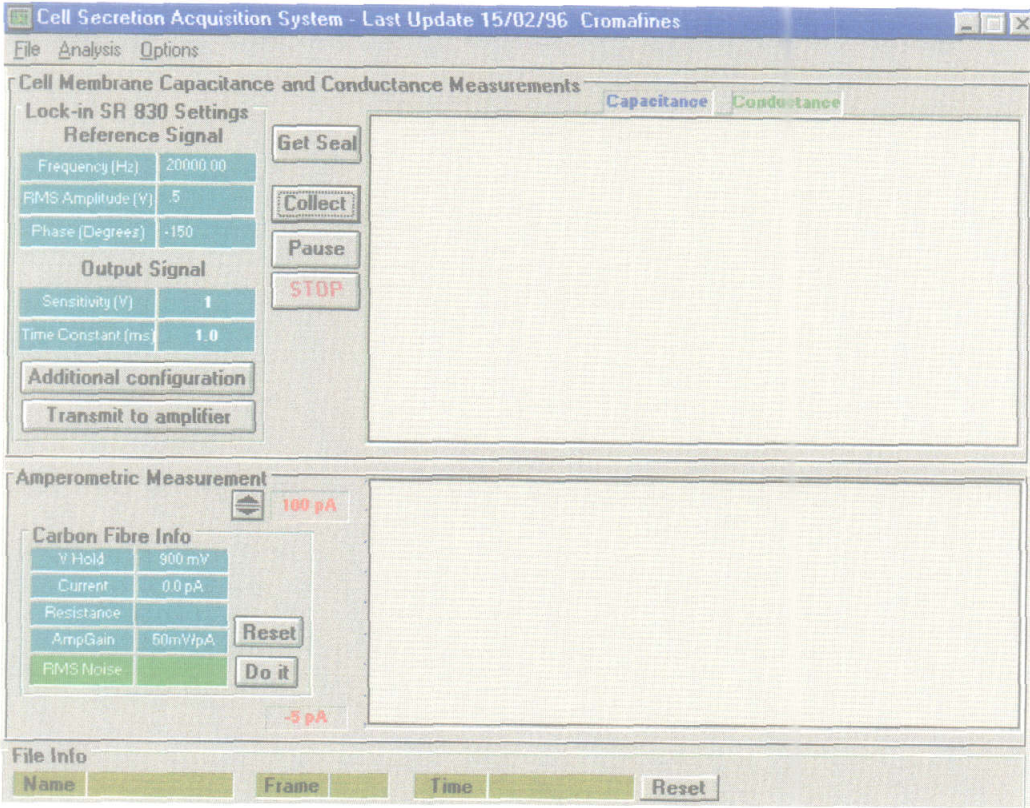


Figura 22. Pantalla de adquisición del programa Lockin , realizado en lenguaje Visual Basic, utilizado para los registros electrofisiológicos. A la derecha y arriba se sitúa la ventana de visualización de los trazos real e imaginario de la admitancia y abajo el trazo de amperometría. A la izquierda se encuentran “cajas de texto” que informan de las características de la señal de estimulación y del electrodo de detección electroquímica.



#### 4.4. Análisis de los eventos exocitóticos

El programa de ordenador también contiene una ventana que permite abrir un archivo de un registro y medir de forma manual o semiautomática los parámetros de los trazos imaginario y real de la admitancia y la amperometría (figura 23). La posición de los cursores verticales seleccionando el comienzo del salto en el trazo imaginario, que indica la fusión de un grano y el final de la espiga de liberación en el trazo amperométrico, delimita el evento que queremos analizar. Los cursores horizontales permiten seleccionar el tamaño del salto de capacidad. De forma automática, el programa introduce en una tabla los valores obtenidos de los distintos parámetros analizados: tamaño del salto de capacidad, amplitud de la espiga, tiempo en alcanzar el pico máximo y carga de la espiga, calculada integrando el área bajo la espiga. Además directamente a partir de estos datos el programa calcula y proporciona los valores del radio y volumen de la vesícula (asumiendo una capacidad específica de  $9 \text{ fF} \cdot \mu\text{m}^2$  y considerando la vesícula como una esfera perfecta), el número de moléculas (a partir de la ley de Faraday), el número de moles y la molaridad a las que están almacenadas las sustancias detectadas de la vesícula. La medida de la conductancia de poro y la capacidad durante una fusión de una vesícula fueron calculados, según los algoritmos, de forma automática por el programa. Los datos fueron almacenados en archivos ASCII e importados y tratados en el programa "IGOR" para un análisis específico de datos y representación.

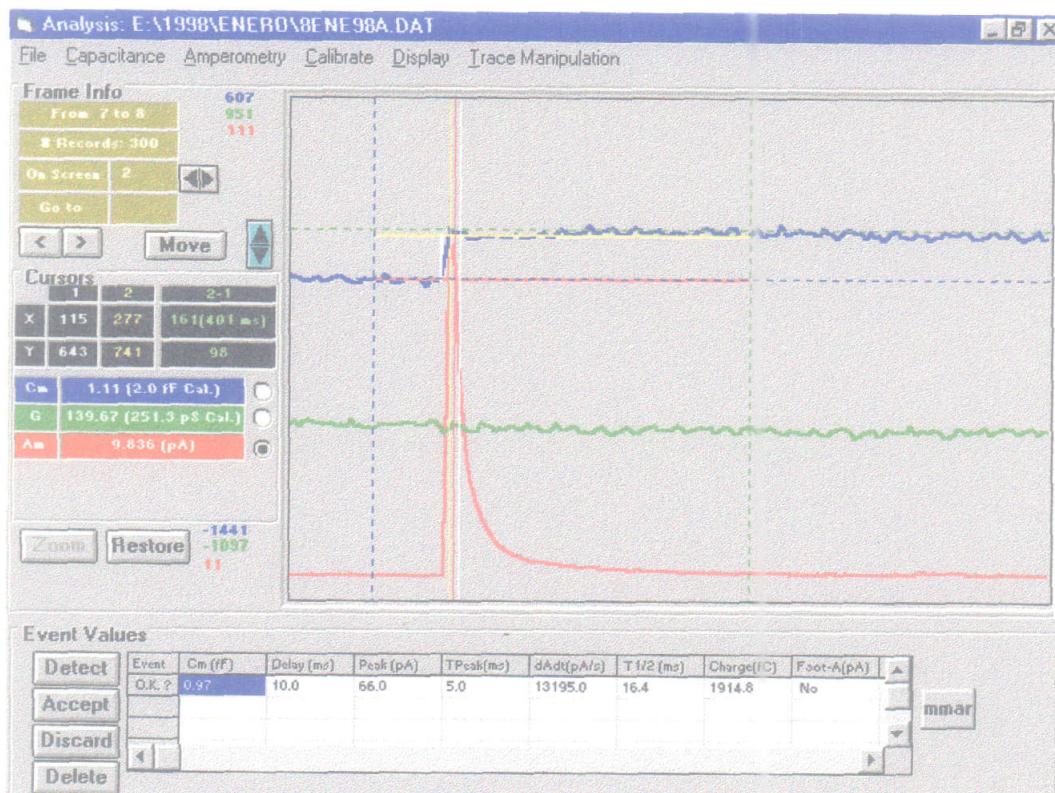


Figura 23. Pantalla de análisis de los registros electrofisiológicos. Los datos analizados son incluidos en la tabla inferior. Puede hacerse un "zoom" de la zona seleccionada por los cursores para analizar la conductancia del poro o estudiar las características de la espigas amperométricas en detalle.

## RESULTADOS

### EXOCITOSIS EN CÉLULAS CEBADAS A NIVEL DE GRANO SECRETOR UNITARIO

El estudio del proceso secretor en células cebadas se ha llevado a cabo utilizando técnicas electrofisiológicas conjuntamente con técnicas de detección electroquímica. Las células cebadas son un modelo celular idóneo para estudiar eventos discretos de exocitosis. La técnica de “patch-clamp” en la configuración de célula completa permite resolver fusiones de granos secretores del tamaño de una célula cebada y la técnica de amperometría, la liberación cuantal del contenido secretor, al ser la serotonina una sustancia fácilmente oxidable. El estudio a nivel de una única vesícula secretora se ha llevado a cabo utilizando dos aproximaciones técnicas distintas y con dos objetivos finales distintos:

- 1) La técnica de “patch-clamp” en la configuración de célula completa simultáneamente con la amperometría, con el objetivo de estudiar la regulación de la exocitosis, por el calcio citosólico a nivel del poro de fusión y por factores que afectan a la matriz de proteoglicano.

2) Aplicación de la técnica de amperometría en parche con el objeto de resolver la cinética de la expansión del poro de fusión y su implicación en la liberación del transmisor.

## **1. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE “PATCH-CLAMP” EN CONFIGURACIÓN DE CÉLULA COMPLETA Y LA AMPEROMETRÍA AL ESTUDIO DE LA SECRECIÓN EN CÉLULAS CEBADAS DE RATA.**

La exocitosis monitorizada con la técnica de “patch-clamp” en la configuración de célula completa aparece como aumentos en la superficie de la membrana plasmática debido a la fusión de vesículas de secreción individuales. La secreción a nivel de célula única transcurre en minutos y es inducida dializando la célula a través de la pipeta con  $\text{GTP}\gamma\text{-S}$ . Incrementando la concentración del estímulo, la velocidad de desgranulación aumenta. Al término del proceso secretor, la célula ha incrementado su superficie de membrana en un factor de tres.

La liberación del contenido vesicular se detectó aproximando un electrodo de carbono sobre la superficie celular. La detección se acompañó por oxidación amperométrica de las sustancias liberadas. La secreción se observa en forma de una sucesión rápida de espigas de corriente de amplitud variable y con una duración de varios milisegundos. Combinando ambas técnicas es posible estudiar fusión y liberación a tiempo real (figura 24).

### **1.1. Exocitosis a nivel de grano secretor único**

Cuando la velocidad de desgranulación es suficientemente lenta ( $[\text{GTP}\gamma] < 50 \mu\text{M}$ ) como para separar temporalmente los eventos discretos de exocitosis, es posible correlacionar bastante fielmente cada fusión de

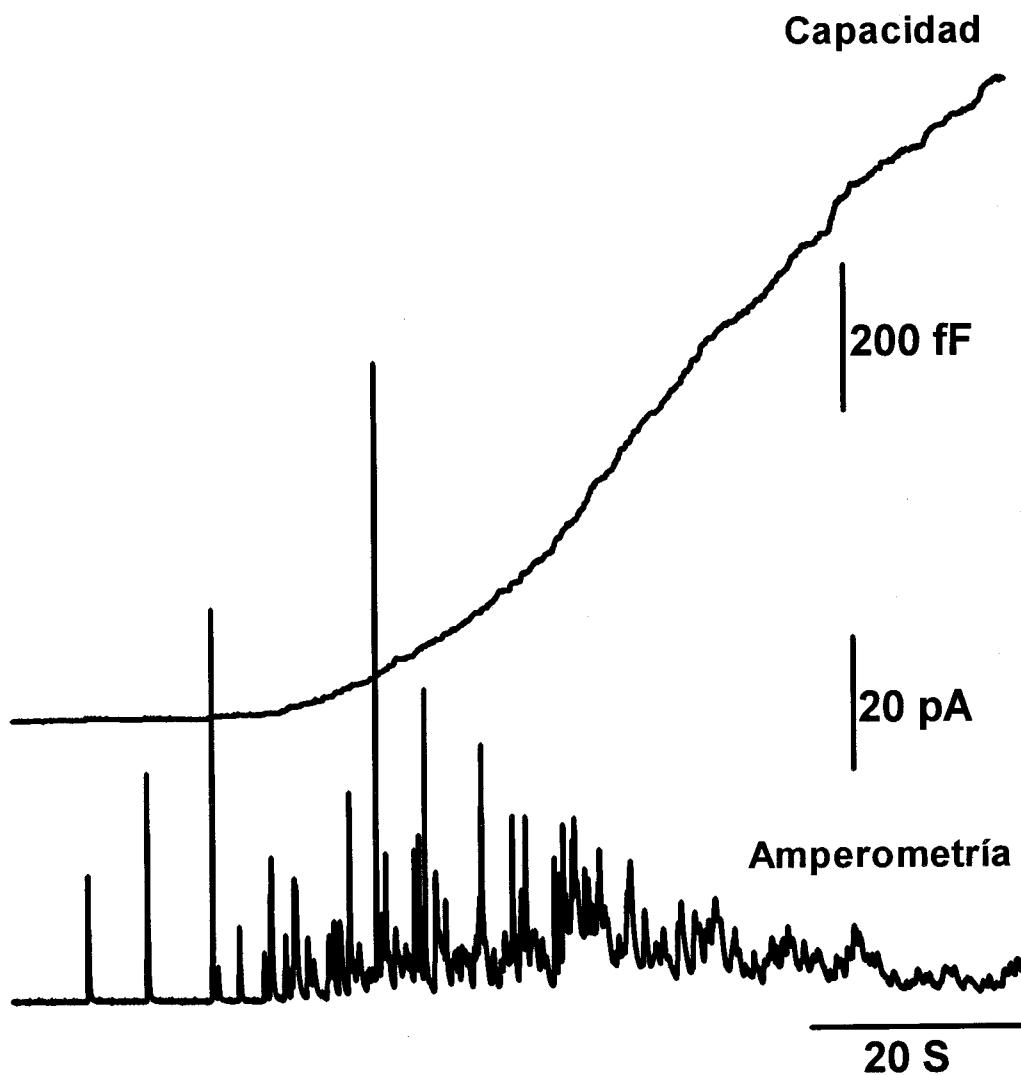


Figura 24. Respuesta secretora en una célula cebada. La desgranulación fue inducida dializando la célula a través de la pipeta con solución que contiene  $20 \mu\text{M}$  de  $\text{GTP}\gamma\text{-S}$  y  $8.6 \mu\text{M}$   $[\text{Ca}^{2+}]$ . La fusión de las vesículas secretoras con la membrana plasmática incrementa la superficie celular y éste efecto se puede monitorizar midiendo la capacidad de la membrana. La amperometría permite la detección de espigas de corriente, correspondientes a la oxidación de la serotonina liberada por cada vesícula.

vesícula con el correspondiente cuanto de liberación en forma de espiga amperométrica (Figura 25). El tamaño de los saltos discretos de capacidad son indicativos de tamaño de las vesículas y oscilan entre 0.5 a 6  $\mu\text{m}^2$  (5 a 60 fF). El primer hecho evidente es que las espigas manifiestan una amplia variabilidad en su forma, que se debe, además de a las características intrínsecas de la liberación para cada vesícula, a la variabilidad del espacio difusional entre el detector de carbono y el sitio de liberación a lo largo de la superficie esférica de la célula. Otro hecho observable es que fusión y liberación no ocurren simultáneamente sino que transcurre un retraso variable de decenas de milisegundos. Aunque el tiempo de difusión, dependiente del coeficiente de difusión ( $D \sim 6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ) de las moléculas de serotonina, desde las vesículas fundidas al detector, tiene un papel importante en esta latencia, no es el único factor que participa en el retraso. Así, en los eventos mostrados en el registro expandido de la figura 25, se observa que, la espiga más rápida y de mayor amplitud es también la que presenta un tiempo de retardo superior tras la fusión de la vesícula. Esto no puede ser explicado por simple difusión. El intervalo, entre el cambio de capacidad y la aparición de la espiga amperométrica, revela una serie de procesos subyacentes desde que se produce la fusión hasta que se detecta el contenido de la misma. Así, el retraso antes de la liberación total puede reflejar el tiempo necesario para la expansión del poro de fusión y para disociar la matriz de proteoglicano donde el contenido vesicular está fuertemente condensado.

La descripción de las características de las espigas amperométricas viene definida por una serie de parámetros (figura 26): La amplitud máxima, la anchura media (que es la anchura de la espiga al 50% de su máxima amplitud), el tiempo en alcanzar el pico y la carga de la espiga, calculada integrando el área bajo el transiente amperométrica. En ocasiones, la espiga amperométrica es precedida por una pequeña corriente (el "pie" de la

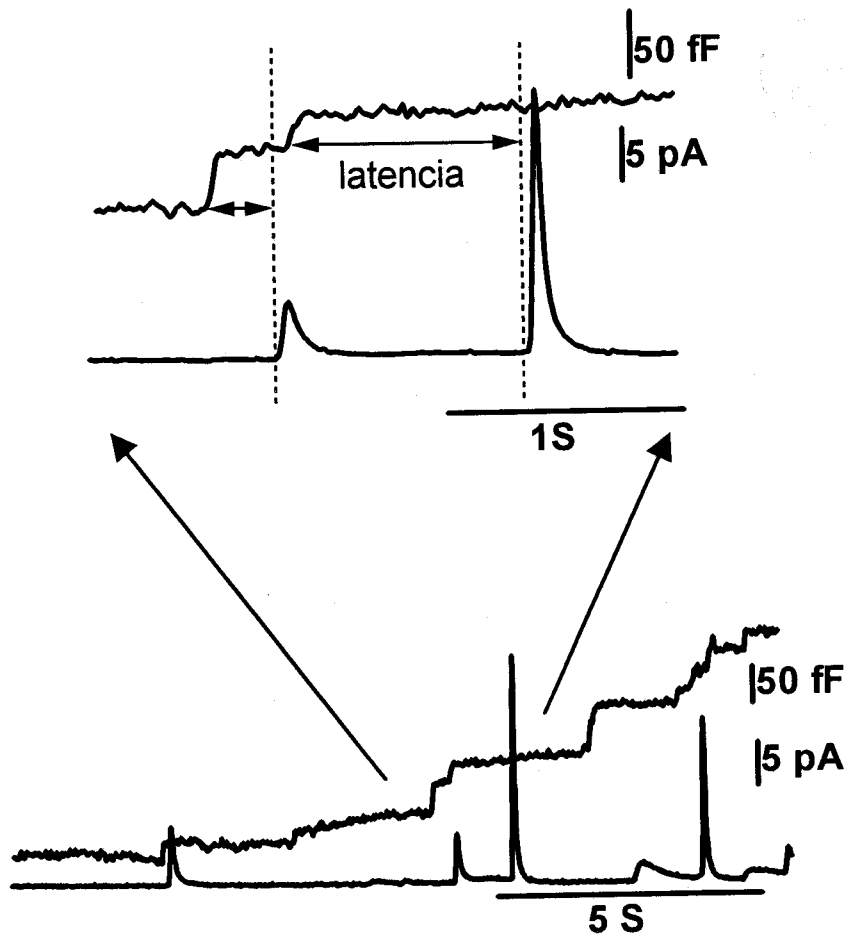


Figura 25. Eventos secretores correspondientes a fusiones de vesículas únicas en una célula cebada. Un incremento en la capacidad de la membrana refleja la fusión de una vesícula secretora. El tamaño del salto de capacidad es proporcional a la superficie de la membrana de la vesícula y suele estar asociado a una espiga amperométrica. Aquellas espigas más rápidas y de mayor amplitud pertenecen a aquellos granos que se han fundido más cerca del detector electroquímico, mientras que las más anchas y bajas a los fundidos en puntos más alejados del detector. No existe ninguna relación observable entre el tamaño del salto de capacidad y la amplitud de la espiga amperométrica. Los eventos mostrados en una escala más expandida muestran como el retraso entre la fusión y liberación de una vesícula suele ser variable.

espiga), que representa la liberación de moléculas a través de un pequeño poro (Alvarez de Toledo y col., 1993). A continuación, se produce el pico de la espiga.

Con estas consideraciones, en los siguientes apartados se ha estudiado como el calcio intracelular y diversos factores que afectan a la disociación de la matriz de proteoglicano modifican y regulan el curso temporal de la liberación de vesículas individuales.

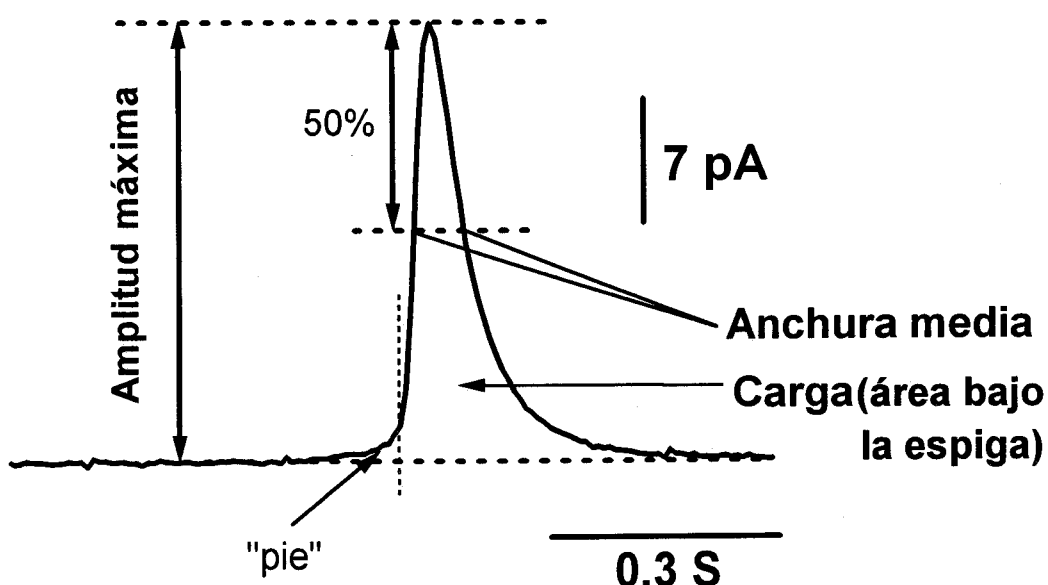


Figura 26. Descripción de los parámetros cinéticos de las espigas amperométricas.

## 1.2. El calcio intracelular en la regulación de la expansión del poro de fusión.

Estudios previos en células cebadas de ratón "beige" han demostrado que el calcio intracelular controla la expansión del poro de fusión (Fernández Chacón y Alvarez de Toledo, 1995; Hartmann y Lindau, 1995). Esto permite que la célula, regulando las concentraciones de calcio presente en cada instante, controle la velocidad con la que los productos secretores pueden



ser liberados, una vez que la fusión del grano se ha producido. La doble medida simultánea de la fusión y liberación, permiten medir el tiempo que transcurre entre ambos fenómenos, a las distintas concentraciones de calcio. El estudio de las latencias (dependiente de la  $[Ca^{2+}]_i$ , entre el inicio de la fusión de cada vesícula (salto de capacidad) y el inicio de cada espiga amperométrica de liberación, es una buena aproximación para discernir las características de la molécula que une calcio.

La duración de este retraso se distribuye exponencialmente (figura 27). Cuando se construye un histograma de frecuencias de las latencias entre la fusión y la liberación se observa que éste se ajusta bastante bien a una exponencial simple. El valor de la constante de tiempo para esa exponencial es indicativo del valor medio de la distribución. Así, para cada una de las distintas concentraciones intracelulares de calcio usadas para dializar las células, obtenemos un valor medio. Las células fueron perfundidas a través de la pipeta de registro con soluciones que contienen: 50 nM ( $n=114$ ,  $\tau=233$ ), 200 nM ( $n=38$ ,  $\tau=203$  ms), 400 nM ( $n=93$ ,  $\tau=102$  ms), 500 nM ( $n=101$ ,  $\tau=129$  ms), 600 nM ( $n=43$ ,  $\tau=92$  ms) y 8.6  $\mu$ M ( $n=107$ ,  $\tau=82$  ms) de  $Ca^{2+}$  libre. La representación de las constantes de tiempo frente a la concentración intracelular de calcio se ajusta a una sigmoide, indicando que el poro de fusión muestra una dependencia sigmoideal de la concentración de calcio (Figura 28). La curva es una representación de la ecuación de Hill ( $f=233-146 \times [Ca^{2+}]^n / K + [Ca^{2+}]^n$ ). El coeficiente de Hill ( $n$ ) = 3.5 y  $K = 0.011$ . La saturación media ocurrió a 300 nM de  $[Ca^{2+}]$ . Estos resultados indican que al menos 4 iones calcio participan de forma cooperativa para producir la expansión del poro de fusión. Los valores medios de los parámetros cinéticos (anchura media y velocidad de subida) de las espigas amperométricas a bajo calcio (tabla V) no difieren significativamente de los valores medios en la situación control, a alto calcio.

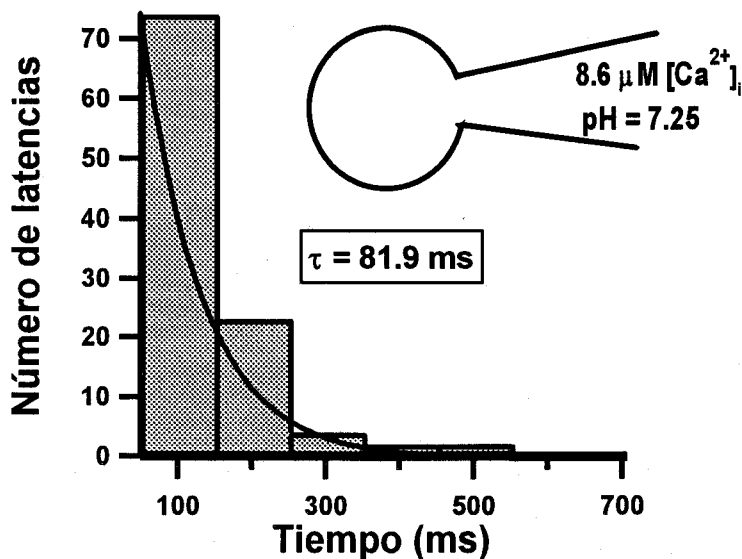


Figura 27. Histograma de las latencias registradas en condiciones de alto calcio ( $8,6 \mu\text{M}$ ), que sigue una distribución exponencial con una constante de tiempo de  $82 \text{ ms}$ .

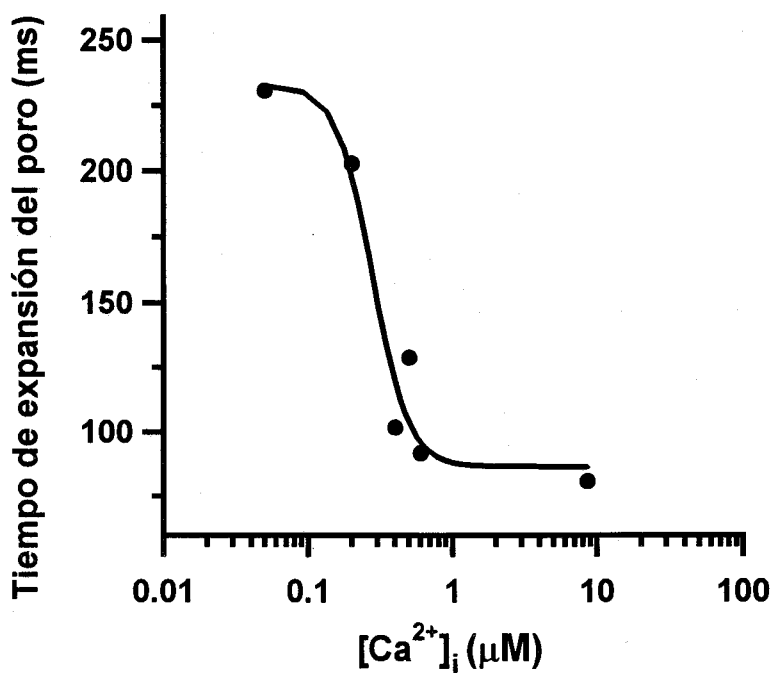


Figura 28. Efecto de la concentración de calcio libre intracelular sobre la latencia entre la fusión y la liberación vesicular. La acción del calcio es ejercida a nivel del poro de fusión. Las constantes de tiempo de las exponenciales calculadas para cada una de las concentraciones de calcio empleadas en nuestros experimentos son los valores de referencia sobre los que se ajusta la función sigmoidea.

### 1.3. Factores que afectan a la liberación del transmisor

El núcleo de un grano secretor de una célula cebada es un hidrogel con una alta densidad de cargas negativas relativas a los grupos sulfatos y carboxilos de la matriz de proteoglicano, cuyo principal componente es heparina sulfatada. Esta matriz atrae los productos secretores cargados positivamente (ejemplos: serotonina (5-HT), histamina y  $\text{Ca}^{2+}$ ). Al pH nativo del interior del grano de aproximadamente 6 (Johnson y col., 1980), la mayoría de la 5-HT ( $\text{pK}_a = 4.9$ ) es almacenada en forma monovalente, mientras que la mitad de la histamina ( $\text{pK}_a = 5.9$ ) es almacenada en forma divalente. Se ha propuesto que cationes orgánicos e inorgánicos compiten por los mismos sitios de la matriz de heparina y que ésta tiene las propiedades de un intercambiador catiónico (Uvnäs y Aborg, 1983), de tal manera que los cationes de la 5-HT pueden liberarse rápidamente de la matriz sólo si hay suficiente número de cationes disponibles ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^{2+}$ ) en el medio externo. Además, esta molécula de proteoglicano es altamente hidrofílica, capaz de atraer grandes cantidades de agua y formar un gel hidratado que ocupa un gran volumen para su masa.

#### 1.3.1. Efecto del pH

Para probar si el retraso antes de la liberación total del contenido puede reflejar el tiempo requerido para iniciar la disociación química de la matriz o gel intravesicular, bañamos las células con solución extracelular a pH similar al del interior del gránulo con objeto de anular el gradiente químico que pudiera ser motor responsable de la descondensación de la matriz y/o liberación del contenido de la vesícula. La comparación se realizó utilizando 3 concentraciones de calcio intracelular, semejantes a las previamente usadas en las condiciones estándar: 200 nM ( $n = 97$ ,  $\tau = 203$  ms), 600 nM ( $n = 152$ ,  $\tau = 171$  ms) y 8.6  $\mu\text{M}$  ( $n = 67$ ,  $\tau = 169$  ms). En los tres

casos se observa que hay un retraso considerable en la liberación a pH 5,5 con respecto a pH 7,2 (figura 29). Las diferencias se hacen un poco más notables a las concentraciones de calcio más altas, donde la expansión del poro deja de ser un paso limitante y el retraso sería debido fundamentalmente al efecto del pH. La anchura media de las espigas amperométricas a alto calcio si es significativamente mayor (151 ms) que en la situación control (73 ms), indicando que existe un enlentecimiento en el curso temporal de la liberación a consecuencia del efecto del pH sobre la descondensación de la matriz de proteoglicano. A pesar de que la 5-HT y la histamina permanecen cargadas positivamente a este pH, compitiendo con los cationes externos por las cargas negativas de la matriz, el propio gradiente químico de estas moléculas parece ser suficiente para que la liberación se siga produciendo.

**Tabla V.** Valores medios de parámetros de las espigas amperométricas medidas en diferentes condiciones experimentales ( $\bar{x} \pm e.e$ ).  $t_{1/2}$ : Anchura media;  $i_{max}$ : amplitud máxima de la espiga

Condiciones	Nºespigas	Anchura media	$i_{max}$ (pA)	$t_{1/2}$ (pA/ms)	Carga (pC)
alto[Ca <sup>2+</sup> ]	111	73,1 ± 3,7	14,3 ± 1,44	0,39 ± 0,04	1,17 ± 0,09
bajo [Ca <sup>2+</sup> ]	61	102,4 ± 10,4	16,5 ± 2,33	0,51 ± 0,07	1,68 ± 0,15
pH 5,5	59	151,5 ± 15,8	14,1 ± 1,96	0,24 ± 0,03	2,19 ± 0,32
alta osmolaridad	159	95,45 ± 6,92	11,6 ± 0,98	0,30 ± 0,03	1,10 ± 0,07
alta histamina	143	75,34 ± 4,50	29,9 ± 2,14	0,77 ± 0,07	2,00 ± 0,10

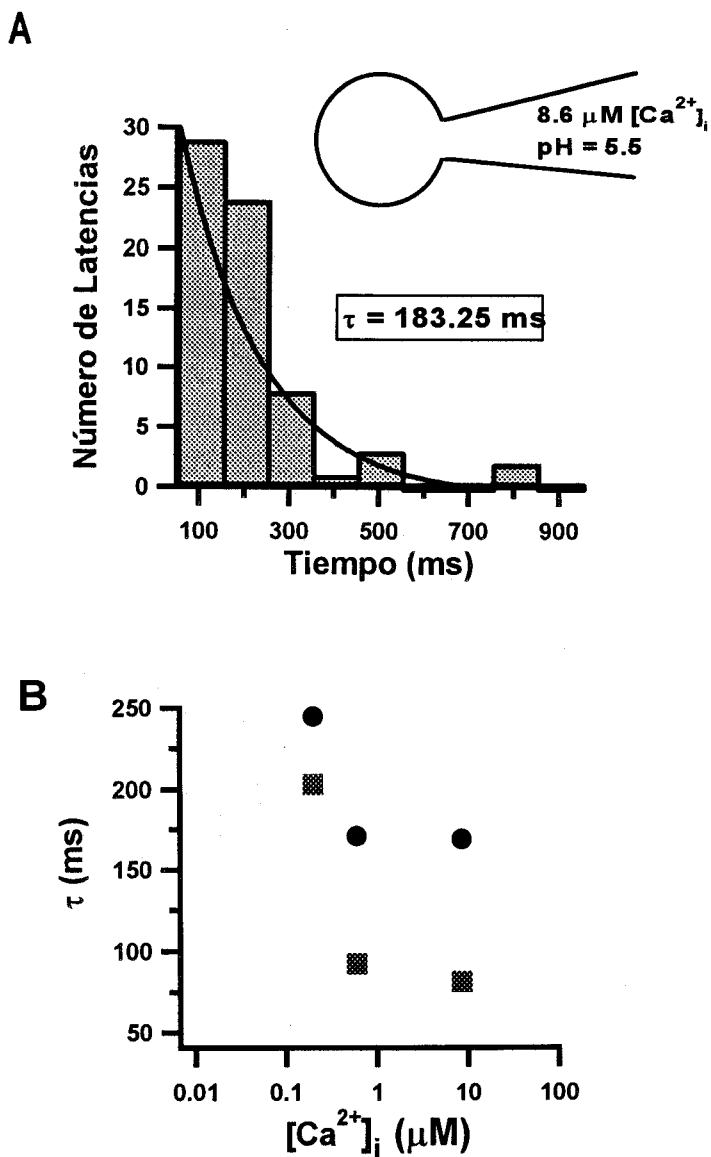


Figura 29. Efecto del pH sobre el tiempo de latencias entre la fusión y la liberación. **A)** Histograma de latencias registradas en condiciones de alto calcio (8,6  $\mu\text{M}$ ) y pH 5.5. El valor de la constante de tiempo es más del doble del valor obtenido en las condiciones control. **B)** Comparación a pH 7.2 (cuadrados) y a pH 5.5 (círculos) de los valores de referencias ( $\tau$ ) para las tres concentraciones de calcio en las que se estudió el efecto del pH.

### 1.3.2. Factores que afectan al hinchamiento de la matriz

Posteriormente a la fusión de la vesícula tiene lugar el hinchamiento de la matriz (Zimmerberg y col., 1987) debido a la entrada de agua a través del poro de fusión. Estos datos indican que el hinchamiento de la matriz no es la fuerza conductora responsable de la fusión de los gránulos secretores con la membrana plasmática. La entrada de agua se produce cuando a través del poro de fusión, dos cationes de sodio sustituyen un catión divalente de 5-HT, disminuye el potencial químico del agua dentro de la matriz del gránulo, y el agua es absorbida por el gel. Además al agua libre, el agua que hidrata los iones disueltos también es tomada por el gel.

#### 1.3.2.1. Efecto de la osmolaridad

Para estudiar si el hinchamiento del gel afecta a la liberación del contenido del grano, procedimos en primer lugar a inhibir el hinchamiento utilizando una solución hiperosmótica ( $660 \text{ mmol.Kg}^{-1}$ ) en el medio extracelular. En estas condiciones, inhibimos el flujo de agua al interior del grano cuando se forma el poro de fusión. Para alta concentración de calcio ( $[\text{Ca}^{2+}] = 8.6 \mu\text{M}$ ) en la solución de la pipeta, la constante de tiempo de la exponencial sencilla que ajusta el histograma de frecuencia de latencias (Figura 30) entre fusión y liberación resulta ( $n = 117$ ,  $\tau = 240 \text{ ms}$ ), 3 veces mayor a la calculada en condiciones estandar. Ya que la inhibición del hinchamiento de la matriz no parece afectar a la expansión del poro (Monck y col., 1991) el retraso en la liberación debe de producirse por un efecto sobre la matriz de proteoglicano. Sin embargo, el hecho de que la liberación no esté inhibida y que los valores medios de las características de las espigas no difieran de los valores control (Tabla V), sugiere que el hinchamiento no es tampoco la fuerza conductora que promueve la liberación.

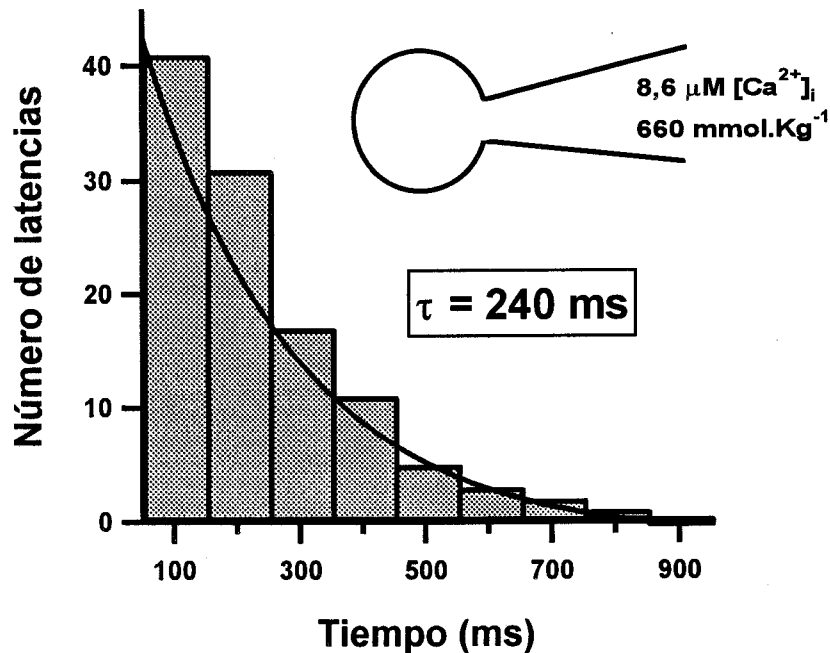


Figura 30. Histograma de las latencias registradas en condiciones de alta osmolaridad.

### 1.3.2.2. Efecto de la histamina

Sometiendo a las células a una solución del baño que contiene 130 mM de histamina, a pH ácido, se inhibe el hinchamiento del gránulo al menos en un 90% y la velocidad de hinchamiento un 20% (Monck y col., 1991). Sin embargo, la liberación de serotonina se produce, confirmando las observaciones previas en condiciones de alta osmolaridad de que el hinchamiento de la matriz no es necesario para la liberación del transmisor. No obstante, el retraso ( $n = 55$ ,  $\tau = 248 \text{ ms}$ ) entre fusión y liberación a  $8,6 \mu\text{M}$  de calcio libre, se incrementa aún de forma más dramática (figura 31).

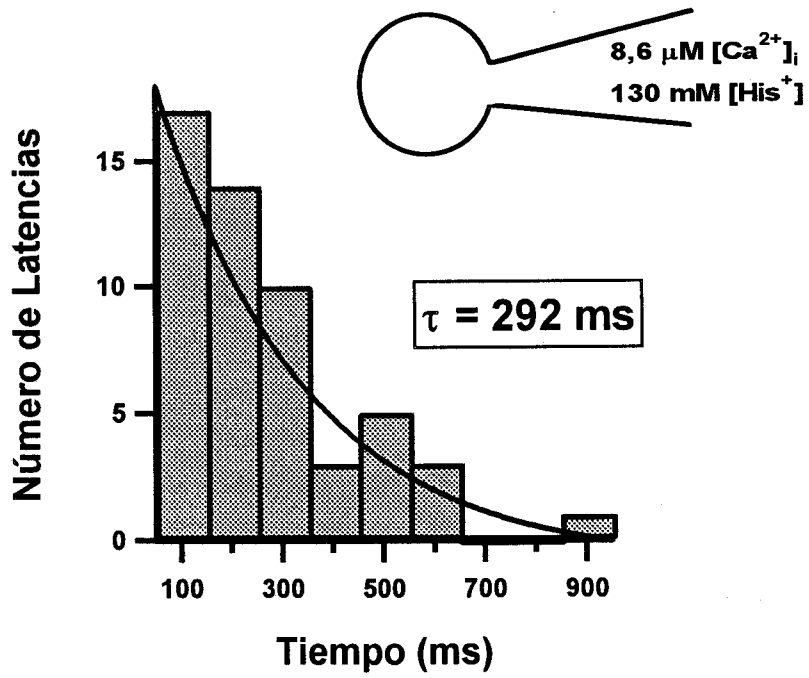


Figura 31. Histograma de las latencias registradas en condiciones de alta histamina.



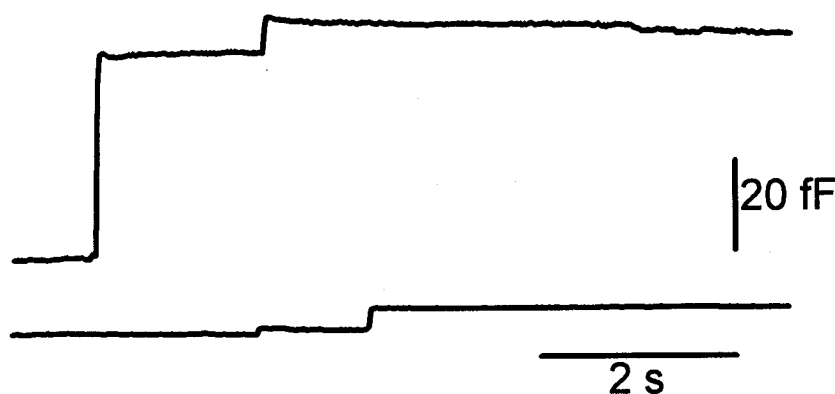
## **2. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPEROMETRÍA EN PARCHE AL ESTUDIO DE LA EXOCITOSIS EN CÉLULAS CEBADAS DE RATA.**

La mayoría de las células secretoras tienen vesículas y gránulos exocitóticos y endocitóticos con diámetros comprendidos entre 60 y 300 nm, que corresponden a cambios de capacidad de 0.1-2.3 fF. Este tamaño es demasiado pequeño para poder ser resuelto en registros de célula completa. Para poder estudiar la exocitosis a nivel de gránulo secretor unitario las células cebadas son un buen modelo por poseer gránulos de mayor diámetro (700-750 nm). Además, el bajo ruido en registros de pequeños parches de membrana proporciona suficiente resolución (Neher y Marty, 1982) para detectar fusiones de vesículas de pequeño tamaño, así como para estudiar las propiedades del poro de fusión. La técnica de amperometría en parche, que combina amperometría con la medida de capacidad en pequeños parches de membrana, se aplicó al estudio de la exocitosis a nivel de vesículas secretoras unitarias en células cebadas de rata. Medimos cambios en la capacidad de la membrana debidos a fusiones de dos tipos diferentes de vesículas. Un tipo de vesícula, de tamaño similar al descrito anteriormente mediante el registro en célula completa y un segundo tipo de vesículas que no habían podido ser detectados anteriormente debido a su pequeño tamaño. Además fué posible por primera vez estudiar la dinámica de la apertura y expansión del poro de fusión exocitótico conjuntamente con la liberación del contenido del gránulo.

### **2.1. Exocitosis de pequeñas vesículas y gránulos secretores específicos**

Incrementos en forma de saltos de capacidad de la membrana del parche (figura 32) se observaron en el 60% de los sellos conseguidos. Estos incrementos debido a fusiones de vesículas ocurrieron espontáneamente y

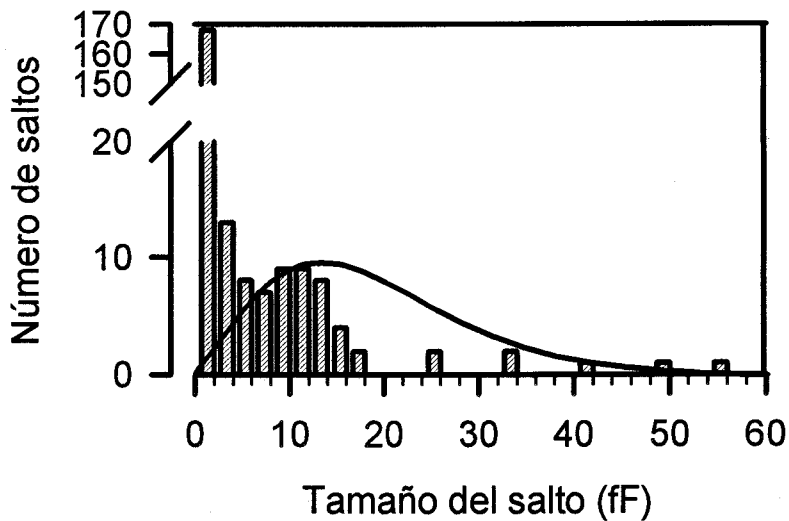
no pudieron ser inducidos por la aplicación del compuesto 48/80, un secretagogo típico de las células cebadas peritoneales de rata (Rohlich, 1971).



*Figura 32. Los incrementos de capacidad, que indican fusión espontánea de vesículas de células cebadas con la membrana del parche, ocurre en forma de saltos de tamaño variable*

El rango de tamaño de los saltos de capacidad se distribuye desde 0.1 fF (nuestro límite de resolución) hasta 100 fF (figura 33), aunque los eventos más frecuentes tuvieron una amplitud entre 0.1 fF y 4 fF, seguidos por aquellos cuya rango de amplitud fluctúa entre 8 y 15 fF. Estos últimos son muy similares a los esperados por fusiones de gránulos de células cebadas específicos (Fernández y col., 1984). La curva envolvente de la distribución de frecuencia de los tamaños de vesículas, derivada de estudios de micrografía electrónica (Helander y Bloom, 1974) (figura 33A) sugiere que los eventos de capacidad detectados por amperometría en parche englobados bajo esta curva, corresponden a la fusión de gránulos de células cebadas específicos. Una distribución más detallada de los pequeños saltos de capacidad (figura 33B) muestra que tiene una forma similar a la observada para gránulos específicos, con un valor medio de 0.35 fF. La mayoría de los eventos están concentrados entre 0.2 y 0.6 fF.

A



B

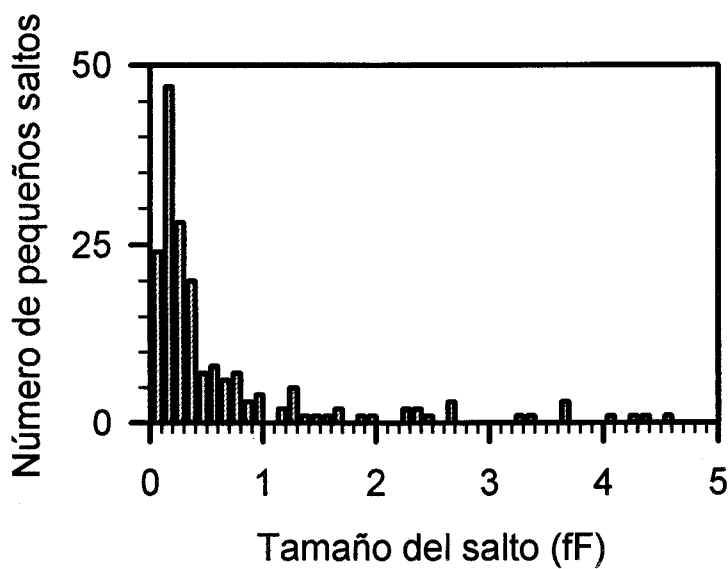


Figura 33. Distribución de frecuencias del tamaño de los saltos de capacidad en células cebadas monitorizados con la técnica de amperometría en parche. La línea continúa en A es el perfil de la distribución de tamaños de gránulos obtenidos por microscopía electrónica. En B, se muestra una distribución de frecuencias de los saltos de capacidad más pequeños, donde se muestran con mayor detalle los primeros 5 fF del histograma mostrado en A.

## **2.2. La fusión de gránulos específicos produce señales amperométricas.**

Los incrementos pequeños en la capacidad de la membrana del parche no son seguidos por ninguna señal detectable en el electrodo de amperometría. Este tipo de eventos correspondientes a vesículas de muy pequeño tamaño se han podido detectar por primera vez con la utilización de esta técnica.

Los grandes incrementos en el área de membrana si fueron acompañados por una señal amperométrica (figura 34), indicando claramente liberación instantánea de serotonina al medio extracelular de gránulos secretores, que se funden con la membrana del parche. Estas espigas amperométricas son similares a las medidas con fibras de carbono extracelulares estandar (Fernández-Chacón y Alvarez de Toledo, 1995).

El número y tamaño de eventos registrados por célula es muy variable. La técnica de amperometría en parche ofrece la ventaja de detectar sólo el material liberado en la pipeta de registro. Esto es importante porque el origen de la señal amperométrica procede de la misma localización, es decir, del parche de membrana y evita la detección de moléculas liberadas en el resto del área de la superficie celular. El efecto de la difusión se refleja en espigas amperométricas de muy variables características. En los registros de amperometría en parche, podemos obviar la variable difusional. Por ello, en general, hay una buena correlación lineal entre la amplitud y la carga de las espigas con respecto al tamaño del salto de capacidad (figura 35), indicando que la cantidad de transmisor almacenada en cada gránulo secretor es muy similar para gránulos de la misma célula. En el registro de la figura 34 puede observarse que en general, aquellas espigas separadas temporalmente poseen parecidas anchuras medias y

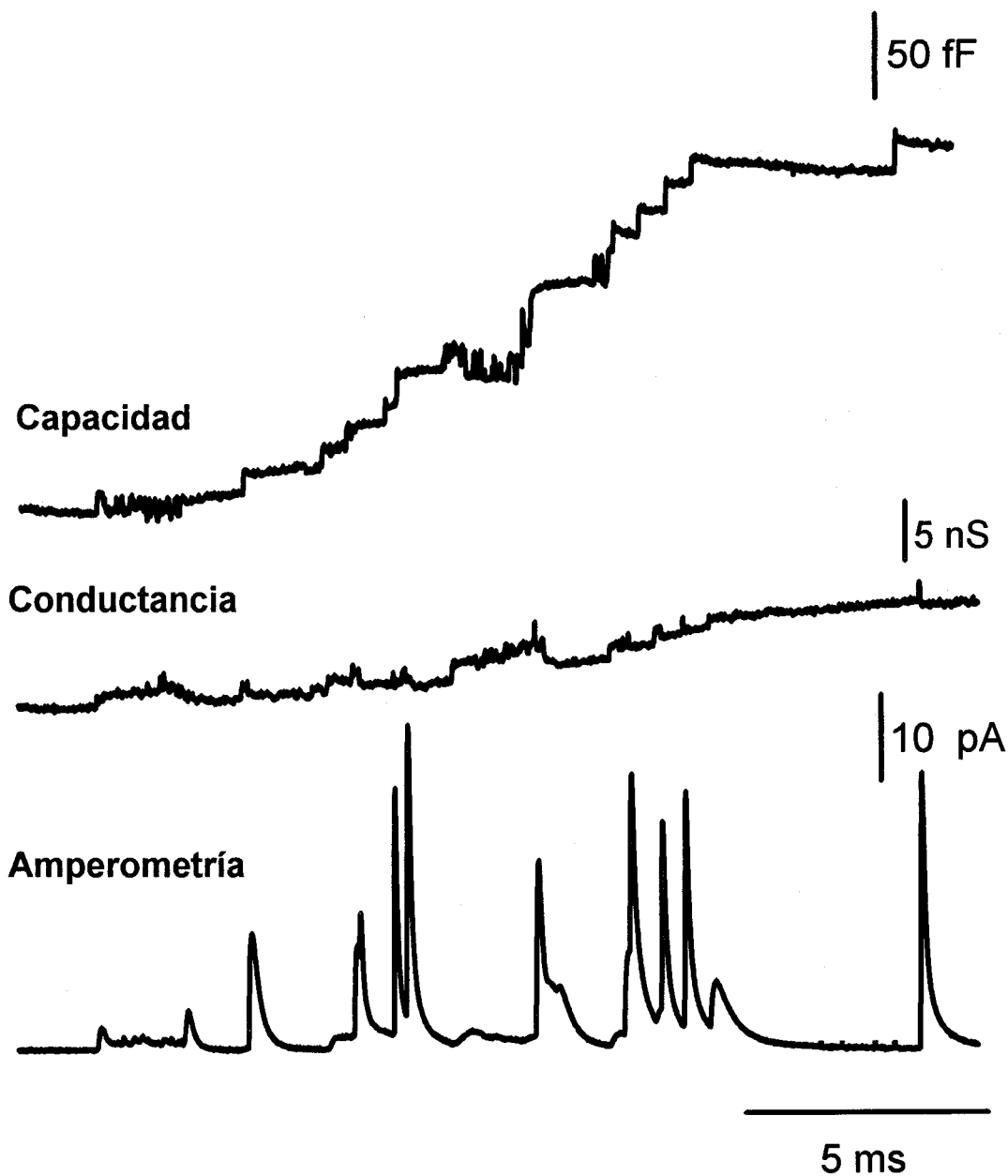


Figura 34. Registro de amperometría en parche en una célula cebada que muestra transientes amperométricos asociados con saltos de capacidad, y trazo de conductancia.

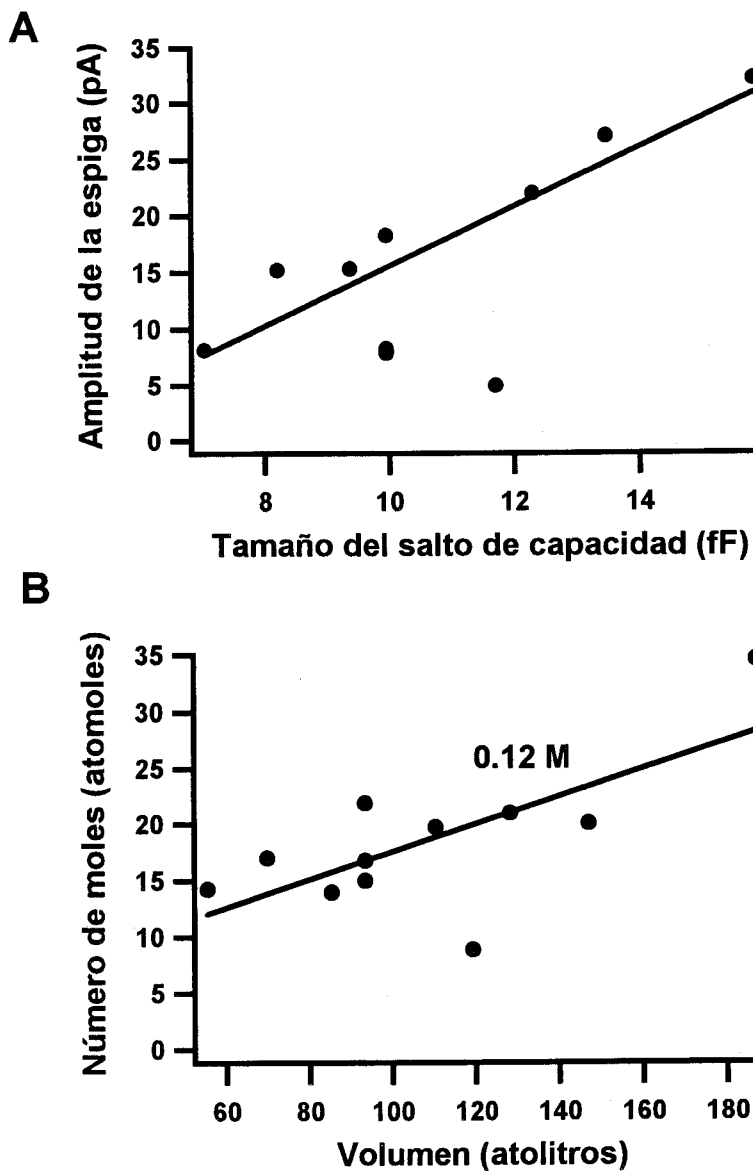


Figura 35. A) Relación entre la amplitud de la corriente amperométrica y el tamaño del salto de capacidad. A partir de la carga de la espiga amperométrica calculada integrando el área bajo la curva es posible hallar el número de moles de transmisor liberado. B) Relación entre el número de moles y el volumen vesicular. La pendiente de 0.12 indica el valor de la concentración (en molar) de los gránulos para esta célula.

fases de subida, debido a la eliminación de la distorsión que introducía la difusión. Sin embargo, en este registro también puede observarse que la cinética del poro de fusión está ejerciendo un papel muy importante en la liberación del transmisor. El trazo de conductancia mostró cambios durante los eventos de fusión, indicando que nuestro sistema en configuración de célula adherida es capaz de registrar actividad de poros de fusión durante la exocitosis. Así, por ejemplo, la figura 36 muestra el primer evento del registro en una escala más expandida. Se produce un transiente amperométrico de pequeña amplitud y forma inusual. Las partes real e imaginaria de la admitancia muestran fluctuaciones correlacionadas de tamaño similar, que es típica de un poro de fusión pequeño. El siguiente evento, un salto de capacidad instantáneo, indica que un poro de fusión se expande rápida y completamente liberando rápidamente el contenido secretor.

### **2.3. Fases en la expansión del poro de fusión**

Una ventaja de esta técnica, por su bajo ruido, es cuantificar con muy buena resolución la conductancia de los poros de fusión que se forman durante la exocitosis. La resolución para medir conductancias del poro de fusión depende del producto  $\omega \cdot C$ . Las medidas de capacidad en célula adherida tienen mínimo ruido a 20 KHz, por tanto fué ésta alta frecuencia la elegida para las medidas realizadas. peritoneales (300 a 800 nm de radio) ofrece una muy buena resolución para medir conductancias de poro. Fué posible determinar la expansión de los poros de fusión a partir de conductancias de poro de rango entre 50 pS hasta más de 1000 nS, lo que nos permite determinar diferentes fases en la expansión del poro de fusión. La figura 37 muestra dos ejemplos de analisis de poros de fusión formados durante la exocitosis de dos gránulos secretores. A partir de los trazos del componente imaginario (proporcional a la capacidad) y del componente real

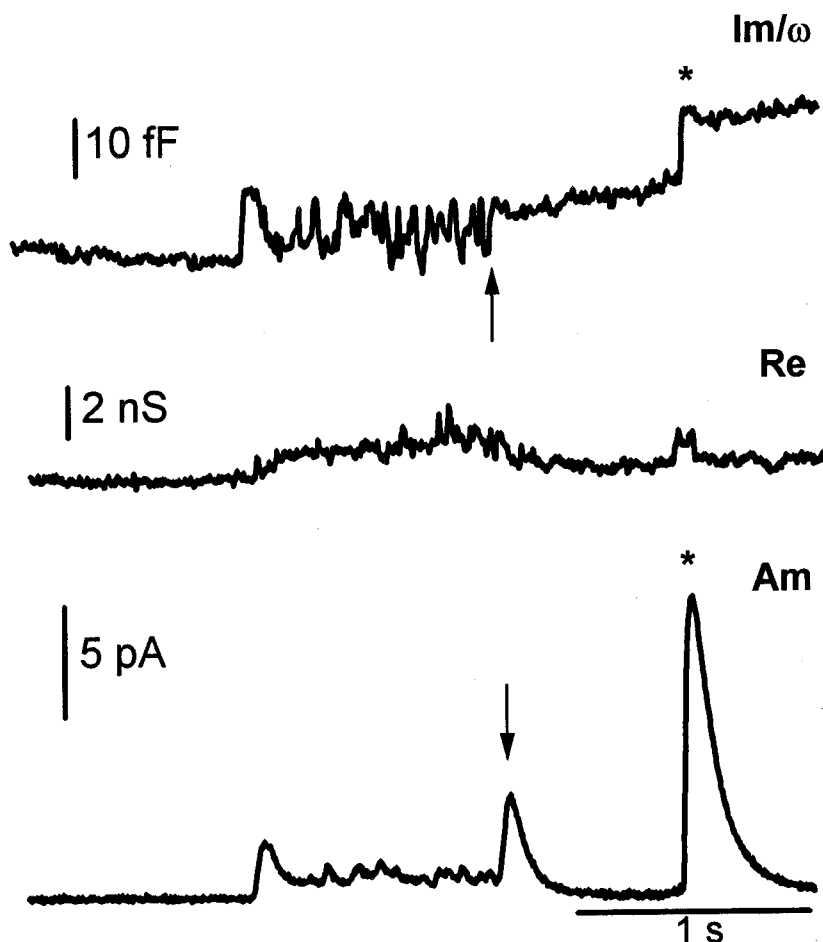


Figura 36. Primer evento del registro anterior mostrado en una escala de tiempo más expandida.  $Im/\omega$ : Parte imaginaria de la admitancia.  $Re$ : Parte Real de la admitancia.  $Am$ : Corriente amperométrica. Las partes real e imaginaria de la admitancia fluctúan durante más de un segundo, indicando parpadeos (aperturas y cierres) del poro de fusión exocitótico que limitan la liberación del transmisor a su través. Finalmente, el poro termina por fundirse completamente con la membrana plasmática y el resto del contenido de la vesícula es liberado (flecha). Cuando la fusión de la vesícula es instantánea, la liberación es en forma de espiga típica (\*).



(proporcional a la resistencia) de la admitancia, podemos calcular la conductancia del poro de fusión. A diferencia de los registros en célula completa (Breckenridge y Almers, 1987), la medida de capacidad en los registros de célula adherida muestran una lenta y pequeña subida en el trazo imaginario antes de producirse un claro incremento en forma de salto. Esta lenta subida en capacidad tiene una proyección más pronunciada en la parte real de la admitancia, indicando que durante esta fase temprana de fusión de membrana, el comportamiento eléctrico de la vesícula está principalmente dominado por un componente puramente resistivo, es decir, por la alta resistencia (conexión estrecha) del poro de fusión. Coincidiendo con el incremento en el trazo de capacidad hay un abrupto incremento en conductancia. Después del salto rápido en la capacidad hay un incremento posterior más lento que corresponde con una lenta disminución en la conductancia.

Es posible conocer el curso temporal del poro de fusión para una vesícula. Para los eventos registrados en nuestros experimentos se pueden distinguir tres fases diferentes. En una fase inicial, cuando se produce la fusión de la vesícula y la conexión es muy estrecha ( $< 1$  nm de diámetro), el poro de fusión permanece alrededor de 500 pS durante más de dos segundos en uno de los eventos mostrados y alrededor de 400 ms en el otro caso. Hay fluctuaciones sobre este valor para ambos eventos y no se observaron cambios discretos en conductancia, indicando una dilatación lenta de ambos poros. En una segunda fase se produce una expansión abrupta del poro como lo indica el incremento en forma de escalón del trazo de capacidad. Esta dilatación fue mucho más rápida que la apertura inicial previa, 1000 nS/s frente a menos de 1 nS/s de la fase inicial. Por último, se puede observar una tercera fase de expansión del poro comparable a la apertura inicial. La conductancia dominante durante la expansión del poro de fusión se puede ilustrar mejor con un histograma de frecuencias (figuras

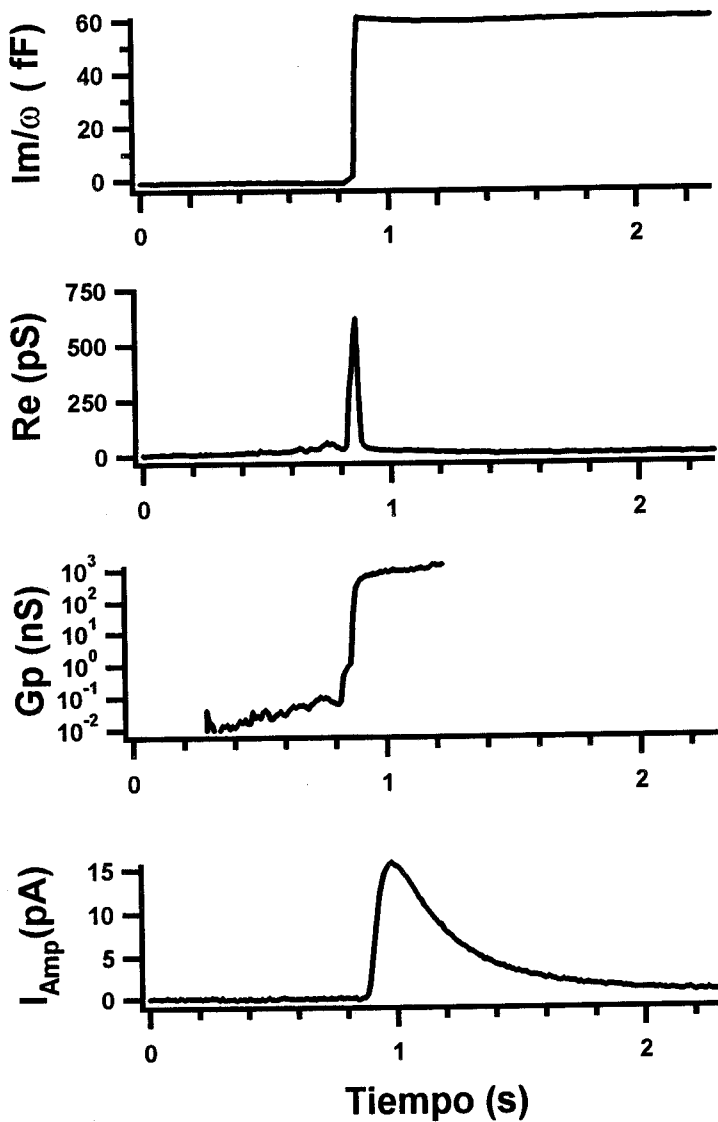


Figura 37 A. Ejemplo de la apertura y expansión del poro de fusión de una vesícula secretora de una célula cebada y la liberación del su contenido secretor en un registro de amperometría en parche. De las cantidades de la parte real ( $Re$ ) e imaginaria ( $Im$ ), el curso temporal de la conductancia del poro ( $Gp$ ) puede calcularse (Ver Métodos).

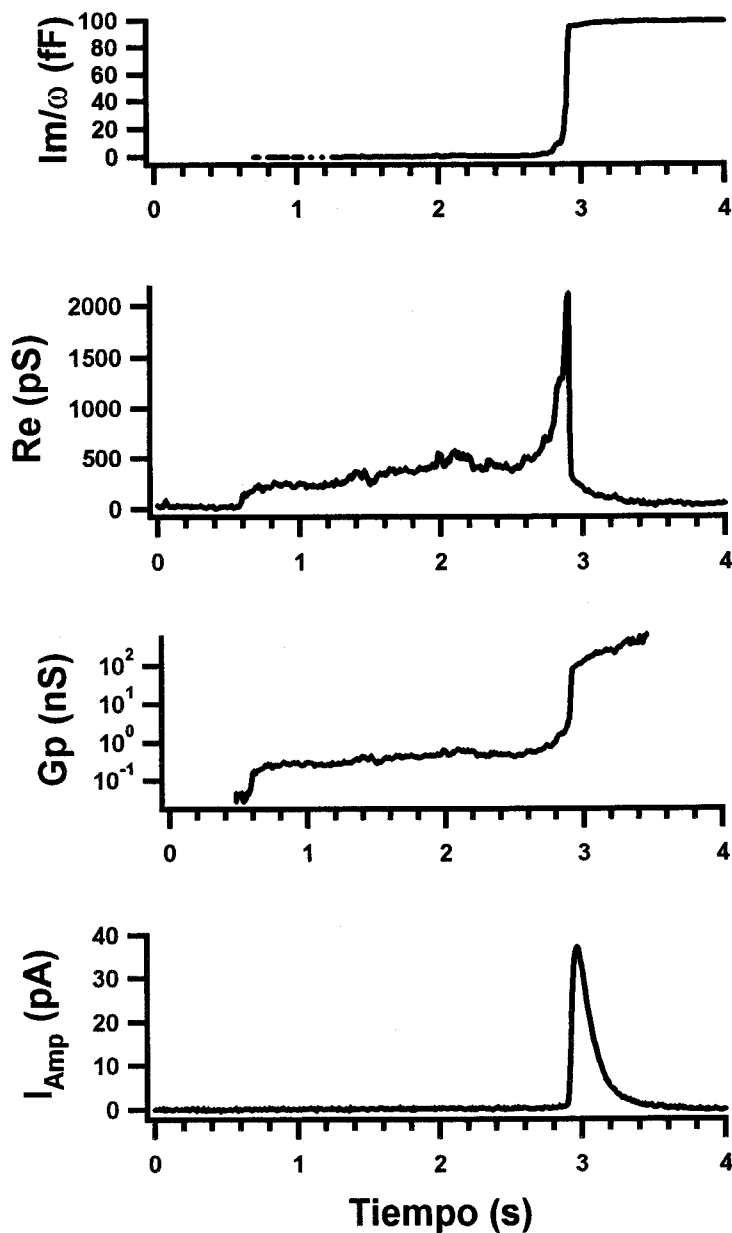


Figura 37 B. Ejemplo similar al anterior. En ambos, se distinguen tres fases de expansión del poro . La primera una conductancia del poro muy pequeña, de larga duración, la segunda un aumento rápido, mayor de 10 nS y que se corresponde con la fase de subida de la espiga de liberación. En la última fase, el poro se dilata lentamente por encima de los 100 nS.

38A y B), La fase inicial tiene una conductancia variable entre 30 y 300 pS, siendo característico de un gránulo secretor particular. Por ejemplo, en el evento de la figura 38A, la fase inicial tiene una conductancia media de 260 pS versus la conductancia dominante de 60 pS de la figura 38B.

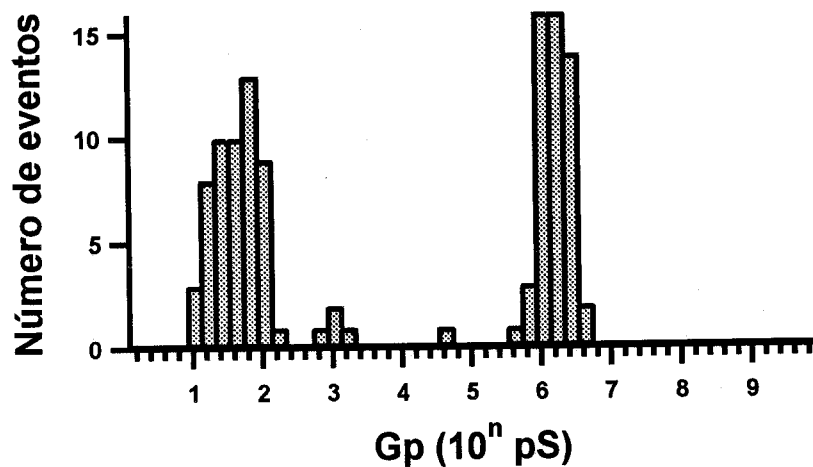
Al mismo tiempo que se sigue el curso temporal de la expansión del poro de fusión se puede establecer una correlación con la liberación del contenido de los mismos gránulos. La fase inicial no está acompañada por ninguna señal detectable en amperometría, probablemente indicando que en nuestras condiciones de registros el electrodo de la fibra de carbono esta demasiado lejos (4-8  $\mu\text{m}$ ) de la membrana del parche para detectar la lenta liberación de serotonina a través del poro de fusión ("pie") (Chow y col., 1992; Alvarez de Toledo y col., 1993). Inmediatamente después de la expansión rápida del poro (fase II) se observa la fase de subida de la espiga amperométrica. La expansión última del poro (fase III) se desarrolló durante la fase decayente de la espiga de liberación.

#### **2.4. Endocitosis en configuración de célula adherida.**

Después de la formación del sello, la capacidad de la membrana del parche disminuye de forma continua durante 200-300 fF en los dos primeros minutos del registro, hasta alcanzar un nivel constante. Los decrementos en la capacidad del parche suceden en forma de escalones (figura 39A, probablemente indicando captación de membrana de la membrana plasmática. El histograma de frecuencias de estos escalones descendentes (figura 39B) se ajusta bien a una exponencial sencilla con una media de 0.25 fF (rango de 0.1 fF a 1.7 fF). A veces estos decrementos ocurrieron de forma transitoria, probablemente indicando la formación de un poro de fisión transitorio. La velocidad de disminución de la capacidad de la membrana del parche varió ampliamente y solo ocasionalmente la disminución inicial de la

capacidad de la membrana del parche fue interrumpida con incrementos continuos de capacidad.

**A**



**B**

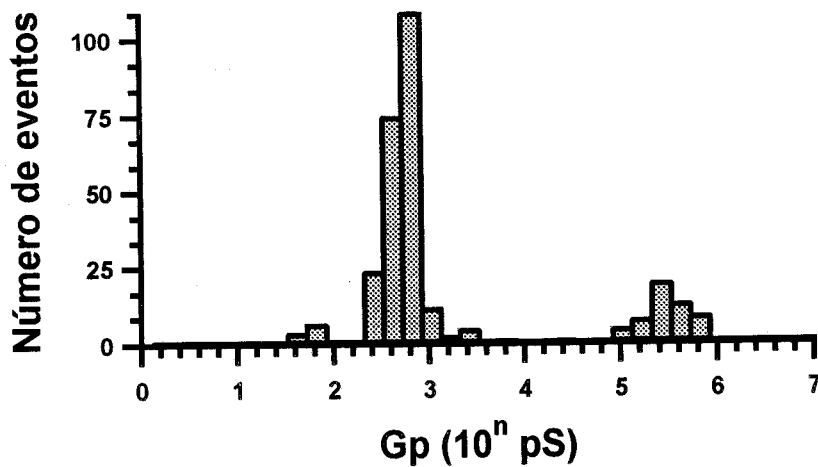


Figura 38. Histogramas de frecuencias de los valores de conductancias de los poros mostrados en la figura 37A y B.

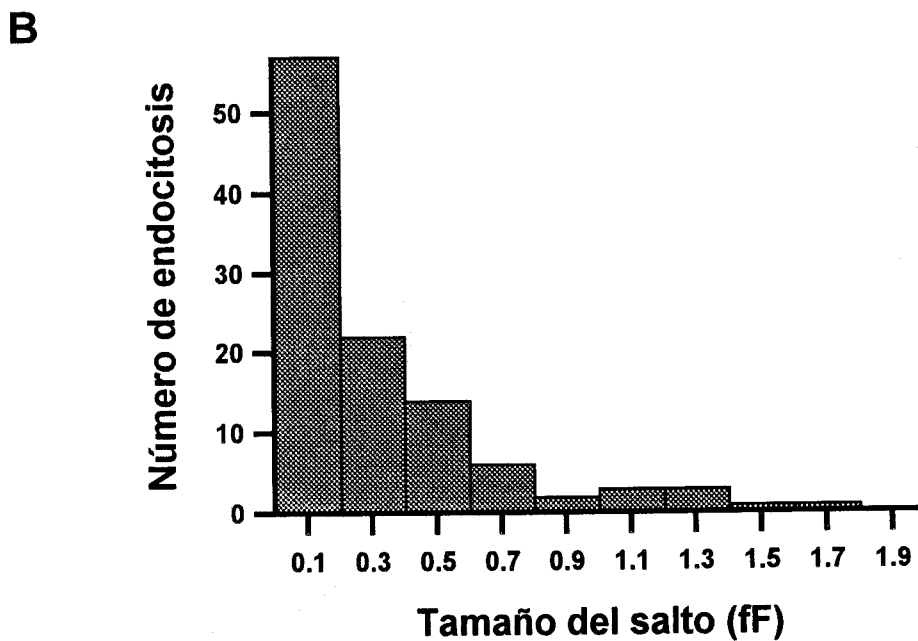
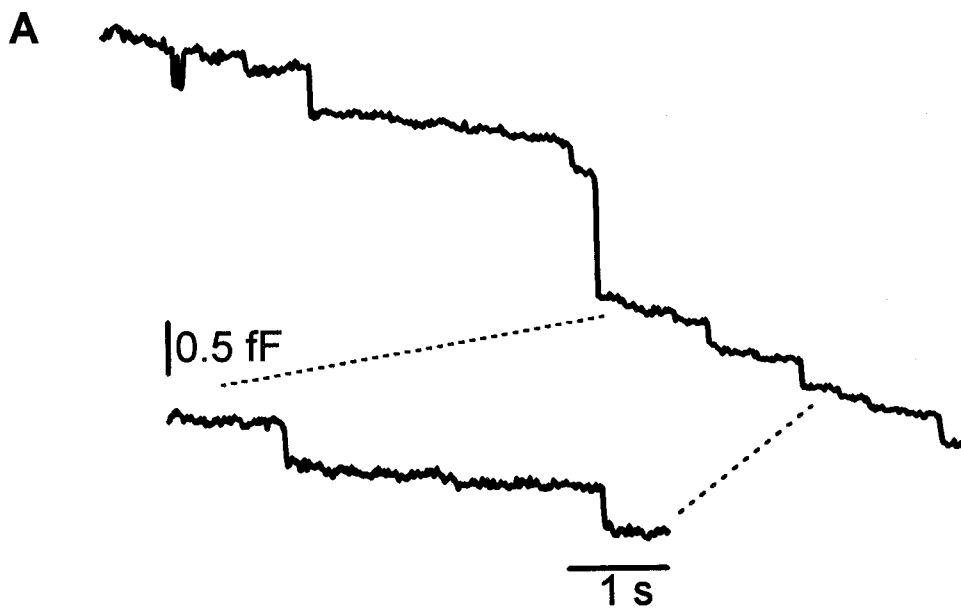


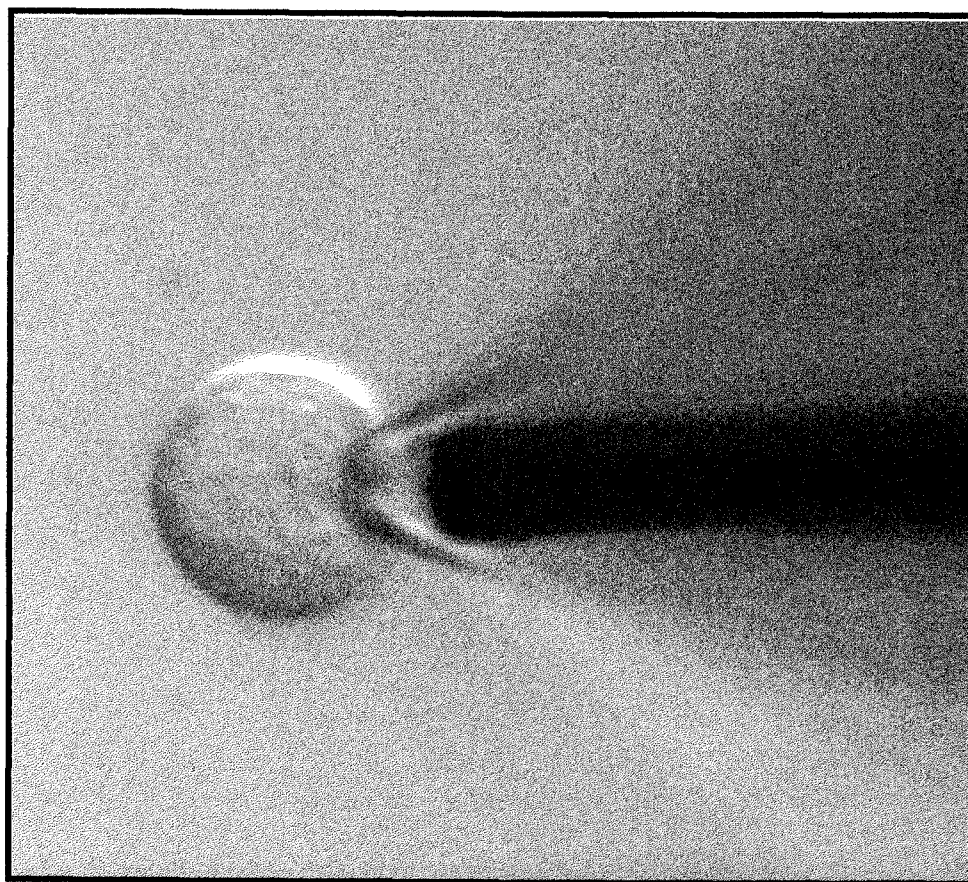
Figura 39. Endocitosis en un parche de membrana durante los primeros segundos después de obtener un gigasello en una célula cebada. La distribución de frecuencias de los decrementos de capacidad muestra que más del 80% de los eventos tienen un tamaño entre 0.1 y 0.7 fF.

### **3. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE AMPEROMETRÍA EN PARCHE AL ESTUDIO DE LA SECRECIÓN EN CÉLULAS CROMAFINES DE RATA.**

En este apartado se estudia el fenómeno secretor en células cromafines de rata utilizando la técnica de amperometría en parche. La figura 40 muestra una célula cromafín durante el transcurso de un experimento típico y la figura 41 representa el comienzo de un registro de una célula cromafín en el proceso de consecución de un sello. Desde que una micropipeta es introducida en la solución del baño hasta que finalmente se consigue una unión perfecta entre ésta y la superficie de la membrana, se produce un aumento en la resistencia eléctrica del electrodo. Al mismo tiempo, conforme se produce una aproximación gradual del detector electroquímico a la superficie celular se pueden observar espigas de liberación producidas por estimulación mecánica de la célula. Una observación interesante es que a pesar de que algunas de las espigas amperométricas se producen aún antes de la completa obtención del sello, las características morfológicas de todas ellas son muy semejantes.

#### **3.1. Tipos de exocitosis**

La alta resolución de la técnica de amperometría en parche permite resolver eventos unitarios de fusión con buena relación señal-ruido. Atendiendo a los tipos de variaciones que se producen en el registro de capacidad durante la exocitosis en las células cromafines de rata, se han distinguido dos tipos de eventos de fusión de las vesículas secretoras con la membrana plasmática: Las fusiones irreversibles y las reversibles. Las fusiones irreversibles o fusiones completas son aquellas en que el incremento de capacidad se mantiene estable, es cuando la membrana vesicular se integra en la membrana plasmática. Las fusiones reversibles o también denominadas "flickers" se caracterizan porque se forma un



*Figura 40. Fotografía tomada de una célula cromafín de rata durante el transcurso de un experimento de amperometría en parche.*



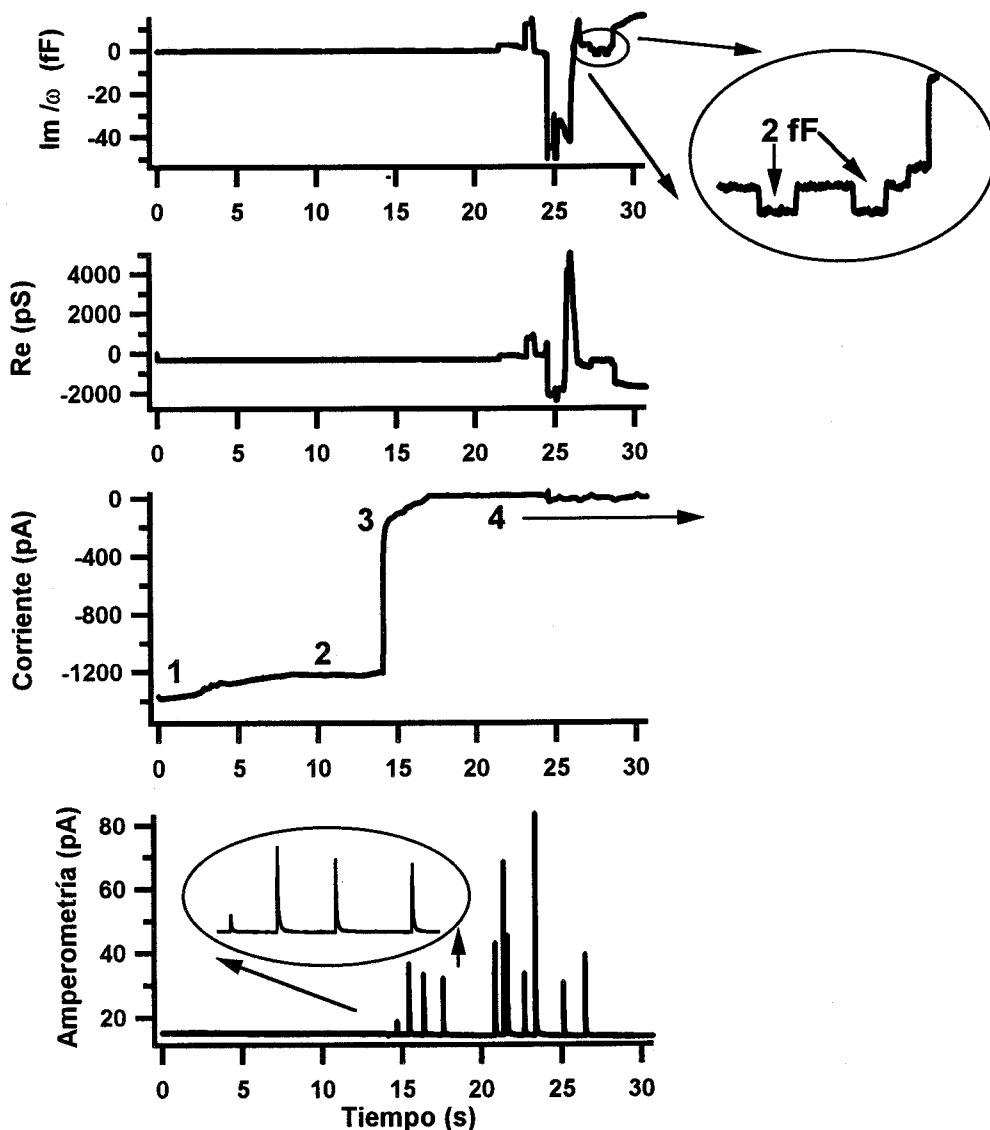


Figura 41. Primeros 30 segundos de un experimento típico de amperometría en parche en una célula cromafín de rata. La corriente registrada desde que la pipeta se encuentra en la solución del baño (1), toca la célula (2), se ejerce presión negativa (3) y finalmente la pipeta sella con la superficie de la membrana celular (4) va disminuyendo (en valor absoluto) progresivamente al principio y rápidamente al final hasta hacerse casi 0, que es cuando la resistencia de la pipeta se hace muy alta. Después de la consecución del sello, se procede a compensar el componente rápido de la capacidad (deflexiones en  $Im/\omega$  y  $Re$ ) y a dar el pulso de calibración de 2 fF (inserto en el trazo  $Im/\omega$ ). Voltaje aplicado a la micropipeta : -2 mV.

incremento capacitativo transitorio debido a la conexión (poro de fusión) formada durante un período de tiempo entre el interior de la vesícula y el medio extracelular.

### **3.2. Fusiones unitarias de vesículas secretoras y liberación de catecolaminas**

En aproximadamente un 25% de los parches en los que se consigue un sello de alta resistencia eléctrica con la técnica de amperometría en parche se producen de forma espontánea eventos excitotóxicos en forma de incrementos de capacidad asociados con espigas amperométricas (figura 42). Cada incremento discreto de capacidad indica la apertura total de una vesícula secretora cromafín al medio extracelular y cada espiga amperométrica la liberación del contenido total de la vesícula. Sin embargo, en ocasiones, se observan transientes amperométricos de menor amplitud y forma inusual que se corresponden con fusiones transitorias de vesículas con la membrana plasmática, similares a las ya observadas en células cebadas (Alvarez de Toledo y col., 1993) y cromafines bovinas (Albillos y col., 1997), donde la liberación se produce lentamente debida a las estrechas dimensiones del poro de fusión.

A veces también aparecen saltos de capacidad irreversibles que no llevan asociados ninguna espiga amperométrica (figura 43A), indicando que se trata de gránulos vacíos de catecolaminas. No se trata de una falta de detección o sensibilidad del electrodo de la fibra de carbono puesto que en esta misma célula se pueden observar espigas amperométricas correspondientes a incrementos irreversibles de capacidad.

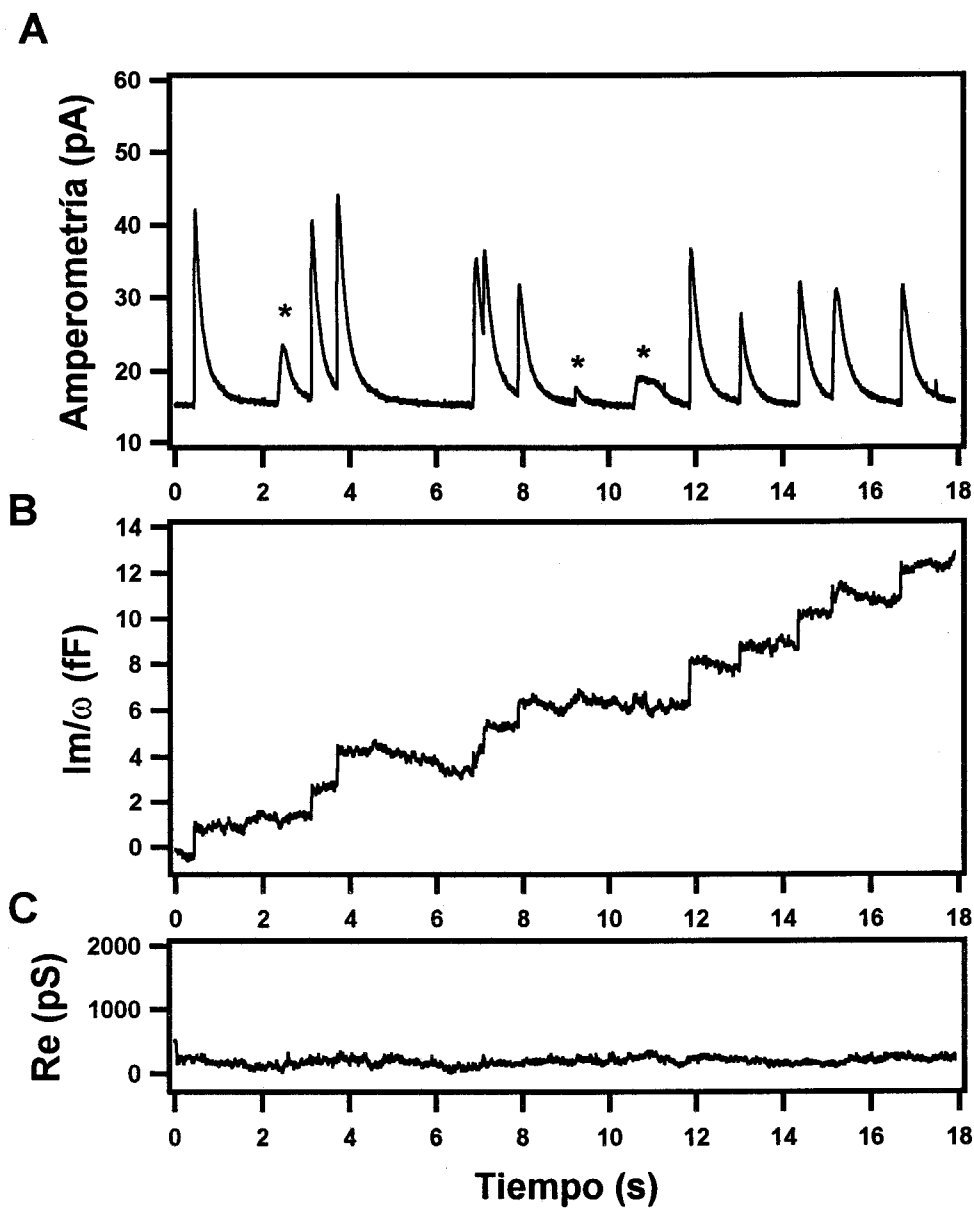


Figura 42. Fusiones irreversibles de gránulos cromafines de rata utilizando la técnica de amperometría en parche. La resolución de esta técnica permite resolver la fusión de un único gránulo cromafín. Los eventos de amperometría marcados corresponden a liberaciones durante eventos de fusión transitorios. **A)** Espigas de liberación amperométrica. **B)** Incrementos irreversibles de capacidad. **C)** Trazo de conductancia.

### **3.3. Características de los eventos unitarios con fusión irreversible**

#### **3.3A. Relación entre el salto de capacidad y la espiga amperométrica**

En general, para cada célula se puede observar una muy buena correlación entre el tamaño del salto de capacidad irreversible (o tamaño de la vesícula) y la amplitud de la espiga amperométrica (o contenido de neurotransmisor). Esto indica que el contenido de catecolaminas para cada vesícula suele permanecer constante. Para determinar la concentración de catecolaminas dentro del gránulo, el contenido de catecolaminas fué calculado de la carga de las espigas amperométricas, asumiendo una transferencia de dos electrones por molécula (Bauer y col, 1988), y los tamaños de los saltos de capacidad fueron convertidos a volúmenes de gránulos. La pendiente de la recta de correlación entre el contenido de catecolaminas de los gránulos que liberaron y el volumen de los mismos indica la concentración molar media (figura 43B).

#### **3.3B. Dimensiones de un gránulo cromafín**

La figura 44 muestra la distribución de tamaños de los incrementos discretos de capacidad. El tamaño medio fue de  $1.13 \pm 0.03$  fF (media  $\pm$  d.e) con un rango desde 0.25 y 2.8 fF. La transformación de la capacidad de la vesícula a radio de vesícula (asumiendo una capacidad de membrana específica de  $9 \text{ fF} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ ) predice un radio de vesícula de  $92 \pm 22$  nm (media  $\pm$  d.e). Estos valores se ajustaron bien a una distribución de gauss. El tamaño que hemos determinado es inferior al determinado por microscopía electrónica en cromafines de rata (Tomlinson y col., 1987; Nordmann, J., 1983) y al estimado en cromafines bovinas (Albillos y col, 1997) pero muy similar al predicho para gránulos cromafines de ratón usando análisis de ruido en medidas de capacidad en célula entera (Moser y Neher, 1997).

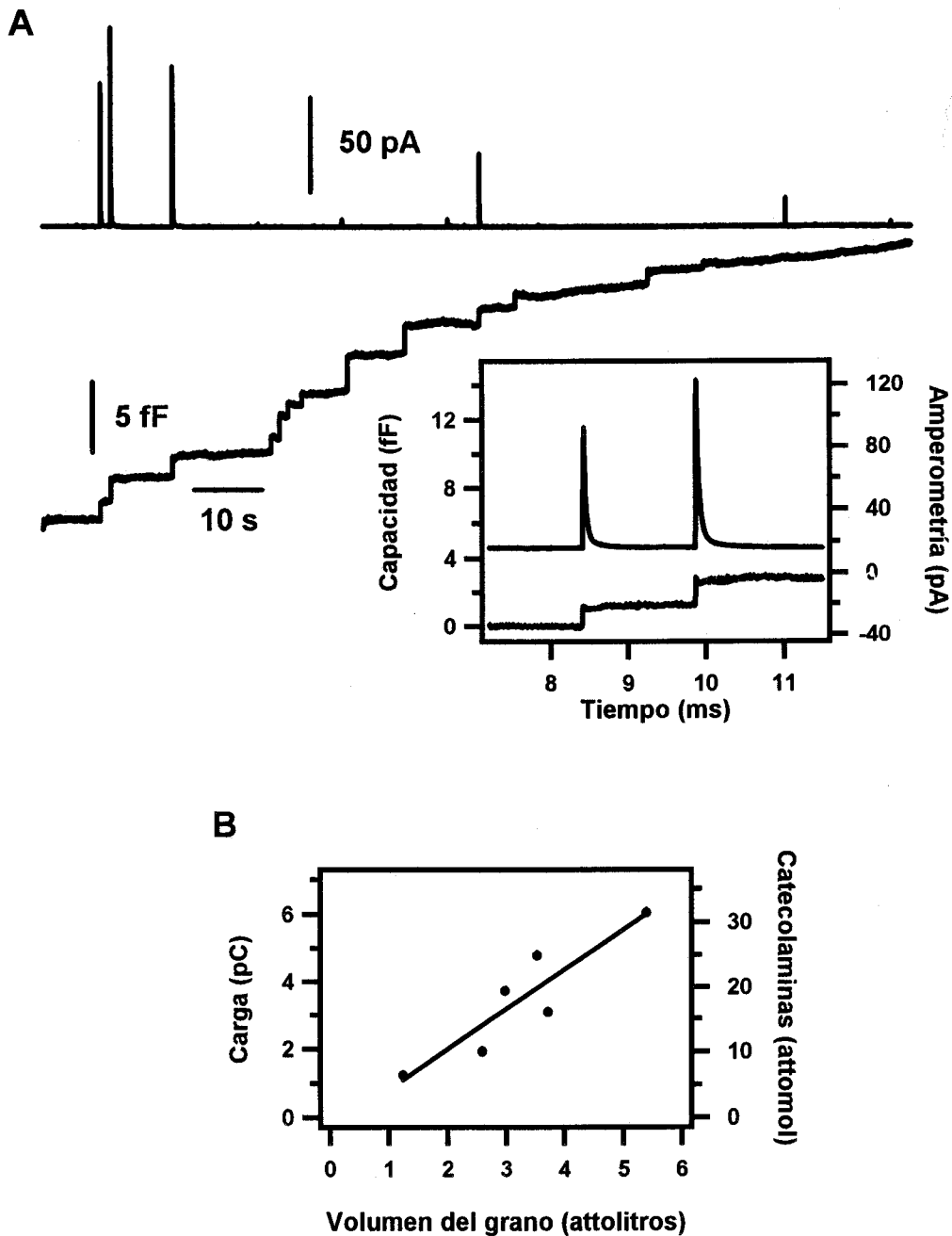


Figura 43. **A)** Registro de amperometría en parche en que se observa fusiones de vesículas vacías de catecolaminas. El inserto corresponde a una expansión temporal de los dos primeros eventos de fusión donde se produjo liberación total en forma de espigas amperométricas típicas. **B)** Relación entre contenido de catecolaminas y volumen del grano de los eventos con liberación de la célula anterior. La pendiente de la recta indica la concentración molar media para esta célula.

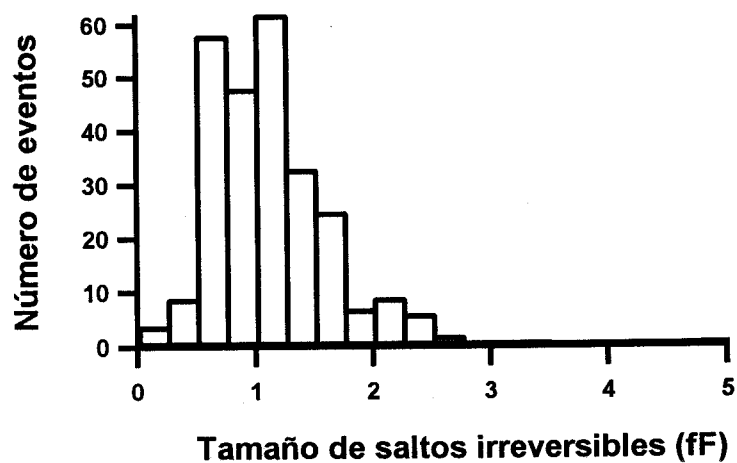
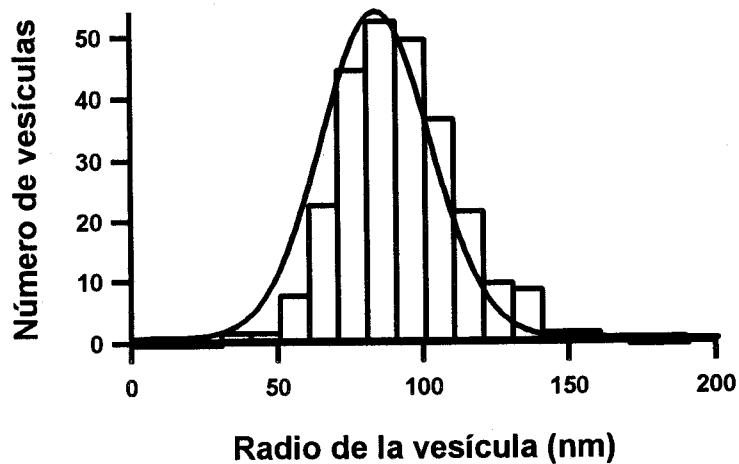
**A****B**

Figura 44. **A)** Distribución de los tamaños de los saltos de capacidad de fusiones completas de vesículas cromafines con la membrana del parche. **B)** Transformación de tamaño de capacidad a radio de vesícula y ajuste por una función de gauss.

### 3.3C. Cantidad y concentración de catecolaminas de un gránulo cromafín.

La cantidad de catecolaminas liberada de cada gránulo fue estimada por la integral de las espigas amperométricas (carga). La distribución de cargas (figura 45) tiene un valor medio de  $1.51 \pm 0.1$  pC ( $\pm$  e.e.). De la distribución de tamaños de saltos y de la carga amperométrica estimamos una concentración de catecolaminas media ( $\pm$  e.e.) de  $2.5 \pm 0.15$  M, superior a la estimada en cromafines bovinas (Albillos y col, 1997) y a la concentración determinada en cromafines de rata por métodos morfométricos (Tomlinson y col, 1987).

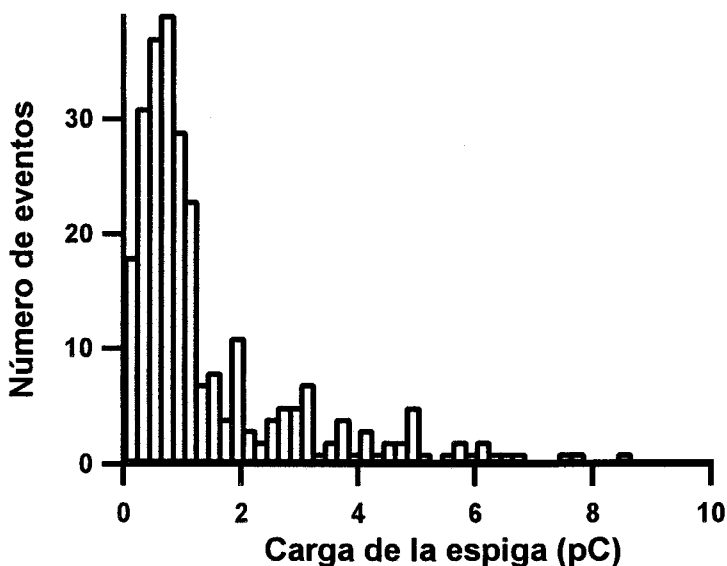


Figura 45. Distribución de la carga de catecolaminas de las espigas amperométricas asociadas a las fusiones irreversibles de vesículas cromafines.

### **3.4. Fusiones reversibles de los gránulos cromafines de rata**

Con alta frecuencia se registran espigas amperométricas acompañadas por incrementos de capacidad reversibles muy rápidos (figura 46). A diferencia de los transientes amperométricos de fusiones reversibles observados en la figura 42, que tienen escasa incidencia y que son lentos y de escasa amplitud, estas espigas muestran propiedades cinéticas similares a las espigas de fusiones irreversibles. En el registro mostrado en la figura 46 puede observarse como a pesar de monitorizarse espigas rápidas que indican liberación de catecolaminas del parche de membrana aislado, no hay cambio neto de capacidad, desde el inicio al final del registro. Sin embargo, si se hacen notar transitorios o parpadeos ("flickers") muy rápidos de capacidad acompañando a algunas de estas espigas. Esto sugiere que una fusión transitoria de una vesícula cromafín puede producir liberación instantánea de catecolaminas en forma de espiga amperométrica típica. En las otras cinco espigas registradas no se observa cambio evidente en la capacidad. Posiblemente se debe a la falta de detección debida a que los transitorios de capacidad duran menos que nuestra velocidad de muestreo (5 ms/punto.).

### **3.5. Características de los eventos de liberación con fusión reversible**

La amplitud del transitorio de capacidad en estos eventos también está linealmente correlacionada con la carga de la espiga detectada amperométricamente (figura 47). El contenido de catecolaminas es proporcional al volumen del grano, indicando que esta célula de vesículas de tamaños diferentes tiene una concentración de catecolaminas constante de 3.95 M. Esta concentración es 4 veces mayor que la calculada para células cromafines bovinas.



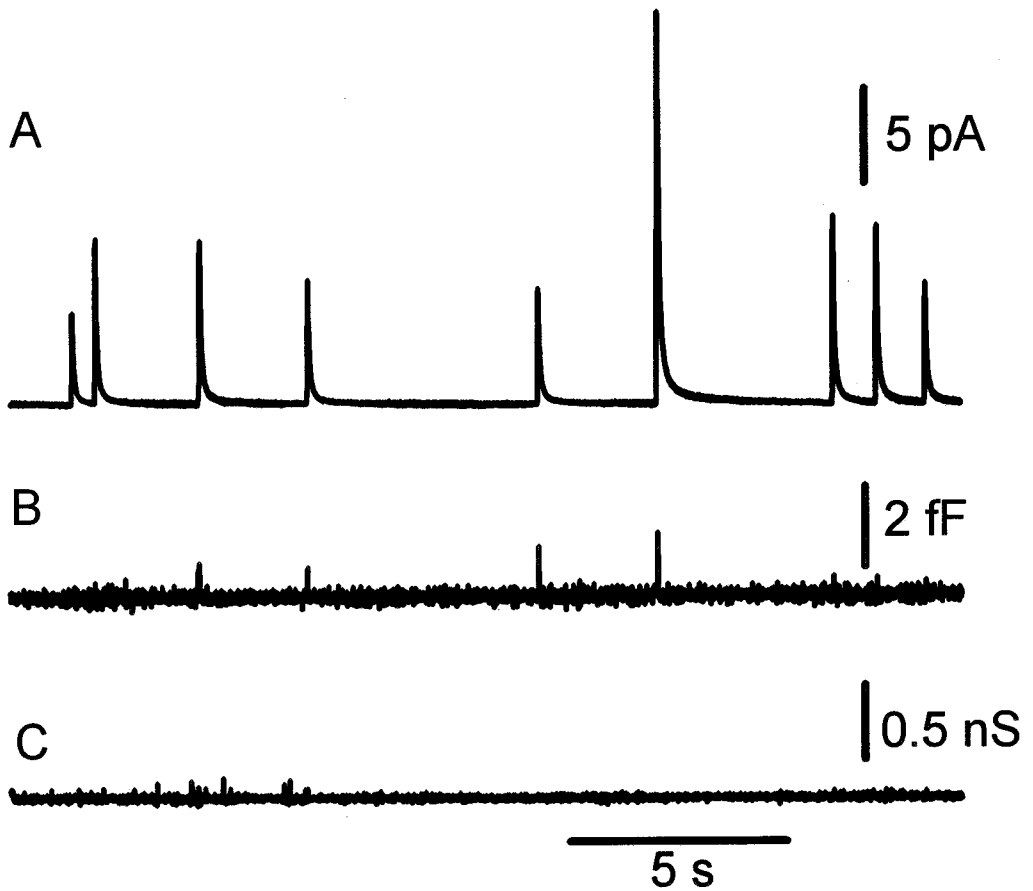


Figura 46. Liberación rápida de catecolaminas durante eventos de fusión transitoria ("flickers") en una célula cromafín de rata, registrada aplicando la técnica de amperometría en parche. A: trazo de amperometría. B: trazo de capacidad. C: trazo de conductancia.

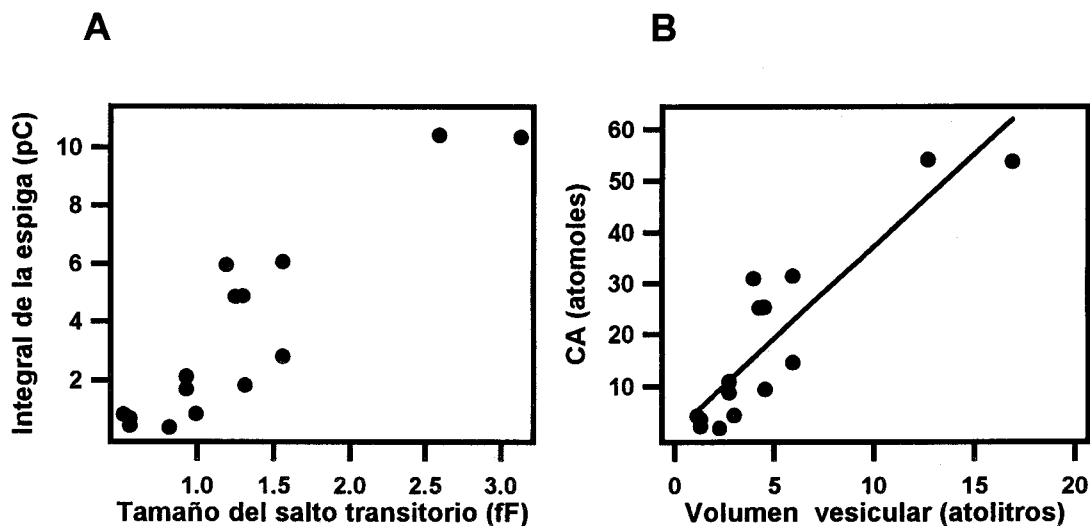


Figura 47. **A)** Relación entre la carga amperométrica y el tamaño de la fusión transitoria de los eventos registrados en la célula mostrada en la figura 5 y **B)** Relación entre el contenido de catecolaminas (CA) y el volumen de gránulo. La pendiente de la recta de regresión indica la concentración de catecolaminas para esta célula: 3.95 M.

### 3.5A. Curso temporal de la liberación durante una fusión transitoria

En la figura 48 se muestra uno de estos eventos en una escala temporal más expandida. El transitorio de capacidad, en forma caja, que muestra singular similitud con el registro de corriente de un canal iónico único, dura 55 ms. Es el tiempo que el poro de fusión conecta el interior del gránulo con el espacio extracelular. La liberación se produce a través de este poro en dos etapas. Primero hay una pequeña liberación de catecolaminas en forma de una pequeña señal amperométrica o "pie", durante 35 ms, seguido por una espiga rápida que indica liberación instantánea del contenido del gránulo al medio extracelular. Cuando la fase de elevación de la espiga alcanza aproximadamente el 80 % de su máximo valor es cuando se produce el cierre del poro de fusión excitotico reflejado en el salto en decremento de capacidad.

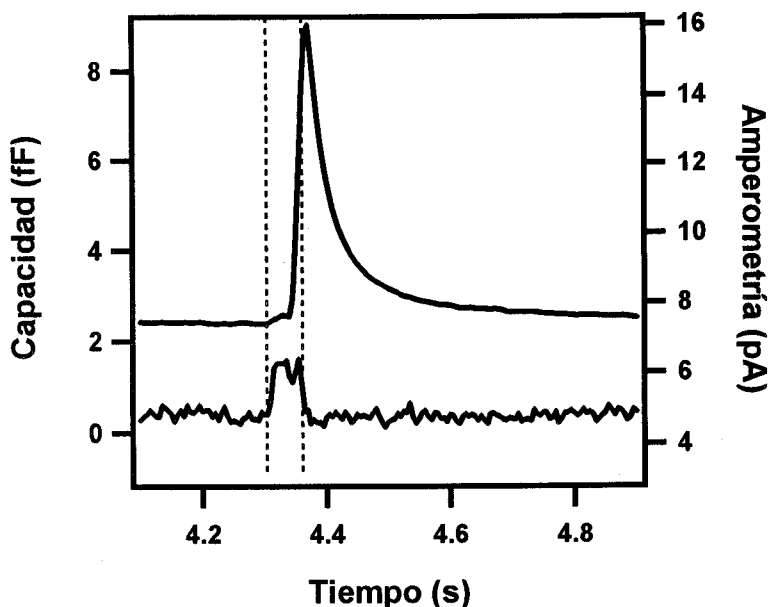
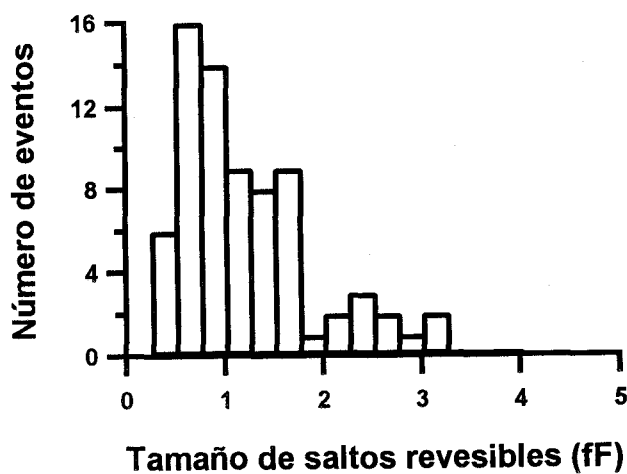


Figura 48. En una escala temporal más expandida se muestra uno de los eventos de la figura 46 (el tercero). La espiga amperométrica se inicia después del pie y antes del salto hacia abajo en la capacidad. Las líneas punteadas indican la duración del evento.

En los 74 eventos de este tipo registrados, siempre después de la aparición de la espiga, de forma inmediata se produce el cierre del poro de fusión, lo que hace pensar que el proceso de fusión por sí mismo es el responsable de la oclusión del poro. Esto difiere de los eventos observados anteriormente y de los observados en células cebadas (Alvarez de Toledo y col., 1993) y células cromafines bovinas (Albillos y col., 1997) donde la liberación se produce en forma mucho más lenta y sin señal amperométrica en forma de espiga típica.

**A**



**B**

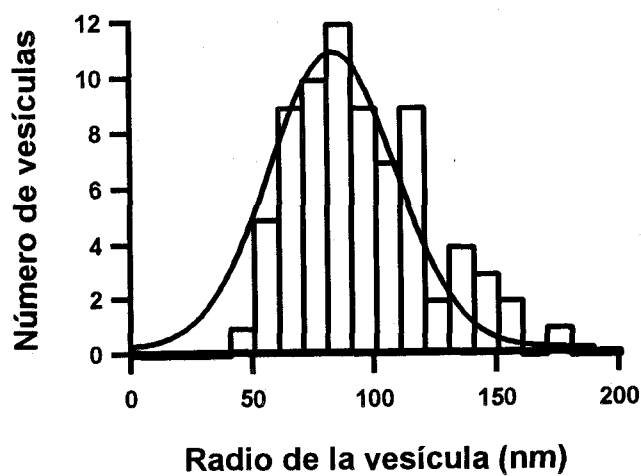


Figura 49. Histogramas de frecuencia del tamaño de los saltos de capacidad reversibles (A) y del radio de la vesícula estimado (B).

### 3.5B. Dimensiones y carga de un gránulo cromafín con fusión transitoria.

La distribución de los tamaños de saltos para los eventos reversibles (figura 49) es muy similar a la obtenida para los eventos irreversibles (figura 44). El tamaño medio de los transitorios es de  $1.23 \pm 0.09$  fF (media  $\pm$  d.e.) y se distribuyó entre 0.25 a 3.25 fF. La distribución de la carga de catecolaminas de las espigas amperométricas también es muy parecida (figura 50) a la obtenida para las vesículas que se funden irreversiblemente con la membrana plasmática (figura 45). La carga media es de  $1.38 \pm 0.17$  pC ( $\pm$  e.e.). La concentración de catecolaminas media estimada para estas vesículas es de  $2.59 \pm 0.15$  M (media  $\pm$  e.e.), que es semejante a la concentración de los eventos irreversibles. Estos resultados claramente sugieren que los eventos reversibles e irreversibles proceden de un mismo tipo de vesículas y que la liberación asociada con los eventos de fusión transitorios es completa.

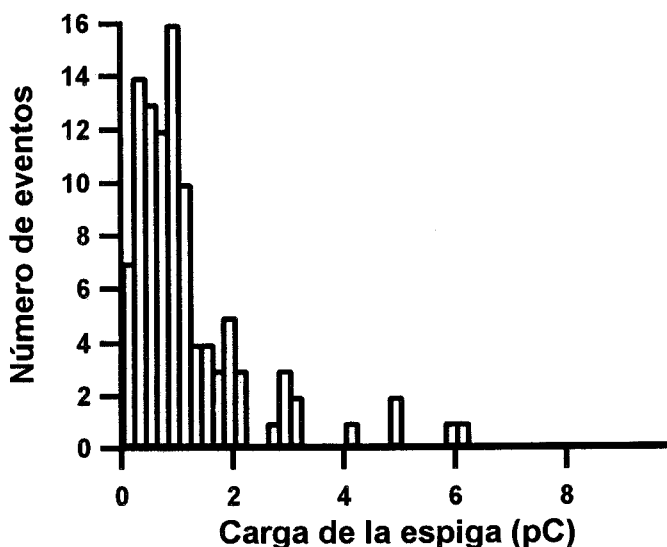


Figura 50. Distribución de carga para los eventos reversibles o transitorios

### 3.5C. Características cinéticas de las espigas amperométricas de fusiones transitorias.

Las características cinéticas de las espigas amperométricas de las fusiones transitorias son muy similares a las que son producto de fusiones completas con la membrana plasmática. La figura 51 compara dos espigas que se han producido cada una por un tipo de fusión en la misma célula, una por fusión completa y la otra por fusión transitoria. La técnica de amperometría en parche nos permite obviar los parámetros difusionales, al encontrarse el detector siempre a la misma distancia del foco de liberación. Los perfiles de solapamiento de las espigas normalizadas son casi idénticos. La espiga de la fusión transitoria presentó un "pie" bastante rápido. El tiempo de subida o tiempo para alcanzar el pico fue de 10 ms, la velocidad de subida de 1.384 pA/s y la anchura media de 45 ms. La fase descendente o cola de la espigas se ajustó bien a una exponencial sencilla con una constante de tiempo de 47 ms. La tabla VI muestra los valores medios de parámetros típicos de fusiones reversibles e irreversibles de gránulos cromafines.

Tabla VI. Valores medios de parámetros medidos en gránulos cromafines de rata usando la técnica de amperometría en parche (valores expresados como media  $\pm$  e.s.)

Tipo de exocitosis	Capacidad del gránulo (fF)	Diámetro del gránulo (nm)	Carga de la espiga (pC)	Amplitud de la espiga (pA)	Tiempo de subida de la espiga (ms)
<b>Fusión Irreversible</b>	1.13 $\pm$ 0.03 n = 266	184 $\pm$ 2.7 n = 266	1.50 $\pm$ 0.09 n = 266	11.7 $\pm$ 1.0 n = 266	30.9 $\pm$ 1.6 n = 266
<b>Fusión reversible</b>	1.22 $\pm$ 0.02 n = 74	189 $\pm$ 6.6 n = 74	1.37 $\pm$ 0.16 n = 103	16.8 $\pm$ 1.9 n = 103	26.3 $\pm$ 2.6 n = 103

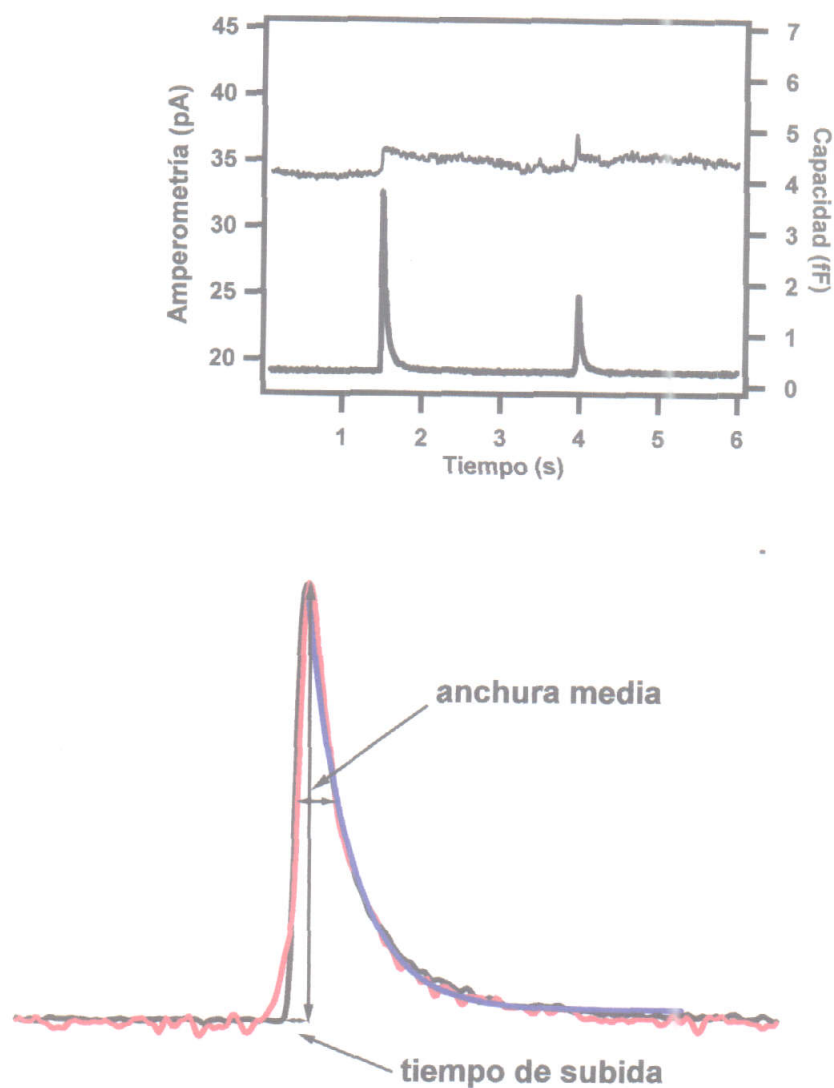


Figura 51. Comparación de las características cinéticas de dos espigas amperométricas. En trazo negro se muestra la espiga que procede de la fusión irreversible y en rojo la procedente del transitorio. En azul se representa la exponencial sencilla que ajusta perfectamente la cola de las espigas. En el inserto se muestra la porción del registro con el trazo de capacidad y de amperometría. Las espigas fueron filtradas y normalizadas para su comparación.

### 3.5D. Duración de los eventos de fusión transitoria

La duración de los eventos transitorios fue variable y la distribución de frecuencias se distribuye exponencialmente (Figura 52). Esta función se ajusta a una exponencial sencilla con una constante de tiempo de 62 ms, indicando el tiempo medio de apertura del poro en nuestras condiciones experimentales.

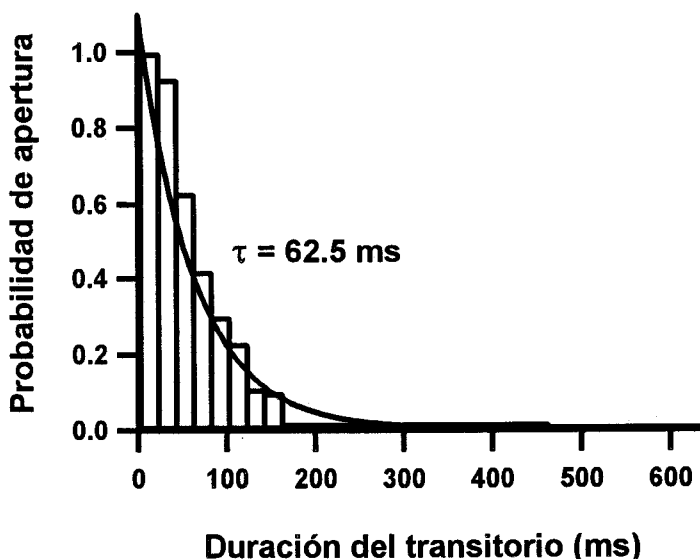


Figura 52. La duración de los eventos transitorios de capacidad esta exponencialmente distribuida.

En ocasiones también hemos observado en el trazo imaginario (figura 53) multiples cambios de capacidad en sentido creciente y decreciente, todos ellos del mismo tamaño pero con distinta duración y no van acompañados de ninguna señal amperométrica, indicando que se trata de un único gránulo cromafín que abre y cierra su poro de fusión repetidamente durante breves periodos de tiempo, produciendo “flickers” de un gránulo que



ya esta vacío de catecolaminas. Es muy improbable que se trate de fusiones de gránulos distintos, todos ellos del mismo tamaño.

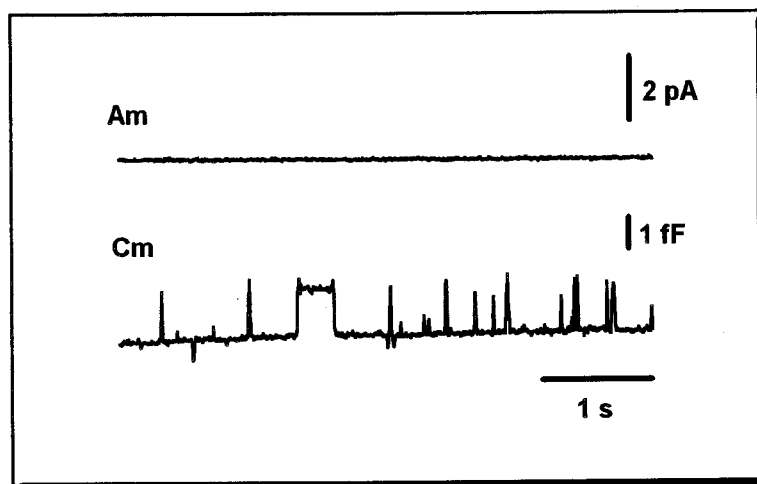
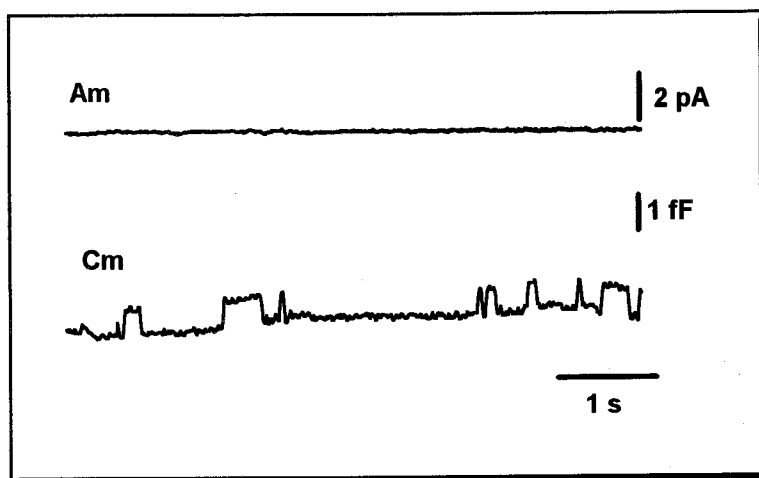


Figura 53. Ejemplos de gránulos cromafines con fusión transitoria repetida sin liberación. Am: Trazo de amperometría; Cm: Trazo de capacidad.

Frecuentemente los transitorios sin liberación sucedieron en células que previamente habían mostrado eventos transitorios con liberación en forma de espigas, lo que sugiere que los mismos gránulos tras abrirse transitoriamente y liberar su contenido, pueden ser competentes para una nueva etapa de fusión aunque no se haya producido todavía el relleno de las vesículas de nuevo neurotransmisor. Los eventos observados más a menudo son aquellos cuyo incremento transitorio en capacidad fluctúa entre 0.7 - 0.9 fF, que son los gránulos más abundantes en células cromafines de rata. Independientemente del tamaño del gránulo, el poro puede abrirse durante periodos de tiempo muy breves, sin embargo, los gránulos más pequeños muestran tendencia a abrirse únicamente durante períodos de tiempo cortos, como muestra el área más vacía de puntos del gráfico de la figura 54.

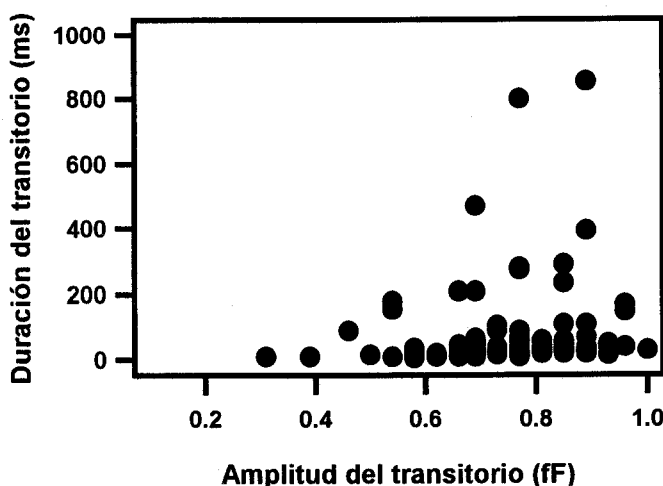


Figura 54. Relación entre duración y amplitud del transitorio de capacidad.

### 3.6. Poros de fusión durante una fusión transitoria.

A partir de la proyección de los trazos Real e Imaginario de la admitancia durante la fusión transitoria de una vesícula podemos calcular la conductancia del poro y la capacidad de dicha vesícula (Ver Métodos). De

esta manera es posible estimar el diámetro alcanzado por el poro de fusión formado durante el transcurso de la conexión entre el medio intra y extravascular al mismo tiempo que seguimos el curso temporal de la liberación de catecolaminas a su través.

Como hemos visto, un poro de fusión de un gránulo cromafín de rata puede transitoriamente abrirse durante pocos milisegundos y liberar completamente su contenido en forma de espiga amperométrica. En ocasiones, también detectamos poros que permanecen abiertos durante varios segundos y liberan parcial o totalmente su contenido con una cinética de liberación más lenta. Las características propias de ambos transitorios vienen especialmente definidas por las características del poro de fusión que se forma. A partir de ahora hablaremos de dos tipos de fusiones transitorias, un tipo de fusión transitoria de corta duración y liberación total y rápida y el segundo tipo, correspondientes a poros pequeños, de larga duración y de lenta y escasa liberación.

### **3.6.1. Poros de fusión con liberación total y rápida**

En la figura 55 se representa el curso temporal de la conductancia ( $G_p$ ) del poro de fusión durante un evento reversible. Junto a este trazo se representan las variaciones que experimentan el componente imaginario ( $Im$ ), el componente real ( $Re$ ) de la admitancia y la capacidad de la vesícula ( $C_v$ ). El trazo inferior es el registro amperométrico que recoge la liberación de catecolaminas. El curso temporal de la liberación es dependiente del curso temporal de la conductancia del poro. Inicialmente se forma un poro con una conductancia que se mantiene en un plató de 400 pS durante 35 ms y durante éste tiempo a través del poro se produce una pequeña fuga del neurotransmisor en forma de "pie" amperométrico. Después la conductancia del poro crece y excede 1 nS antes de cerrarse completamente. La breve

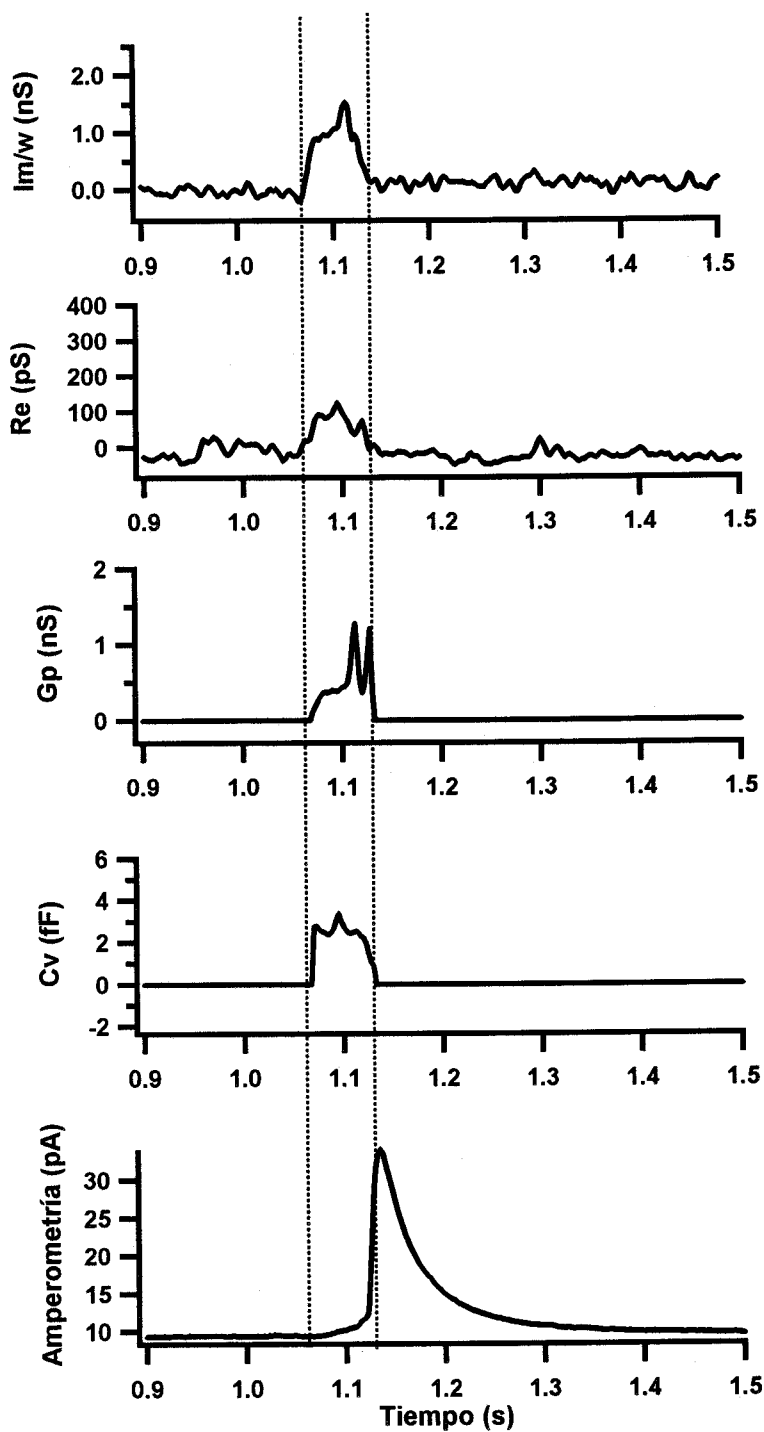


Figura 55. Conductancia del poro ( $G_p$ ) de fusión y capacidad de la vesícula ( $C_v$ ) calculadas de la parte Real ( $Re$ ) e Imaginaria ( $Im$ ) de la admitancia, y pie amperométrico seguido por la señal amperométrica en forma de espiga durante la expansión de dicho poro. Las líneas verticales indican la duración del evento.

expansión del poro de fusión coincide con la espiga amperométrica. El poro suele crecer tan rápidamente que la conductancia no se puede determinar con seguridad, aunque siempre excedió los 700 pS, y probablemente crece hasta un valor mayor. Los niveles de conductancia máxima que pudieron ser medidos durante los eventos de fusión transitorios son muy variables y no dependen del tamaño del gránulo ni de la duración del transitorio (figura 56).

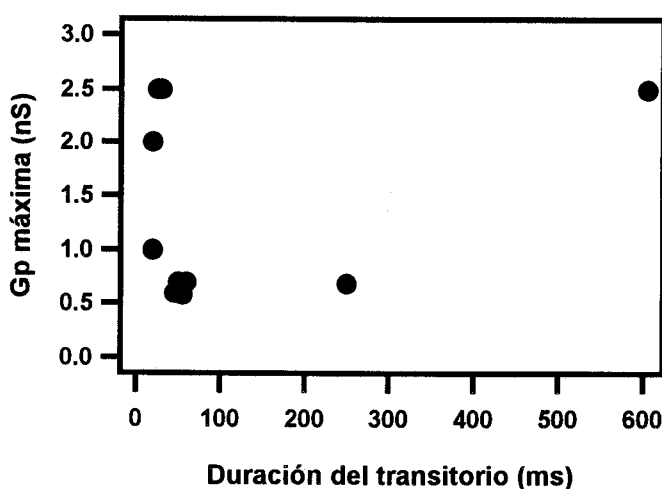


Figura 56. Conductancias máximas medidas en relación a la duración de los eventos transitorios.

Un histograma de frecuencia de la conductancia del poro es mostrado en la figura 57. Para 20 eventos diferentes en que el pie duró suficiente tiempo para calcular el poro de fusión, el valor medio de conductancia medido fué de 400 pS. Este valor es muy similar a la conductancia de poro estimada para eventos irreversibles obtenidos en gránulos de células cebadas usando la configuración de célula entera de la técnica de "patch-clamp" (Alvarez de Toledo y col., 1993) y en gránulos cromafines bovinos usando amperometría en parche (Albillos y col., 1997).

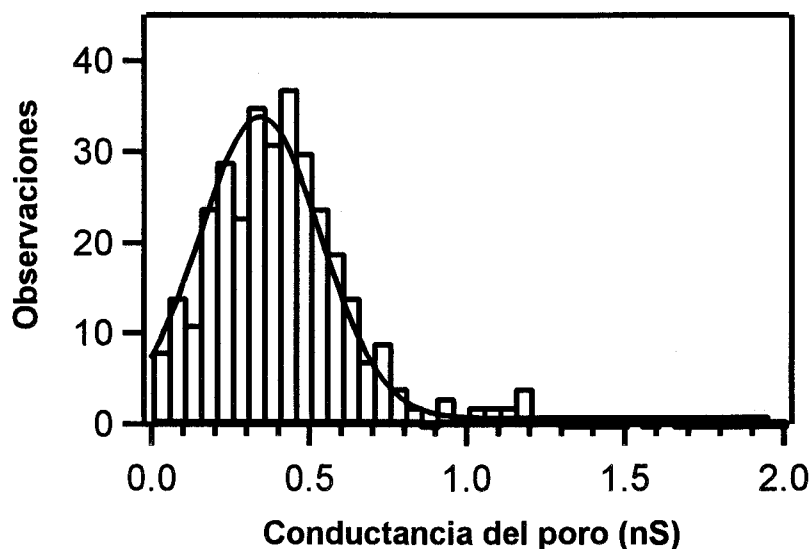


Figura 57. Distribución de la conductancia del poro durante el pie en fusiones transitorias. La curva es el ajuste por una función de gauss.

### 3.6.2. Poros de fusión con liberación de cinética lenta

Los transientes amperométricos lentos proceden de poros pequeños. A diferencia de los transitorios con liberación rápida en forma de espiga donde la conductancia máxima se alcanza al final, justo antes del cierre del poro y mientras se produce la espiga, en los transitorios con liberación lenta como en el ejemplo de la figura 58, el poro se abre y alcanza al inicio la conductancia máxima que no supera los 500 pS. Después, la conductancia progresivamente va disminuyendo, hasta que al cabo de un tiempo relativamente largo (250 ms) el poro se cierra. La conductancia media fue de  $204 \text{ pS} \pm 80 \text{ pS}$  ( $\pm \text{d.s.}$ ). La liberación no es inmediata, sino que se observa después de un retraso tras la apertura del poro, probablemente debido a la difusión de las moléculas de catecolaminas hasta el detector. Es por eso que, la amplitud máxima de amperometría no coincide con la máxima conductancia de poro. La relación entre conductancia de poro y liberación amperométrica en este evento, considerando los valores de

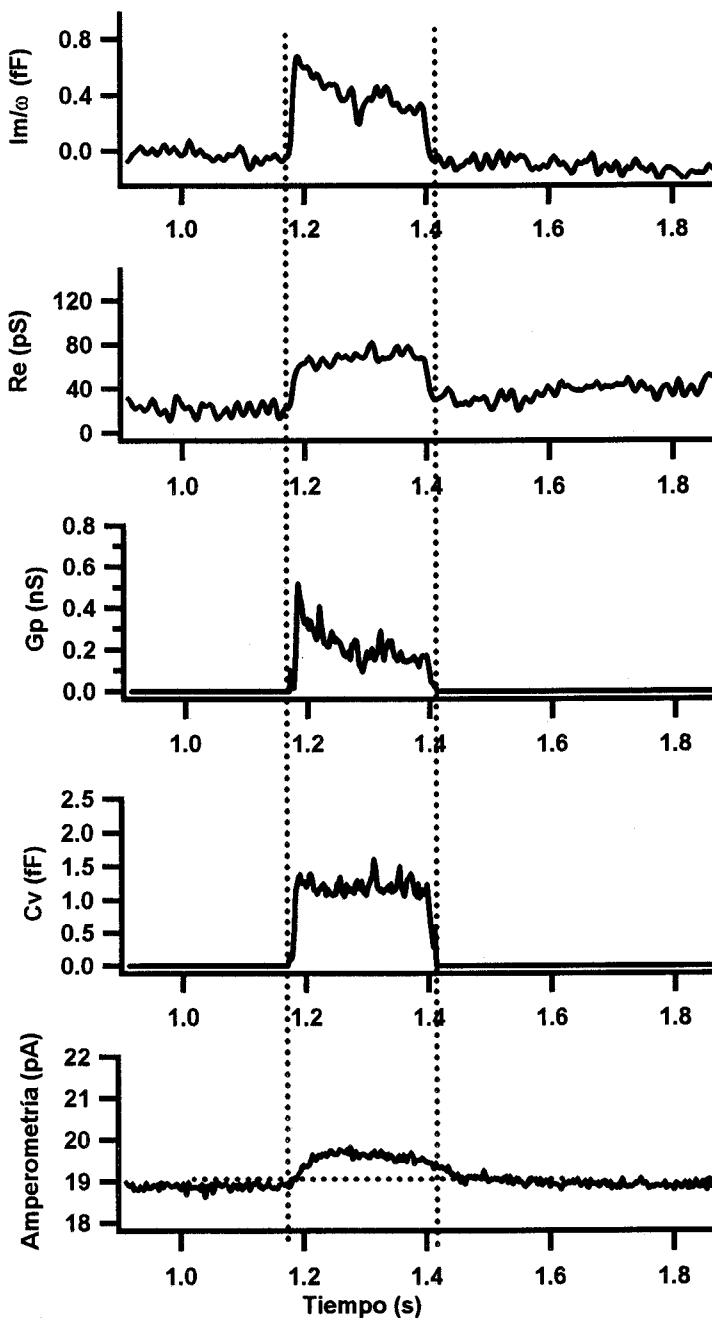


Figura 58 . Conductancia del poro de fusión ( $Gp$ ) y capacidad de la vesícula ( $Cv$ ) de un evento transitorio calculadas a partir de los trazos Real ( $Re$ ) e Imaginario ( $Im$ ) de la admitancia, y liberación amperométrica.

conductancia donde la cinética de liberación no está afectada por el retraso difusional (cuando conductancia y amperometría están en su fase decreciente), es lineal. La regresión lineal tiene una pendiente de 1.8 pA/nS (figura 59), correspondiente a un flujo de 5,6 millones de moléculas por nS. Este valor es semejante al flujo de liberación de serotonina en células cebadas (Alvarez de Toledo y col., 1993) pero es 10 veces más lento que el flujo de catecolaminas en células cromafines bovinas (Albillos y col., 1997) durante el poro formado durante una fusión irreversible. La carga de integrar este transiente fue de 180 fC, correspondiente a  $0,56 \times 10^6$  moléculas ó 0.93 atomoles. El volumen del grano de 3.76 atolitros y la concentración de 250 mM. En este tipo de eventos la liberación está limitada por el tamaño del poro. Este hecho imposibilita conocer la concentración real de la vesícula. Posiblemente sólo se ha producido una liberación parcial del contenido.

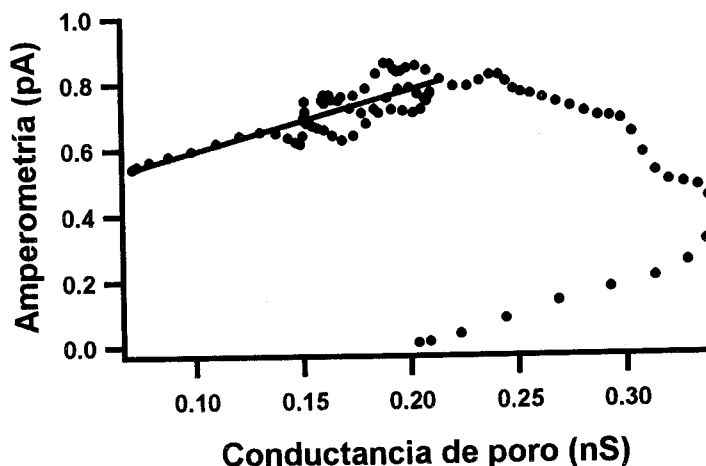


Figura 59. Relación entre corriente amperométrica y conductancia del poro de fusión durante el evento transitorio de la figura anterior. La pendiente de la línea de regresión indica el flujo de moléculas a través del poro formado.



El histograma de frecuencia de las conductancias de poro (figura 60) para este tipo de eventos muestra que el valor máximo fué de 129 pS, indicando que el tamaño de poro para estos eventos es bastante inferior al que se puede alcanzar durante una fusión transitoria de cinética rápida o al que se forma durante el pie en una fusión irreversible en células cromafines bovinas (Albillos y col., 1997). Los valores de conductancia máxima no superan los 500 pS.

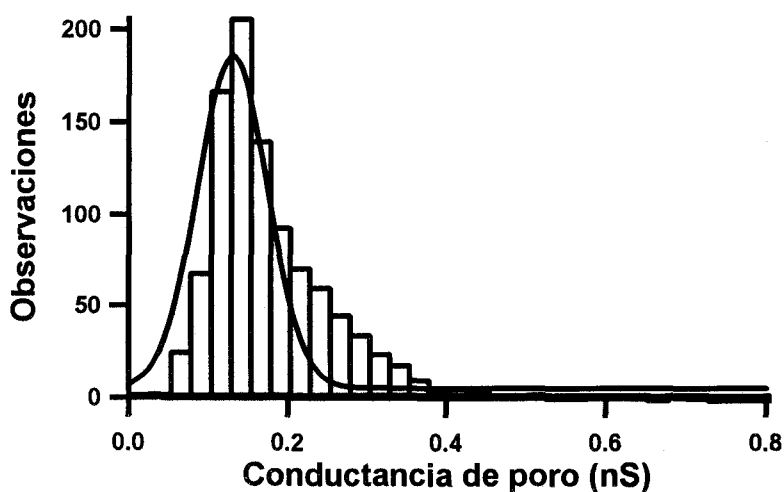


Figura 60. Distribución de las conductancias de poro durante fusiones reversibles con liberación lenta. La curva es el ajuste de una función de Gauss.

### 3.7. Transferencia de membrana durante una fusión transitoria

A veces, observamos que para una fusión transitoria con liberación rápida, el tamaño del salto hacia abajo en la capacidad durante el transitorio es menor que el salto hacia arriba precedente (figura 61), indicando que hay un incremento neto en el área de la membrana plasmática posiblemente debida a una transferencia de membrana de la membrana de la vesícula a la membrana plasmática mientras están conectadas por el poro de fusión.

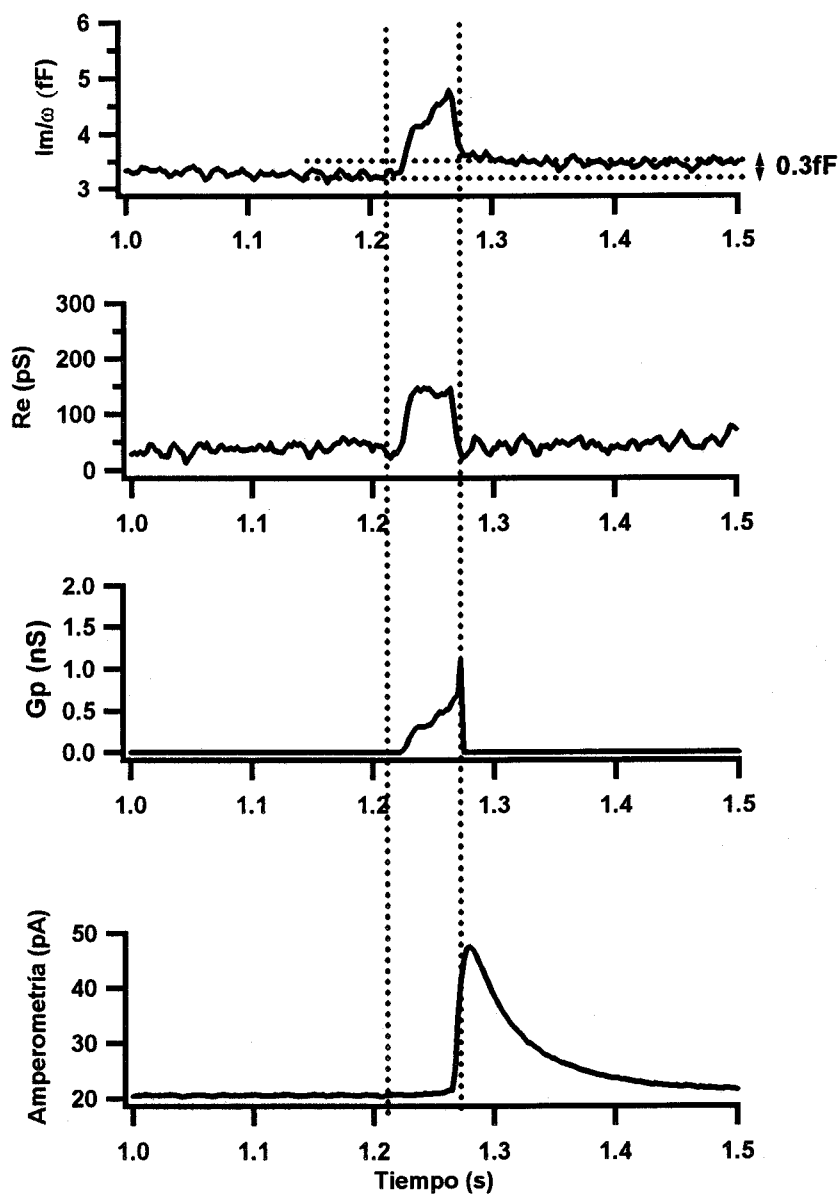


Figura 61. Evento transitorio de capacidad con liberación en forma de espiga típica donde se observa una asimetría en el tamaño de los saltos hacia arriba y hacia abajo de capacidad. Se ha producido una transferencia de 0.3 fF de membrana desde la vesícula a la membrana plasmática.

Esto contrasta con los resultados obtenidos en células cebadas (Monk y col., 1990) donde el movimiento neto de membranas durante el "flicker" se produce en sentido contrario, desde la membrana plásmica a la membrana de la vesícula. Una endocitosis de vesículas muy pequeñas, estrictamente correlacionada con la exocitosis de un gránulo único podría ser también una explicación (Lollike y col., 1998).

### **3.8. Regulación de los eventos de fusión exocitótico.**

La exocitosis que registramos con la técnica de amperometría en parche en las células cromafines de rata es espontánea. En ocasiones, bien sea por el estímulo mecánico ejercido con la micropipeta o por propia actividad intrínseca, la célula comienza a disparar potenciales de acción y a secretar. Generalmente la célula no se desgranula completamente sino que lo hace en determinadas zonas o focos, que al microscopio tienen una curiosa apariencia y a veces semejan a cráteres. Con la configuración 'in situ' no podemos dializar el citosol e inducir la exocitosis. Sin embargo, podemos jugar con la composición iónica de la solución de la pipeta. De hecho, la proporción de eventos reversibles e irreversibles que obtenemos de una célula cromafín en un experimento depende de la composición de la solución utilizada. Utilizando 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Ba}^{2+}$  y 50 mM  $\text{Na}^+$  en la solución de la pipeta, la mayoría de los eventos fueron fusiones irreversibles y completas, sólo en un 1% (2 de 178) de los casos se observaron fusiones reversibles. Sin embargo, utilizando alta concentración de calcio (90 mM) el 75 % (90 de 120) de los eventos fueron reversibles (figura 62). Probamos una concentración intermedia (20 mM  $\text{Ca}^{2+}$  y 35 mM  $\text{Na}^+$ ) en la solución de la pipeta y obtuvimos un 80% (8 de 10) de fusiones reversibles. Esto parece indicar que el calcio controla o regula el tipo de exocitosis. Este control de la secreción de neurotransmisor por calcio de dos formas distintas de fusión de los gránulos exocitóticos tiene una relevancia muy importante, como se discutirá más adelante, en el ciclo de las vesículas sinápticas.

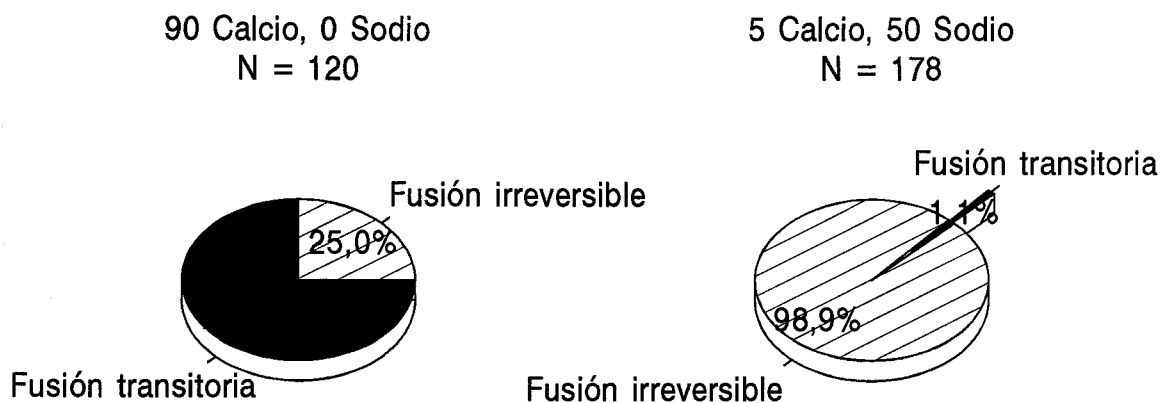


Figura 62. Porcentaje de eventos de fusión transitoria frente a eventos irreversibles dependiente de la composición de la solución de la pipeta.

### 3.9. Endocitosis en células cromafines de rata

Decrementos de la capacidad de la membrana del parche en forma de escalones (figura 63A) indican captación de membrana plasmática. La figura 63B muestra el histograma de frecuencias de estas endocitosis. El valor medio es de  $0.6 \pm 0.41$  ( $\pm$  d.e.) y el rango de tamaños se distribuyó de 0.1 a 2.3 fF. El tamaño de éstas vesículas es ligeramente inferior al tamaño determinado en vesículas exocitóticas.

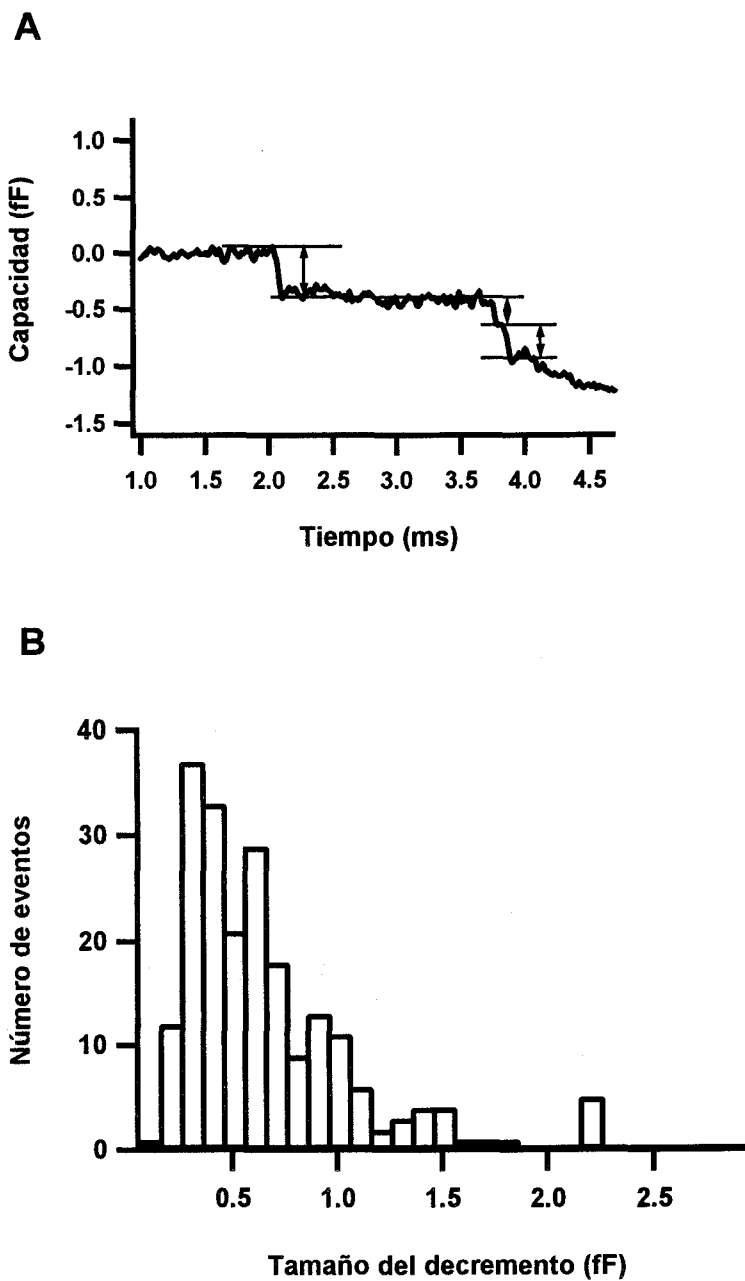


Figura 63. **A)** Endocitosis de vesículas, indicadas por los decrementos escalonados de la capacidad de la membrana plasmática, medida con la técnica de amperometría en parche, en una célula cromafín de rata. **B)** Distribución de tamaños en forma de histograma de frecuencias de los decrementos de capacidad.

## **DISCUSIÓN**

El presente trabajo se ha basado en el estudio de la exocitosis, un proceso celular básico que tiene lugar en todas las células del organismo y subyace en la mayoría de las funciones fisiológicas. Nos hemos centrado en el estudio de los mecanismos que determinan la fusión y expansión de la membrana de la vesícula en la membrana plasmática y la liberación del transmisor al medio extracelular.

Hemos desarrollado y puesto a punto la técnica de amperometría en parche. La aplicación de ésta técnica en dos tipos celulares: cromafines y mastocitos de rata ha puesto de manifiesto la utilidad de esta técnica para estudiar la exocitosis a nivel de gránulos secretorios únicos del tamaño de una vesícula sináptica.

A continuación se discutirán los resultados obtenidos en tres grandes apartados. Primero, la regulación de la liberación del contenido vesicular una vez que se ha producido la fusión de membranas, contemplando el papel del poro de fusión y la matriz intravesicular. En segundo lugar, se hablará de la exocitosis, estudiada por primera vez, en vesículas cromafines de rata y por último se discutirán las fusiones reversibles y su relevancia biológica.

## **1. REGULACIÓN DE LA LIBERACIÓN TRÁS LA FUSIÓN VESICULAR**

La secreción rápida de neurotransmisores de terminales sinápticos es la tarea más importante que las neuronas deben realizar. Datos clásicos de medidas de potenciales postsinápticos indican que la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, la entrada de calcio, la activación de la maquinaria excitotónica y la liberación y difusión del neurotransmisor a la membrana postsináptica ocurre en menos de 200  $\mu\text{s}$  (Almers, 1990). Por esta razón, las neuronas y otras muchas células han desarrollado una forma de exocitosis fuertemente regulada y el calcio desarrolla un papel crucial en la regulación. A continuación, se especifican las etapas de la exocitosis regulada por calcio.

En primer lugar, se sabe que el calcio regula el reclutamiento de nuevos gránulos secretores (Neher y Zucker, 1993) para la exocitosis. Este paso implica reorganización del citoesqueleto, que capacita a los gránulos a acercarse a la membrana plasmática (Burgoyne y Morgan, 1993), y ensamblaje de algunos componentes de la maquinaria de fusión en sitios de liberación en la membrana. Los requerimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  para esta etapa (von Rüden y Neher, 1993) son consistentes con una proteína de calcio de alta afinidad que es activada de forma máxima a 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  libre. El reclutamiento de nuevas vesículas en las sinapsis está probablemente controlada por sinapsina y el receptor de calcio sería la calmodulina

actuando fosforilando las sinapsinas y conduciendo a su disociación de las vesículas sinápticas (Valtorta y col.,1992). En segundo lugar, el calcio dispara la fusión. En las sinapsis, este proceso esta controlado por una proteina de unión a calcio de baja afinidad (saturación a  $> 100 \mu\text{M}$  de calcio libre; von Gersdorff y Matthews,1994b), mientras que en células neuroendocrinas esta regulado por una proteina con una afinidad un orden de magnitud superior a las neuronas (Heinemann y col.,1994; Neher y Zucker,1993). En neuronas, la principal candidata es la sinaptotagmina, se satura a  $100 \mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  y cada mol de proteina une 4 moles de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por último, la captación de nueva membrana por endocitosis y el reciclaje para formar nuevas vesículas también estan activados por calcio.

Combinando de forma simultánea, medidas de capacidad de membrana para monitorizar la fusión de una vesícula, con la medida de liberación de transmisor por amperometría, se observa que existe un retraso variable entre la fusión vesicular y la liberación del contenido, sugiriendo la idea de que las vesículas tienen mecanismos de regulación que restringen la liberación, incluso después de que la fusión de la membrana haya ocurrido.

### **1.1. La dilatación del poro refleja una etapa limitante en la liberación.**

El tamaño de un poro determinará su capacidad para permitir el paso difusional de los productos secretores hacia el espacio extracelular. De hecho, en ocasiones es posible observar un pequeño "pie" amperométrico que representa la lenta liberación a través de un poro que aún no se ha expandido completamente. A altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se observan latencias entre la fusión y la liberación vesicular más cortas que cuando se utilizan concentraciones de calcio inferiores. Fernández-Chacón y Alvarez de Toledo en 1995 junto con Hartmann y Lindau demostraron que



el calcio esta afectando a la cinética del poro de fusión. Se puso de manifiesto una nueva etapa de control por calcio en el ciclo de las vesículas secretoras.

Con objeto de conocer cual es el responsable molecular que subyace al proceso de dilatación del poro de fusión, estudiamos el efecto de la concentración de calcio citosólico sobre el tiempo de latencias entre la fusión y la liberación y que nos sirve como medida indirecta del tiempo requerido para la expansión y por tanto para que tenga lugar la liberación del transmisor. Hallamos que la regulación de la expansión del poro tiene una dependencia sigmoideal de la concentración de calcio intracelular, indicando que la proteína de unión de calcio en esta etapa del proceso secretor une calcio de forma cooperativa. La saturación media ocurrió a 0.3 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . El conocimiento de la afinidad del receptor de calcio puede ayudar a determinar que proteína regula la expansión del poro de fusión. En el caso más simple, el sitio de acción del calcio que afecta a la evolución del poro puede ser el mismo que dispara la fusión y podría implicar la sinaptotagmina. Sin embargo, hay otras posibilidades. El calcio puede activar sistemas de segundos mensajeros que pueden conducir a fosforilación u otras modificaciones covalentes de proteínas relevantes produciendo cambios conformacionales. También el calcio podría modificar o influenciar la composición lipídica de las membranas de la vesícula y/o plasmática, activando fosfolipasas o proteínas de transferencia fosfolipídica. La composición lipídica de la membrana en muchos casos ejerce grandes cambios en la curvatura de la membrana y por tanto en la dinámica del proceso de fusión (Zimmerberg y col., 1991).

## **1.2. Etapas en el proceso de expansión del poro de fusión**

Durante el "pie" existe una alta correlación temporal entre las señales

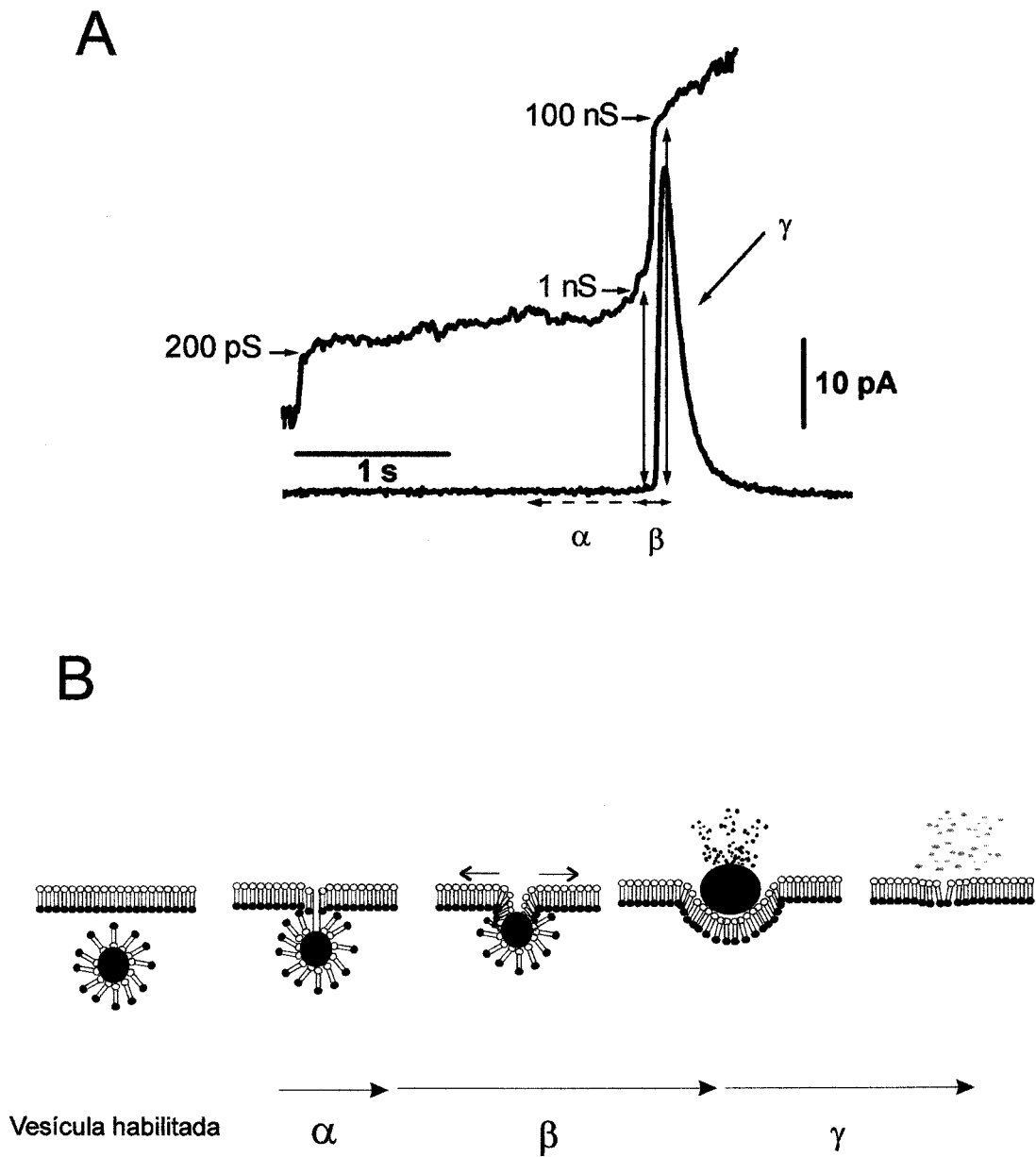
amperométricas y la conductancia del poro de fusión (Alvarez de Toledo y col.,1993), indicando el papel que ejerce el poro, durante las etapas iniciales de su evolución, en la liberación. Sin embargo, aún se desconoce de que manera durante la espiga amperométrica, es decir durante el grueso de la liberación, el poro esta limitando con su tamaño el paso de transmisor a su través.

Inicialmente, estudios ultraestructurales mostraron que un pequeño poro conecta el interior de la vesícula secretora al medio extracelular (Chandler y Heuser,1980; Knoll y col.,1991; Ornberg y Reese,1981; Schmidt y col.,1983). Posteriormente vinieron los estudios electrofisiológicos. Debido a la limitada resolución para estimar la conductancia de poros en registros de célula entera, sólo se han podido conocer las etapas iniciales de formación del poro de fusión (Breckenridge y Almers,1987b; Zimmerberg y col.,1987). El poro de fusión se forma con una conductancia media de 300 pS (Almers y Tse,1990) aunque conductancias de tan sólo 40 pS se han podido medir en neutrófilos humanos usando la configuración de registro "in situ" (Lollike y col.,1995). Estas medidas permitieron conocer que el poro presenta estados semi-estables de conductancias y se dilata hasta alcanzar unos pocos nS (Curran y col.,1993; Melykian y col.,1995). Lo que le ocurre después, no se ha podido determinar a causa de la limitada resolución de éstas medidas.

Nosotros utilizando la técnica de amperometría en parche hemos podido, por su bajo ruido, cuantificar con muy buena resolución, la conductancia de poros de fusión, en células cebadas de rata, desde la formación del poro (varios pS) hasta etapas últimas de la expansión (centenas de nS). Al mismo tiempo, hemos correlacionado los valores de poro con la liberación de los productos secretores.

Distinguimos tres fases en la formación y expansión del poro. En la primera fase, se forma una conexión eléctrica de alrededor de 500 pS y permanece estable durante un tiempo relativamente largo. Durante esta fase cabría esperar señal amperométrica en forma de "pie". En los ejemplos mostrados de la figura 37 no se han detectado, posiblemente porque la fibra de carbono se encontraba demasiado alejada de la superficie celular. Luego, se produce una expansión abrupta por encima de los 10 nS. Esta fase coincide con la fase de subida de la espiga amperométrica, sugiriendo que esta porción de la espiga puede reflejar el tiempo para que el poro de fusión se expanda desde sus dimensiones iniciales a una estructura mayor que permite su máxima liberación (figura 63).

Los valores de conductancia medidos en estas etapas se corresponden con aquellos valores medidos con la técnica de "patch-clamp" en la configuración de célula entera en células cebadas de ratón "beige" (Curran y col., 1993). Como la resolución para medir conductancias de poros depende del producto de  $\omega.C$ , estos ratones, que poseen granos excepcionalmente gigantes fueron hasta ahora los que permitían un conocimiento más exacto sobre el poro de fusión. Sin embargo la técnica de amperometría en parche permite ampliar el estudio de los poros a otros sistemas celulares. Así, hemos puesto de manifiesto una nueva fase en la evolución del poro en ratas silvestres (figura 64), donde el poro se dilata gradualmente hasta valores que superan los 100 nS de conductancia y que se corresponde con la fase de caída de la espiga amperométrica. La naturaleza exponencial del flujo decayente durante la porción final de la espiga predice una fase limitante de la difusión del transmisor e independiente del tamaño del poro (Schroeder y col., 1996). Sin embargo, por ahora, han sido vanos los esfuerzos realizados para ajustar por simple difusión, utilizando simulaciones de Montecarlo, la fase final de la espiga amperométrica.



**Figura 64. A)** Evento secretor de una vesícula de una célula cebada. Se representan la conductancia del poro de fusión y la señal amperométrica asociada. **B)** Se proponen varias etapas para la exocitosis. Una vesícula se funde con la membrana plasmática, resultando en un poro que conecta el contenido vesicular con el medio externo. El flujo de serotonina libre durante el estado que denominamos  $\alpha$  esta restringido por el tamaño del poro. Luego el poro se expande rápidamente resultando un flujo desde la vesícula caracterizado por  $\beta$ . La velocidad de disociación de serotonina de la matriz proteica retarda la liberación y esta reflejada por el parametro  $\gamma$ .

Estos descubrimientos pueden arrojar nuevas ideas sobre el mecanismo de expansión del poro de fusión. El poro de fusión proporciona una vía de entrada de agua dentro de la matriz del gránulo secretor que causa descondensación del contenido secretor e hinchamiento de la matriz (Verdugo, 1991). La inhibición del hinchamiento no cambia la expansión del poro de fusión en células cebadas de ratón "beige" (Monck y col., 1991), ni inhibe, como hemos mostrado en el apartado de resultados, la liberación. Esto sugiere que la expansión del poro de fusión es independiente del hinchamiento de la matriz. Sin embargo, existe la posibilidad de que el hinchamiento esté relacionado con la fase tardía de expansión del poro y conduzca a la incorporación completa de la membrana del gránulo a la membrana plasmática y a acelerar la velocidad de expulsión del contenido del gránulo secretor, una vez que el poro se ha abierto lo suficiente para exponer el contenido de la vesícula al medio extracelular.

### **1.3. La matriz del gránulo secretor en la liberación**

La liberación durante el "pie" amperométrico o eventos de fusión transitorios es proporcional a la conductancia del poro de fusión (Alvarez de Toledo y col., 1993), indicando como ya se ha mencionado que la liberación está limitada por el poro de fusión. Sin embargo, en células cebadas de ratón "beige", la cantidad de serotonina que difunde de la vesícula durante el pie fue sólo una pequeña fracción de la cantidad total almacenada en la vesícula (1-2%), y la velocidad de liberación fue significativamente menor que la predicha si toda la serotonina estuviese disponible para liberar (Alvarez de Toledo y col., 1993). Y aunque la liberación fuera proporcional a la conductancia del poro para cada gránulo, la velocidad fue muy variable incluso cuando el contenido total fuera similar, indicando que otros eventos gobiernan la velocidad de liberación de los productos secretores a través del poro de fusión. Además, si se compara los cursos temporales de liberación

de los gránulos secretores de células cebadas de ratón "beige" ( $\varnothing$  : 4.5  $\mu\text{m}$ ), células cebadas de rata (0.7  $\mu\text{m}$ ) y células cromafines adrenales bovinas (0,2  $\mu\text{m}$ ) se observa una clara dependencia del tamaño de la vesícula, y la anchura media del transiente de liberación depende 1,5 veces del radio de la vesícula (Alvarez de Toledo y col., 1993). Ya que un mecanismo puramente difusional predice una dependencia de tercer orden, la gran espiga de liberación que sigue a la expansión del poro de fusión está también limitada por un mecanismo no difusional (Alvarez de Toledo y col., 1993). Una probable explicación es que la mayoría de la serotonina esta atrapada dentro de la matriz del gránulo secretor y es por tanto osmoticamente inactiva e incapaz de liberarse a través del poro de fusión durante la etapa temprana de liberación. Así, el mecanismo que determina como los productos secretores estan atrapados controlará la velocidad de secreción.

Cuando el poro de fusión se abre y expone el contenido del gránulo secretor al medio extracelular, el contenido no está disponible para la inmediata liberación difusional. En células cebadas, la histamina y la serotonina estan atrapadas en un gel de proteoglicano de heparina (Uvnäs y Aborg,1983). El gel de proteoglicano actúa como una "trampa" molecular para la histamina cuando se condensa durante la formación del gránulo maduro en condiciones acídicas. La histamina y serotonina son liberadas en la descondensación e hinchamiento. La composición e hinchamiento de estos geles son dependientes de la composición iónica del medio que los baña. Cationes divalentes y pH ácido favorecen la condensación; iones monovalentes y pH neutro favorecen el hinchamiento (Curran y Brodwick,1991; Fernandez y col.,1991). Estas propiedades sugieren que la matriz sufre una transición de fase de gel polimérico, similar a la demostrada para mucinas de gránulos secretores de células caliciformes (Verdugo,1991).

Nosotros hemos estudiado el efecto de factores que afectan a la descondensación de la matriz en células cebadas y por tanto a la liberación, midiendo el tiempo de latencias entre la fusión del gránulo y la liberación, utilizando de forma simultánea la medida de la capacidad de membrana y la amperometría.

La condensación de histamina en los gránulos de células cebadas conduce a su propio secuestro dentro de la red de proteoglicano de heparina. La condensación se produce del efecto cooperativo de al menos 4 moléculas de histamina con doble valencia unidos a las cargas negativas fijas de la matriz a pH 5.5. La matriz del gránulo secretor puede rápidamente descondensarse por soluciones salinas que contienen  $\text{Na}^+$  a concentraciones iguales o inferiores a las del fluido extracelular y a pH neutro (Fernández y col.,1991). La sustitución de una histamina por un ión sodio puede ser suficiente para descondensar una unidad polimérica individual. Así, parece que bajo exocitosis, la sustitución de histamina por sodio extracelular, por un mecanismo de intercambio iónico (Uvnäs y Aborg,1983), dispara la descondensación explosiva de la matriz de heparina, liberando el contenido secretor de su trampa polimérica.

En primer lugar, nosotros hemos utilizado una solución a pH ácido, similar al pH observado en el interior vesicular. A este pH la histamina se almacena de forma divalente y la serotonina en forma monovalente y son atraídas por las cargas negativas de la matriz vesicular (Johnson y col.,1980). En nuestras condiciones experimentales, a pH extracelular 5.5 observamos que la liberación esta retrasada ( $\tau = 169$  ms;  $8,6 \mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ ) respecto a las condiciones control ( $\tau = 81$  ms), además la anchura media de la espiga, un parámetro cinético que puede ser indicativo de como la liberación se produce, aumenta (151 ms a pH 5.5 frente a 73 ms en condiciones control), indicando que la liberación no sólo puede retrasar el

momento en que se produce sino mientras ésta se esta produciendo. Este comportamiento probablemente se debe a que la serotonina, sustancia que estamos detectando por amperometría y posiblemente la histamina, estan siendo fuertemente atraídas por la matriz y tienden a soltarse más lentamente que en las condiciones control.

La posibilidad de que el hinchamiento de la matriz del gránulo debido a la entrada de agua a través del poro de fusión juegue un papel en la liberación es bastante convincente. Para probar esta idea nosotros establecimos condiciones que inhiben el hinchamiento del gránulo secretor. La matriz de proteoglicano contenida en los gránulos secretores de las células cebadas sufren en condiciones normales un incremento de 2 a 3 veces su volumen cuando se exponen a medio extracelular con Na<sup>+</sup> (Monk y col., 1991). Ya que la matriz del gránulo secretor puede ser recondensada por histamina acídica (Curran y Brodwick,1985; Villalon y col.,1990), nosotros usamos un medio de histamina isotónica a pH 5,5 para inhibir el hinchamiento de la matriz de proteoglicano. La alta concentración de histamina a pH ácido mimetiza el medio ambiente de gránulos secretores intactos (Alter y Schwartz,1989) e inhibe la velocidad de hinchamiento del gránulo después de la fusión un 95% (Monck y col.,1991), proporcionando un método simple experimental para perturbar el hinchamiento del grano y estudiar su efecto sobre la liberación. Así, cuando utilizamos soluciones que enlentecen o inhiben el hinchamiento de la matriz, bien se trate de soluciones hiperosmóticas o con alta histamina, la latencia entre la fusión y liberación se hace mayor ( $\tau = 240$  y  $\tau = 292$  ms respectivamente). En ningún caso, parece que la liberación esté inhibida, indicándonos o bien, que el hinchamiento de la matriz aunque juega un papel en la liberación no es el factor desencadenante de la liberación o bien el 5% restante que no se inhibe en condiciones de alta histamina es suficiente para disparar la liberación. En cualquier caso, parece evidente que substituciones de soluciones iónicas



simples, que afecten la disociación de la matriz de proteoglicano son suficientes para controlar la liberación de transmisor, y por tanto el mecanismo de regulación de la liberación a este nivel no parece depender de actividad enzimática o fuente de energía metabólica.

## **2. LA RESPUESTA SECRETORA DE VESÍCULAS AISLADAS EN CÉLULAS CROMAFINES DE RATA.**

Nuestro estudio se ha centrado en la caracterización de la exocitosis a nivel de vesículas individuales, utilizando la técnica de amperometría en parche sin aplicación de estímulo. Teniendo en cuenta las características y la respuesta secretora que han presentado las células, este estudio se ha realizado en excelentes condiciones experimentales. Un pequeño porcentaje (~25%) de las células que sellaron respondieron con al menos un evento de fusión y liberación. El número medio de eventos de fusión y liberación de un gránulo por célula fué de 12, aunque un sólo evento por célula fué el caso más frecuente (6 células) seguidas por 2 y 3 eventos (5 células), aunque también se observó el extremo opuesto de hasta 124 eventos por célula. Se ha descrito en células cromafines bovinas (Robinson y col., 1995), utilizando técnicas de imagen de  $Ca^{2+}$  junto con detección electroquímica con fibras de carbono, que los sitios de entrada de calcio y de liberación de catecolaminas están colocalizados, sugiriendo la idea que la secreción ocurre en "zonas activas". Esto puede proporcionar una hipótesis razonable que explique porque no todos los parches de membrana aislados tuvieron éxito en la respuesta secretora, aún con la aplicación de un estímulo despolarizante. Además, una peculiaridad observada bajo el microscopio óptico que apoya esta idea es la presencia de focos de desgranulación distribuidos aleatoriamente por la superficie celular. Asimismo, utilizando quinacrina, un colorante fluorescente que tiñe los compartimentos ácidos en células cebadas, se ha demostrado igualmente que éstas células también

sufren de forma focalizada exocitosis de vesículas secretoras (Valero, 1998).

La distribución de tamaños de gránulos exocitóticos procede de medidas morfométricos de micrografías electrónicas. El radio medio de una vesícula cromafín de rata calculado por estos métodos es de 114,5 nm. Sin embargo, estas medidas son bastantes indirectas al estar los perfiles de los gránulos analizados en delgadas secciones, que no son ecuatoriales y requerir asunciones que permiten su conversión a distribución de tamaño de gránulo. La medida de capacidad de membrana puede ser utilizada para determinar la superficie de gránulos individuales independientemente de la forma que el gránulo pueda tener. Los datos presentados en este trabajo muestran que la capacidad eléctrica y por tanto el área de la superficie de gránulos secretores de células cromafines de rata se distribuye de forma unimodal. El valor medio de capacidad es de 1.13 fF (radio de la vesícula: 92 nm) similar al valor estimado (1.3 fF) por análisis de ruido en medidas de capacidad en célula entera (Moser y Neher, 1997b) pero más pequeño que el calculado en células cromafines bovinas (2.1 fF; Albillos y col., 1997). Diferencias de tamaño de un mismo tipo celular entre especies se han observado también en eosinófilos equinos y humanos (Hartmann y col., 1995b). El valor más pequeño de capacidad correspondió a 0.1 fF que corresponde a una vesícula de 51 nm de radio, comparable a tamaños de vesículas sinápticas y evidenciando por tanto que la técnica de amperometría en parche puede ser también utilizada para resolver fusiones de vesículas sinápticas aisladas.

La amperometría es muy útil para cuantificar la cantidad de sustancia liberada pero si además estamos limitando la contaminación de moléculas de transmisor liberadas en puntos distantes del detector, acotando un parche de membrana, podemos obtener una medida muy exacta de la cantidad de catecolaminas que se está liberando de una única vesícula

cromafín. La carga media total de los eventos analizados es de  $1,51 \pm 0,1\text{pC}$  (media  $\pm$  e.e;  $n = 265$ ), que corresponde aproximadamente con 4,7 millones de moléculas. Ya que cada espiga amperométrica se asocia a un incremento de capacidad, hemos calculado el volumen de cada vesícula y lo hemos comparado con la carga de la espiga correspondiente, obteniéndose una relación entre la carga y el volumen vesicular. La relación entre la carga y el volumen de los eventos para una misma célula se ajusta a una línea recta (figura 47), lo que sugiere que la concentración por vesícula es bastante homogénea. Se obtiene un valor de concentración medio de  $2,5 \pm 0,15\text{ M}$  ( $\pm$ e.e). Esta concentración es 5 veces superior a la obtenida en estudios realizados en grandes poblaciones de células cromafines de rata (Tomlinson y col.,1987). Este aumento en parte se debe a la diferencia en volumen calculado por métodos morfométricos y posiblemente a que en los estudios realizados con grandes poblaciones celulares se infraestima la cantidad de catecolaminas. Estimaciones previas en células cebadas (Fernández Chacón y Alvarez de Toledo,1995) utilizando amperometría (analizando para una mayor exactitud en la medida sólo aquellos eventos amperométricos procedentes de vesículas fundidas cerca del detector) indican que la carga media por vesícula es de  $3,01\text{ pC}$  y la concentración de  $91\text{ mM}$ . En células cromafines bovinas la concentración estimada por la técnica de amperometría parche (Albillos y col.,1997) es próxima a  $1\text{M}$ . La concentración de neurotransmisor en neuronas aún no ha podido ser estimada por métodos electroquímicos. Sin embargo, es probable que las vesículas sinápticas, debido a su pequeño tamaño y siguiendo la tendencia observada presenten una concentración de transmisor superior a la que nosotros hemos estimado para los gránulos cromafines de rata. Estos valores de concentración, que son muy altos en comparación con la concentración de solutos en el medio citosólico, son incompatibles con la estabilidad de la vesícula secretora ya que favorecería una entrada de agua hacia el lumen vesicular. La apariencia electro-lúcida de las vesículas claras

sugiere que el contenido se mantiene en solución. Sin embargo, parece improbable que los productos secretores estén simplemente en solución, generando grandes gradientes osmóticos y necesitando de un continuo consumo de energía.

En ocasiones, hemos observado la aparición de incrementos discretos en el registro de capacidad que no se asocian con señal amperométrica. Estos eventos “en blanco”, no se deben a fusiones de vesículas alejadas del detector electroquímico cuya señal de liberación no pueda llegar a detectarse. Esta no puede ser la causa, al limitar, con la técnica de amperometría en parche, la detección de la exocitosis a aquellas vesículas que se funden en el parche de membrana aislado, cercanas a la fibra de carbono. Tampoco se debe a una posible pérdida de sensibilidad del detector, puesto que durante un mismo registro pueden observarse alternativamente eventos “en blanco” con otros con liberación amperométrica. Más bien parece tratarse de vesículas con escaso o nulo contenido en catecolaminas. El vaciamiento de estas vesículas puede haberse producido por fusiones previas de tipo reversible. Otra posibilidad es que para las condiciones experimentales utilizadas (alta concentración de calcio y ningún sodio en la solución de la pipeta) en el registro de la figura 52, la descondensación de la matriz de cromogranina está inhibida (Curran y Brodwick, 1991; Fernández y col., 1991) y esta inhibición puede estar impidiendo la liberación del contenido de catecolaminas atrapado en el interior de la matriz. Este hecho confirmaría una acción directa de la descondensación e hinchamiento de la matriz de gránulo secretor en el proceso de liberación del transmisor, pero no sobre la formación ni dilatación del poro de fusión. Como se discutirá más adelante, también se observó un número significativo de “blancos” durante los eventos de fusión transitorios.

### **3. FUSIONES TRANSITORIAS EN CÉLULAS CROMAFINES DE RATA**

Parece un auténtico derroche para la economía celular que durante la liberación de hormonas y neurotransmisores de una célula, la membrana de una vesícula deba incluirse y formar parte de la membrana plasmática para ser recaptada sólo segundos o minutos más tarde. Actualmente, la fusión vesicular transitoria y la liberación parcial están experimentalmente bien establecidos (Fernández y col., 1984; Spruce y col., 1990; Alvarez de Toledo y col., 1993; Albillos y col., 1997). Sin embargo, uno de los rasgos más llamativos de la liberación durante las inusuales fusiones transitorias observadas suele ser la lenta (Albillos y col., 1993) y escasa (Alvarez de Toledo y col., 1993) cantidad liberada de productos de secreción al medio externo. Por esta razón, aunque ha habido mucha especulación, se considera que este tipo de eventos podría no ser más que un fallo azaroso en el proceso normal de fusión de algunas vesículas y carecerían de un significado funcional relevante,

Sin embargo, nuestros resultados indican que las fusiones transitorias pueden ser inducidas en determinadas condiciones y la cantidad de transmisor liberada durante las mismas es igual de importante que la liberada durante una fusión irreversible. Además, el tamaño de la vesícula, las propiedades del poro de fusión y las características cinéticas de la liberación son también similares a las que se producen durante las fusiones irreversibles, indicando que un típico gránulo cromafín de rata puede, según qué estímulos, sufrir fusión irreversible con la membrana plasmática o formar durante escasos milisegundos, un poro para liberar totalmente su contenido, manteniendo su integridad sin necesidad de sintetizar nueva vesícula a partir del aparato de Golgi.

En células cromafines de rata nosotros observamos los dos tipos de eventos de fusión transitorio mencionados: fusiones transitorias con escasa y lenta liberación y fusiones transitorias con liberación total y rápida, en forma de espiga amperométrica típica.

### **3.1. Fusiones transitorias con liberación total y rápida.**

Hasta ahora, el porcentaje de los eventos de fusión transitoria en células que tienen vesículas pequeñas no era conocido debido a que la mayoría de los eventos estaban por debajo de la resolución de la medidas de capacidad. Utilizando la metodología desarrollada en este trabajo hemos demostrado que las fusiones transitorias es una forma significativa de exocitosis en células cromafines y posiblemente también lo sea en neuronas, como parecen sugerir los recientes trabajos basados en técnicas de imagen utilizando el colorante fluorescente FM1- 43 (Murthy y Stevens, 1998; Miesenböck y col., 1998).

El mismo grupo de vesículas que se excita por fusión irreversible es capaz de hacerlo por fusión transitoria. Esto es evidente ante la gran semejanza de las distribuciones del tamaño del grano y de carga de las espigas amperométricas, así como por la similitud del valor medio de concentración de trasmisor.

La anchura media de las espigas amperométricas detectadas depende de la distancia de difusión (Jankowski y col., 1992; Poyato, 1998). Así, cuanto más cerca se encuentra el electrodo de carbono del punto de liberación, más pequeña será la anchura media de la espiga amperométrica. Si normalizamos y superponemos para comparar las espigas amperométricas observadas durante el registro de una célula, observamos que en general, los perfiles de los transientes se sobreponen perfectamente,

debido a que la técnica de amperometría en parche establece y mantiene los mismos parámetros espaciales (distancia al detector y ángulo de la pipeta) durante todo el registro. No obstante, como ya se ha mencionado, otros mecanismos, como las propiedades del poro o la matriz pueden afectar durante la liberación, modificando la duración y cinética de las espigas. Sin embargo, cuando en un mismo registro, observamos eventos de liberación procedentes de fusiones irreversibles y reversibles y los comparamos (Figura 51), observamos que las espigas tienen una cinética idéntica, indicando que no sólo es que el mismo tipo de vesícula pueda fundirse de forma irreversible o reversible sino que independientemente de como tenga lugar la fusión, el proceso de liberación del transmisor es igual de eficaz para la célula. Además cabría esperar que los mecanismos por los que se produce la liberación durante las fusiones reversibles, sean los mismos que durante las fusiones irreversibles. Este hecho sugiere dos cosas: primero, que a diferencia de los poros observados durante las fusiones transitorias descritas en la literatura, donde el poro de fusión formado, limitaba por su pequeño tamaño la velocidad de liberación (Alvarez de Toledo y col., 1993; Albillos y col., 1997), el poro de fusión formado en este tipo de eventos debe tener propiedades semejantes al poro de fusión formado durante las típicas fusiones irreversibles. Los datos expuestos en el apartado de resultados sobre el poro de fusión indican que realmente esto ocurre así. En segundo lugar, que la disociación de la matriz intravesicular tampoco afecta a la cinética de la liberación y es independiente de si con posterioridad, el poro vuelve a cerrarse o a expandirse definitivamente en la membrana plasmática. Posiblemente porque como ya se discutió, la disociación de la matriz dependa fundamentalmente de las condiciones iónicas del experimento. De todas formas, como luego se discutirá, precisamente son las condiciones iónicas del experimento las que determinan la profusión de los eventos reversibles.

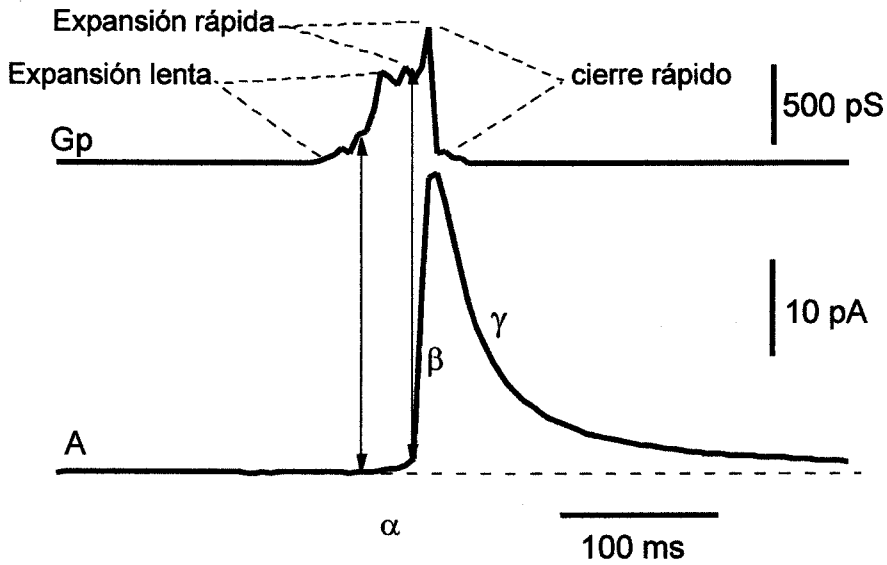
En células cromafines, el 20-50 % de los eventos de liberación son precedidos por un “pie” frente a < 1% en células cebadas (Spruce y col., 1990). En nuestros registros, no observamos durante los eventos de fusión irreversibles, espigas con “pies”, seguramente porque el poro se expande rápidamente y no limita la liberación. Sin embargo, es frecuente observar “pies” en aquellos eventos transitorios durante las etapas iniciales de expansión del poro, cuando éste aún es estrecho.

La primera diferencia significativa que llama la atención en los eventos reversibles que hemos descrito, es la corta duración de los transitorios capacitativos ( $\tau = 62,5$  ms). Frecuentemente tan rápidos, que pasan desapercibidos por nuestro sistema de registro que adquiere a una velocidad de muestreo de 5 y 2,5 ms/pto. En estos casos, es el registro amperométrico el que hace constar que se están produciendo eventos excitóticos, por lo que resulta imprescindible el combinar ambas medidas para la evaluación de los resultados. Además, observamos que existe una tendencia a que los gránulos más pequeños únicamente se abran durante periodos de tiempo muy cortos (figura 54), lo que consiguientemente sugiere la pregunta de que pueda estar ocurriendo en tipos celulares con gránulos aún de menor tamaño que los cromafines de rata.

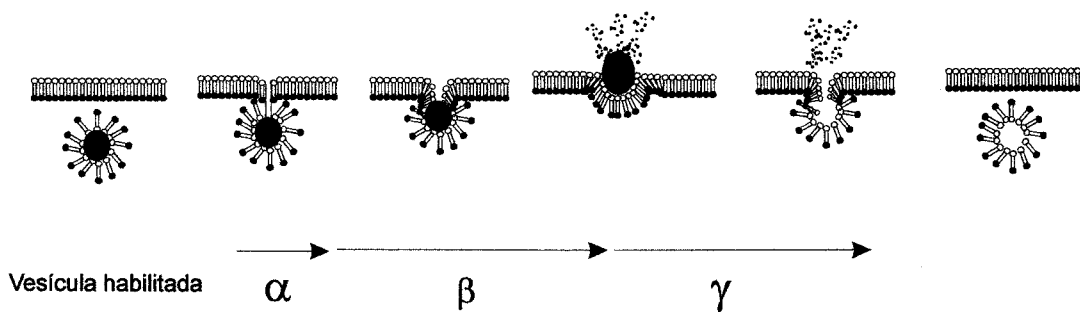
Existen ocasiones en que se observan transientes amperométricas tan rápidos (anchura media menor de 5 ms) y sin correlato visible en el trazo capacitativo (no mostrado), que es imposible tener plena certeza acerca de la naturaleza meramente biológica de la señal. Sin embargo, cabe destacar que en células del cuerpo carotídeo que liberan dopamina (Ureña y col., 1994) y en neuronas dopaminérgicas del caracol *Planorbis corneus* (Chen y col., 1996), las espigas amperométricas observadas son muy rápidas (anchura media < 4 ms) y pequeñas, semejantes a éstas que nosotros en ocasiones observamos. Una interpretación para explicar este



A



B



**Figura 65. A)** Evento de fusión transitorio con liberación en forma de espiga en una vesícula cromafín de rata. Se aprecia el correlato temporal entre la conductancia o tamaño del poro de fusión y la liberación. **B)** A semejanza de los eventos irreversibles, el pie ( $\alpha$ ) se produce durante la etapa inicial de expansión más lenta del poro. La fase de expansión rápida se corresponde con la fase ascendente ( $\beta$ ) de la espiga amperométrica. A diferencia de los eventos irreversibles, la fase decauyente ( $\gamma$ ), coincide con el cierre rápido del poro de fusión, lo que refleja una etapa de liberación independiente de éste.

tipo señales es que durante la fusión se produce la liberación de una cantidad de neurotransmisor menor al contenido total de la vesícula. Un pequeño poro podría regulando la duración de una fusión transitoria, controlar la cantidad de neurotransmisor liberada.

Por otra parte, la técnica de amperometría en parche también ha podido poner de manifiesto que en ocasiones se producen fusiones transitorias, observados como “parpadeos” en el trazo de capacidad, sin respuesta amperométrica alguna. El histograma de duración de estos eventos tiene una constante de tiempo similar a la de los transitorios con liberación y la distribución de tamaños también es similar, lo que sugiere que son el mismo tipo de vesículas las responsables de ambos tipos de eventos. Por otro lado, es frecuente observar que una misma vesícula, de forma repetida se funde de forma transitoria con la membrana plasmática, como demuestra la similitud en los tamaños de los transitorios de capacidad (figura 53). Es posible que una vesícula se funda de forma transitoria con la membrana plasmática y libere su contenido, y después esa misma vesícula vuelva a fundirse nuevamente, aún sin haberse recargado con nuevo neurotransmisor. Una hipótesis interesante sería que los eventos transitorios lentos y con escasa liberación descritos en la literatura (Alvarez de Toledo y col., 1993; Albillos y col., 1997) y que nosotros, a veces, también observamos, no sean más que producto de vesículas en un proceso intermedio de reciclado, en el que aún no han terminado de rellenarse con nuevo neurotransmisor, después de haberse vaciado en una ronda anterior de exocitosis por fusión transitoria. Sin embargo, como con posterioridad se discutirá, el tamaño del poro que se forma durante estos eventos es bastante menor al tamaño medido durante los transitorios rápidos y puede ser esta la causa que realmente limite el contenido de transmisor liberado.

En todas las fusiones transitorias con liberación, enseguida después de la fase de subida de la espiga se produce el cierre del poro de fusión, lo que plantea la hipótesis de que la salida de catecolaminas dispara el proceso de oclusión del poro. Las fuerzas que pueden ser responsables de este hecho son por ahora desconocidas, pero una posible explicación es la tensión a la que puede estar sometido la membrana del gránulo secretor. El hinchamiento del gránulo secretor debido a la entrada de agua a través del poro de fusión no puede ser el origen de la tensión de la membrana del gránulo ya que además tiende a ejercer fuerzas en el sentido de expansión de la membrana del gránulo. Pero una posibilidad es que la asociación de los gránulos secretores con componentes del citoesqueleto (Burgoyne y Cheek, 1987; Linstedt y Kelly, 1987) incremente la tensión del gránulo a un nivel crítico. Posiblemente, una tensión entre membranas debe existir para explicar la transferencia de membranas, de la membrana del gránulo a la membrana plasmática, que a veces observamos durante una fusión transitoria (figura 61).

### **3.2. Fusiones transitorias con liberación lenta**

En células cromafines de rata se pueden observar fusiones transitorias semejantes a las descritas en células cebadas (Alvarez de Toledo y col., 1993) y en cromafines bovinas (Albillos y col., 1997), donde la cinética de liberación es lenta. El poro de fusión es el que limita con su pequeño tamaño (conductancia media: 129 pS) la liberación de catecolaminas. Se ha propuesto que el transmisor liberado se debe al contenido que se encuentra en disolución (Alvarez de Toledo y col., 1993). El poro de fusión no se expande, con lo que el contenido atrapado en la matriz permanece en el interior de la vesícula sin liberarse. Existe una relación lineal entre la conductancia del poro y la liberación amperométrica. La pendiente de esta regresión lineal (1,8 pA/nS) corresponde a un flujo de

5,6 millones de moléculas por nS. Este valor es semejante al flujo de liberación de serotonina en células cebadas (Alvarez de Toledo y col., 1993), aunque 10 veces más lento que el flujo de catecolaminas en células cromafines bovinas (Albillos y col., 1997) durante el poro formado durante una fusión irreversible. Aparentemente estos datos parecen revocar la idea de que la secreción es tanto más rápida cuanto más pequeño es el tamaño del gránulo secretor del tipo celular del que se trate (Neher, 1993). El lento flujo de liberación de catecolaminas puede deberse a que la cantidad de transmisor almacenada sea muy pequeña. Son posibles dos propuestas. Bien, que el contenido disuelto en la vesícula y habilitado para liberarse a través del poro formado sea muy pequeño. O bien, puede tratarse de vesículas que previamente se han fundido y liberado su contenido y aún no están completamente recargadas de transmisor.

### **3.3. Papel del calcio y sodio en los eventos de fusión reversible.**

La sensibilidad de los eventos de fusión transitorios a alteraciones en las condiciones iónicas en el medio extracelular puede servir para comprender la naturaleza del proceso que subyace. La observación de que altas concentraciones de calcio (90mM) en la solución de la pipeta incrementa el número de fusiones transitorias sugiere que algunas características del proceso de fusión después de la iniciación de la fusión son dependientes de calcio. Podría ocurrir que el sitio de calcio que afecta la evolución y expansión del poro de fusión que hemos descrito anteriormente sea también el responsable del cierre del poro de fusión. Fluctuaciones amperométricas rápidas debida a fusiones transitorias en células cromafines (Zhou y col., 1996) mostraron una dependencia de la concentración de calcio intracelular en el número y frecuencia de éstas señales. Sin embargo, el calcio debería actuar desde el interior celular y aunque el alto calcio extracelular puede incrementar la concentración de

calcio citósolico existen otras posibilidades más claras. En las condiciones experimentales empleadas, las fuerzas implicadas en la expansión final de la matriz intravesicular tienden a ser pequeñas. Como anteriormente se ha citado, una alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y nada de  $\text{Na}^+$  en la solución de la pipeta inhibe el hinchamiento de la matriz del gránulo secretor. Iones  $\text{Ca}^{2+}$  son responsables de la condensación de las matrices en gránulos de mucina y en células cebadas, mientras que la ausencia de iones  $\text{Na}^+$  impide el mecanismo de intercambio iónico para el hinchamiento de la matriz (figura 66). A pesar de que el hinchamiento de la matriz esta siendo total o parcialmente inhibido, la liberación de catecolaminas se produce. Este resultado, aunque sorprendente, esta de acuerdo, con nuestros resultados previos en células cebadas, donde la inhibición de la matriz por histamina acídica o soluciones hiperosmóticas no refrena la liberación de serotonina. Sin embargo, en células cebadas no observamos en estas condiciones fusiones transitorias con liberación en forma de espiga. Una explicación puede estar en el tamaño del gránulo secretor. En vesículas más pequeñas, la relación superficie/volumen es mayor y la contribución de la matriz sería menor. Además, conforme la ley de Laplace, la tensión (T) de una esfera de paredes finas de, diametro d, viene dado por  $T = Pd/4$ . Por tanto, la membrana de una vesícula cromafín de rata desarrollaría una tensión 35 veces menor que la membrana de una vesícula cebada, aunque 4 veces superior a la tensión en una vesícula sináptica, si consideramos los diámetros de éstas vesículas.

### **3.4. Implicaciones de las fusiones transitorias en el ciclo vesicular**

Una vesícula que se funda transitoriamente, después de cerrarse podría reusarse y recargarse con catecolaminas a alta concentración. Sin embargo, el acopio de nuevo neurotransmisor probablemente sólo será factible si las proteínas de la matriz estan presentes. La conductancia de los

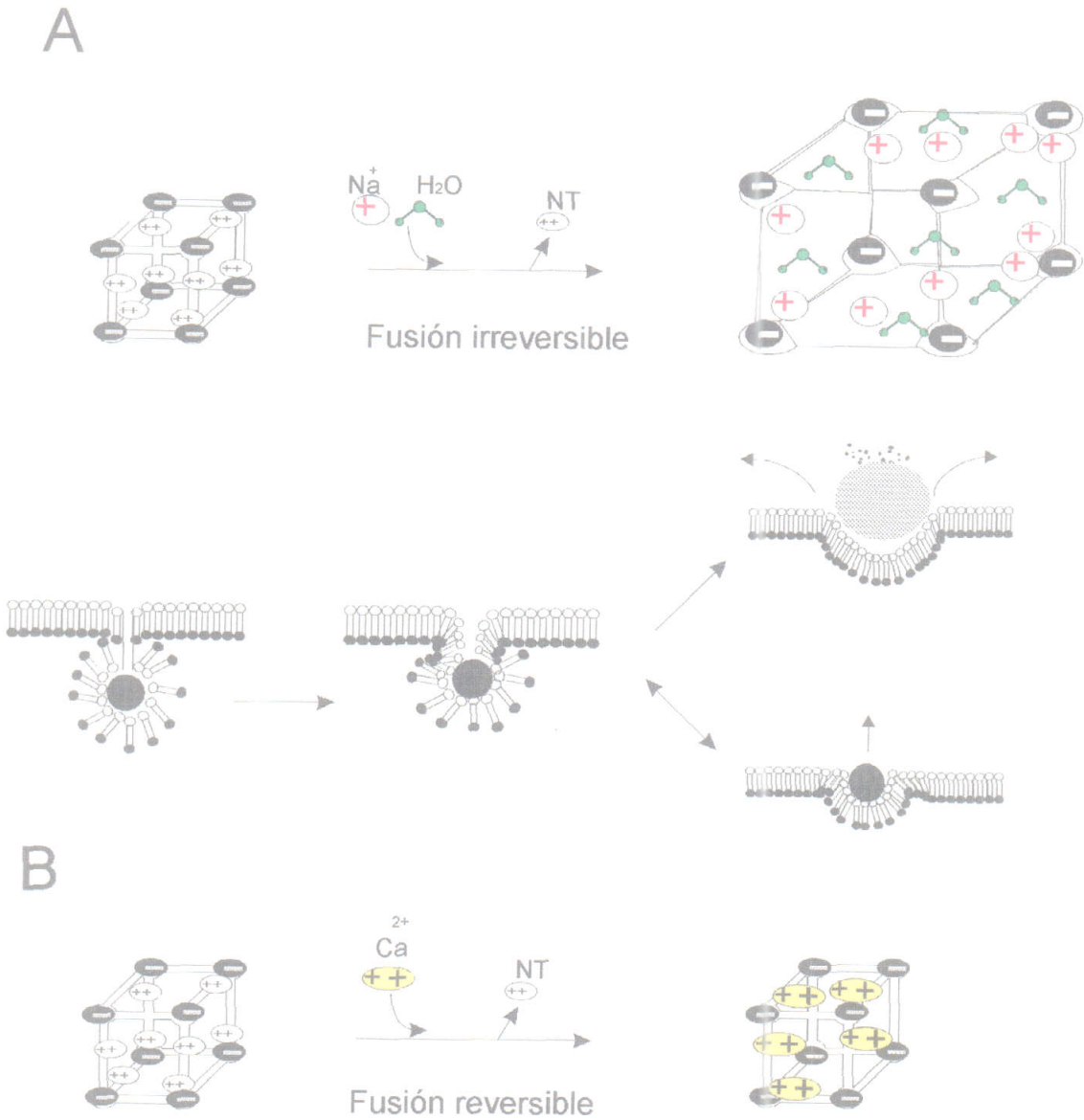


Figura 66. Esquema ilustrativo que muestra el intercambio iónico entre el medio extracelular y la matriz polimérica para las condiciones experimentales inductoras de eventos de fusión irreversibles (**A**) y reversibles (**B**). En ambos casos, el transmisor (NT) es liberado con igual eficacia, pero mientras, que en presencia de sodio, se produce el hinchamiento de la matriz por el flujo de agua que acompaña, probablemente, en alto calcio y ausencia de sodio, la matriz permanece condensada, deteniendo la expansión final irreversible.

poros de fusión transitorios tienen un valor medio de 400 pS, aunque pueden llegar a superar los 700 pS durante el proceso de expansión. A un poro de fusión de 2 nm de radio le correspondería una conductancia menor de 1 nS. Este tamaño de poro durante tan sólo escasos milisegundos es posible que limite la permeación de proteínas de alto peso molecular (77 K) y por tanto la pérdida de proteínas de la matriz granular.

Existe evidencia de endocitosis asociada a exocitosis en diferentes tipos celulares. Medidas de capacidad mostraron endocitosis rápida en neuronas bipolares (von Gersdorff y Matthews, 1994a), melanótrofos (Thomas y col., 1994) y células cromafines (Heinemann y col., 1994). Este tipo de endocitosis es más rápida que la endocitosis mediada por clatrina (Hsu y Jackson, 1996; Smith y Neher, 1997; Thomas y col., 1994). Se ha sugerido (Artalejo y col., 1995; Henkel y Almers, 1996) que esta forma de endocitosis es responsable del reciclaje de membranas en células neuroendocrinas a causa de que es el proceso de endocitosis más rápido conocido que ocurre después de la secreción y probablemente no depende de vesículas revestidas. Este tipo de endocitosis es dependiente de calcio y calmodulina. Una exocitosis seguida por una endocitosis rápida de la vesícula podría subyacer a los eventos de fusiones transitorias que nosotros observamos. Así, la regulación de la endocitosis por calcio puede contribuir al reciclado de membrana durante la secreción en diferentes tipos celulares.

La trascendencia fisiológica de la liberación durante una fusión reversible reside en que evita que la membrana vesicular colapse con la membrana celular, quedando tras la liberación de los productos de secreción, la vesícula íntegra en el citosol. La membrana vesicular posee proteínas específicas encargadas de sensor segundos mensajeros y mediar la fusión (Jahn y Südhof, 1994; Südhof y col., 1993), que pasan a la membrana celular cuando ocurre una fusión completa. El reciclaje selectivo

de estas proteínas es un mecanismo poco conocido (Kelly y Grote, 1993). Si bien durante las fusiones reversibles ( $\tau = 62,5$  ms) pueden mezclarse los lípidos (Monck y col., 1990), las proteínas vesiculares no llegan a difundir a la membrana plasmática manteniendo la vesícula, su integridad y su funcionalidad. Datos recientes (Otto y col., 1997) muestran que en vesículas sinápticas aisladas, además de la proteína de fusión de la vesícula, sinaptobrevina, se pueden encontrar también proteínas de membrana plasmática, la syntaxina y SNAP-25, ensambladas formando complejo. Esto podría explicarse por ciclos previos de exo-endocitosis rápida, donde la vesícula puede sufrir fusión reversible, durante la cual se forma el complejo proteico de fusión que es atraído a la membrana de la vesícula cuando ésta se endocita. La relación sinaptobrevina a syntaxina y SNAP-25 es de 6:1 (Walch-Solimena y col., 1995) en vesículas sinápticas purificadas, lo que indicaría que las vesículas pueden disponer de más oportunidades para fundirse transitoriamente antes de tener que reciclarse a través de un ciclo completo, por intermediarios endosomales (Figura 67).

Betz y Bewick (1992) mostraron que el uso de una clase de colorantes lipofílicos, que incluye el FM1-43, son sondas muy útiles para el estudio del tráfico vesicular. Cuando están presente en medio acuoso, estos colorantes se unen muy favorablemente a la parte extracelular de la bicapa lipídica de la membrana plasmática e incrementa su fluorescencia. Cuando se produce la exocitosis, más colorante es absorbido debido a la membrana vesicular incorporada a la superficie celular. Cuando la membrana es captada por endocitosis, el colorante es internalizado junto con la membrana, produciendo un conjunto de vesículas de endocitosis teñidas. Cuando subsiguientemente, el colorante es eliminado del medio extracelular, el colorante atrapado es el mayor contribuyente de la fluorescencia. Betz y colaboradores siguieron el destino de las vesículas endocíticas durante ciclos de exocitosis y endocitosis en la unión



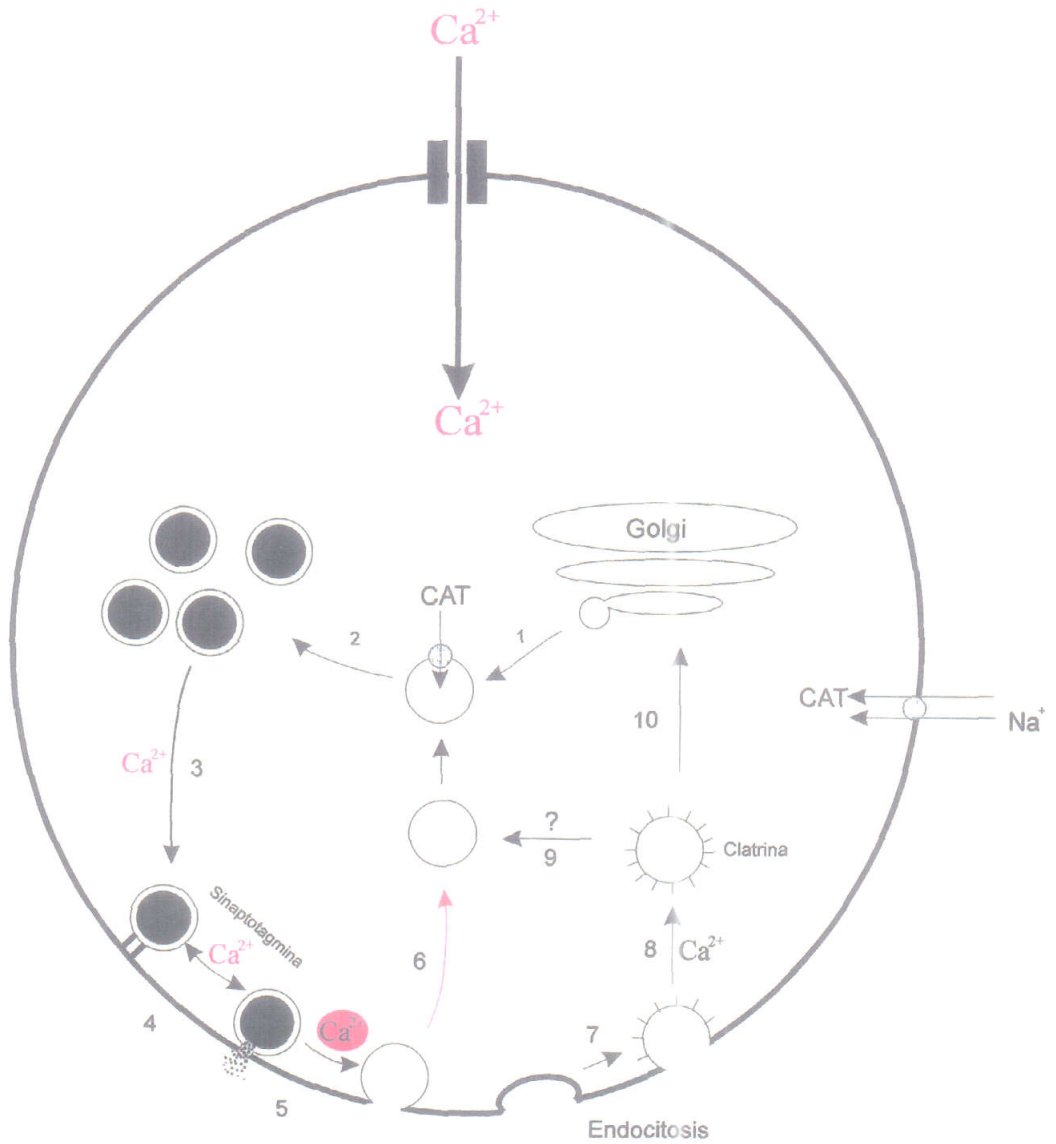


Figura 67. Etapas del ciclo vesicular en una célula cromafín de rata. Inicialmente, las vesículas se originan del aparato de Golgi (1), son recargadas de catecolaminas (CAT), a través de transportadores específicos (2). Varias etapas dependientes de calcio (3 y 4) transloca las vesículas a la membrana plasmática y provoca la fusión de membranas. La expansión del poro es también dependiente de calcio (5). Generalmente la endocitosis mediada por clatrina (7, 8), también dependiente de calcio, es la vía "clásica" para el reciclaje de vesículas. La fusión reversible ("Kiss and Run") puede ser una ruta opcional (6) para la síntesis rápida de nuevas vesículas.

neuromuscular y mostraron que las vesículas están listas en aproximadamente 1 minuto para una nueva ronda de exocitosis (Betz y Bewick, 1992; Betz y Bewick, 1993). Más recientemente, el método ha sido aplicado extensamente para estudiar el tráfico vesicular en botones sinápticos y se ha mejorado al punto de poder resolver eventos endocitóticos y exocitóticos únicos. Se ha observado endocitosis y exocitosis cuantales (Murthy y Stevens, 1998; Ryan y col., 1997) y la cantidad de colorante tomada por endocitosis cuantales iguala la cantidad de colorante perdida por evento de liberación, indicando que debe existir un estricto acoplamiento de exocitosis y endocitosis para una gran población de vesículas. El tiempo necesario para un ciclo completo (desde que las vesículas se endocitan hasta que están listas para liberar) es de 90s (Ryan y col., 1993). En botones sinápticos, un conjunto de 5-20 vesículas pueden ser liberadas mucho más rápidamente que la gran mayoría y una vez depletadas están nuevamente listas para liberar con una constante de tiempo de 5-12 s (Dobrunz y Stevens, 1997; Stevens y Tsujimoto, 1995). Recientemente, apoyando nuestro trabajo se ha observado que el alto calcio extracelular o la estaurosporina aumentan la velocidad de endocitosis rápida de vesículas en terminales nerviosos de hipocampo (Klingauf y col., 1998).

Todos estos datos apoyan la hipótesis de exocitosis por fusión transitoria, conocida como "Kiss and Run", propuesta inicialmente por Meldolesi y Ceccarelli en 1981 y demostrada por Alvarez de Toledo y colaboradores años más tarde. El uso de la técnica de amperometría en parche pone en evidencia de forma más directa que esta forma de exocitosis, no solamente se produce con gran eficacia sino que puede tener gran trascendencia en determinados sistemas biológicos en específicas condiciones, probablemente cuando la velocidad en la liberación del transmisor sea clave para la función celular.

## APÉNDICE I

### CÁLCULO DE LA IMPEDANCIA DEL CIRCUITO EQUIVALENTE DE UNA CÉLULA EN LA CONFIGURACIÓN DE CÉLULA ENTERA:

En primer lugar, en paralelo  $R_m$  y  $C_m$  (figura 4), la inversa de la impedancia de membrana ( $Z_m$ ) es la suma de las inversas de la resistencia de membrana e impedancia capacitativa ( $1/j\omega C_m$ ):

$$\frac{1}{Z_m} = \frac{1}{R_m} + j\omega C_m = G_m + j\omega C_m$$

donde  $\omega = 2 \times \pi \times f$ . ( $f$ = frecuencia)

Y en serie  $R_s$  con el circuito, la impedancia total ( $Z_T$ ) es la suma de la impedancia de membrana y la resistencia en serie ( $R_s$ ):

$$Z_T = Z_m + R_s = \frac{1}{G_m + j\omega C_m} + \frac{1}{G_s} = \frac{1 + \frac{G_m}{G_s} + \frac{j\omega C_m}{G_s}}{G_m + j\omega C_m} \rightarrow Y = \frac{1}{Z_T} = \frac{G_m + j\omega C_m}{1 + \frac{G_m}{G_s} + \frac{j\omega C_m}{G_s}}$$



## CONCLUSIONES

1) Se ha utilizado un sistema de medida de la superficie celular mediante la técnica de “patch-clamp” que permite medir el incremento neto de superficie que tiene lugar durante la fusión de un gránulo de secreción. Se ha empleado también una técnica de detección de los productos liberados conocida como amperometría. La utilización conjunta de ambos métodos se ha aplicado al estudio de la exocitosis en células cebadas permitiendo la monitorización conjunta de dos etapas de un mismo proceso: la fusión y la liberación de un gránulo secretor.

2) Se ha desarrollado una nueva técnica, la amperometría en parche, que al combinar la amperometría con la técnica de “patch-clamp”, en la configuración de registro “in situ” permite una resolución mejorada de la fusión de pequeñas vesículas y de la medida de los poros de fusión exocitóticos.

3) La aplicación de esta técnica en células cebadas peritoneales permitió definir tres fases en la formación y expansión del poro de fusión. En la primera fase, se forma una conexión de aproximadamente 500 pS, la segunda fase corresponde con una expansión abrupta por encima de los 10 nS que coincide con la fase de subida de la espiga de liberación y en la tercera fase el poro se expande hasta un tamaño mayor que permite su máxima liberación.

4) El tiempo de expansión del poro de fusión muestra una dependencia sigmoideal de la concentración citosólica de calcio. Una proteína que une calcio de manera cooperativa, con una saturación media de 300 nM parece ser la responsable de la dilatación del poro de fusión y por tanto de regular la liberación.

5) La utilización de soluciones extracelulares que afectan a la descondensación de la matriz intravesicular, como el pH ácido, la alta osmolaridad y la alta concentración de histamina, retrasa el momento en que la liberación se produce, implicando un mecanismo de regulación a este nivel.

6) La amperometría en parche ha permitido estudiar la respuesta secretora de vesículas aisladas en células cromafines de rata, demostrando que los gránulos cromafines de rata pueden liberar su contenido bien por fusión reversible o irreversible con la membrana plasmática.

7) Hemos podido medir el tamaño medio de una vesícula cromafín de rata, y hemos estimado un radio de 92 nm. La concentración de catecolaminas por vesícula para una misma célula es bastante homogénea y se calcula en  $2,5 \pm 0,15$  M.

8) La liberación del contenido total de catecolaminas a través de una fusión reversible resulta en una espiga rápida semejante a la que se produce durante una fusión irreversible, indicando que no sólo el mismo tipo de vesícula puede fundirse de manera reversible o irreversible, sino que independientemente de como tenga lugar la fusión, el proceso de liberación del transmisor es igual de eficaz para la célula.

9) En eventos de fusión transitorios, el poro de fusión permanece abierto durante pocos milisegundos ( $\tau = 62.5$  ms). Este tiempo es suficiente para permitir la liberación total de catecolaminas.

10) El tamaño del poro en que la espiga amperométrica es detectada en los eventos de fusión reversible supera los 700 pS y aparentemente no limita la liberación.

11) Las fuerzas implicadas en la expansión final del poro de fusión pueden estar reducidas en 90  $\text{Ca}^{2+}$  y 0  $\text{Na}^+$  y pueden favorecer los eventos de fusión reversibles.

12) Nuestros resultados muestran que la liberación del contenido de los granos secretores puede ser completo durante las fusiones transitorias. Este mecanismo representa un nuevo proceso celular durante la exocitosis, con implicaciones directas sobre la liberación de neurotransmisores.

## BIBLIOGRAFÍA

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

Almers, W. Exocytosis. *Annual Review of Physiology* **52**, 607-624 (1990).

Almers, W. y Neher, E. Gradual and stepwise changes in the membrane capacitance of rat peritoneal mast cells. *Journal of Physiology* **386**, 205-217 (1987).

Almers, W. y Tse, F.W. Transmitter release from synapses: does a preassembled fusion pore initiate exocytosis? *Neuron* **4** (1990).

Alter, S.C. y Schwartz, L.B. Effect of histamine and divalent cations on the activity and stability of tryptase from human mast cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **991**, 426-430 (1989).

Alvarez de Toledo, G., Fernández Chacón, R. y Fernández, J.M. Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature* **373**, 555-557 (1993).

Alvarez de Toledo, G. y Fernández, J.M. The events leading to secretory granule fusion. In *Cell Physiology of Blood*, R.B. Gunn and J.C. Parker, eds., 334-344 (1988).

Angleton, J.K. y Betz, W.J. Monitoring secretion in real time: capacitance, amperometry and fluorescence compared. *Trends in Neuroscience* **20**, 281-287 (1997).

Armstrong-James, M. y Fox, K. The electrochemical detection of enkephalins in bulk solution and following iontophoresis. *Journal of Physiology* **313**, 38P (1981).

Artalejo, C.R., Henley, J.R., McNiven, M.A. y Palfrey, H.C. Rapid endocytosis coupled to exocytosis in adrenal chromaffin cells involves  $Ca^{2+}$ , GTP, and dynamin but not clathrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **92**, 8328-8332 (1995).

Augustine, G.J. y Neher, E. Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *Journal of Physiology* **450**, 247-271 (1992).

Bauer, J.E., Kristensen, E.W., May, L.J., Wiedemann, D.J. y Wightman, R.M. Fast-scan voltammetry of biogenic amines. *Analytical Chemistry* **60**, 1268-1272 (1988).

Benchimol, S. y Cantin, M. Ultrastructural radioautography of synthesis and migration of proteins and catecholamines in the rat adrenal medulla. *Cell Tissue Res.* **225**, 293-314 (1982).

Betz, W.J. y Bewick, G.S. Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science* **255**, 200-203 (1992).

Betz, W.J. y Bewick, G.S. Optical monitoring of transmitter release and synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Journal of Physiology* **460**, 287-309 (1993).

Betz, W.J. y Henkel, A.W. Okadaic acid disrupts clusters of synaptic vesicles in frog motor nerve terminals. *Journal of Cell Biology* **124**, 843-854 (1994).

Betz, W.J. y Wu, L.G. Synaptic transmission. Kinetics of synaptic-vesicle recycling. *Curr. Biol.* **5**, 1098-1101 (1995).

Bittner, M.A. y R.W., Holz. A temperature-sensitive step in exocytosis. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 16226-16229 (1992).



Breckenridge, L.J. y Almers, W. Final steps in exocytosis observed in a cell with giant secretory granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **84**, 1945-1949 (1987a).

Breckenridge, L.J. y Almers, W. Currents through the fusion pore that forms during exocytosis of a secretory vesicle. *Nature* **328**, 814-817 (1987b).

Bruns, D. y Jahn, R. Real-time measurements of transmitter release from single synaptic vesicles. *Nature* **377**, 62-65 (1995).

Burgess, T.L. y Kelly, R.B. Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annual Review of Cell Biology* **3**, 243-293 (1987).

Burgoyne, R.D. y Cheek, T.R. Cytoskeleton: role of fodrin in secretion. *Nature* **326**, 448 (1987).

Burgoyne, R.D. y Morgan, A. Regulated exocytosis. *Biochemical Journal* **293**, 305-316 (1993).

Carmichael, S.W. Morphology and innervation of the adrenal medulla. *Stimulus-secretion coupling* **1**, 1-29 (1986).

Carmichael, S.W. y Brooks, J.C. Ultrastructural demonstration of exocytosis in the intact rat adrenal medulla. *Journal of Electron Microscopy Technology* **12**, 316-322 (1989).

Ceccarelli, B. y Hurlbut, W.P. Ca<sup>2+</sup>-dependent recycling of synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *Journal of Cell Biology* **87**, 297-303 (1980)

Cole, K.S., *Membranes, ions and impulses*. (University of California Press, Berkeley, California, 1968).

Crespi, F. *In vivo* voltammetric detection of neuropeptides with micro carbon fibre biosensors: Possible selective detection of somatostatin. *Analytical Biochemistry* **194**, 69-76 (1991).

Curran, M. y Brodwick, M.S. Mast cell exocytosis and gel-swell of granules. *Biophysical Journal* **47**, 172a (Abstract) (1985).

Curran, M., Cohen, F.S., Chandler, P., Munson, J. y Zimmerberg, J. Exocytotic fusion pore exhibit semi-stable states. *Journal of Membrane Biology* **133**, 61-75 (1993).

Curran, M.J. y Brodwick, M.S. Ionic control of the size of the vesicle matrix of beige mouse mast cells. *Journal of General Physiology* **98**, 771-790 (1991).

Chandler, D.E. y Heuser, J.E. Arrest of membrane fusion events in mast cells by quick-freezing. *Journal of Cell Biology* **86**, 666-674 (1980).

Chen, G., Gutman, D.A., Zerby, S.E. y Ewing, A.G. Electrochemical monitoring of bursting exocytotic events from the giant dopamine neuron of *Planorbis corneus*. *Brain Research* **733**, 119-124 (1996).

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

Chow, R., Klingauf, J. y Neher, E. Time course of  $Ca^{2+}$  concentration triggering exocytosis in neuroendocrine cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **91**, 12765-12769 (1994).

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

De Camilli, P. y Jahn, R. Pathways to regulated exocytosis in neurons. *Annual Review of Physiology* **52**, 625-645 (1990).

Dobrunz, L.E. y Stevens, C.F. Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron* **18**, 995-1008 (1997).

Douglas, W.W. Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *British Journal of Pharmacology* **34**, 451-474 (1968).

Duchen, M.R. Voltammetric detection of quantal secretory events from isolated rat peritoneal mast cells. *Journal of Physiology* **467**, 2P (1993).

Engisch, K. y Nowycky, M. Compensatory and excess retrieval: two types of endocytosis following single step depolarizations in bovine adrenal chromaffin cells. *Journal of Physiology*. **506**, 591- 608 (1998).

Erickson, J.D., y col., Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic gene locua". *Journal of Biological Chemistry* **269**, 21929-21932 (1994).

Fernández-Chacón, R., Estudio de la exocitosis mediante detección electroquímica y técnica de "patch-clamp" en células cebadas. Sevilla (1995).

Fernández-Chacón, R. y Alvarez de Toledo, G. Cytosolic Calcium facilitates release of secretory products after exocytotic vesicle fusion. *FEBS Letters* **363**, 221-225 (1995).

Fernández, J.M., Neher, E. y Gomperts, B.D. Capacitance measurements reveal stepwise fusion events in degranulating mast cells. *Nature* **312** (1984).

Fernández, J.M., Villalon, M. y Verdugo, P. Reversible condensation of mast cell secretory products in vitro. *Biophysical Journal* **59**, 1022-1027 (1991).

Fesce, R., Grohvaz, F., Valtorta, F. y Meldolesi, J. Neurotransmitter release: fusion or "kiss-and-run". *Trends in Cell Biology* **4**, 1-4 (1994).

Fidler, N. y Fernández, J.M. Phase tracking: an improved phase detection technique for cell membrane capacitance measurement. *Biophysical Journal* **56**, 1153-1162 (1989).

Gerdes, H.H., Rosa, P., Phillips, E., Baeuerle, P.A., Frank, R., Argos, P. y Huttner, W.B. The primary structure of human secretogranin II, a widespread tyrosine-sulfated secretory granule protein that exhibits low pH- and calcium-induced aggregation. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 12009-12015 (1989).

Gillis, K.D., Techniques for membrane capacitance measurements. in *Single-Channel Recording* B. Sakmann, E. Neher, Eds. (1995).

Griffiths, G. y Simons, K. The *trans* Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* **234**, 438-443 (1986).

Grynkiewicz, G., Poenie, M. y Tsien, R.Y. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* **260** (1985).

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. y Sigworth, F.J. Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv* **391**, 85-100 (1981).

Hartmann, J. y Lindau, M. A novel Ca<sup>2+</sup> - dependent step in exocytosis subsequent to vesicle fusion. *FEBS Letters* **363**, 217-220 (1995a).

Hartmann, J, Scepek, S. y Lindau, M. Regulation of granule size in human and horse eosinophils by number of fusion events among unit granules. *Journal of Physiology* **483**, 201-209 (1995b).

Hayashi, T., McMahon, H., Yamasaki, S., Binz, T., Hata, Y., Südhof, T.C. y Niemann, H. Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *The Embo Journal* **13**, 5051-5061 (1994).

Heinemann, C., Chow, R.H., Neher, E. y Zucker, R.S. Kinetics of the secretory response in bovine chromaffin cells following flash photolysis of caged  $Ca^{2+}$ . *Biophysical Journal* **67**, 2546-2557 (1994).

Helander, H.F. y Bloom, G.D. Quantitative analysis of mast cell structure. *Journal of Microscopy* **100**, 315-321 (1974).

Helle, K.B. Chromogranins: universal proteins in secretory organelles from *Paramecium* to man. *Neurochem. Int.* **17**, 165-175 (1990).

Henkel, A.W. y Almers, W. Fast steps in exocytosis and endocytosis studied by capacitance measurements in endocrine cells. *Current Opinion in Neurobiology* **6**, 350-357 (1996).

Hille, B., *Ionic channels of excitable membranes*. (Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 1994).

Hsu, S-F. y Jackson, M.B. Rapid exocytosis and endocytosis in nerve terminals of the rat posterior pituitary. *Journal of Physiology* **494**, 539-553 (1996).

Huang, L.-Y.M. y Neher, E.  $Ca^{2+}$  dependent exocytosis in the somata of dorsal root ganglion neurons. *Neuron* **17**, 135-145 (1996).

Iravani, M.M., Kruk, Z.L. y Millar, J. Electrochemical detection of nitric oxid using fast cyclic voltammetry. *Journal of Physiology* **467**, 48P (1993).

Jahn, R. y Südhof, T.C. Synaptic vesicles and exocytosis. *Annual Review of Neuroscience* **17**, 219-246 (1994).

Jankowski, J.A., Schroeder, T.J., Holz, R.W. y Wightman, R.M. Quantal secretion of catecholamines measured from individual bovine adrenal medullary cells permeabilized with digitonin. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 18329-18335 (1992).

Johnson, R.G., Carty, S.E., Fingerhood, B.J. y Scarpa, A. The internal pH of mast cell granules. *FEBS letters* **120**, 75-79 (1980).

Kanner, B.I. Glutamate transporters from brain. A novel neurotransmitter transporter family. *Febs letters* **325**, 95-99 (1993).

Katz, B. y Miledi, R. Propagation of electric activity in motor nerve terminals. *Proceedings of the Royal Society of London [Biol]* **161**, 453-482 (1965a).

Katz, B. y Miledi, R. The measurement of synaptic delay and the time course of acetylcholine release at the neuromuscular junction. *Proceedings of the Royal Society (London)* **161**, 483-495 (1965b).

Katz, B. y Miledi, R. The effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals. *Proceedings of the Royal Society (London)* **161**, 496-503 (1965c).

Kelly, R.B. Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science* **230**, 25-32 (1985).

Kelly, R.B. y Grote, E. Protein targeting in the neuron. *Annual Review of Neuroscience* **16**, 95-127 (1993).

Kennedy, R.T., Huang, L., Atkinson, M.A. y Dush, P. Amperometric monitoring of chemical secretions from individual pancreatic  $\beta$ -cells. *Analytical Chemistry* **65**, 1882-1887 (1993).

Klingauf, J., Kavalali, E.T. y Tsien, R.W. Kinetics and regulation of fast endocytosis at hippocampal synapses. *Nature* **394**, 581-585 (1998).

Knoll, G. , Braun, C. y Plattner, H. Quenched flow analysis of exocytosis in *Paramecium* cells: Time course, changes in membrane structure, and calcium requirements revealed after rapid mixing and rapid freezing of intact cells. *Journal of Cell Biology* **113**, 1295-1304 (1991).

Kobayashi, S., Kent, C. y Coupland, R. Observations on the localization of labeled amino acid in mouse adrenal chromaffin cells after the injection of L-[4,5-<sup>3</sup>H] leucine. *Journal of Endocrinology* **78**, 21-29 (1978).

Leszczyszyn, D.J., Jankowski, J.A., Viveros, O.H., Diliberto, E.J., Near, J.A. y Wightman, R.M. Nicotinic Receptor-mediated Catecholamine Secretion from Individual Chromaffin Cells. *The Journal of Biological Chemistry* **265**, 14736-14737 (1990).

- Lindau, M. Time-resolved capacitance measurements : monitoring exocytosis in single cells. *Quarterly Reviews of Biophysics* **24**, 75-101 (1991).
- Lindau, M. y Almers, W. Structure and function of fusion pores in exocytosis and ectoplasmic membrane fusion. *Current Opinion in Cell Biology* **7**, 509-517 (1995).
- Lindau, M. y Fernández, J.M. IgE mediated degranulation of mast cells does not require opening of ion channels. *Nature* **319**, 150-153 (1986).
- Lindau, M. y Neher, E. Patch-clamp technique for time-resolved capacitance measurements in single cells. *Pflügers Archiv* **411**, 137-146 (1988).
- Lingg, G., Fisher, C.R., Schmidt, W. y Winkler, H. Exposure of an antigen of chromaffin granules on cell surface during exocytosis. *Nature* **301**, 610-611 (1983).
- Lollike, K., Borregaard, N. y Lindau, M. The exocytotic fusion pore of small granules has a conductance similar to an ion channel. *Journal of Cell Biology* **129**, 99-104 (1995).
- Lollike, K., Borregaard, N. y Lindau, M. Capacitance flickers and pseudoflickers of small granules, measured in cell-attached configuration. *Biophysical Journal* **75**, 53-59 (1998).
- Lupas, A., Van Dyke, M. y Stock, J. Predicting coiled-coils from protein sequences. *Science* **252**, 1162-1164 (1991).
- Llinas, R., Sugimori, M. y Silver, R.B. Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science* **256**, 677-679 (1992).
- Ma, Y.H., Lores, P., Wang, J. y Grodsky, G.M. Constitutive (pro)insulin release from pancreas of transgenic mice expressing monomeric insulin. *Endocrinology* **136**, 2622-2230 (1995).
- Malinski, T. y Taha, Z. Nitric oxid release from a single cell measured *in situ* by a porphyrinic-based microsensor. *Nature* **358**, 676-678 (1992).
- Marín, A.J. y Tabares, L. Single secretory events recorded by electrochemical methods from rat pineal cells. *Biophysical Journal* **64**, A195 (1993).
- Mayer, A., Wickner, W. y Haas, A. Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p ( $\alpha$ -SNAP) can precede docking and fusion of yeast vacuoles. *Cell* **85**, 83-94 (1996).

McIntire, S.L., Reimer, R.J., Schuske, K., Edwards, R.H. y Jorgensen, E.M. Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* **389**, 870-876 (1997).

Meldolesi, J. y Ceccarelli, B. Exocytosis and membrane recycling. *Philos Trans R Soc Lond Biol* **296**, 55-65 (1981).

Melykian, G.B., Niles, W.D. y Cohen, F.S. The fusion kinetics of influenza hemagglutinin expressing cells to planar bilayer membranes is affected by HA density and host cell surface. *Journal of General Physiology* **106**, 783-802 (1995).

Miesenböck, G., De Angelis, D.A. y Rothman, J.E. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* **394**, 192-195 (1998).

Millar, J. y Williams, G.V. Fast differential ramp voltammetry: A new voltammetric technique designed specifically for use in neuronal tissue. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **282**, 33-49 (1990).

Monck, J., Alvarez de Toledo, G. y Fernández, J.M. Tension in secretory granule membranes causes extensive membrane transfer through the exocytotic fusion pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **87**, 7804-7808 (1990).

Monck, J. y Fernandez, J.M. The exocytotic fusion pore. *Journal of Cell Biology* **119**, 1395-1404 (1992).

Monck, J. y Fernandez, J.M. The exocytotic fusion pore and neurotransmitter release. *Neuron* **12**, 707-716 (1994).

Monck, J., Oberhauser, A.F., Alvarez de Toledo, G. y Fernández, J.M. Is swelling of the secretory granule matrix the force that dilates the exocytotic fusion pore? *Biophysical Journal* **59**, 39-47 (1991).

Moser, T. y Neher, E. Rapid exocytosis in single chromaffin cells recorded from mouse adrenal slices. *Journal of Neuroscience* **17**, 2314-2323 (1997a).

Moser, T. y Neher, E. Estimation of mean exocytic vesicle capacitance in mouse adrenal chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* **94**, 6735-6740 (1997b).

Murthy, V.N. y Stevens, C.F. Synaptic vesicles retain their identity through the endocytic cycle. *Nature* **392**, 497-501 (1998).

Neher, E. Concentration profiles of intracellular calcium in the presence of a diffusible chelator. *Experimental Brain Research*. **14**, 80-96 (1986).

Neher, E. The influence of intracellular calcium concentration on degranulation of dialysed mast cells from rat peritoneum. *Journal of Physiology* **395**, 193-214 (1988).

Neher, E. Secretion without full fusion. *Nature* **363**, 497-498 (1993).

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

Neher, E., Sakman, B. y Steinbach, J.H. The extracellular patch-clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflügers Archiv* **375**, 219-228 (1978).

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

Nicaise, G., Maggio, K., Thirion, S., Horoyan, M. y Keicher, E. The calcium loading of secretory granules: a possible key event in stimulus-secretion coupling. *Biological Cell* **75**, 89-99 (1992).

Nichols, B.J., Ungermann, C., Pelham, H.R., Wickner, W.T. y Haas, A. Homotypic vacuolar fusion mediated by t- and v-SNAREs. *Nature* **387**, 199-202 (1997).

Nordmann, J.J. Combined stereological and biochemical analysis of storage and release of catecholamines in the adrenal medulla of the rat. *Journal of Neurochemistry* **42**, 434-437 (1983).

Nüsse, O. y Lindau, M. The dynamics of exocytosis in human neutrophils. *Journal of Cell Biology* **107**, 2117-2123 (1988).

O'Connor, V., Augustine, G.J. y Betz, H. Synaptic vesicle exocytosis molecules and models. *Cell* **76**, 785-787 (1994).

Ornberg, R. L. y Reese, T.S. Beginning of exocytosis captured by rapid-freezing of *Limulus* amoebocytes. *Journal of Cell Biology* **90**, 40-54 (1981).



Otto, H., Hanson, P.I. y Jahn, R. Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 in the membrane of synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **94**, 6197-6201 (1997).

Parsons, T.D., Coorsen, J.R., Horstmann, H. y Almers, W. Docked granules, the exocytotic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells. *Neuron* **15**, 1085-1096 (1995).

Patzak, A. y Winkler, H. Exocytotic exposure and recycling of membrane antigens of chromaffin granules: Ultrastructural evaluation after. *Journal of Cell Biology* **97**, 1906-1917 (1986).

Peter, D., Liu, Y., Sternini, C., de Giorgio, R., Brecha, N. y Edwards, R.H. *Journal of Neuroscience. Differential expression of two vesicular monoamine transporters* **9**, 6179-6188 (1995).

Pfenninger, K., Akert, K., Moor, H. y Sandri, C. The fine structure of freeze-fractured presynaptic membranes. *Journal of Neurocytology* **1**, 129-149 (1972).

Phillips, J.H., Burridge, S.P., Wilson, S.P. y Kirshner, N. Visualization of the exocytosis/endocytosis secretory cycle in culture adrenal chromaffin cells. *Journal of Cell Biology* **97**, 1906-1917 (1983).

Poyato, J.M., Estudio de la cinética de la exocitosis en células cromafines aisladas aplicando la técnica de amperometría en parche. Universidad de Sevilla (1998).

Rabenstein, T.D. Proton nuclear magnetic resonance studies of mast cell histamine. *Biochemistry* **26**, 6923-6926 (1987).

Rahamimoff, R. y Fernández, J.M. Pre- and postfusion regulation of transmitter release. *Neuron* **18**, 17-27 (1997).

Robinson, I.M., Finnegan, J.M., Monck, J.R., Wightman, R.M. y Fernandez, J.M. Colocalization of calcium entry and exocytotic release sites in adrenal chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **92**, 2474-8 (1995).

Ryan, T.A., Reuter, H. y Smith, S.J. Optical detection of a quantal presynaptic membrane turnover. *Nature* **388**, 478-482 (1997).

Ryan, T.A., Reuter, H., Wendland, B. y Schweizer, F.E. The kinetics of synaptic vesicle recycling measured at single presynaptic boutons. *Neuron* **11**, 1-20 (1993).

Schmidt, W., Patzak, W., Lingg, G. y Winkler, H. Membrane events in adrenal chromaffin cells during exocytosis: a freeze-etching analysis after rapid cryofixation. *European Journal of Cell Biology* **32**, 31-37 (1983).

Schroeder, T.J., Borges, R., Finnegan, J.M., Pihel, K., Amatore, C. y Wightman, R.M. Temporally resolved, independent stages of individual exocytotic secretion events. *Biophysical Journal* **70**, 1061-1068 (1996).

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

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

Spruce, A.E., Breckenridge, L.J., Lee, A.K. y W., Almers. Properties of the fusion pore that forms during exocytosis of a mast cell secretory vesicle. *Neuron* **4**, 643-654 (1990).

Stern, M.D. Buffering of calcium in the vicinity of a channel pore. *Cell Calcium* **13**, 183-192 (1992).

Stevens, C.F. y Tsujimoto, T. Estimates for the pool size of releasable quanta at a single central synapse and for the time required to refill the pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **92**, 846-849 (1995).

Südhof, T.C. The synaptic vesicle cycle : a cascade of protein-protein interaction. *Nature* **375**, 645-653 (1995).

Südhof, T.C., De Camilli, P., Niemann, H. y Jahn, R. Membrane fusion machinery: insights from synaptic proteins. *Cell* **75**, 1-4 (1993).

Tanaka, T. Gels. *Sci. Am.* **244**, 124-138 (1981).

Tatham, P.E.R., Duchon, M.R. y Millar, J. Monitoring exocytosis from single mast cells by fast voltammetry. *Pflüger Archiv* **419**, 409-414 (1991).

Thomas, P., Lee, A.K., Wong, J.G. y Almers, W. A triggered mechanism retrieves membrane in seconds after Ca<sup>2+</sup> - stimulated exocytosis in single pituitary cells. *Journal of Cell Biology* **124**, 667-675 (1994).

Thomas, P., Wong, J.G., Lee, A.K. y Almers, W. A low affinity Ca<sup>2+</sup> receptor controls the final step in peptide secretion from pituitary melanotrophs. *Neuron* **11**, 93-104 (1993).

Tomlinson, A., Durbin, J. y Coupland, R.E. A quantitative analysis of rat adrenal chromaffin tissue: Morphometric analysis at tissue and cellular level correlated with catecholamine content. *Neuroscience* **20**, 895-904 (1987).

Trifaro, J.M. y Vitale, M.L. Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *Trends in Neuroscience* **16**, 466-471 (1993).

Ureña, J.M., Fernández Chacón, R., Benot, A., Alvarez de Toledo, G. y López Barneo, J. Hypoxia induced voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> entry and quantal dopamine secretion in carotid body glomus cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **91**, 10208-10211 (1994).

Uvnäs, B y Aborg, C.H. Cation exchange-a common mechanism in the storage and release of biogenic amines stored in granules (vesicles)? *Acta Physiological Scandinavian* **119**, 225-234 (1983).

Uvnäs, B. y Aborg, C.H. Role of ion exchange in release of biogenic amines. *News Physiol. Sci.* **4**, 68-71 (1989).

Valero, V., Monitorización del calcio citosólico y su correlación con la exocitosis en células endocrinas. Universidad de Sevilla (1998).

Valtorta, F., Benfenati, F. y Greengard, P. Effects of the neuronal phosphoprotein synapsin I on actin polymerization. I. Evidence for a phosphorylation-dependent nucleating effect. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 7195-7198 (1992).

Valtorta, F., Fesce, R., Grohovaz, F., Haimann, C., Hurlbut, W.P., Lezzi, N., Torri-Tarelli, F., Villa, A. y Ceccarelli, B. Neurotransmitter release and synaptic vesicle recycling. *Neuroscience* **35**, 477-489 (1990).

Verdugo, P. Mucin exocytosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **144**, S33-S37 (1991).

Verhage, M., McMahon, H.T., Ghijsen, W. E., Boosman, F., Scholten, G., Wiegant, V.M. y Nicholls, D.G. Differential release of amino acids, neuropeptides, and catecholamines from isolated nerve terminals. *Neuron* **6**, 517-524 (1991).

Villalon, M., Verdugo, P. y Fernandez, J.M. A molecular mechanism for selective packaging and release of secretory products. *Biophysical Journal* **57**, 495a (abstract) (1990).

Vitale, M.L., Seward, E.P. y Trifaró, J.M. Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron* **14**, 353-363 (1995).

von Gersdorff, H. y Matthews, G. Inhibition of endocytosis by elevated internal calcium in a synaptic terminal. *Nature* **370**, 652-655 (1994a).

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

Walch-Solimena, C., Blasi, J., Edelman, L., Chapman, E.R., Fisher von Mollard, W. y Jahn, R. The t-SNAREs syntaxin 1 and SNAP-25 are present on organelles that participate in synaptic vesicle recycling. *Journal of Cell Biology* **128**, 637-645 (1995).

Whiteheart, S.W., Griff, I.C., Brunner, M., Clary, D.O., Mayer, T., Buhrow, S.A. y Rothman, J.E. SNAP family of NSF attachment proteins includes a brain-specific isoform. *Nature* **362**, 353-355 (1993).

Wightman, R.M., Jankowski, J.A., Kennedy, R.T., Kawagoe, K.T., Schroeder, T.J., Leszczyszyn, D.J., Near, J.A., Diliberto, E.J. y Viveros, O.H. Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **88**, 10754-10758 (1991).

Wightman, R.M., Schroeder, T.J., Finnegan, J.M., Ciolkowski, E.L. y Pihel, K. Time course of release of catecholamines from individual vesicles during exocytosis at adrenal medullary cells. *Biophysical Journal* **68**, 383-390 (1995).

Zhou, Z. y Mislser, S. Action potential-induced quantal secretion of catecholamines from rat adrenal chromaffin cells. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 3498-3505 (1995).

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

Zimmerberg, J., Curran, M. y Cohen, F.S. A lipid/protein complex hypothesis for exocytotic fusion pore formation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **635**, 307-317 (1991).

Zimmerberg, J., Curran, M., Cohen, F.S. y Brodwick, M. Simultaneous electrical and optical measurements show that membrane fusion precedes secretory granule swelling during exocytosis of beige mouse mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **84**, 1585-1589 (1987).



EVA MA ALES GONZALEZ DE LA HIGUERA  
 Desarrollo y aplicación de la técnica de cooperación  
 en parques al estudio de la actividad de estos árboles  
 artificiales y ornamentales

APTO "CUM LAUDE"

15

decentro

98

*[Signature]*

Luis Talar

M. García

*[Signature]*

A. Carralero

*[Signature]*

600672940



UNIVERSIDAD DE SEVILLA