



Universidad
de La Laguna

Escuela de Doctorado
y Estudios de Posgrado

TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL

Regulación de la liberación cuántica de neurotransmisores en la célula cromafín

AUTOR/A

Ayoze

González

Santana

DIRECTOR/A

José David

Machado

Ponce

CODIRECTOR/A

Ricardo

Borges

Jurado

DEPARTAMENTO O INSTITUTO UNIVERSITARIO

FECHA DE LECTURA

14/06/19



**Universidad
de La Laguna**

Departamento de Medicina Física y Farmacología
Facultad de Ciencias de la Salud
Sección de Medicina

**“Regulación de la liberación cuántica de neurotransmisores en la
célula cromafín”**

Memoria de Tesis para aspirar al Grado de Doctor por la
Universidad de La Laguna presentada por

Ayoze González Santana

Directores:

José David Machado Ponce

Ricardo Borges Jurado

La Laguna, a 23 de abril de 2019



Universidad de La Laguna

D. José David Machado Ponce, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Medicina Física y Farmacología de la Universidad de La Laguna, y D. Ricardo Borges Jurado, Catedrático del Departamento de Medicina Física y Farmacología de la Universidad de La Laguna,

CERTIFICAN:

Que D. Ayoze González Santana ha realizado, bajo nuestra tutela, el trabajo titulado: “**Regulación de la liberación cuántica de neurotransmisores en la célula cromafín**” que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de La Laguna.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en La Laguna a 23 de abril de 2019.

Dr. José David Machado Ponce

Profesor Contratado Doctor

Dr. Ricardo Borges Jurado

Catedrático de Farmacología

Agradecimientos

Quiero comenzar este apartado dando las gracias a mis directores de Tesis, el Dr. José David Machado y el Dr. Ricardo Borges. En primer lugar, gracias por haberme dado la oportunidad de desarrollar mi Tesis Doctoral bajo su tutela. Aún recuerdo el día en el que me entrevisté con David para optar a una beca de investigación en su laboratorio. A pesar de haberlo conocido durante algunas clases del Máster, me invadían los nervios al reunirme con él cara a cara. Ese fue el inicio de casi 6 años de convivencia en el laboratorio donde me ha orientado y enseñado tanto en el ámbito científico como personal y por lo que le estaré eternamente agradecido. Gracias Ricardo por embriagarme de una pasión por la ciencia envidiable, por esas enormes ganas de transmitirme tus conocimientos con la alegría que tanto te caracteriza. Gracias también a los dos por los cursos, congresos y estancias que no sólo me han permitido viajar, cosa que hasta el comienzo de mi tesis nunca había hecho, sino donde he podido aprender muchísimo y conocer gente maravillosa.

En segundo lugar, quiero agradecer a Mariano Hernández y Teresa Acosta por ser las personas que me iniciaron en la investigación y con una enorme pasión por la ciencia, me engancharon a ella. Nunca me olvidaré de los buenos momentos que pasé en el laboratorio de Genética, aprender donde se respira un aire de alegría, compañerismo y sabiduría fue todo un placer. Mariano es sin duda el mejor profesor de mi carrera y tuve el privilegio de formar parte de su grupo de investigación. Nunca lo olvidaré cantando desde su despacho del laboratorio, bromeando en los pasillos y compartiendo horas de análisis de SNPs para determinar especies de vides canarias con potencial enológico. Gracias por compartir tantos momentos de poyata donde aprender a extraer DNA de vides y montar reacciones de PCR llegó a ser apasionante y muy divertido. Muchas gracias a Titi por estar siempre dispuesta a enseñar y ayudar, por ser una persona maravillosa y compartir muy buenos momentos dentro y fuera del laboratorio.

Gracias a la Dra. Elizabeth Seward, el Dr. Sebastian Barg y todas las personas de sus laboratorios que me acogieron durante algunos meses, me enseñaron *patch-clamp* y me ayudaron a madurar en el ámbito científico.

Gracias a Natalia, Marta y Judith por ser las personas del laboratorio de Farmacología que me enseñaron la mayoría de las técnicas que conozco actualmente. Quiero agradecer especialmente a Judith, que es la persona con la que más tiempo he compartido en el laboratorio. Ha sido sin duda una gran profesora y también una gran amiga. Multitud de experimentos, cientos de discusiones científicas y millones de risas juntos. No hay palabras, ni suficientes páginas en esta Tesis que puedan describir lo importante que has sido para mí estos años y lo realmente agradecido que te estoy.

Gracias a mi alma gemela Sara por ser compañera de Facultad y de laboratorio y como no, una gran amiga. Gracias también a Rebe, Pablo y Romina por ser los mejores compañeros que cualquier persona podría tener y, sobre todo, grandísimos amigos. Ustedes saben lo mucho que los quiero.

Gracias a Ana que, aunque hayamos compartido pocas horas de poyata juntos, me has ayudado en los últimos momentos duros de la Tesis y sobre todo me has regalado muchos buenos momentos. Gracias a todos mis compañeros de Farmacología, los que siguen en el laboratorio y los que pasaron por él, Dani, Javi, Silvia, Lea, Laura, Chus, Estefi, Maite y Sole con los que he pasado tan buenos momentos en el contuberniábulo, en cafetería y fuera del laboratorio también.

Gracias a Lisbel, por confiar en mí, por el apoyo y por las charlas hasta largas horas de la madrugada que tanto nos gustan. También quiero agradecer a Desi y su familia que han estado durante estos años para todo lo que he necesitado. A Natalia, Estefi, Lidia y Alex, por los buenos momentos juntos.

A Yurena por aguantarme desde que recuerdo. Gracias por tu amistad, confianza y apoyo.

Por su puesto, agradecer a mi familia, sobre todo mi madre, mi padre, mi madrina y mi querido hermano, que han estado siempre apoyándome, cuidándome y demostrándome que me quieren. A mis sobrinas Ainhoa y Aroa que, aunque no las vea mucho, me alegra que formen parte de mi vida.

Gracias a Julio por estar a mi lado durante todos estos años, por el cariño, apoyo e infinita paciencia.

Este trabajo ha sido financiado a través del proyecto BFU2013-45253/FPI del Ministerio de Economía y Competitividad.

El autor de este trabajo, Ayoze González Santana, ha disfrutado de una beca de investigación BES-2014-068251 del programa FPI del Ministerio de Economía y Competitividad.

Publicaciones

1. **González-Santana, A.**, Marrero-Hernández, S., Dorta, I., Hernández, M., Pinto, F.M., Báez, D., Bello, A.R., Candenás, L., & Almeida, T.A. (2016). Altered expression of the tachykinins substance P/neurokinin A/hemokinin-1 and their preferred neurokinin 1/neurokinin 2 receptors in uterine leiomyomata. *Fertility and sterility*, *106*(6), 1521-1529. IF=4,803; Q1 (Obstetrics & Gynecology).
2. Estévez-Herrera, J., Domínguez, N., Pardo, M.R., **González-Santana, A.**, Westhead, E.W., Borges, R., & Machado, J.D. (2016). ATP: The crucial component of secretory vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(28), E4098-4106. IF=9,504; Q1 (Multidisciplinary sciences).
3. Estévez-Herrera, J., **González-Santana, A.**, Baz-Dávila, R., Machado, J.D., & Borges, R. (2016). The intravesicular cocktail and its role in the regulation of exocytosis. *Journal of Neurochemistry*, *137*(6), 897-903. IF=4,609; Q1 (Biochemistry & Molecular biology).

Manuscritos en preparación:

4. **González-Santana, A.**, Estévez-Herrera, J., Seward, E., Borges, R., & Machado, J.D. GLP-1R is expressed in chromaffin cells and modulates the quantal release.
5. **González-Santana, A.**, Castañeyra, L., Baz-Dávila, R., Estévez-Herrera, J., Domínguez, N., Méndez, I., Padín, L.F., Machado, J.D., Ebert, S.N., & Borges, R. Adrenal chromaffin cells from mice lacking adrenaline.

Índice

Índice

Abreviaturas	VII
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Concepto y evolución histórica de la neurotransmisión	5
1.2. La exocitosis y su estudio	8
1.3. La médula adrenal y las células cromafines	12
1.3.1. Las células cromafines como modelo para el estudio de la exocitosis.	14
1.3.2. Síntesis de las catecolaminas.	16
1.3.3. Tipos de células cromafines.	18
1.4. La vesícula cromafín	21
1.5. El ciclo de vida de una vesícula cromafín	23
1.5.1. Formación de los gránulos cromafines	23
1.5.2. Transporte de los gránulos hacia la membrana plasmática.	25
1.5.3. Exocitosis de los gránulos cromafines	27
1.5.4. Poro de fusión de los gránulos cromafines	30
1.5.5. Endocitosis y reciclado de las vesículas secretoras	31
1.6. Segundos mensajeros intracelulares	32
1.6.1. El calcio	32
1.6.1.1. Los canales Ca ²⁺	33
1.6.1.2. El calcio y su implicación en la exocitosis	36
1.6.2. El AMPc.	36
1.6.2.1. La PKA y su papel en la exocitosis regulada	38
1.6.2.2. El EPAC y la exocitosis	41

1.7. El GLP-1 y su receptor, el GLP-1R	43
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
3. MATERIAL Y MÉTODOS.	53
3.1. Reactivos y constructos de DNA.	53
3.2. Modelo animal.....	54
3.3. Genotipado de ratones	55
3.4. Aislamiento y cultivo de células.....	55
3.4.1. Cultivo primario de células cromafines bovinas.....	55
3.4.2. Cultivo primario de células cromafines murinas.....	56
3.4.3. Cultivo de la línea PC12.....	56
3.5. Transfección de células.....	57
3.6. PCR.....	57
3.6.1. Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA de cromafines bovinas.....	57
3.6.2. Diseño de los oligonucleótidos para la PCR	58
3.4.3. PCR.....	58
3.7. <i>Western-blot</i>	59
3.7.1. Preparación de las muestras	59
3.7.2. Separación de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE.....	59
3.7.3. Transferencia de las proteínas a membranas de PVDF	60
3.8. Inmunofluorescencia	61
3.9. Microscopía de onda evanescente o TIRFM.....	62
3.10. Determinación de la actividad de la luciferasa	63
3.11. Cromatografía líquida de alta presión con detección electroquímica (HPLC-ED).....	64
3.12. Estudio de secreción de CAs a tiempo real	66
3.13. Detección de proteínas mediante <i>Dot-blot</i>	67

3.14. Test de tolerancia a la insulina	68
3.15. Monitorización de las CAs contenidas en la adrenal tras la hipoglucemia inducida por insulina	68
3.16. Detección de CAs por medio de amperometría en célula única	68
3.16.1. Elaboración de los electrodos de carbono.....	68
3.16.1.1. Fabricación.	68
3.16.1.2. Calibración.....	69
3.16.2. Construcción de micropipetas para aplicar sustancias.	71
3.16.3. Detección amperométrica de la exocitosis.....	71
3.16.4. Análisis de datos amperométricos.	72
3.16.5. Parámetros cinéticos de las espigas amperométricas.....	72
3.16.6. Criterios de selección de espigas amperométricas.	73
3.17. Patch-clamp en configuración de célula completa	74
3.17.1. Fabricación de las pipetas de <i>patch-clamp</i>	74
3.17.2. Determinación de la capacidad celular por medio de <i>patch-clamp</i> ...	74
3.17.3. Análisis de los datos de capacidad	75
3.18. Análisis estadístico.	75
4. RESULTADOS	79
4.1. ESTUDIO DEL GLP-1R EN CÉLULAS CROMAFINES	79
4.1.1. El receptor de incretinas GLP-1R se expresa en las células cromafines.	79
4.1.2. La activación del receptor de GLP-1 con Ex-4 induce el incremento de la síntesis de las CAs y un aumento en la expresión de la enzima TH.....	81
4.1.3. La Ex-4 activa la expresión del gen de la TH en PC12.....	83
4.1.4. La amperometría en célula única revela un aumento en la cantidad de CAs liberadas por cada vesícula en las células tratadas con Ex-4.....	85

4.1.5. La sobreexpresión del receptor de GLP-1 intensifica el efecto de la Ex-4	89
4.1.6. El incremento en la secreción de CAs se debe a la activación de la ruta intracelular mediada por PKA y no por la vía EPAC	91
4.1.7. Medidas de la capacidad eléctrica de las membranas y las corrientes de Ca^{2+} no muestran diferencias entre células cromafines tratadas con Ex-4 y células controles	95
4.1.8. El aumento de CAs liberadas con el tratamiento con Ex-4 e IBMX se corresponde con un aumento en la liberación de CgA.....	97
4.1.9. El tratamiento con Ex-4 incrementa la liberación de CgA-EGFP de los gránulos cromafines	99
4.2. ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN Y EXOCITOSIS DE CATECOLAMINAS EN RATONES PNMT-KO, CARENTES DE ADRENALINA	101
4.2.1. Las glándulas adrenales de ratones PNMT-KO no contienen adrenalina y tienen un 50% más de noradrenalina	101
4.2.2. Regulación homeostática de la glucosa en ratones PNMT-KO	102
4.2.3. La liberación de CAs es menor en las células cromafines de los ratones PNMT-KO	105
5. DISCUSIÓN.	113
5.1. ESTUDIO DEL GLP-1R EN CÉLULAS CROMAFINES	113
5.1.1. ¿El receptor de GLP-1 se expresa en células cromafines?.....	113
5.1.2. ¿Qué vía de segundos mensajeros se pone en marcha tras la activación del GLP-1R en las células cromafines?	116
5.1.3. La activación de los receptores de incretinas modifica el tamaño cuántico de la liberación de catecolaminas.....	119

5.1.4. ¿Qué consecuencias funcionales puede tener el GLP-1R en células cromafines?	124
5.2. ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN Y EXOCITOSIS DE CATECOLAMINAS EN RATONES PNMT-KO, CARENTES DE ADRENALINA	126
5.2.1. ¿Son los ratones PNMT-KO un buen modelo de estudio de las diferencias entre células adrenérgicas y noradrenérgicas?.....	126
5.2.2. ¿Las células adrenérgicas lo son porque acumulan adrenalina o es un tipo celular distinto al de una célula noradrenérgica a pesar de la CA que acumula?	127
6. CONCLUSIONES.....	133
7. ANEXOS.....	135
ANEXO I. Soluciones de trabajo empleadas.....	137
ANEXO II. Listado de anticuerpos utilizados, aplicación y dilución de uso	139
ANEXO III. Extracción de DNA y PCR para el genotipado de ratones	140
I. Extracción de DNA genómico.....	140
II. Amplificación por PCR	141
ANEXO IV. Cultivo primario de células cromafines bovinas.....	143
ANEXO V. Cultivo primario de células cromafines murinas	147
ANEXO VI. Amplificador "Lock-in"	148
8. BIBLIOGRAFÍA.....	155

Abreviaturas

A	Adrenalina
AC	Adenilato ciclasa
ACh	Acetilcolina
ADP	Adenosín difosfato
AMP	Adenosín monofosfato
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
APS	Persulfato de amonio
ATP	Adenosín trifosfato
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
BSA	Bovine serum albumin / Suero de albúmina bovina
CA	Catecolamina
CCDV	Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje
CgA	Cromogranina A
CgB	Cromogranina B
CRE	Cyclic AMP-responsive element / Elemento de respuesta al AMPC
CREB	Cyclic AMP-responsive element binding proteins / proteínas de unión a los elementos de respuesta al AMPC
CRHR1	Receptor-1 de hormona liberadora de corticotropina
DA	Dopamina
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DHBA	3,4-dihidroxibencilamina
DMPP	Dimetil fenil piperazinio
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DβH	Dopamina-β-hidroxilasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFP	Enhanced Green Fluorescence Protein / Proteína fluorescente verde mejorada
EPAC	Exchange protein activated directly by cyclic AMP / Proteína de intercambio directamente activada por cAMP
EPP	End plate potential / Potencial de placa terminal
Ex-4	Exendina-4
FBS	Foetal Bovine Serum / Suero fetal bovino
Fig	Figura
GABA	Ácido gamma aminobutírico
GAPDH	Gliceraldehído 3 Fosfato Deshidrogenasa
GEF	Guanine exchange factor / factor de intercambio de guanina
GIP	Polipéptido inhibidor gástrico

GLP-1	Glucagon-like peptide-1 / Péptido-1 similar al glucagón
GLP-1R	Glucagon-like peptide-1 receptor
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GPCR	G protein-coupled receptor / Receptor acoplado a proteína G
GTP	Guanosín trifosfato
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxyetil)-1-piperazinetanosulfónico
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography / Cromatografía líquida de alta presión
HPLC-ED	HPLC acoplado a detección electroquímica
HPRT	Hipoxantina fosforibosil transferasa
HS	Horse serum/Suero de caballo
IBMX	3-isobutil-1-metil-xantina
I_{max}	Amplitud máxima de corriente
IP_3	Inositol 1,4,5-trifosfato
IRP	Immediately Releasable Pool / Grupo de vesículas que se liberan de forma inmediata
KO	Knock-out
LAAD	L-aminoácido-aromático-descarboxilasa
LDCV	Large Dense Core Vesicles / Vesículas grandes de núcleo denso
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
LVA	Bajo umbral de activación
NA	Noradrenalina
NO	Óxido nítrico
NSF	N-ethylmaleimide Sensitive Factor
NTP	Nucleótidos trifosfatos
PA	Potencial de acción
PACAP	Péptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria
PC12	Línea celular de feocromocitoma de rata
PCA	Ácido perclórico
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PDE	Fosfodiesterasa
PIP2	Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
PKA	Proteína quinasa-A
PKC	Proteína quinasa-C
PLC	Fosfolipasa C
PNMT	Feniletanolamina-N-metil-transferasa
PNMT-KO	PNMT-knock out
PVDF	Polivinilideno difluoruro
Q	Carga ó contenido cuántico en catecolaminas
qPCR	PCR cuantitativa

RT-PCR	PCR con transcriptasa reversa
RNA	Ribonucleic acid / Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
RRP	Readily Releasable Pool / Grupo de vesículas preparadas para ser liberadas
RVLM	Médula rostroventrolateral
SEM	Media del error estándar
siRNA	Small Interference RNA / RNA de interferencia
SDS	Dodecilsulfato sódico
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SgII	Secretogranina II
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Protein Receptor
SRP	Slowly Releasable Pool / Grupo de liberación lenta
SPN	Sympathetic preganglionic neurons / Neuronas preganglionares simpáticas
STD	Mezcla de estándares de HPLC
SV	Vesícula secretora
$t_{1/2}$	Ancho de una espiga amperométrica a la mitad de la amplitud máxima
t_p	Tiempo en alcanzar la amplitud máxima de una espiga amperométrica
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TH	Tirosina hidroxilasa
TIRFM	Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
VAMP	Vesicle-associated membrane protein / Proteína asociada a la membrana vesicular
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
VMAT	Transportador de monoaminas vesicular
VNUT	Transportador de nucleótidos vesicular
WT	Wild type / Cepa control
2-DG	2-Deoxiglucosa
5-HT	5-Hidoxitriptamina / Serotonina
8-pCPT	8-(4-chlorophenylthio)-2'-O-methyladenosine-3',5'-cyclic monophosphate

Resumen/Abstract

RESUMEN.

La exocitosis, un proceso esencial para la vida, es el principal mecanismo de comunicación celular y está presente en todas las células de forma constitutiva. La exocitosis regulada dependiente de Ca^{2+} consiste en la fusión de una vesícula secretora con la membrana plasmática, de tal manera que las sustancias almacenadas en su interior se liberan al medio extracelular. De la regulación de este proceso, tanto en el número de vesículas secretadas como en la cantidad y la manera en la que cada vesícula libere su contenido, depende la comunicación neuronal y la capacidad secretora de diversas células neuroendocrinas del organismo. En esta Tesis hemos realizado un estudio de los factores biológicos que afectan a la regulación del tamaño cuántico y a la cinética de la exocitosis en células cromafines adrenomedulares.

Por un lado, hemos ahondado en algunas de las vías de señalización que controlan la exocitosis, específicamente la vía del adenosín monofosfato cíclico (AMPC), que se activa tras la estimulación del receptor de incretinas *glucagon-like peptide-1* (GLP-1R). La activación del GLP-1R da lugar a un incremento de AMPC que actúa, a través de proteína quinasa A (PKA), modulando el último paso de la exocitosis de catecolaminas (CAs) en las células cromafines. De esta forma, se promueve la liberación de mayor cantidad de neurotransmisores por vesícula.

Por otro lado, hemos realizado una caracterización de la exocitosis en células cromafines carentes de adrenalina por medio del uso de ratones knock-out para la enzima feniletanolamina-N-metil-transferasa (PNMT). Comprobamos que existe una fuerte especialización entre el fenotipo de célula cromafín y la CA que acumula. Así, células adrenérgicas conteniendo noradrenalina no son capaces de retener esa amina con la misma afinidad con la que retienen la CA que le es propia, la adrenalina, lo cual conlleva a una disminución del contenido de CAs totales.

ABSTRACT

Exocytosis is an essential process for life, being the main mechanism for cellular communication and it is present in all cells in a constitutive way. Conversely, regulated exocytosis is a Ca^{2+} -dependent process which entails the fusion of a secretory vesicle with the plasma membrane, thus allowing the release of stored substances to the extracellular medium. The success of neuronal communication and the secretory capacity of neuroendocrine cells depends on the regulation of this process, both the number of secreted vesicles as the amount of vesicle content released. In this Doctoral Thesis, we have studied the biological factors that affect the regulation of the quantum size and the kinetics of exocytosis in adrenomedullary chromaffin cells.

On one hand, we wanted to delve into some of the signaling pathways that control exocytosis, specifically the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) pathway activated after stimulation of the glucagon-like peptide-1 incretin receptor (GLP-1R). The activation of GLP-1R induces an increase in cAMP acting through protein kinase A (PKA), modulating the last step of exocytosis of catecholamines (CAs) in chromaffin cells. This process promotes the increase in the release of neurotransmitters per vesicle.

On the other hand, we have made a characterization of exocytosis distinguishing between adrenergic and noradrenergic cells present in the adrenal medulla. Through the use of knockout phenylethanolamine-N-methyltransferase mice (PNMT-KO), we found that there is a strong specialization between the chromaffin cell phenotype and the CA that accumulate. Thus, adrenergic cells containing noradrenaline are not able to retain that amine with the same affinity as retain adrenaline, which leads to a decrease in the content of total CAs.

Introducción

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Concepto y evolución histórica de la neurotransmisión.

La neurotransmisión química es un concepto inicialmente desarrollado para explicar las observaciones relacionadas con la propagación del impulso nervioso. Hasta finales del siglo XIX, se pensaba que existía una continuidad física entre los nervios, a través de los cuales se producía dicha transmisión. Fue Santiago Ramón y Cajal el que demostró que el sistema nervioso estaba constituido por un aglomerado de unidades independientes y definidas, lo que pasó a conocerse como “doctrina de la neurona” y, además, propuso que las neuronas se comunican entre sí en zonas concretas, posteriormente denominado sinapsis por Sherrington (Foster, 1897). También desarrolló el principio de la polarización dinámica según el cual el impulso nervioso se transmitía de forma unidireccional. Ramón y Cajal recibió el Premio Nobel de Medicina en 1906, junto con Camilo Golgi, por la estructura del sistema nervioso.

Los impulsos nerviosos dan lugar a la liberación de moléculas provenientes de las neuronas y ejercen una respuesta en otras células del organismo, ya sean células del músculo liso, del músculo esquelético, de las glándulas exocrinas u otras neuronas. A esas moléculas que transmiten la información neuronal se les llamó neurotransmisores. Pero, ¿cómo se llegó al descubrimiento de los neurotransmisores?

En 1791, Luigi Galvani describió uno de sus experimentos que consistía en aplicar pequeñas corrientes eléctricas a la médula espinal de ranas después de haber sido sacrificadas, consiguiendo que se produjeran contracciones musculares en sus miembros. Estas observaciones le permitieron a Galvani concluir que las corrientes eléctricas eran las responsables del movimiento de los músculos.

En 1856, Claude Bernard describió el lugar de actuación de los curares en la unión neuromuscular: “el lugar donde el nervio y el músculo se encuentran”. Los venenos vegetales que constituyen el curare bloquean la transmisión de los impulsos eléctricos desde los nervios hacia los músculos. Varios años después, entre 1898 y 1901, Max Lewandowsky y John Langley, observaron, de forma

independiente, que los efectos producidos por la inyección de extractos de glándulas suprarrenales en fibras musculares y los de la estimulación eléctrica de nervios simpáticos eran similares. Estos efectos incluían, entre otras respuestas, la dilatación de las pupilas, incremento de la presión sanguínea, inhibición de la acción del esfínter del estómago e intestino y contracción del útero. En 1905, un discípulo de Langley, Thomas Elliot, probó a estimular con adrenalina fibras musculares denervadas y comprobó que se producía su contracción, por lo que debía ser esta hormona la que se libera tras la estimulación de las fibras simpáticas que inervan los músculos (Elliot, 1904). La teoría propuesta por Elliot fue ignorada durante mucho tiempo, ya que parecía mas probable que la adrenalina estuviera imitando algunos de los efectos que se producen por la estimulación eléctrica, que pensar que la transmisión sináptica se producía mediante la liberación de sustancias químicas.

Otto Loewi realizó, en 1921, un experimento clave en el avance del conocimiento de la neurotransmisión: conectó dos corazones de rana, ambos con contracción cardiaca, y a continuación, estimuló el nervio vago de uno de ellos. El líquido con el que había perfundido el primer corazón lo hizo circular por el segundo corazón no estimulado, produciéndose una disminución de la frecuencia cardiaca de este último (fig. 1.1). Dedujo que el corazón estimulado había liberado alguna sustancia, por la estimulación del nervio vago, a la que denominó “vagusstoff”, es decir, sustancia enlentecedora del corazón de origen vagal. Varios años más tarde se demostró que se trataba de la acetilcolina (ACh) (Para una revisión histórica más detallada ver Brailowsky, 1995).

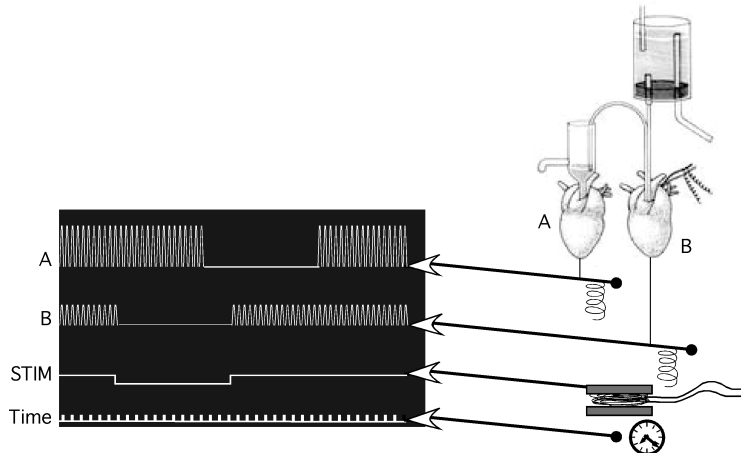


Figura 1.1. Esquema del experimento realizado por Otto Loewi. Conectó dos corazones de rana por medio de un sistema de perfusión, de tal manera que el líquido procedente del corazón B lo hacía circular por el corazón A. Tras la estimulación del nervio vago del corazón B, observó que no solo disminuía la contracción cardiaca del corazón estimulado, sino que al cabo de un tiempo también disminuía la contracción del corazón A, el cual no había sido estimulado. Para una explicación detallada del experimento ver el texto.

En la década de los años 30, varios trabajos pusieron de manifiesto la actuación de la ACh como neurotransmisor. En 1934, Wilhelm Feldberg publicó que la ACh es el transmisor que se libera del nervio espláncico a la médula suprarrenal (Feldberg et al., 1934). Años después, Henry Dale también demostró el papel de dicho neurotransmisor en la unión neuromuscular (Dale et al., 1936).

Hodkin y Huxley dieron a conocer, en 1952, un modelo para explicar los mecanismos iónicos que tienen lugar en la iniciación y propagación de los potenciales de acción del axón gigante del calamar. Demostraron que la fibra nerviosa utiliza la energía derivada del transporte de iones sodio y potasio a través de las membranas para generar los impulsos eléctricos (Hodgkin and Huxley, 1952).

Muchas de las evidencias que llevaron a comprender los mecanismos de liberación de los neurotransmisores se deben a los experimentos llevados a cabo por Bernard Katz y colaboradores durante las décadas de 1950 y 1960, examinando la liberación del neurotransmisor ACh en las uniones neuromusculares. Mediante el uso de microelectrodos, colocados en fibras musculares, pudieron registrar cambios en su potencial de membrana después de estimular eléctricamente la

neurona presináptica. Se generaba un potencial de acción que podía ser registrado al causar una despolarización transitoria de la fibra muscular postsináptica y, como consecuencia, la contracción de la dicha fibra muscular. Ese cambio en el potencial de membrana lo denominaron potencial de placa terminal (EPP). Más tarde, se dieron cuenta de que en ausencia de estimulación eléctrica del terminal presináptico también ocurría la despolarización espontánea de las células musculares (Fatt and Katz, 1952). Esto les permitió demostrar que el EPP se origina por la liberación de ACh desde el terminal axonal en paquetes discretos, que definieron como cuantos. Un potencial de acción presináptico causa un EPP postsináptico debido a la sincronización de la liberación de cientos de cuantos de ACh desde la neurona.

El desarrollo de la microscopía electrónica durante la década de los años 1950 permitió la visualización de estructuras membranosas en los terminales sinápticos que se definieron como vesículas sinápticas (SVs) (De Robertis and Bennett, 1954). Es en esas estructuras donde se almacenan los neurotransmisores.

Gracias a todos estos trabajos se estableció la teoría de la neurotransmisión química, surge el concepto de secreción cuántica y se llega a la identificación de las SVs.

1.2. La exocitosis y su estudio.

La exocitosis es el proceso por el cual una vesícula presente en el interior de la célula libera su contenido al espacio extracelular por medio de su fusión con la membrana plasmática.

En 1961, Douglas y Rubin demostraron que el ión Ca^{2+} es clave en el proceso de exocitosis de catecolaminas (CAs). Usando glándulas de gato perfundidas con soluciones salinas sin Ca^{2+} y con concentraciones crecientes del mismo, observaron que sólo si el Ca^{2+} estaba presente ocurría liberación de los transmisores. Además, cuanto mayor era la concentración de dicho catión (siendo 17,6 mM la concentración máxima estudiada), mayor era la secreción. Sugirieron que la ACh, como neurotransmisor en la médula adrenal, causa algún cambio en las células medulares que permite a los iones Ca^{2+} entrar en ellas y disparar la liberación de

CAs (Douglas and Rubin, 1961). En 1952, Sandow ya había propuesto que el Ca^{2+} era necesario para la contracción muscular llamando a este proceso “acoplamiento excitación-contracción”. Debido a la similitud con este proceso, Douglas y Rubin acuñaron la expresión “acoplamiento estímulo-secreción” por el cuál se produce la secreción de neurotransmisores y hormonas, siendo el Ca^{2+} el que conecta el estímulo o excitación y la respuesta secretora.

En 1965, Banks y Helle descubrieron la presencia de proteínas en el líquido con el que habían perfundido glándulas suprarrenales estimuladas con ACh. Estas proteínas, luego identificadas como cromograninas, debían ser liberadas junto a las CAs por medio de exocitosis (Banks and Helle, 1965).

Se han descrito dos tipos de exocitosis principales en las células eucariotas: la constitutiva y la regulada. La constitutiva ocurre en todos los tipos celulares, no depende de Ca^{2+} y es la que tiene lugar para secretar componentes del plasma y de la matriz extracelular, enzimas lisosomales y componentes que formarán parte de la membrana plasmática (Burgess and Kelly, 1987). La exocitosis regulada es, en cambio, dependiente de Ca^{2+} y es la encargada de liberar de forma controlada el contenido de las vesículas secretoras actuando en respuesta a una señal fisiológica.

Experimentos realizados por Heuser y Reese en 1973 usando peroxidasa del rábano picante, en preparaciones de nervios aislados de ranas, demostraron que ésta podía ser absorbida por el reciclado de las SVs, descubriendo así que la liberación cuántica se basa en ciclos de exocitosis-endocitosis de compartimentos membranosos (Heuser and Reese, 1973).

Huttner y colaboradores, en 1983, fueron capaces de aislar SVs a partir de corteza cerebral de rata empleando fraccionamiento celular. Su objetivo era detectar la proteína sinapsina I, la cual es una proteína específica de neurona que actúa como sustrato para proteínas quinasas y la cual se sabía que estaba implicada en la función sináptica. Demostraron que la fosforilación del dominio de unión de esta proteína a las SVs permite la disociación de ambas, y plantearon que dicho proceso podría ser importante en la regulación de la liberación de las SVs (Huttner et al., 1983). No obstante, el método desarrollado para aislar dichas vesículas permitió además cuantificar el contenido de neurotransmisores en las mismas,

observándose unos niveles muy superiores a los que se encuentran en el citosol. En el caso de las células cromafines, el aislamiento de sus gránulos permitió determinar su composición y que la cantidad de CAs contenidas en ellas es muy alta, alcanzando una osmolaridad teórica de 1,5-2 osmoles. Dicha concentración de CAs dentro de los gránulos cromafines sólo se puede justificar si existe una interacción de las mismas con otros constituyentes de los gránulos que reduzca la salida de esas aminas (Winkler and Westhead, 1980; Helle et al., 1985).

En el año 1993, el trabajo de Söllner y colaboradores, del grupo de James E. Rothman, marcó un hito importante en el conocimiento de los factores que gobiernan la exocitosis. Por medio de la purificación de receptores SNAP (*Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment Protein*) de una fracción de cerebro bovino, identificaron la relación existente entre varias proteínas que ya habían sido descritas estar implicadas en el proceso de la exocitosis. A estas proteínas se denominaron SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptors*). La unión de esas proteínas presentes en las membranas de las vesículas secretoras y plasmática desencadena la aproximación de ambas membranas y su fusión, permitiendo así la liberación del contenido vesicular (Söllner et al., 1993).

El desarrollo de las técnicas electrofisiológicas permitió avanzar en el conocimiento de la exocitosis. El *patch-clamp* es una técnica desarrollada por Ervin Neher y Bert Sakmann en 1976, que permite medir las corrientes iónicas de membrana con gran sensibilidad. Haciendo uso de una pipeta de vidrio con un diámetro de punta de 3-5 μm , fueron capaces de establecer un sello con la membrana plasmática. Este sello se produce al acercar la pipeta a la superficie celular y aplicar presión negativa cuando entran en contacto. De esta forma, una parte de la membrana celular se invagina al interior de la pipeta, formando lo que se conoce como “estructura en Ω ”. Esta configuración se denomina “célula unida” (*cell-attached*) y permite el estudio del paso de corriente a través del fragmento de membrana presente en el interior de la pipeta (Neher and Sakmann, 1976). Además, es la configuración de partida para el resto de las configuraciones en *patch-clamp*. Una vez obtenido el sello, se puede aplicar más presión negativa, o aplicar un pulso de voltaje, para romper el fragmento de membrana del interior de la pipeta, sin perder el sello, quedando conectado el interior de la pipeta con el citoplasma. De esta forma se obtiene la configuración de “célula completa” (*whole-*

cell), la cual puede ser usada para estudiar las propiedades eléctricas de las células completas o incluso medir la capacidad de las membranas, que es una medida directa del área de su superficie (Neher and Marty, 1982).

En 1990, Wightman y colaboradores mostraron que podían registrar eventos exocitóticos individuales de neurotransmisores, fácilmente oxidables y ocurriendo en la escala temporal de milisegundos, mediante el uso de microelectrodos amperométricos (Leszczyszyn et al., 1990; 1991; Whightman et al., 1991). De esta forma, se consiguió llevar a cabo mediciones directas y a tiempo real de la liberación química de neurotransmisores, siendo capaces incluso de diferenciar la exocitosis de aminas procedentes de vesículas individuales.

Más tarde, la combinación de medidas de capacidad por medio de técnicas de *patch-clamp* y medidas de corriente amperométricas, demostraron por primera vez liberación de neurotransmisores desde vesículas secretoras que no realizan fusión completa con la membrana plasmática (Álvarez de Toledo et al., 1993). También se logró realizar mediciones amperométricas en regiones discretas de membrana, aisladas por una pipeta de *patch-clamp* que a su vez llevaba inserto un electrodo de fibra de carbono, registrando simultáneamente en el mismo evento exocitótico: la fusión de la vesícula y la liberación de los neurotransmisores (Albillos et al., 1997). Esa técnica es conocida como *patch-amperometry*. La voltametría cíclica es otra técnica electrofisiológica que permitió la identificación de los neurotransmisores por su comportamiento a la óxido-reducción, al aplicar rampas de voltaje con microelectrodos colocados sobre las células. La voltametría cíclica también permite medir la concentración de las moléculas secretadas (Pihel et al., 1996).

La aplicación de las técnicas comentadas anteriormente junto con el desarrollo de técnicas moleculares ha permitido establecer las bases del proceso de la exocitosis. En una revisión publicada en el 2011 por Südhof y Rizo y otra publicada en el 2012 por Jahn y Fasshauer, se propone una hipótesis que recoge los mecanismos moleculares llevados a cabo por las proteínas clave en la exocitosis. Multitud de estudios estructurales y funcionales habían aportado información acerca del papel fisiológico de las proteínas SNARE, sinaptotagminas, complexinas, Munc18 y Munc13, sin embargo, hasta ese entonces, había sido difícil unificar en

una imagen la secuencia molecular de eventos desde el atraque o *docking* vesicular, es decir, cuando una vesícula se pone en contacto con la membrana plasmática, hasta que se produce su fusión con la misma (Südhof and Rizo, 2011; Jahn and Fasshauer, 2012).

En los últimos años se han realizado estudios que pretenden caracterizar pasos intermedios en la ruta de fusión vesicular, mediada por las proteínas SNARE. Se ha demostrado que el *docking* se mantiene incluso después de que las proteínas SNARE se han desensamblado, lo cual indica que se trata de un estado que requiere mínima energía y que, probablemente, es estabilizado por medio de atracciones electrostáticas entre las membranas lipídicas. Se trata de un estado irreversible, es decir, una vez alcanzado solo puede culminar con la fusión de las vesículas, representando así una etapa previa a la exocitosis (Yavuz et al., 2018).

El conocimiento que existe actualmente acerca de la exocitosis es muy amplio y prueba de ello es la gran cantidad de trabajos científicos publicados al respecto. Sin embargo, se trata de un proceso extremadamente complejo por lo que mientras surjan nuevas ideas y se desarrollen nuevas técnicas podremos seguir profundizando en su comprensión.

1.3. La médula adrenal y las células cromafines.

Las glándulas adrenales (o suprarrenales) son dos estructuras endocrinas situadas retroperitonealmente, sobre el polo superior de ambos riñones. Están constituidas por una médula y una corteza que la envuelve. Ambas zonas pueden considerarse como dos órganos independientes con grandes diferencias tanto a nivel histológico, funcional y de origen embriológico, pero que co-existen espacialmente. En la médula adrenal se encuentran las células cromafines formando acinos en torno a capilares sanguíneos (Díaz-Flores et al., 2008). Estas células producen y secretan CAs, esencialmente adrenalina (A), noradrenalina (NA) y, en menor proporción, dopamina (DA) en respuesta a una situación de estrés agudo o miedo, durante el ejercicio físico violento o durante una amenaza. Las CAs deben su nombre al grupo catecol (3,4-dihidroxifenilo) y al grupo amina, común en todas ellas. La acción de estas moléculas sobre receptores específicos produce efectos tales como el aumento del ritmo cardíaco, vasoconstricción,

broncodilatación y/o cambios metabólicos que están conducidos a suplir las demandas de oxígeno o la correcta irrigación de los tejidos corporales, permitiendo así reaccionar al cuerpo ante una situación de *lucha o huida* (Cannon, 1915).

Por otro lado, la corteza adrenal es la encargada de la síntesis de esteroides que, secretados al torrente sanguíneo, cumplen diversos efectos endocrinos. Las células que la conforman se distribuyen en tres zonas, denominadas, desde el exterior hacia el interior, zona glomerular que secreta mineralocorticoides, la zona fascicular que es la principal productora de glucocorticoides y zona reticular que produce glucocorticoides y andrógenos. Además, cumplen una función paracrina sobre la médula adrenal estimulando la secreción de CAs por parte de las células cromafines y evitando la diferenciación morfológica de estas células (Bornstein et al., 1997).

La médula adrenal es considerada como un ganglio simpático modificado y las células cromafines que la componen, neuronas modificadas que no poseen axones y liberan “neurohormonas” directamente a la sangre (Díaz-Flores et al., 2008). Esto se debe a que tanto las células cromafines como el sistema nervioso simpático provienen del neuroectodermo, compartiendo así un origen embriológico común. Algunos de los progenitores neuronales provenientes de la cresta neural originan el sistema simpático, mientras que otros migran e invaden la corteza suprarrenal dando lugar a la médula. A continuación, la acción de diversos factores de crecimiento hace que las células se diferencien formando un tejido endocrino que sintetiza CAs.

Las fibras nerviosas simpáticas que inervan las células cromafines, al igual que las fibras que inervan los ganglios simpáticos, liberan ACh, sustancia P y polipéptido activador del adenilato ciclasa pituitaria (PACAP). En el caso de la ACh, ésta se unirá con alta afinidad a los receptores colinérgicos presentes en la superficie de dichas células. Estos receptores son principalmente de dos tipos: nicotínicos y muscarínicos. Los primeros son receptores ionotrópicos y son los que mayoritariamente estimulan la secreción en las células cromafines. Son canales iónicos que, cuando se activan por ACh, permiten el paso de cationes, principalmente Na^+ , originando una despolarización en la membrana que lleva al disparo de potenciales de acción. Como consecuencia, se produce la apertura de

canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV) en la membrana plasmática, dando lugar a la entrada de Ca^{2+} que desemboca en la exocitosis de las vesículas secretoras. Los receptores muscarínicos son de tipo metabotrópico y están acoplados a proteínas G. Cuando se activan estos últimos, se produce una respuesta bifásica de Ca^{2+} : por un lado, se induce despolarización de membrana, con la consecuente activación de CCDV y, por otro lado, incrementa el inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) mediado por fosfolipasa C (PLC), movilizándolo así el Ca^{2+} de almacenes intracelulares sensibles a IP_3 . Dichos almacenes intracelulares son, por ejemplo, retículo endoplásmico o el aparato de Golgi. Todo ello lleva a la secreción de CAs (Eberhard and Holz, 1987; D'Andrea and Grohovaz, 1995; Inoue et al., 2003).

No obstante, los subtipos de receptores colinérgicos responsables de la secreción de CAs varían entre las distintas especies. En las células cromafines aisladas de gallinas, sólo los receptores muscarínicos son los responsables de la secreción (Knight and Baker, 1986; Ledbetter and Kirshner, 1975). La secreción de células cromafines bovinas, por el contrario, depende casi exclusivamente de receptores nicotínicos (Ballesta et al., 1989) teniendo la estimulación muscarínica un efecto modulador en dicha secreción (Kao and Schneider, 1985). La secreción está mediada por ambos tipos de receptores en otras especies como el gato, la cobaya, el perro y la rata.

1.3.1. Las células cromafines como modelo para el estudio de la exocitosis.

El término cromafín fue acuñado en el siglo XIX por el histólogo Alfred Kohn y deriva de la especial afinidad que tienen las vesículas secretoras de las células cromafines para teñirse con sales de cromo, como el dicromato potásico (Coupland, 1965). Además de las células cromafines de la médula adrenal, existen pequeños grupos de células que dan una reacción cromafín y pueden encontrarse en el interior de la corteza, en corpúsculos extraadrenales (paraganglios) situados junto a vasos sanguíneos grandes y en las glándulas gástricas del estómago e intestino (enterocromafines). Estas células, observadas mediante microscopía electrónica, contienen gránulos electrodensos con CAs, aunque en mucha menor proporción en comparación con las células cromafines de la médula adrenal.

El aislamiento y mantenimiento de las células cromafines en cultivo ha sido muy útil en el establecimiento de las bases iónicas y moleculares de la secreción de hormonas y en revelar los posibles mecanismos que controlan la plasticidad fenotípica y química durante el desarrollo del sistema nervioso autónomo (Livett, 1984). Además, la gran cantidad de células que pueden obtenerse en un cultivo y la relativa homogeneidad entre ellas justifica su amplio uso en investigación.

Las células cromafines tienen una gran similitud con las neuronas simpáticas postganglionares por lo que podrían considerarse como paraneuronas. El concepto de paraneurona fue introducido por Fujita y Kobayashi para referirse a células neuroendocrinas con propiedades similares a las neuronas en cuanto a su origen, estructura, función y metabolismo (Kobayashi, 1977). Al igual que las neuronas, las células cromafines derivan de la cresta neural, poseen vesículas secretoras y son células excitables, es decir, disparan potenciales de acción que abren canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática y produce la entrada de Ca^{2+} resultando en la liberación exocitósica de catecolaminas y otras sustancias activas (García et al., 2006). Además, las proteínas implicadas en la exocitosis en ambos tipos celulares son similares (Roth and Burgoyne, 1994; Hodel et al., 1994; Morgan and Burgoyne, 1995; Burgoyne and Morgan, 2003; Sørensen et al., 2006).

No obstante, una diferencia importante entre las células cromafines y las neuronas es que, en la sinapsis, un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular permite la fusión de vesículas secretoras en menos de un milisegundo ya que la excitación y la señal postsináptica ocurren casi de manera inmediata. En células secretoras no sinápticas, estudios electroquímicos revelan que existe un retraso significativo entre la despolarización y la liberación de transmisores (Chow et al., 1992). Una explicación a este fenómeno es que un estímulo secretor producido en una neurona da lugar a la apertura de canales de Ca^{2+} que llevan al incremento de este ión en el orden de 100 μM . Esta elevada concentración de Ca^{2+} en torno a los canales crea microdominios que permiten la rápida secreción de las vesículas acopladas a esas zonas activas. En el caso de las células cromafines, la despolarización de la membrana produce una cascada de eventos que llevan al incremento de Ca^{2+} en el orden de 5-30 μM y, finalmente, a la fusión de vesículas que no están necesariamente en zonas activas (adyacentes a los canales de Ca^{2+} que se abren tras la despolarización) (Chow et al., 1994). Esto tiene sentido si

tenemos en cuenta que, en las células cromafines, así como las β -pancreáticas o de la neurohipófisis, la velocidad de liberación de los transmisores está limitada, no tanto por la propia liberación de los mismos, sino por su posterior transporte al órgano diana a través de la circulación sanguínea.

Las células cromafines han sido ampliamente usadas para estudiar los mecanismos que regulan la exocitosis debido a que, aisladas de la médula adrenal y en cultivo, poseen un tamaño mayor que la mayoría de las neuronas y adoptan una geometría esférica que permite la fácil aplicación de técnicas electrofisiológicas como el *patch-clamp* (Neher and Marty, 1982) o la amperometría (Wightman et al., 1991). También permitió evidenciar la fusión vesicular de forma simultánea a la detección del transmisor contenido en ella (Albillos et al., 1997) y la identificación y descripción de los componentes de la maquinaria exocitótica (Söllner et al., 1993; Südhof and Rizo, 2011; Jahn and Fasshauer, 2012).

1.3.2. Síntesis de las catecolaminas.

Las CAs son sintetizadas en las células cromafines de la médula adrenal, en las neuronas simpáticas postganglionares y en los sistemas catecolaminérgicos del sistema nervioso central (Kvetnansky et al., 2009).

La ruta biosintética de las CAs comienza a partir del aminoácido precursor L-tirosina. Hay dos fuentes principales de tirosina, la dieta y la hidroxilación del aminoácido fenilalanina en el hígado. Una vez entra la L-tirosina en la célula cromafín adrenal o en los terminales nerviosos catecolaminérgicos del cerebro, la enzima citoplasmática tirosina hidroxilasa (TH) convierte la L-tirosina en L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) al hidroxilar el anillo fenólico de la L-tirosina (fig. 1.2). La TH es una hidroxilasa de aminoácidos que requiere los cofactores O_2 , Fe^{2+} y tetrahidrobiopterina (BH_4). En condiciones fisiológicas, esta reacción es el paso limitante de la ruta biosintética de CAs (Levitt et al., 1965) ya que la actividad de esta enzima es de unas 100 a 1000 veces inferior al del resto de las enzimas de la ruta y además, la BH_4 se encuentra a niveles subsaturantes en la célula por lo que la actividad de la TH depende de su disponibilidad. La TH está regulada tanto a corto como a largo plazo. A corto plazo es inhibida por los catecoles (retroalimentación negativa), es activada por diversos efectores como los glucocorticoides, el AMPc, la

nicotina y las hormonas esteroideas y también puede ser fosforilada por diversas kinasas (Daubner et al., 2011). A largo plazo puede ser regulada prácticamente por todos los procesos reguladores: estabilidad enzimática, a nivel transcripcional, post-traduccional y epigenético (Lenartowski and Goc, 2011).

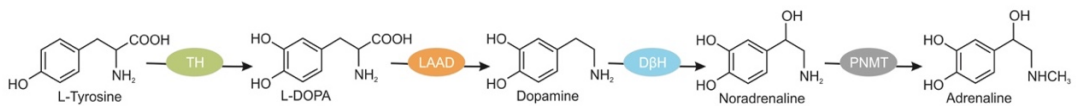


Figura 1.2. Ruta biosintética de las catecolaminas.

El siguiente paso es la descarboxilación de la L-DOPA para dar lugar a la dopamina (DA). Esta reacción también tiene lugar en el citoplasma y está catalizada por la DOPA descarboxilasa o L-aminoácido-aromático-descarboxilasa (LAAD). La actividad de esta enzima depende de los niveles de su cofactor, el fosfato de pirodoxal. La LAAD no es específica de tejido catecolaminérgico, ya que interviene en la síntesis de otros neurotransmisores como la serotonina (5-HT).

A continuación, la DA es introducida en el interior de las vesículas por medio de los transportadores vesiculares de monoaminas (VMATs). En el interior del gránulo ocurre el tercer paso de la síntesis, mediado por la dopamina- β -hidroxilasa (DBH), que cataliza la hidroxilación de la DA en posición β , dando lugar a la noradrenalina (NA).

Sólo en las células que sintetizan adrenalina (A) se expresa la enzima feniletanolamina-N-metil-transferasa (PNMT), que cataliza la conversión de la NA en A mediante la adición de un grupo metilo usando la S-adenosil metionina como cofactor. Esta enzima se encuentra en el citoplasma con lo que la NA debe salir de los gránulos, a través de la VMAT, para ser metilada y convertida en A. Esta última será de nuevo transportada al interior de los gránulos para su almacenaje y posterior liberación.

1.3.3. Tipos de células cromafines.

Las cuatro enzimas implicadas en la ruta de síntesis de las CAs no siempre están presentes en la misma célula. Las células adrenérgicas son aquellas que poseen las cuatro enzimas, por lo que la ruta de síntesis acaba en la A. Aquellas células que carezcan de PNMT sintetizarán NA, pero no A (serán células noradrenérgicas). Las que carezcan de D β H y PNMT serán células dopaminérgicas puesto que la ruta acaba con la formación de DA. Así, en las médulas adrenales de los mamíferos, las células cromafines se distribuyen en grupos homotípicos de acuerdo con su fenotipo catecolaminérgico. La proporción de ambos subtipos celulares se calcula midiendo la cantidad relativa de A y NA. Esta proporción varía entre especies, así en la rata predomina la A (80-85%), en el ratón cerca de un 66% de las CAs totales es A, en la vaca y el hombre el porcentaje de este neurotransmisor es un 75%, mientras que en el gato la proporción de ambas CAs es similar (Aunis and Langley, 1999).

Además de las diferencias en las CAs que almacenan en sus gránulos, la expresión de ciertas proteínas, así como de receptores presentes en la superficie celular varía entre células adrenérgicas y noradrenérgicas. Las mayores diferencias observadas han sido los receptores de histamina, de angiotensina II y los muscarínicos, los cuales se expresan preferentemente en células adrenérgicas. La distribución de los subtipos de receptores opioides también es diferente (Aunis and Langley, 1999).

Otros estudios demuestran que las isoformas del transportador vesicular de monoaminas, VMAT1 y VMAT2, se distribuyen de forma distinta en las células adrenérgicas y noradrenérgicas. Así, por ejemplo, todas las células cromafines de roedores expresan VMAT-1 y, sin embargo, solo un grupo de ellas expresan VMAT-2. Estas células cromafines expresando ambos tipos de transportadores de aminas son células noradrenérgicas (Weihe et al., 1995; Erickson et al., 1996; Tillinger et al., 2010). Además, los receptores purinérgicos P₂, que movilizan Ca²⁺, se distribuyen de forma distinta en las células que acumulan A o NA, siendo los P₂X preferencialmente localizados en las células noradrenérgicas y los P₂Y en las adrenérgicas (Tomé et al., 2007).

Con respecto a la innervación que llega a la glándula adrenal también es diferente entre células adrenérgicas y noradrenérgicas. Las células cromafines son innervadas directamente por axones de neuronas preganglionares simpáticas (SPNs) (Kesse et al., 1988).

Morrison y colaboradores mostraron que las SPNs pueden ser subdivididas en base a sus velocidades de conducción axonal y su respuesta a la estimulación de neuronas premotoras simpáticas en la médula rostroventrolateral (RVLM), así como su respuesta a la activación por baroreceptores o glucoprivación sistémica. Así, las SPNs que innervan las células adrenérgicas reciben señales de neuronas premotoras de conducción lenta de la RVLM, las cuales son sensibles a glucoprivación e insensibles a la activación barorefleja (Verberne and Sartor, 2010). Por el contrario, las SPNs que innervan las células noradrenérgicas se activan por rutas de conducción rápida de neuronas de la RVLM, que son barosensibles e insensibles a glucoprivación (Morrison and Cao, 2000) (fig. 1.3).

Los vasos sanguíneos de la corteza y la médula adrenal están innervados por neuronas postganglionares simpáticas noradrenérgicas (Parker et al., 1990; Carlsson et al., 1993; Toth et al., 1997), así como axones aferentes espinales y vagales (Mohamed et al., 1998; Coupland et al., 1989; Nijijima, 1992).

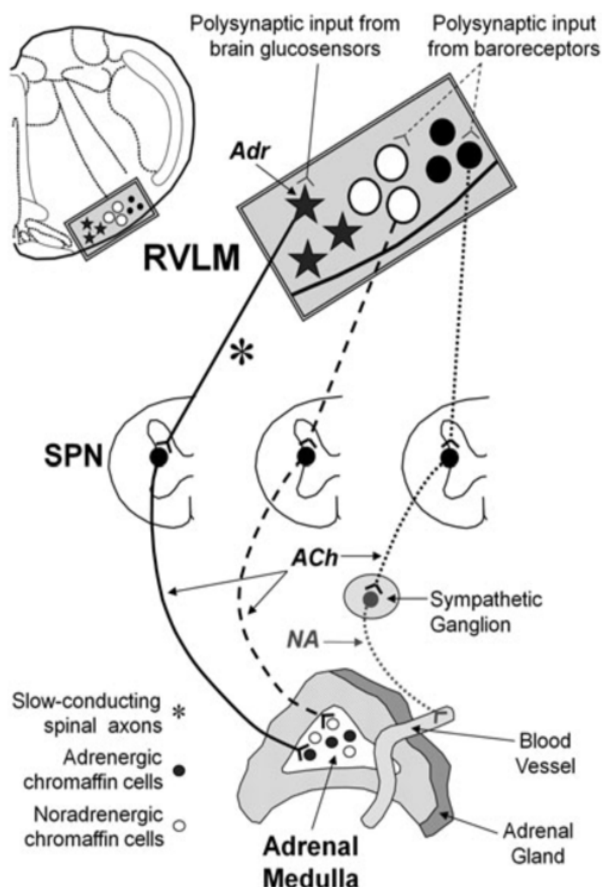


Figura 1.3. Inervación de la glándula adrenal. La glándula adrenal está inervada por neuronas colinérgicas preganglionares que tienen como diana exclusivamente las células cromafines. Las neuronas postganglionares noradrenérgicas tienen como diana solo los vasos sanguíneos presentes en la glándula. Las células cromafines adrenérgicas reciben señales de neuronas preganglionares que a su vez proceden de neuronas premotoras sensibles a glucosa. Las células cromafines noradrenérgicas reciben señales de neuronas preganglionares que a su vez proceden de neuronas barosensibles. (Tomado de Veberne et al., 2016).

Siempre se ha definido una célula adrenérgica como una célula cromafín capaz de sintetizar, almacenar y liberar A y una noradrenérgica aquella que, debido a la ausencia de la enzima PNMT, almacena y libera NA. El estudio de las diferencias entre ambos fenotipos celulares, en cuanto a la expresión desigual de determinadas proteínas y receptores, el tipo de transportador vesicular que poseen, así como su inervación, ha llevado a considerar la médula adrenal como una entidad heterogénea consistente en la agrupación de subpoblaciones celulares distintas. Sin

embargo, debido a que se desconoce el grado de especificidad de cada tipo celular con la CA que le es propia, podríamos preguntarnos: ¿qué pasaría si una célula adrenérgica no fuera capaz de sintetizar A? ¿seguiríamos considerándola adrenérgica? ¿sería capaz de almacenar NA con la misma afinidad con la que acumula la A?. En esta tesis intentaremos responder a estas preguntas.

En nuestro laboratorio disponemos de ratones modificados genéticamente en los cuales sus células son incapaces de sintetizar A. Esto se logró interfiriendo el gen que codifica para la enzima PNMT (Ebert et al., 2004). Nos planteamos comprobar si las células cromafines adrenérgicas y noradrenérgicas tienen ese fenotipo debido a la CA que acumulan o lo tienen independientemente de dichas CAs. El uso de ratones PNMT-KO nos puede ayudar a resolver ese dilema.

1.4. La vesícula cromafín.

Las células cromafines almacenan las CAs dentro de estructuras membranosas denominadas gránulos o vesículas cromafines (Hillarp and Nilson, 1954). Se han identificado diferentes tipos de vesículas según su tamaño y forma al microscopio electrónico (Koval et al., 2001), siendo las más abundantes las denominadas vesículas de núcleo denso grande (LDCV). Estas vesículas se denominan así debido a la matriz muy electrodensa que se observa por microscopía electrónica.

Cada célula cromafín contiene alrededor de 10.000 gránulos en ratones (Crivellato et al., 2008), pudiendo llegar a los 10.000-20.000 gránulos en vacas (Phillips, 1982; Burgoyne, 1991; Plattner et al., 1997), lo que supone, aproximadamente, del 13 al 30% del volumen del citoplasma. No obstante, la cantidad total de vesículas secretoras liberables estimada por medio de técnicas electrofisiológicas no coincide con el número total de vesículas determinado por estudios morfológicos (Vitale et al., 1995). Las vesículas liberables sólo comprenden entre 2.000 a 6.000 vesículas en vacas (Phillips et al., 1983; Carmichael and Winkler, 1985; Heinemann et al., 1993).

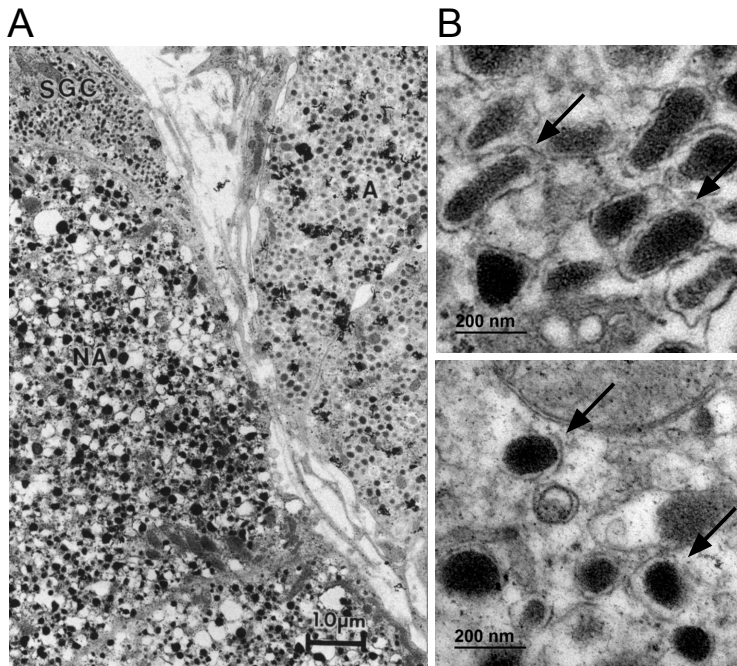


Figura 1.4. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión con los tipos de células y gránulos cromafines. A. “NA” indica una célula noradrenérgica, “A” una célula adrenérgica y “SGC” una célula cromafín de gránulos pequeños (Tomado de Kobayashi and Coupland, 1993). B. Micrografías electrónicas de gránulos noradrenérgicos y adrenérgicos. En el *panel superior*, las flechas indican gránulos típicamente noradrenérgicos con núcleo electrodenso y el halo amplio. En el *panel inferior* las flechas indican gránulos típicos adrenérgicos, de menor tamaño, matriz menos electrodenso y halo reducido.

En 1955, Jeffrey D. Lever realizó las primeras imágenes de los gránulos cromafines con microscopía electrónica. Se dio cuenta de que la apariencia de dichos gránulos varía mucho en tamaño, forma y densidad electrónica. Además, muchos de ellos estaban rodeados por un halo de material menos denso (Lever, 1955). Su aspecto tras la fijación con glutaraldehído y postfijación con tetraóxido de osmio parece depender de su contenido en aminas. Los gránulos que contienen adrenalina suelen ser menos electrodensos ya que la adrenalina difunde por acción del fijador, mientras que la noradrenalina precipita proporcionando una apariencia más electrodenso a los gránulos que la contienen (Coupland and Hopwood, 1966).

Los gránulos adrenérgicos, dependiendo de la especie animal, varían entre 50 y 350 nm de diámetro (en ratón 170-350 nm), tienen una morfología circular, electrodensidad moderada con un contenido de apariencia granulada y un halo que

suele ser reducido y uniforme (fig. 1.4; B, *panel inferior*). En el caso de los gránulos noradrenérgicos, su diámetro suele ser mayor al de los adrenérgicos variando entre 185-495 nm en ratón, tienen morfología irregular, forma ovalada o elíptica, un núcleo denso excéntrico y un halo amplio (fig. 1.4; B, *panel superior*), (Díaz-Flores et al, 2008).

Además de las CAs, las vesículas cromafines contienen una matriz proteica donde el principal componente son las cromograninas (A, B y secretograninas) (Helle and Serck-Hanssen, 1969; O'Connor and Frigon, 1984), nucleótidos de adenina, Ca^{2+} (Winkler, 1993) y péptidos menores como neuropéptido Y (Allen et al., 1983) y encefalinas (Lewis et al., 1979; Viveros et al., 1979).

Estudios de proteómica usando fracciones de membrana de vesículas cromafines revelaron la existencia de prohormonas, proteasas, proteínas implicadas en el metabolismo y transporte de las CAs, proteínas estructurales, enzimas de regulación redox, bombas ATPasas que regulan la translocación de protones, regulación del Ca^{2+} , componentes de señalización y proteínas involucradas en los mecanismos exocitóticos (Hook et al., 2010).

1.5. El ciclo de vida de una vesícula cromafín.

El ciclo de vida de una vesícula secretora incluye su formación, desplazamiento hacia la membrana plasmática, el acoplamiento con la misma, su fusión o exocitosis y el reciclado posterior por medio de endocitosis.

1.5.1. Formación de los gránulos cromafines.

La biogénesis de las vesículas secretoras de gránulo denso comienza con la síntesis de las proteínas que van a formar parte de ellas. Esto ocurre en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso (Perone et al., 1997), desde donde serán transportadas al complejo de Golgi. La clasificación de las proteínas destinadas a la ruta secretora tiene lugar en la red *trans-Golgi*, donde además ocurre la agregación de proteínas solubles tales como las graninas, cuya agregación depende del pH y el Ca^{2+} (Kim et al., 2001). Se originan así gránulos secretores inmaduros (Tooze and Huttner, 1990).

Las vesículas inmaduras sufren, a continuación, un proceso de acidificación (fig. 1.5, paso 1). Una bomba de protones dependiente de ATP citosólico, la V-ATPasa, establece un gradiente electroquímico que utilizan los transportadores vesiculares para rellenar el interior del gránulo con neurotransmisores, en contra del gradiente de concentración (fig. 1.5, paso 2). Dicha V-ATPasa se localiza en la membrana de las vesículas y establece el gradiente electroquímico por medio de la entrada de protones a la vesícula alcanzando ésta un pH de aproximadamente 5,5 (Jonhson and Scarpa, 1976; Pollard et al., 1979; Winkler and Westhead, 1980).

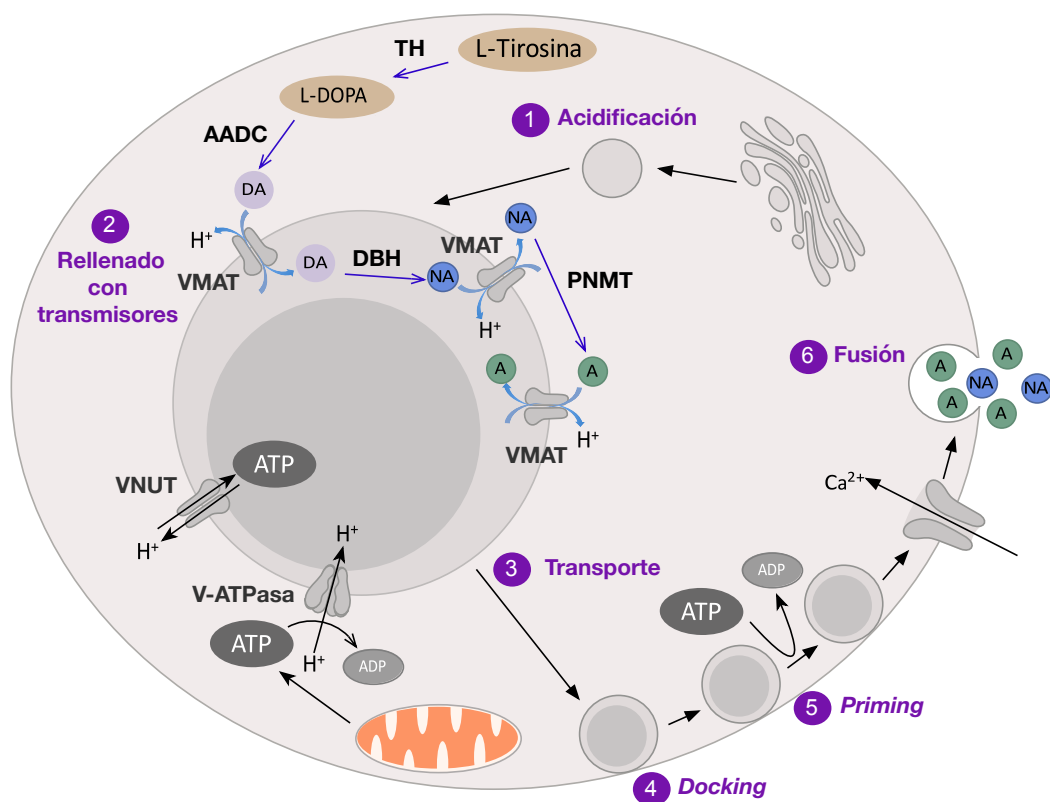


Figura 1.5. Esquema de las etapas del ciclo de vida de un gránulo cromafín. 1, los gránulos cromafines se sintetizan en la cara *trans* del complejo de Golgi. 2, la V-ATPasa acidifica el medio intravesicular estableciendo un gradiente electroquímico necesario para que se rellenen las vesículas con CAs. La vesícula central representada en el paso 2 se muestra aumentada con respecto al resto de vesículas y componentes celulares, con fines divulgativos. 3, los gránulos se desplazan hacia la membrana plasmática. 4, *docking* o anclaje de las vesículas a la membrana. 5, *priming* o activación de los gránulos para ser secretados. 6, fusión con la membrana plasmática.

1.5.2. Transporte de los gránulos hacia la membrana plasmática.

Después de su formación, la mayoría de las vesículas se localizan en el grupo de reserva, donde permanecen durante periodos de tiempo variables y desde donde, algunas de ellas, pasan a diferentes compartimentos intracelulares en función de su disponibilidad para ser liberadas. Experimentos realizados modificando el nivel del Ca^{2+} intracelular combinado con medidas de capacidad de la membrana celular por medio de *patch-clamp*, ofrecen una resolución temporal para la fusión vesicular en el rango de milisegundos y revela que la liberación de CAs ocurre con cinéticas diferentes, las cuales están relacionadas con distintos grupos de gránulos secretores (fig. 1.6) (Neher and Zucker, 1993; Ashery et al., 2000; Sørensen, 2004; Stevens et al., 2011). Un rápido incremento del Ca^{2+} citosólico induce exocitosis que puede ser resuelta en dos cinéticas, una cinética rápida que se corresponde con un grupo de vesículas preparadas para ser liberadas (RRP, de sus siglas en inglés, *Readily Releasable Pool*) y una cinética lenta que correspondería a un grupo de vesículas que se liberan de forma lenta (SRP, por sus siglas en inglés, *Slowly Releasable Pool*) (Voets et al., 1999; Voets, 2000). En un principio se pensaba que la diferencia entre ambos grupos vesiculares se debía a su distinta sensibilidad al Ca^{2+} . Posteriormente, se consideró que se trataba de diferentes etapas de maduración. Así, SRP sería un paso previo a las RRP que alcanzarían este estado cuando se vuelven competentes para fusionarse con la membrana plasmática (Walter et al., 2013). Actualmente, la teoría de que la maduración de los gránulos es lo que determina su presencia en un grupo vesicular concreto y su probabilidad de fusión no se considera correcta. Se sabe que las vesículas pueden permanecer en el grupo no liberable o ser reclutados pasando a formar parte de alguno de los grupos susceptibles de ser liberados (Burgoyne and Morgan, 2003). En el 2003, Duncan y colaboradores relevaron que las vesículas de células cromafines bovinas forman parte de las distintas poblaciones en base a su edad, siendo las recién sintetizadas las más cercanas a la membrana y con tiempos de vida más cortos en comparación con las vesículas más viejas, que se localizan en regiones de la célula alejadas de la membrana. Esto ha sido posteriormente corroborado por otros autores que proponen que las vesículas más jóvenes son las primeras en ser liberadas (Duncan et al., 2003; Tsuboi et al., 2010; Estévez-Herrera et al., 2016).

No se conoce con exactitud la vida media de los gránulos en la célula, pero se han hecho aproximaciones experimentales. El grupo de Norman Kirshner determinó que la A permanece estable dentro de la célula durante aproximadamente 15-18 días (Corcoran et al, 1984) y ese podría ser el reflejo de la duración de los gránulos activos.

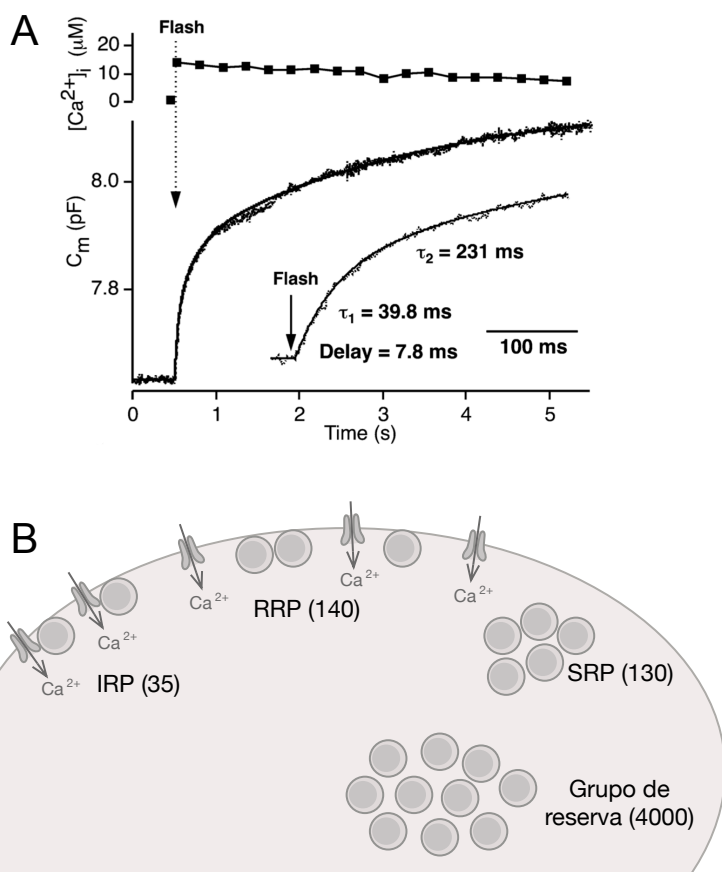


Figura 1.6. Movilización de los diferentes grupos vesiculares tras un incremento de Ca^{2+} en la célula.
A. Se representa la concentración de Ca^{2+} intracelular (panel superior) y la capacidad de la membrana (panel inferior) durante el incremento de Ca^{2+} inducido por fotolisis (denominado como “flash” en la imagen). Un flash de luz UV produce un rápido incremento de Ca^{2+} encapsulado en la célula dando lugar a un aumento instantáneo de la capacidad de la membrana. En la curva de capacidad se pueden distinguir tres cinéticas diferentes. Las dos primeras son mostradas a mayor resolución en la misma figura. La cinética más rápida ($\tau=39,8ms$) corresponde con la fusión de RRP, la segunda cinética observada ($\tau=231ms$) se corresponde a la fusión de SRP. El tercer componente se corresponde con la fusión de vesículas pertenecientes al grupo de reserva (Tomado de Sørensen, 2004). **B.** Modelo de los diferentes grupos vesiculares. La estimación del número de vesículas de cada grupo se indica entre paréntesis. Se muestra IRP que son vesículas pertenecientes al SRP pero que se encuentran localizados próximos a canales de Ca^{2+} (Modificado de Voets et al., 1999).

Además, se ha definido otro grupo vesicular que son aquellas que se liberan de forma inmediata al aumentar el Ca^{2+} intracelular (IRP, por sus siglas en inglés, *Immediately Releasable Pool*). Las IRP se definen como un pequeño grupo de vesículas pertenecientes a las RRP que están localizadas muy cerca de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Horrigan and Bookman, 1994; Pasche et al., 2012; Cárdenas and Marengo, 2016). Este proceso de desplazamiento de los gránulos cromafines está muy regulado por la reorganización del citoesqueleto de actina próxima a la membrana (Aunis and Bader, 1988; Giménez-Molina et al., 2018).

1.5.3. Exocitosis de los gránulos cromafines.

La exocitosis de los gránulos cromafines tiene lugar en tres etapas, un paso conocido como “docking” o anclaje a la membrana plasmática, un segundo paso denominado “priming” o activación de los gránulos que los hace competentes para fusionarse con la membrana (fig. 1.5, paso 4 y 5) y el tercer paso de fusión vesicular. La fusión se lleva a cabo mediante el ensamblaje del complejo proteico SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptors*), que fueron descubiertos como receptores para SNAPs, un grupo de proteínas solubles asociadas al factor NSF (*N-ethylmaleimide sensitive factor*) (Söllner et al., 1993). Dicho complejo está compuesto por una proteína de la membrana vesicular (v-SNARE), que es la sinaptobrevina, y dos proteínas de la membrana plasmática (t-SNARE), la syntaxina y la SNAP-25. El complejo SNARE se considera la maquinaria básica para la exocitosis, no obstante, otras proteínas, como los sensores de Ca^{2+} , son necesarios para que se lleve a cabo el proceso (fig. 1.7).

El *docking* de las vesículas depende de las proteínas syntaxina y SNAP-25 de la membrana plasmática y de la proteína vesicular sinaptotagmina-1 (de Wit et al., 2009; Mohrmann et al., 2013). Esta última es una proteína transmembrana que pertenece a la familia proteica con dos dominios de unión al Ca^{2+} , por lo que actúa como el principal sensor de Ca^{2+} en el proceso de exocitosis. Además de unirse a Ca^{2+} , se une a fosfolípidos tales como fosfatidilserina o inositol fosfato (Davis et al., 1999; Takahashi et al., 2010) y a una región ácida del complejo SNARE formado por la syntaxina-1 y SNAP-25 (Brewer et al., 2015; Zhou et al., 2015). La proteína Munc18-1 tiene un papel fundamental en el proceso de *docking* favoreciendo la formación del complejo syntaxina/SNAP-25 (Toonen and Verhage, 2007).

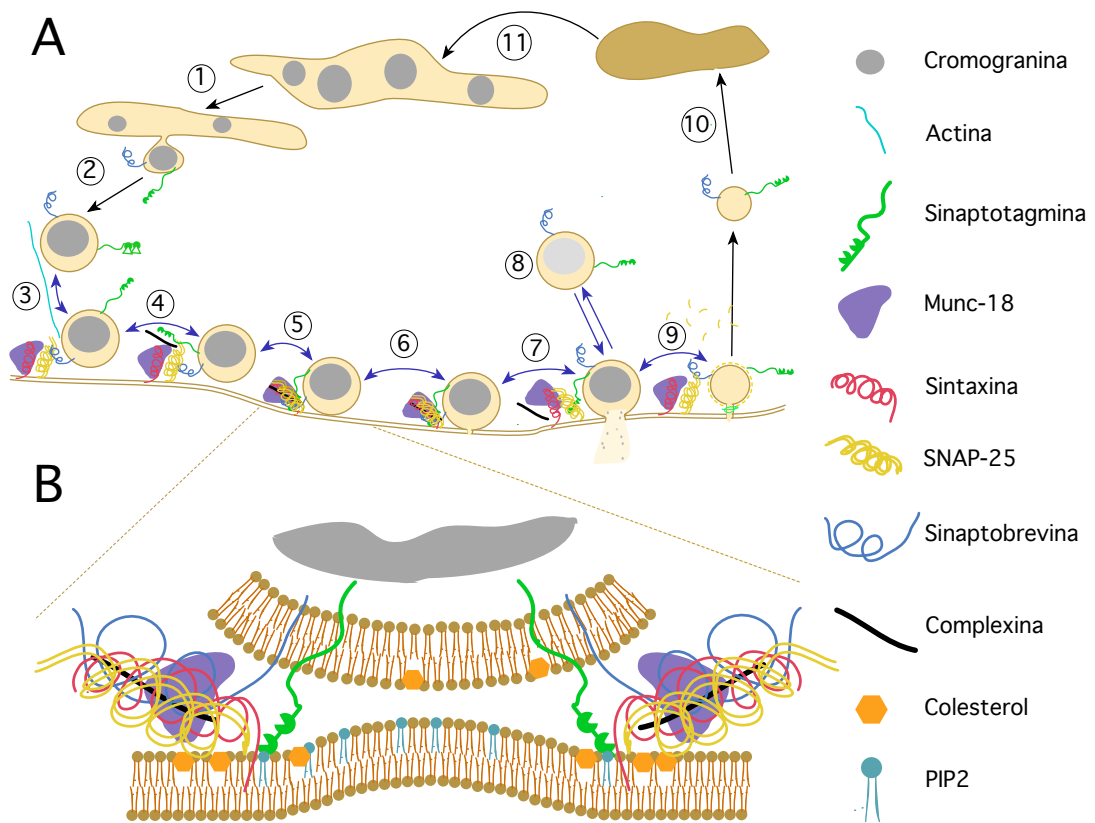


Figura 1.7. Exocitosis y endocitosis de los gránulos cromafines. A. Principales pasos del proceso. 1, las proteínas que van a formar parte de los gránulos se clasifican y empaquetan en el complejo de Golgi. 2, los gránulos se transportan a las zonas activas. 3, los filamentos de actina transportan los gránulos hasta los puntos de anclaje a la membrana. 4, *docking*, el complejo SNARE se ancla a la membrana debido a la unión de la sintaxina y SNAP-25 de la membrana plasmática, y la sinaptotagmina-1 de la membrana vesicular. 5, *priming*, mediado por Munc 13, sinaptotagmina y complexina. Munc 13 permite que el complejo SNARE se mantenga en una conformación abierta permitiendo que pueda unirse a la sinaptobrevina y SNAP-25. 6, comienza a formarse el poro de fusión. 7, el poro de fusión se expande permitiendo la liberación parcial o completa del contenido del gránulo. 8, el gránulo vuelve a cerrarse después de una fusión parcial con la membrana plasmática. 9, recuperación de la membrana por endocitosis en caso de una fusión completa. 10 y 11, los gránulos endocitados viajan hacia endosomas o lisosomas desde donde pueden comenzar un nuevo ciclo secretor después de su clasificación en el complejo de Golgi. **B. La organización del complejo SNARE en el estado de *priming*.** La presencia de colesterol y fosfolípidos permite la curvatura de la membrana plasmática favoreciendo así la dinámica de fusión. (Modificado de Carbone et al., 2019, artículo en preparación).

El *priming* es el proceso por el cual todos los componentes del complejo SNARE adquieren la localización adecuada para ser capaces de interactuar entre ellos y que se produzca la fusión de los gránulos con la membrana plasmática. Este paso requiere de la participación de las proteínas Munc13, proteínas activadoras dependientes de Ca^{2+} (CAPS), snapina, sinaptotagmina-1 y complexina, entre otras. Munc13 favorece la conformación abierta de la sintaxina-1 (Dulubova et al., 1999; Ma et al., 2011) permitiendo que ésta pueda unirse a la sinaptobrevina y la SNAP-25. CAPS es esencial para la exocitosis de vesículas inducida por Ca^{2+} . Interactúa con la sintaxina-1 y la SNAP-25 en varios de los estados del ensamblaje del complejo SNARE (Daily et al., 2010). Snapina es otra proteína moduladora del complejo SNARE que se une a la SNAP-25 estabilizando la interacción entre sinaptotagmina y el complejo SNARE (Tian et al., 2005). En el caso de las complexinas, éstas son una familia de pequeñas proteínas citosólicas que se unen al complejo SNARE en etapas previas a la fusión (Liu et al., 2006). Las células cromafines expresan complexina-2 (Archer et al., 2002), la cual se une a la sinaptotagmina-1 impidiendo que pueda ensamblarse el complejo SNARE. Cuando los niveles de Ca^{2+} citosólico incrementa como consecuencia de la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, dicho Ca^{2+} se une a la sinaptotagmina desplazando la complexina unida y permite de esa forma el ensamblaje del complejo SNARE. Este papel de la complexina-2 ha sido observado con la complexina-1 en la sinapsis neuronal (Giarudo et al., 2006; Schaub et al., 2006). Si ocurriera un ensamblaje prematuro del complejo SNARE las complexinas evitarían la fusión.

La fusión de las vesículas ocurre cuando el complejo SNARE se cierra de forma similar a lo que haría una cremallera (proceso conocido como “zippering”) acercando la membrana de la vesícula a la membrana plasmática lo suficiente como para que disminuya la barrera energética permitiendo la fusión de las mismas (Oelkers et al., 2016). Este complejo está formado por 4 hélices- α , con la sinaptobrevina contribuyendo con una hélice- α , SNAP-25 con dos hélices- α y la sintaxina con una (Südhof and Rothman, 2009).

Recientemente, Reinhard Jahn y colaboradores han propuesto que la sinaptotagmina es capaz de inducir exocitosis a través de un mecanismo independiente de su unión al complejo SNARE. Este mecanismo implica la unión de la sinaptotagmina a la fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂). Cuando los niveles de

Ca^{2+} citosólico incrementan, aumenta la afinidad de la sinaptotagmina con PIP2, por la neutralización de sus cargas negativas en los sitios de unión al Ca^{2+} , promoviendo así la fusión con la membrana plasmática (Pérez-Lara et al., 2016). No obstante, aún no está claro si la unión de la sinaptotagmina a PIP2 es competitiva o independiente a asociación con el complejo SNARE (Marengo and Cárdenas, 2018).

1.5.4. Poro de fusión de los gránulos cromafines.

El proceso de fusión se inicia con la formación de un canal de alta conductancia que permite el flujo de CAs desde el citoplasma de la célula hacia el medio extracelular. A ese canal se le denomina “poro de fusión” y tiene un diámetro inicial menor a 3 nanómetros (Albillos et al., 1997). Puede permanecer abierto durante periodos de tiempo variables antes de expandirse completamente, lo cual se conoce como exocitosis completa, o bien, puede volver a cerrarse, resultando en la liberación parcial de CAs. Éste último mecanismo se conoce como exocitosis parcial y es la forma de liberación predominante a bajas frecuencias de estimulación. El fenómeno de “kiss-and-run” es una exocitosis parcial en el que ocurre una fusión transitoria muy rápida de la vesícula con la membrana plasmática, de una duración aproximada de 0,5 s (Fesce et al., 1994; Alés et al., 1999; Elhamdani et al., 2006). Entre el “kiss-and-run” y la exocitosis completa existe un rango muy amplio de exocitosis parciales que depende del nivel de fusión de la vesícula con la membrana.

Una vez formado el poro de fusión, el tiempo que tarda en expandirse depende del tamaño de la vesícula (Álvarez de Toledo et al., 2018). Además, el diámetro del poro de fusión determina la cantidad y el tipo de moléculas que son liberadas. Así, poros de fusión estrechos permitirán la salida de moléculas pequeñas como las CAs, pero poros de fusión más dilatados permitirán el paso de moléculas de mayor tamaño tales como las cromograninas. La incorporación completa de la membrana vesicular a la membrana plasmática permite la liberación de todo su contenido (Fulop et al., 2005; Perrais et al., 2004).

1.5.5. Endocitosis y reciclado de las vesículas secretoras.

El reciclaje de componentes de la membrana de las vesículas que han sufrido exocitosis ocurre por vía endocitosis. La endocitosis es un proceso necesario no solo para mantener constante la superficie de la membrana sino también para renovar los lípidos y proteínas de la misma.

Cuando ocurre una exocitosis completa, el reciclado de las vesículas incluye la recuperación de membrana desde la superficie celular, la internalización en forma de endosomas y su transporte de vuelta a la red *trans-Golgi* para allí ser procesada y formar parte, finalmente, de nuevas vesículas (Lingg et al., 1983; Fulop et al., 2005)

Si la exocitosis ha sido parcial, tipo *kiss-and-run*, ocurre una rápida endocitosis después del cierre del poro de fusión (Barg et al., 2002). De esta forma, gran cantidad de vesículas vuelven a sellarse después de hacer exocitosis sin perder su identidad (Perrais et al., 2004; Díaz-Flores et al., 2008), es decir, conservando la membrana y la mayoría de las proteínas de la membrana y la matriz. Usando medidas de capacidad y amperometría en parche se ha sugerido que el tamaño límite del poro de fusión para su reversibilidad es alrededor de 3,4 nm, tamaños mayores darían lugar a una fusión irreversible, es decir, acabaría siempre en una fusión completa del gránulo con la membrana plasmática (Albillos et al., 1997; Alés et al., 1999). No obstante, observaciones usando TIRFM (Perrais et al., 2004) y captura en fase fluida (von Grafenstein and Knight, 1992) concluyen que incluso poros de diámetro mayor son reversibles. Esos gránulos parcialmente fusionados con la membrana plasmática podrían ser parcial o completamente vaciados de CAs y otros componentes solubles (Tabares et al., 2001) y al volver a sellarse serían rápidamente acidificados (Taraska et al., 2003).

Los complejos SNARE que ya han sido utilizados durante la exocitosis también pueden ser reciclados. En este proceso actúa el factor NSF que, además de favorecer la fusión vesicular, actúa como una chaperona que utiliza la energía obtenida en la hidrólisis de ATP para desensamblar las proteínas que constituyen los complejos SNARE y, de esta forma, puedan reutilizarse (Morgan and Burgoyne, 1995).

1.6. Segundos mensajeros intracelulares.

La principal forma que tienen las células para regular la exocitosis son los segundos mensajeros. Éstos son iones o moléculas producidas en las células que utilizan como señalización en respuesta a determinados estímulos para desencadenar un efecto. Ese efecto puede ser, por ejemplo, la proliferación celular, su diferenciación, metabolismo, migración, apoptosis o, como se dijo anteriormente, la exocitosis.

El descubrimiento de los segundos mensajeros lo llevó a cabo Earl Wilbur Sutherland Jr., por lo cual ganó el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1971. Usando preparaciones celulares de hígado, Sutherland Jr. se dio cuenta de que, al añadir adrenalina, se producía un incremento de la glucogenolisis. Esto tenía lugar por un incremento en la actividad fosforilasa que desencadenaba el segundo mensajero que acababa de descubrir, adenosín monofosfato cíclico (AMPC) (Rall and Sutherland, 1959).

Además del AMPC, otros segundos mensajeros son el guanósín monofosfato cíclico (GMPC), el Ca^{2+} , el diacilglicerol o el IP_3 . En los próximos apartados trataremos algunos de ellos haciendo especial atención a su relación con la exocitosis.

1.6.1. El calcio.

El Ca^{2+} es quizás el segundo mensajero más común tanto en células neuronales como endocrinas puesto que la mayoría de las funciones celulares están influenciadas por este ión (Clapham, 1995).

La concentración de iones Ca^{2+} en el citoplasma es muy baja, del orden de 50-200 nM. Sin embargo, en el exterior celular su concentración es varios órdenes de magnitud superior, aproximadamente 1-2 mM. Este enorme gradiente de Ca^{2+} es además reforzado por el gradiente eléctrico al ser el interior celular negativo y el Ca^{2+} un catión divalente. El gradiente de Ca^{2+} se genera y mantiene gracias a la existencia de proteínas en la membrana plasmática que realizan el intercambio de este ión. Uno de ellas es una ATPasa conocida como bomba de Ca^{2+} , que saca 2 iones Ca^{2+} hacia el medio extracelular por cada molécula de ATP hidrolizada y la

otra es el intercambiador $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$, el cual lleva a cabo el cotransporte de 1 ión Ca^{2+} del citoplasma al espacio extracelular y 3 iones Na^{2+} en el sentido contrario. Este intercambiador $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ también aparece en la mitocondria (fig. 1.8). Estos sistemas de transporte de Ca^{2+} sirven para mantener unos niveles basales de este ión en el citoplasma muy bajos frente al medio extracelular. No obstante, cuando a la célula le llega un estímulo, el Ca^{2+} puede actuar como segundo mensajero elevando su concentración intracelular. Este Ca^{2+} entra a la célula a través de canales de Ca^{2+} .

1.6.1.1. Los canales de Ca^{2+} .

Los canales del Ca^{2+} pueden clasificarse en función del estímulo que lo activa, hay canales del Ca^{2+} dependientes de voltaje, canales de Ca^{2+} operados por receptor, dependientes de la cantidad del Ca^{2+} en los depósitos intracelulares y operados por segundos mensajeros (fig. 1.8).

Los canales del Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV) están presentes en la membrana plasmática de células excitables, como las neuronas y las células neuroendocrinas. Frente a un estímulo despolarizante, estos canales sufren un cambio conformacional que produce su apertura permitiendo así la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular. Esta entrada de Ca^{2+} puede ser muy rápida, lo que permite controlar procesos rápidos de la célula, tales como la contracción muscular o la liberación de transmisores. Cuando la célula vuelve a su estado de reposo y la membrana está hiperpolarizada, dichos canales vuelven a su conformación cerrada. Los CCDV están especialmente implicados en la generación de microdominios de Ca^{2+} pudiendo interactuar así con las vesículas secretoras a través de proteínas sensores del Ca^{2+} del complejo SNARE (Berridge, 2012).

La estructura de los CCDV es similar para todos los miembros de la familia. Se trata de complejos heteromultiméricos con una subunidad α_1 que conforma el poro del canal y un conjunto de subunidades auxiliares β y $\alpha_2\delta$ responsables de la localización, tráfico, estabilización del canal en la membrana, así como de su interacción con otras proteínas y moléculas de señalización (Buraei and Yang, 2010).

Los CCDV pueden clasificarse en tres grandes familias, Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3 , en función de su conductividad, características funcionales y su respuesta farmacológica (Ertel et al., 2000) (Ver resumen en la tabla 1).

Familia	Conductividad	Localización	Características funcionales
Ca_v1	Tipo-L (“Long-lasting”)	Músculo esquelético, corazón, neuronas y células endocrinas	Presentan una alta conductancia y requieren una alta despolarización para su activación
	Tipo-N		
Ca_v2	Tipo-P/Q	Sistema nervioso	
	Tipo-R		
Ca_v3	Tipo-T (Transitorias)	Gran variedad de tipos celulares, donde modulan el potencial de acción y el control de patrones de disparo repetitivo	Presentan una baja conductancia y se activan a bajos potenciales de despolarización

Tabla 1. Clasificación de los CCDV. Se muestra una clasificación en función de su conductividad, su localización y sus principales características funcionales.

Los canales de Ca^{2+} operados por receptor son aquellos que permiten la entrada del Ca^{2+} cuando sufren un cambio conformacional como consecuencia de la unión de un agonista a un receptor. Ese receptor puede ser el propio canal en el caso de los canales ionotrópicos, o bien, un receptor asociado al canal en el caso de los metabotrópicos. Un ejemplo de canal ionotrópico es la familia de receptores nicotínicos presentes en una gran variedad de tipos celulares como las neuronas, células del epitelio bronquial, del sistema inmune o las células cromafines (Karlin, 1993; Wu and Lukas, 2011). Los principales agonistas que actúan sobre los receptores nicotínicos son la ACh y la nicotina (Gündisch and Eibl, 2011). Un agonista no fisiológico de estos canales, ampliamente utilizado para inducir exocitosis a través del incremento de Ca^{2+} en células cromafines, es el dimetil-fenil piperazinio (DMPP).

Los canales del Ca^{2+} operados por depósitos se activan en respuesta de una disminución del Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, tales como el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi o las mitocondrias. Estos canales no sólo se

activan cuando es necesario restablecer la concentración de Ca^{2+} en los depósitos sino como una fuente de este ión, especialmente bajo condiciones en las que la señalización de Ca^{2+} debe ser mantenida durante periodos de tiempo largos (Berridge, 2012).

Los canales de Ca^{2+} operados por segundos mensajeros están controlados por segundos mensajeros procedentes de diversas cascadas de señalización de la célula. Los más representativos son los activados por nucleótidos cíclicos, fundamentalmente AMPc y GMPc, y los regulados por ácido araquidónico.

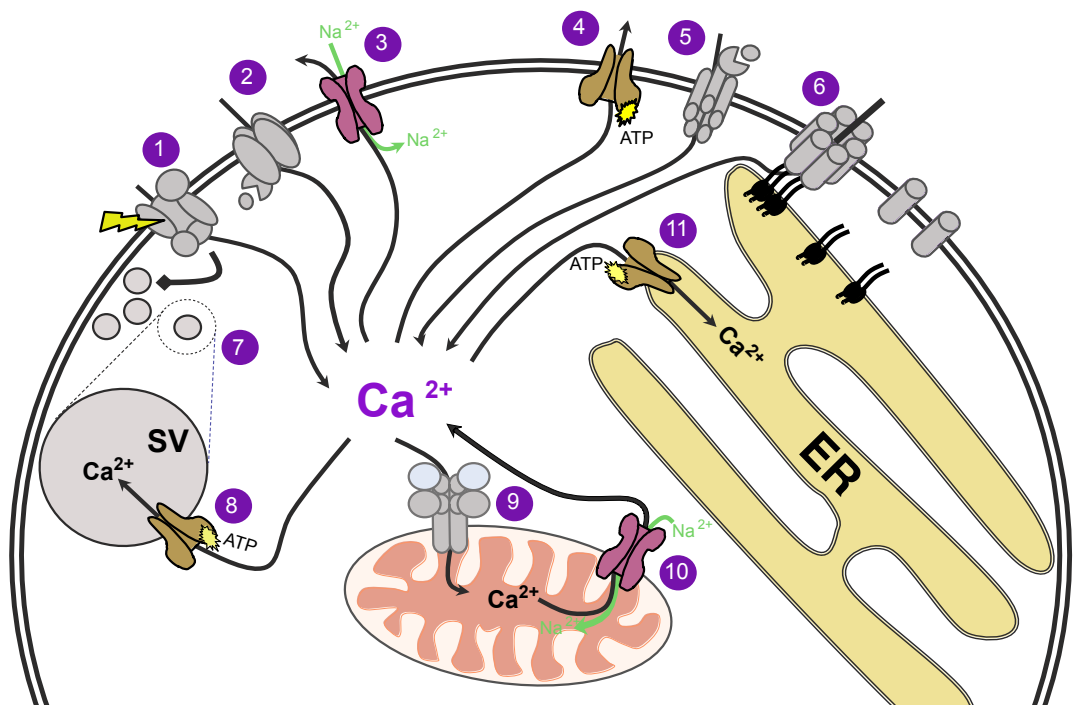


Figura 1.8. Homeostasis de Ca^{2+} en un modelo de célula neuroendocrina. Se representa un modelo de la regulación de flujos de Ca^{2+} celular donde participan el retículo endoplásmico (ER), la mitocondria y las vesículas secretoras (SV). Se encuentran representados los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (1), operados por segundos mensajeros (2), operados por receptor (5) y los canales de Ca^{2+} operados por depósito (6). Por otro lado, se muestran las ATPasas de Ca^{2+} de la membrana plasmática y del ER (4 y 11) y el sistema intercambiador de $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ (3 y 10). En la mitocondria se muestra la captación de Ca^{2+} a través del uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (9) y el intercambiador $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ (10). También se representa un gránulo secretor (7) y el mismo gránulo aumentado mostrando la entrada de Ca^{2+} a través de una ATPasa de Ca^{2+} (Modificado de la tesis del Dr. Pablo Montenegro, 2016).

1.6.1.2. El calcio y su implicación en la exocitosis.

En el segundo apartado de la introducción de esta tesis se comentó el origen de la expresión “acoplamiento estímulo-secreción” con el que Douglas y Rubin, en la década de los años 60, relacionaban un estímulo secretor y la liberación de neurotransmisores, siendo el Ca^{2+} el que conecta ambos procesos.

Una vez que el Ca^{2+} incrementa sus niveles en el interior de la célula por cualquiera de las formas anteriormente comentadas en respuesta a un estímulo, ¿cómo desencadena la exocitosis? Una de las formas es por medio de su interacción con sinaptotagmina-1 que sufre cambios conformacionales al unirse a Ca^{2+} haciendo que pueda ensamblarse el complejo SNARE y se desencadene la fusión de la vesícula con la membrana plasmática. Además de la sinaptotagmina-1, el Ca^{2+} también interacciona con otras proteínas que intervienen en la formación del complejo SNARE como las Munc13.

El incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular no solo interviene en los últimos pasos de la exocitosis, sino que también favorece dicho proceso interviniendo en otros pasos. Se ha comprobado que el Ca^{2+} activa un paso de fosforilación mediada por PKC que modifica la red de actina próxima a la membrana plasmática. Las vesículas que estén cerca de esas zonas del citoesqueleto podrían ser transportadas a sitios secretores activos induciendo su fusión con la membrana (García et al, 2006).

1.6.2. El AMPc.

Tras el Ca^{2+} , el AMPc fue el primer miembro de la familia de segundos mensajeros que se descubrió. El nivel de AMPc en la célula depende de la actividad de, al menos, dos enzimas, la adenilato ciclasa (AC), que cataliza la formación del AMPc a partir de ATP en una reacción que requiere magnesio (Sutherland et al., 1962) y la fosfodiesterasa (PDE), que cataliza su hidrólisis en 5'-AMP (Butcher and Sutherland, 1962).

La formación del AMPc comienza cuando un primer mensajero extracelular (que puede ser una hormona, un neurotransmisor, un lípido o algún fármaco) se une a un receptor acoplado a proteína G (GPCR). La unión del ligando da lugar al

intercambio de GDP por GTP de la subunidad α de la proteína G resultando en su separación de la subunidad β del complejo (fig. 1.9). La subunidad α estimula la AC para catalizar la reacción de ciclado del ATP generando AMPc y pirofosfato (para una revisión más detallada ver Serezani et al., 2008). Algunos de los receptores acoplados a proteína G bien conocidos, y que son estudiados en esta tesis, son los receptores adrenérgicos o los receptores del péptido-1 similar al glucagón (GLP-1R).

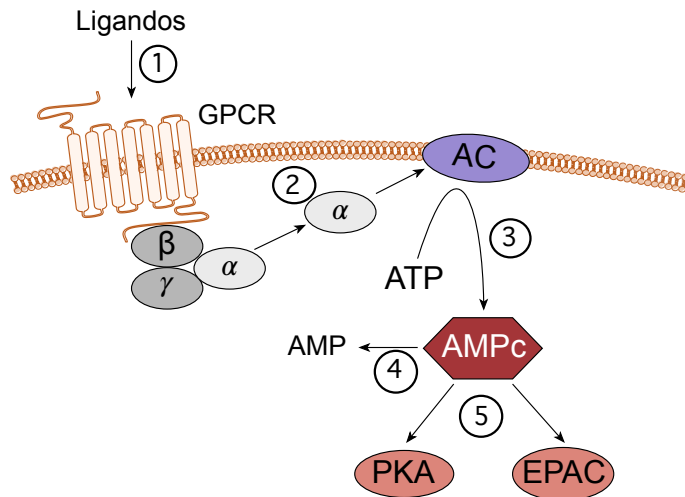


Figura 1.9. Regulación de los niveles de AMPc. 1, unión de un agonista de receptores acoplados a proteína G (GPCR). 2, la unión del agonista produce un cambio conformacional que da lugar a la liberación de la subunidad α de la proteína. Dicha subunidad α se une al adenilato ciclasa (AC). 3, se genera AMPc a partir de ATP. 4, la degradación de AMPc por parte de las fosfodiesterasas (PDE) genera AMP. 5, la señalización mediada por AMPc puede ocurrir vía proteína kinasa-A (PKA) o proteínas de intercambio de guanina directamente activadas por AMPc (EPAC). (Modificado de Serezani, 2008).

Recientemente se ha descrito un proceso alternativo de producción de AMPc independiente de proteínas G, mediado por los receptores de hormonas liberadoras de corticotropina (CRHR1) (Inda et al., 2016). Cuando el CRHR1 se estimula como consecuencia de la unión de su ligando, pueden activarse ACs asociadas a proteína G o bien, se activan ACs solubles, insensibles a la regulación por proteína G, dando lugar, en cualquiera de los casos, al incremento de AMPc. Además, una vez que se produce la internalización del receptor, las ACs solubles actúan como una segunda fuente de producción de AMPc ya que son capaces de incrementar su concentración en diferentes localizaciones intracelulares.

Durante muchos años se pensó que la concentración de AMPc aumentaba uniformemente después de la estimulación de un receptor localizado en la membrana plasmática. Esta visión se basaba en que el AMPc se trata de una molécula soluble con un alto coeficiente de difusión y que, además, se mantiene libre en el citoplasma. No obstante, cada vez hay mas evidencias que consideran que el AMPc se distribuye en microdominios cerca de los sitios de su síntesis, permitiendo así una activación selectiva de las dianas localizadas en su proximidad (Calebiro and Maiellaro, 2014). El desarrollo de las técnicas de microscopía óptica ha permitido una visualización directa de la señalización del AMPc con alta resolución espacial y temporal. Se ha comprobado que la distribución en microdominios del AMPc puede deberse a la distribución heterogénea dentro de la célula de las moléculas con las que interactúa, ya sean receptores, ACs, PDEs, etc.

Una vez que el AMPc ha incrementado su concentración dentro de la célula, puede interactuar con diferentes tipos de proteínas como la proteína quinasa-A (PKA) o con proteínas de intercambio de guanina activadas directamente por AMPc (EPAC, del acrónimo *Exchange Protein Activated Directly by Cyclic AMP*) que son los sistemas efectores de la respuesta celular al estímulo inicial o ligando. Recientemente se ha descrito otra vía de señalización del AMPc en células cromafines, independiente de PKA, que requiere la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Emery and Eiden, 2012).

Entre la multitud de señales intracelulares que lleva a cabo el AMPc, sirve como una señal casi universal que modula y regula la exocitosis en varios sistemas secretores, tanto neuronas, células endocrinas y neuroendocrinas como en células exocrinas (para una revisión detallada ver Serezani et al., 2008).

1.6.2.1. La PKA y su papel en la exocitosis regulada.

La PKA esta compuesta por dos subunidades distintas, una reguladora y otra catalítica, las cuales forman una holoenzima tetramérica, R_2C_2 . En presencia de AMPc, la holoenzima se disocia en sus respectivas subunidades reguladoras y catalíticas siendo estas últimas las que fosforilan multitud de dianas celulares tanto citoplasmáticas como nucleares (Chin et al, 2002).

En células neuronales, la señalización mediada por AMPc-PKA es clave en la transmisión sináptica. PKA lleva a cabo la fosforilación de proteínas implicadas en la maquinaria exocitótica, tales como snapina, Rim1 o SNAP-25, entre otras. Al ser fosforiladas, pueden interactuar con otras proteínas de las zonas activas donde ocurre la sinapsis o pueden interactuar con proteínas del complejo SNARE, estabilizando dicho complejo e incrementando la liberación de las vesículas sinápticas (Chheda et al., 2001; Betz et al., 2001; Lonart et al., 2003; Nagy et al., 2004).

En células cromafines, los agonistas de GPCRs, tales como los receptores de adenosina (Chern et al., 1988), los receptores de histamina (Marley et al., 1991), los receptores del ácido gamma-aminobutírico (GABA) (Oset-Gasque et al., 1993) o los receptores del PACAP (Przywara et al., 1996), producen un incremento de AMPc y, en todos los casos, estimulan la secreción de CAs. Esa estimulación de la secreción depende de la entrada de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje ya que en ausencia de ese ión en el medio extracelular o bloqueando dichos canales se produce una reducción significativa de la exocitosis (Parramón et al., 1995). Usando fármacos activadores de las AC, como la forskolina, que dan lugar a un incremento de AMPc, no afectan a la secreción basal de CAs, pero sí la potencian en presencia de secretagogos, tales como la angiotensina II, la histamina, la metacolina o el potasio (Álvarez et al., 1997). La forskolina también puede incrementar la secreción por la activación de canales de Ca^{2+} (Morita et al., 1987; Doupnik and Pun, 1992), el bloqueo de canales de K^+ (Garber et al., 1990) o alterando la organización del citoesqueleto (Perrin et al., 1992).

La base molecular de la modulación de la secreción de CAs mediada por AMPc-PKA todavía no se conoce con exactitud. Muchos grupos han demostrado que la PKA es capaz de fosforilar la proteína SNAP-25 en su residuo de treonina 138 (Risinger and Bennett, 1999; Chheda et al., 2001; Hepp et al., 2002; Nagy et al., 2004; Gao et al., 2015). Dicha fosforilación es necesaria para la regulación del tamaño de los grupos de vesículas SRP y RRP, así como el ensamblaje del complejo SNARE (Nagy et al., 2004; Gao et al., 2015).

En células β -pancreáticas, las señales de AMPc intracelulares producidas por agonistas de GPCRs, tales como el GLP-1, el péptido inhibidor gástrico (GIP), el

péptido intestinal vasoactivo (VIP) y PACAP, son fundamentales en la regulación de la secreción de insulina. Todos esos ligandos comentados potencian la secreción de insulina por medio de la señalización AMPc-PKA a través de múltiples mecanismos como la inhibición de los canales de K⁺ sensibles a ATP (Holz et al., 1993), el incremento de la actividad de canales de Ca²⁺ tipo L (Britsch et al., 1995; Kanno et al., 1998; Klinteberg et al., 1996) o incrementando la permeabilidad de la membrana a Na²⁺ (Miura and Matsui, 2003; Filipsson et al., 1998). El GLP-1 es quizás el agonista mejor caracterizado y será comentado en el apartado 1.7 de la introducción de esta tesis.

El AMPc también lleva a cabo una importante función de regulación transcripcional a través de la PKA. Existe una amplia familia de factores nucleares de respuesta al AMPc que se unen y regulan la expresión de genes que contienen elementos de respuesta al AMPc (CRE) en sus regiones promotoras. La fosforilación de esas proteínas de unión a CREB (CREBs, por sus siglas en inglés, *CRE Binding proteins*), mediada por las subunidades catalíticas de la PKA, permite su translocación al núcleo celular y la modulación de su actividad (Chin et al, 2002). En este sentido, el gen de la TH, expresadas solo en células que sintetizan CAs, posee elementos CRE en su región promotora. Desde principios de los años 70, Waymire y colaboradores se dieron cuenta de que la actividad de la TH estaba regulada por un mecanismo íntimamente asociado con la concentración de AMPc (Waymire et al., 1972). Varios años más tarde, otro grupo elaboró un plásmido que contiene un fragmento del gen de la TH. Dicho fragmento abarca 773 pb previos al punto de inicio de la transcripción e incluye las primeras 27 pb de la secuencia transcrita (+27/-773) insertado en un gen reportero bacteriano, CAT (Chloramphenicol Acetyltransferase). Usando ese plásmido se comprobó que el AMPc era capaz de mediar la transcripción del RNA mensajero de la TH incluso en células que no expresan la TH de forma natural (Lewis et al., 1987). Poco después se evidenció que existían elementos CRE en la región promotora del gen de la TH (Harrington et al., 1987; Fader and Lewis, 1990). De esta forma, el AMPc es capaz de inducir la expresión de la TH y la fosforilación de la misma (Joh et al., 1978) a través de la PKA, incrementando así la síntesis de CAs. Esto, unido a que la señalización AMPc-PKA potencia la secreción de CAs, indica que dicha señalización interviene tanto en la síntesis como en la secreción de las mismas.

1.6.2.2. El EPAC y la exocitosis.

El EPAC, también conocido como factor de intercambio de guanina mediado por el AMPc (cAMP-GEF), fue descubierto en 1998 cuando trataba de identificar el mecanismo involucrado en la activación de la GTPasa Rap1 dependiente de AMPc (de Rooij et al., 1998). Por otro lado, y de forma independiente, fue identificado por otro grupo que hacía una búsqueda de genes que codificaran proteínas con dominios de unión a nucleótidos cíclicos, presentes en el cuerpo estriado del cerebro (Kawasaki et al., 1998).

Rap forma parte de una familia de las GTPasas denominadas Ras. Las proteínas Ras alternan dos conformaciones estructurales, una activada en la que se encuentra unida a GTP y otra inactivada unida a GDP. Se activan por medio de las proteínas GEF y se desactivan por proteínas activadoras de las GTPasas (GAP), las cuales hidrolizan el GTP en GDP volviendo a su conformación inactiva. El EPAC es una proteína GEF que controla diversas respuestas celulares por medio de la activación de Rap1 a través de AMPc (Schmidt et al., 2013). A su vez, la proteína Rap1 está implicada en múltiples procesos celulares, tales como la proliferación celular, inactivación de linfocitos T y activación plaquetaria. Han sido identificados dos miembros de la familia de proteínas EPAC, EPAC1 y EPAC2. El EPAC1 se expresa en el tiroides, riñón, ovarios, músculo esquelético y regiones específicas del cerebro. El EPAC2 se expresa predominantemente en tejido cerebral y en tejido adrenal (de Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998).

En ciertas células neuronales, como las que realizan la sinapsis del cáliz de Held, EPAC actúa como diana del AMPc dando lugar a la potenciación sináptica. Usando la forskolina, que incrementa la actividad de las ACs, se produce una potenciación de las corrientes postsinápticas excitatorias. Además, el uso de bloqueadores de la PKA, no antagonizan los efectos potenciadores de la liberación mediada por AMPc (Sakaba and Neher, 2001). Sin embargo, activadores específicos de EPAC, tales como el 8-(4-chlorophenylthio)-2'-O-methyladenosine-3',5'-cyclic monophosphate (8-pCPT), dentro de los terminales presinápticos potencia dicha liberación (Kaneko and Takahashi, 2004). Por tanto, un incremento de AMPc en el terminal nervioso facilita la liberación de transmisores, por el incremento del

número de vesículas liberables, a través de la activación de la ruta mediada por EPAC en el cáliz de Held (Seino and Shibasaki, 2005).

En células β -pancreáticas, la exocitosis inducida a través de AMPc, de forma independiente a la PKA, fue descubierta en 1997 por el grupo de Patrik Rorsman. Usando medidas de capacidad encontraron que la exocitosis de los gránulos de insulina, estimulada por AMPc, no se abolía por completo tras la inhibición de PKA (Renström et al., 1997). Poco después fue publicado un trabajo en el que, usando H-89, un inhibidor específico de PKA, combinado con oligonucleótidos interferentes para inhibir EPAC, se reducía enormemente la secreción de insulina potenciada por incretinas (GIP y GLP-1) (Kashima et al., 2001). Esos resultados sugieren que la potenciación de la secreción de insulina por incretinas es mediada tanto por mecanismos dependientes de PKA como por EPAC.

La secreción de insulina a través de EPAC puede ocurrir por diferentes mecanismos. Primero, EPAC2 puede activar fosfolipasa C (PLC), receptores de rianodina (RyR) y ATPasas de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA) (Dzhura et al., 2011; Pereira et al., 2007). Segundo, EPAC2 puede interactuar directamente con el receptor de sulfonilurea-1 (SUR-1), produciendo el cierre de canales de K^+ dependientes de ATP en respuesta a un incremento en la ratio ATP/ADP y regulando así el nivel de Ca^{2+} intracelular (Zhang et al., 2009). En tercer lugar, la interacción de EPAC2 con las proteínas Rim2, Munc 13-1 y Piccolo potencia la exocitosis dependiente de Ca^{2+} (Fujimoto et al., 2002; Kwan et al., 2007; Wang et al., 2017).

Kawasaki y colaboradores describieron en 1998 la presencia de EPAC2 en tejido adrenal (Kawasaki et al., 1998). También ha sido descrita la vía de señalización mediada por EPAC, a través de la activación de receptores PACAP, activando proteínas Rap1 presentes en células cromafines (Emery et al., 2013). Sin embargo, aún no ha sido estudiada la implicación de EPAC en la secreción de CAS en estas células.

1.7. El GLP-1 y su receptor, el GLP-1R.

El GLP-1 es una hormona que pertenece a la familia de las incretinas. El término de incretinas fue introducido en 1930 por Jean La Barre y Eugene U. Still para describir la actividad humoral que lleva a cabo el intestino para incrementar la secreción endocrina del páncreas (La Barre and Still, 1930).

Al igual que el glucagón, el GLP-1 está codificado por el gen preproglucagón. Distintos procesamientos post-translacionales del preproglucagón darán lugar al glucagón en las células α del páncreas o al GLP-1 y GLP-2 en el intestino y en el cerebro (fig. 1.10) (Heinrich et al., 1984). A su vez, el GLP-1 es procesado de dos formas, una de 31 aminoácidos, el GLP-1-(7-37), y otra de 37, el GLP-1-(1-37). Se comprobó que el más pequeño de ellos es más efectivo para incrementar los niveles de AMPc y liberar la insulina en células de insulinoma de rata (Drucker et al., 1987). Actualmente, está bien establecido el papel del GLP-1-(1-37) como el péptido insulínico bioactivo en intestino y cerebro por lo que se hace referencia a esa isoforma como GLP-1 (Kieffer and Habener, 1999).

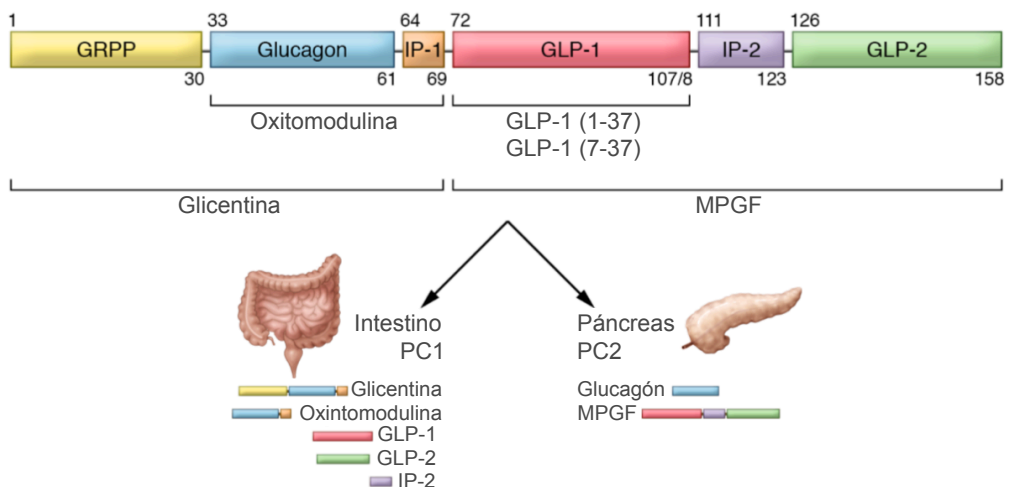


Figura 1.10. Estructura y procesamiento del proglucagón humano. A. Liberación de los péptidos derivados del proglucagón en el páncreas o intestino. PC1, prohormona convertasa 1; PC2, prohormona convertasa 2; MPGF, fragmento de proglucagón mayor. (Modificado de Drucker et al., 2017).

Un incremento de glucosa en sangre debido a la ingesta de alimentos da lugar a la secreción de GLP-1 por las células L-intestinales. Una de las principales funciones del GLP-1 es la potenciación de la secreción de insulina en las células β -pancreáticas (Holst et al., 1987; Mojsov et al., 1987). Además, el GLP-1 actúa sinérgicamente con la glucosa para promover la transcripción del gen de la insulina, ofrecer estabilidad al RNA mensajero generado a partir de dicho gen e inducir su traducción a proteínas. De esa forma, se potencia el relleno de los almacenes de insulina en las células β -pancreáticas (Drucker et al., 1987; Wang et al., 1997; Li et al., 2005). También inhibe la secreción de glucagón, favorece la supervivencia de las células β -pancreáticas y disminuye el vaciamiento gástrico del estómago. En el sistema nervioso central, el GLP-1 aumenta la neuroprotección y disminuye la sensación de apetito (Baggio and Drucker, 2007).

Todas estas funciones del GLP-1 están mediadas por la unión a su receptor, el GLP-1R. Dicho receptor fue clonado y secuenciado por primera vez en 1992 mediante la construcción de una librería de ADN complementario a partir de preparaciones de islotes pancreáticos de rata (Thorens, 1992). Se trata de un receptor acoplado a proteína G de 7 dominios transmembrana con un dominio amino-terminal extracelular esencial para la unión de su ligando y un dominio carboxilo-terminal citoplasmático. La fosforilación en residuos específicos del extremo carboxilo-terminal son fundamentales para la desensibilización y la internalización del receptor (Widmann et al., 1997; Baggio et al., 1999; Baggio and Drucker, 2007).

Además del GLP-1, otro agonista del GLP-1R es la exendina-4 (Ex-4). Se trata de un péptido aislado del veneno de la saliva de un lagarto que habita en zonas áridas de América, conocido como el "monstruo de Gila" (*Heloderma suspectum*). Ya en 1992 se había encontrado que tanto la exendina-3 como la Ex-4 aumentaban la secreción de insulina cuando se administraban en perros (Eng et al., 1992) pero fue en 1993 cuando se comprobó que la Ex-4 actuaba como agonista del GLP-1R (Göke et al., 1993). Es un péptido de 39 aminoácidos cuya homología en su estructura con el GLP-1 alcanza el 53%. Ha sido localizado en una amplia variedad de tejidos que incluyen las células α - β - y δ -pancreáticas, pulmón, corazón, riñón, estómago, intestino, pituitaria, piel y varias regiones del SNC (Baggio and Drucker,

2007). También se ha descrito la presencia del RNA mensajero del receptor en las células PC12 (Perry et al., 2002).

La Ex-4 tiene varias ventajas sobre el GLP-1, es un agente insulinotrópico más potente y mantiene sus niveles en plasma durante más tiempo (Greig et al., 1999). La vida media del GLP-1 en circulación es aproximadamente de 2 minutos sufriendo una rápida inactivación por parte de la enzima proteolítica dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4). Se ha estimado que los metabolitos resultantes de dicha proteólisis se mantienen en plasma durante 5 minutos antes de ser eliminados a través del riñón por filtración glomerular, captación tubular y catabolismo (Ruiz-Grande et al., 1993). En el caso de la Ex-4, esta es capaz de mantenerse en plasma durante aproximadamente 120 minutos debido a que posee una glicina en la posición 2 de su secuencia de aminoácidos que evita su proteólisis por la DPP-4 (Baggio and Drucker, 2007).

En el año 2003 se publicó un estudio en el que evaluaban el efecto de una Ex-4 sintética, la exenatida, en el control de la glicemia en pacientes con diabetes tipo 2 (Fineman et al., 2003). Estudios previos realizados en animales habían dado a conocer su eficacia en la potenciación de la secreción de insulina (Young et al., 1999; Parkes et al., 2001), la supresión de la secreción de glucagón (Gedulin et al., 1999) y el enlentecimiento del vaciamiento gástrico (Jodka et al., 2000) por lo que todo ello indicaba que podría tratarse de un agente terapéutico prometedor para los pacientes con diabetes tipo 2. En el año 2005 se aprobó el uso clínico de la exenatida y actualmente, con muchos avances en sus formas farmacéuticas, sigue siendo un fármaco ampliamente usado para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.

Como ya se ha comentado anteriormente, las células cromafines tienen receptores acoplados a proteína G que modifican la liberación de las CAs por medio de la regulación de segundos mensajeros intracelulares. Algunos de estos receptores también se expresan en las células β -pancreáticas alterando, en este caso, la liberación de insulina. El principal receptor de estas células, que interviene en la regulación de la secreción de insulina, es el GLP-1R, el cual, además, también ha sido descrito en células PC12. Debido al parentesco de las PC12 con las células cromafines nos planteamos las siguientes preguntas que serán abordadas en esta

tesis: ¿el GLP-1R se expresa en las células cromafines? si ese fuera el caso, ¿qué papel fisiológico podría llevar a cabo en estas células?, ¿estaría regulando la liberación de CAs?, ¿cuál sería la vía de segundos mensajeros que estimulada tras su activación?

Hipótesis y objetivos

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

Nuestro equipo de trabajo se ha dedicado durante 30 años al estudio de los factores celulares involucrados en la exocitosis de catecolaminas (CAs) en las células cromafines. Para continuar ahondando en los mecanismos que controlan la eficacia de la exocitosis, planteamos las siguientes hipótesis y objetivos asociados:

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS I.

La vía del AMPc, estimulada a través del receptor de incretinas GLP-1R, modula la síntesis y la liberación de neurotransmisores en células cromafines.

Los objetivos para abordar esta hipótesis son:

- i. Identificación, caracterización y localización de la expresión de GLP-1R en cultivos primarios de células cromafines bovinas.
- ii. Comprobar el efecto de la activación del GLP-1R en la síntesis de CAs.
- iii. Analizar los mecanismos de regulación de la secreción de CAs tras la activación del GLP-1R.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS II.

La cantidad de CAs acumulada en las vesículas secretoras y su exocitosis puede ser diferente en las células cromafines en función del tipo de CA que contiene.

Los objetivos para abordar esta hipótesis son:

- i. Determinar las características de la secreción y parámetros cinéticos de la exocitosis de CAs en un modelo animal carente de adrenalina.

Material y métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. Reactivos y constructos de DNA.

Los siguientes productos se adquirieron de Sigma-Aldrich: ácido bicinconínico, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico, ácido perclórico, adrenalina, albúmina de suero bovino, alúmina, azida sódica, azul de Coomassie, azul de tripán, cebadores oligo “d (T)”, colagenasa, 3-4-dihidrobencialamina, dimetil fenil piperazinio, fenol-cloroformo, heptasulfonato sódico, insulina bovina, kanamicina, L-DOPA, noradrenalina, penicilina, Percoll[®], persulfato de amonio, poli-D-lisina, tripsina, Tri-Reagent, Tritón-X 100, TWEEN[®] 20 y los medios de cultivo Dulbecco Modified Eagle,-Ham’s F12 y RPMI-1640.

El kit de determinación de luciferasa y DNasa I provienen de Promega. El suero bovino fetal, suero de caballo de Biowest y gentamicina de Acofarma. La exendina-4 la obtuvimos de Tocris. El Urografin[®], cebadores con secuencias aleatorias en forma de hexámeros, proteinasa K y cóctel inhibidor de proteasas cOplete[®] de Roche. El kit de purificación de RNA se obtuvo de Zymo Research, el kit de PCR de GenScript y los marcadores de peso molecular de proteínas y de DNA de BioRad. El Gel Red de Biotium. El glucómetro y las tiras reactivas de Accu-Chek, Roche.

La síntesis de los oligonucleótidos la realizó la casa comercial *Integrated DNA Technologies* (IDT) para los cebadores de DNA. Las enzimas de restricción son de la compañía Takara Bio Inc.

La calidad de todas las sales empleadas fue de grado reactivo de Merck o Sigma-Aldrich, el agua fue purificada en un sistema Elix10/MiliQ Gradient A-10 de Millipore.

En el anexo I se muestra una tabla con la composición de las soluciones más comunes empleadas.

El plásmido que contiene la secuencia del GLP-1R en fusión con la proteína fluorescente verde (GLP-1R-EGFP) fue cedido amablemente por el Dr. Alessandro Bisello (University of Pittsburgh, School of Medicine) (Syme et al., 2006) y el

constructo del promotor de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) insertado en el vector pGL3-Basic expresando la luciferasa de luciérnaga (p5' TH-Luc (-272/+27)/Luc) fue proporcionado afectuosamente por la Dra. Esther L. Sabban (New York Medical College) (Nakashima et al., 2003). El plásmido que contiene la secuencia de la CgA fusionada con la proteína verde fluorescente (CgA-EGFP) fue diseñado en nuestro laboratorio. El producto de PCR que contiene la secuencia completa de la CgA se clonó directamente dentro del vector pEGFP-N3 (Clontech-BD Bioscience, Palo Alto, CA, USA) usando las dianas de restricción EcoRI y KpnI (Domínguez et al., 2014). El vector pEGFP-N1 fue obtenido en Clontech Laboratories.

3.2. Modelo animal.

Se han empleado ratones que han sido criados y mantenidos en el Estabulario de la ULL en condiciones controladas y siempre cumpliendo con “el principio ético de las 3 Rs: reducción, refinamiento y reemplazo”. El uso de estos animales ha sido aprobado por el comité ético de la investigación (con números de registro: CEIBA2010-0159 y CEIBA2017-0244).

El Estabulario está inscrito como centro de cría, suministrador y centro usuario en la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias con el número de registro 52-Q3818001-D-02. El proyecto de investigación en el que se desarrolla esta tesis cuenta con el informe favorable del Comité Ético de la Investigación y el Bienestar Animal (CEIBA) de la ULL.

Los animales utilizados en los procedimientos experimentales se trasladan al laboratorio de 4 a 7 días antes de realizar el experimento con el fin de que se aclimaten al nuevo lugar. En el laboratorio se estabulan en un rack ventilado (Tecniplast®, Buguggiate, Italia) con condiciones ambientales controladas (ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, y agua y comida *ad libitum*).

3.3. Genotipado de ratones.

En el año 2013 obtuvimos la cepa de ratones carentes de adrenalina (PNMT-KO), desarrollada por el grupo del Dr. Steven N. Ebert. La base genética de esos ratones proviene de la cepa 129x1/SvJ, los cuales usamos como ratones control (WT) en nuestros experimentos (Ebert et al., 2004). Se verifica el genotipo de todos los ratones utilizados en los experimentos.

Para la determinación del genotipo, se extrae DNA a partir de biopsias de cola de ratón, mediante su digestión con proteinasa K y purificación con cloroformo de fenol. A partir de ese DNA, se realiza una amplificación del mismo mediante PCR empleando dos cebadores para discriminar el alelo mutado y el no mutado del gen que codifica para la enzima PNMT. Los detalles para extracción del DNA, las PCR y la visualización del resultado puede encontrarse en el anexo III.

3.4. Aislamiento y cultivo de células.

3.4.1. Cultivo primario de células cromafines bovinas.

Las glándulas adrenales de vaca han sido proporcionadas por el Matadero Insular de Tenerife. Una vez extraídas del animal son trasladadas al laboratorio en un intervalo de tiempo no superior a 30 min. El aislamiento y cultivo de las células cromafines adrenales se realiza en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar vertical y siguiendo las recomendaciones descritas por (Domínguez et al., 2012; Moro et al., 1990).

Los pasos seguidos se detallan en el anexo IV.

En los casos en los que las células deban sembrarse en cubreobjetos, para conseguir una buena adhesión de las células, éstos se tratan con poli-D-lisina de la siguiente manera:

- Se coloca un cubreobjetos, previamente flameado por ambos lados, en cada pocillo de una placa de 96 pocillos.
- Se pone una gota de poli-D-lisina al 0,01% sobre cada cubreobjetos, se deja secar 30 min en una estufa a 37°C y se lava 3 veces con agua filtrada. Una vez

lavados, se deja la tapa de la placa abierta dentro de la campana de flujo laminar durante 10 min para permitir la evaporación de los restos de agua.

Las células sembradas se mantienen a 5% de CO₂ y 37°C en una atmósfera saturada de humedad en la estufa de cultivo y se utilizan durante un periodo máximo de 4 días.

3.4.2. Cultivo primario de células cromafines murinas.

El protocolo para el aislamiento y cultivo de las células cromafines adrenales de ratón es una modificación del descrito por (Sørensen et al., 2003; Domínguez et al., 2012). Todos los procedimientos se llevan a cabo en condiciones estériles.

El protocolo para el cultivo de las células se detalla en el anexo V.

Las células se utilizan entre 24 y 72 horas después de haber sido sembradas.

3.4.3. Cultivo de la línea celular PC12.

La línea celular neuroendocrina PC12, derivada de feocromocitoma de rata (Greene & Tischler, 1976), se mantienen en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10 mM de HEPES, 5% de FBS, 5% de HS, y los antibióticos gentamicina (40 mg/mL) y penicilina (100 UI/L). Las células se mantienen en frascos de cultivo de 75 cm² en una estufa con 5% de CO₂, a 37°C con atmósfera saturada de humedad, y cada 2-3 días se subcultivan.

Esta línea celular prolifera fundamentalmente en suspensión formando agregados celulares, por lo que para subcultivarlas se recoge el medio de cultivo, se centrifuga a 900 xg durante 5 min y se resuspende en medio fresco previamente precalentado a 37°C a una dilución 1/4.

Para hacer el recuento de las células debemos individualizarlas haciendo pasar la suspensión celular por una aguja de calibre G22 de 20 a 25 veces. El recuento se realiza de la misma forma que el descrito para las células cromafines bovinas en el anexo IV.

3.5. Transfección de células.

Las células cromafines bovinas se electroporan usando un dispositivo nucleofector siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. La nucleofección requiere que las células estén en suspensión por lo que, en el caso de las células cromafines bovinas, el procedimiento se lleva a cabo tras el protocolo de aislamiento celular; en el caso de las PC12, éstas crecen en suspensión. Se usan $3 \cdot 10^6$ células por condición, resuspendidas en 100 μ L de solución de nucleofección (Basic Nucleofector[®] Kit for Primary Mammalian Neurons) conteniendo 3 μ g de los plásmidos. Esta suspensión celular se transfiere a una cubeta de electroporación y se somete al programa O-005, para las células cromafines o el programa U-029, para las PC12. Las células se han utilizado en un periodo entre 24 y 72 horas post-nucleofección.

3.6. PCR.

3.6.1. Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA de cromafines bovinas.

El RNA total de las cromafines bovinas se extraen usando Tri-Reagent y el kit Direct-zol[™] RNA Miniprep. $4 \cdot 10^6$ células se lisan en 800 μ L de Tri-Reagent. Después de añadir 200 μ L de cloroformo y mezclar, las muestras se centrifugan a 12.000 xg durante 15 min a 4°C. Un volumen de etanol absoluto se añade al sobrenadante, se mezcla y luego el RNA se lava y eluye usando Direct-zol[™] RNA Miniprep siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA genómico residual se elimina mediante un paso de digestión con DNasa I. La integridad del RNA se determina por medio de electroforesis en gel de agarosa para comprobar que aparecen las dos subunidades del RNA ribosómico. Además, el RNA se cuantifica por absorbancia usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) con el que también se miden las densidades ópticas (OD) OD₂₆₀ y OD₂₈₀, indicativas de la pureza de las muestras.

La reacción de retrotranscripción se lleva a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante a partir de 2 μ g del RNA total, usando una mezcla 1:1 de cebadores oligo “d (T)” y cebadores aleatorios en forma de hexámeros.

3.6.2. Diseño de los oligonucleótidos para la PCR.

En el diseño de los oligonucleótidos para PCR, cada pareja se selecciona en función de 3 criterios. Primero se determina sean específicos de la secuencia del GLP-1R. Para ello se realiza un *nucleotide BLAST* con las secuencias candidatas a oligonucleótidos con el objeto de ser alineadas con el genoma bovino. Segundo, cada pareja de cebadores se diseña teniendo en cuenta la temperatura de melting (T_m). En concreto, hemos determinado el uso de oligonucleótidos con T_m de 59°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). El tercer criterio es la longitud del amplicón. La longitud media seleccionada es de ≈ 100 bp.

3.6.3. PCR.

Para determinar la expresión del GLP-1R en células cromafines bovinas se realiza una PCR convencional partiendo de las muestras de DNA complementario (cDNA) comentadas en el apartado anterior. Cada muestra se analiza por triplicado en un volumen de reacción total de $20\ \mu\text{L}$ consistiendo en una dilución de 10 veces el cDNA, $2\ \mu\text{L}$ de $10\times$ buffer (*GenScript*), $2,5\ \text{mM}$ Mg^{2+} , $100\ \mu\text{M}$ desoxiribonucleótidos trifosfatos, 5 U de Green Taq DNA polimerasa y $0,25\ \mu\text{M}$ de cada uno de los cebadores. Las condiciones de la reacción fueron 94°C durante 2 min seguido de 40 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 20 segundos y 72°C durante 30 segundos. Para cada experimento, una reacción sin muestra de cDNA se incluye como control negativo.

Como control interno de la PCR, usamos un gen de expresión constitutiva, la hipoxantina fosforibosil transferasa (HPRT), establemente expresado. La secuencia de los cebadores utilizados fueron las siguientes: GLP-1R forward: 5'-TCCTTCATCCTCCGAGCACT-3' y reverse: 5'-TGCATGAGCAGGAACACCAG-3' y HPRT-F: 5'-CTCATGGACTGATTATGGACA-3' y HPRT-R: 5'-GCAGGTCAGCAAAGAACTTAT-3'.

Con el resultado de la PCR se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 1,7% con el fin de observar las bandas correspondientes al GLP-1R y la HPRT.

3.7. Western-blot.

3.7.1. Preparación de las muestras.

Las células cromafines bovinas se lisan en una solución TENT 1% (su composición se muestra en el anexo I), suplementada con un cóctel inhibidor de proteasas. Posteriormente se someten a ultrasonidos con un sonicador Labsonic[®] M (Sartorius) y se conservan a -80°C hasta su utilización.

La cantidad total de proteínas en cada muestra se determina por el método del ácido bicinonínico.

3.7.2. Separación de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE.

La separación de las proteínas se realiza en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE, “sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis”). Los extractos de proteínas se mezclan con el tampón de carga 6x (*Laemmli*) de forma que la muestra quede a una concentración final de 1x. El *Laemmli* contiene SDS y β -mercaptoetanol que permite la desnaturalización de las proteínas, glicerol para aportar densidad homogénea a la muestra y facilitar su carga en los pocillos del gel y azul de bromofenol como marcador del frente de avance de la electroforesis (Las cantidades exactas de cada componente se muestran en el Anexo I). A continuación, las muestras se someten a 95°C durante 5 minutos para desnaturizar las proteínas. Se utilizan geles discontinuos con una zona de compactación (“stacking” 4%) que contiene los pocillos y otra de separación (“resolving” 7,5%) (La composición de cada uno de estos geles se muestra en el anexo I).

Se carga cada muestra en el gel y junto a ellas un marcador de pesos moleculares (Precision Plus Protein[™] Dual Color Standards, BioRad). La electroforesis se lleva a cabo en el sistema Mini Trans-Blot[®] Cell (BioRad) con el tampón de electroforesis SDS-PAGE (25 mM de Tris-base a pH 8,3; 192 mM de glicina; 0,1% de SDS) a un amperaje constante de 40 mA por gel.

3.7.3. Transferencia de las proteínas a membranas de PVDF.

Las proteínas separadas por electroforesis se transfieren a una membrana de polivinilideno difluoruro (PVDF, Immobilon-P Transfer Membranes, Millipore) de 0,45 µm de poro. Se lleva a cabo una transferencia húmeda donde el gel con las proteínas y la membrana se coloca en la cubeta de transferencia llena de solución de transferencia (25 mM Tris-base a pH 8,3; 192 mM de glicina; 0,04% de SDS y 20% de metanol) y se aplica corriente durante 90 min, a un amperaje constante de 350 mA.

Debido a la alta hidrofobicidad de las membranas de PVDF, deben ser activadas antes de la transferencia, para ello se sumergen durante 15 s en metanol absoluto, 2 min en agua milli-Q y, por último, 5 min en tampón de transferencia. Después de la transferencia, la membrana se reactiva y se bloquea durante al menos 30 min, a temperatura ambiente y en agitación horizontal, en una solución de leche desnatada (*Svelty*[®], *Nestle*) al 5% en TBSt (50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl y 0,1% de Tween-20). El bloqueo permite que los sitios de adsorción de la membrana, no ocupados por proteínas, sean ocupados por proteínas de la leche y de esa manera, evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos posteriormente utilizados. Tras el bloqueo se lava la membrana con TBSt 3 veces durante 5 min a temperatura ambiente y en agitación.

Posteriormente, se procede al marcaje con el anticuerpo primario, preparado en una solución de PBS con 1% de BSA (Bovine Serum Albumin) y 0,01% de azida sódica. La incubación con el anticuerpo primario se realiza durante toda la noche a 4°C o durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación, dependiendo del anticuerpo y la proteína a detectar (diluciones de anticuerpos descritas en el anexo II).

A continuación, la membrana se lava en TBSt 3 veces durante 5 min cada lavado, a temperatura ambiente y en agitación. A continuación, se incuba con el anticuerpo secundario que está unido a la peroxidasa de rábano, diluido 1/10000 en TBSt. Luego, la membrana se lava 3 veces en TBSt durante 5 min cada lavado. Finalmente, se revela el marcaje añadiendo el sustrato de la peroxidasa (Clarity Western ECL Substrate, BioRad). La señal de quimioluminiscencia emitida se

detecta con el sistema de captura de imagen (ChemiDoc™ MP, BioRad) y se analiza usando el software provisto por el fabricante (ImageLab).

Para marcar la misma membrana con otros anticuerpos se realiza un proceso de “stripping” (término utilizado para describir la eliminación de los anticuerpos primarios y secundarios de una hibridación previa en una membrana de *western-blot*). Primero, se incuba la membrana con una solución de “stripping” (152 mM de glicina, 0,1% (p/v) de SDS, 1% (v/v) de Tween-20, a pH 2-3) durante 30 min. Luego se hacen dos lavados de 10 min en una solución de NaCl 50 mM y, por último, dos lavados de 5 min con TBSt, a temperatura ambiente y en agitación. A continuación, se puede volver a comenzar con el proceso de bloqueo e hibridación con diferentes anticuerpos como se describió anteriormente.

3.8. Inmunofluorescencia.

Realizamos esta técnica para comprobar la localización del receptor GLP-1R. Las células cromafines bovinas ($5 \cdot 10^6$ células cultivadas), sembradas sobre cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro tratados con 0,01% de poli-D-lisina, fueron fijadas durante 10 min a RT en una solución de 4% de paraformaldehído / 150 mM de sacarosa en PBS. Tras ello, las células se lavan 3 veces con PBS y se incuban durante 1 h en una solución de permeabilización (0,1% Tween-20 en PBS). En el caso de las células sin permeabilizar se obvia ese último paso. A continuación, se bloquean con 5% de BSA en PBS / 150 mM de sacarosa para el caso de las células sin permeabilizar o 5% de BSA en la solución de permeabilización para el caso de las permeabilizadas. La incubación con los anticuerpos primarios anti-GLP-1R y anti-TH (diluciones de anticuerpos descritas en el anexo II) se realiza durante toda la noche en una cámara refrigerada a 4°C y con agitación orbital.

Al día siguiente, se retiran los anticuerpos y las células se lavan con PBS 3 veces durante 10 min. Luego se incuban durante 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos anti-IgG Alexa Fluor® 488 para el marcaje del GLP-1R y anti-IgG Alexa Fluor® 568 para el marcaje de la TH (las diluciones de los anticuerpos se muestran en el apartado 3.2). Tras 3 lavados con PBS durante 10 min, los cubreobjetos se retiran de la solución y se montan usando Fluoroshield® con DAPI (*Sigma-Aldrich*). Las imágenes de microscopía se realizan en

secciones medias x-y en un microscopio confocal Leica TCS SP8 (Leica Microsystems) y se analizan empleando el software Metamorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

3.9. Microscopia de onda evanescente o TIRFM.

Con el fin de estudiar eventos concretos de exocitosis, las células cromafines bovinas, sobreexpresando CgA acoplada a la proteína fluorescente verde (EGFP), se visualizan por medio de microscopía TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy), también llamada de onda evanescente. Esta técnica permite excitar selectivamente fluoróforos en soluciones acuosas o en células localizados a una distancia inferior a 200 nm desde una superficie sólida, sin excitar a aquellas estructuras que se encuentran a una distancia mayor. De esta forma, podemos estudiar el movimiento de los gránulos secretores que contienen CgA-EGFP ubicados en la proximidad de la membrana, así como la exocitosis y endocitosis de dichos gránulos.

Para visualizar las células se utiliza un microscopio invertido (Zeiss 200M; Axiovert, Jena, Alemania) a través de un objetivo de apertura numérica de 1,45 (α Fluor, 100X/1,45; Zeiss) tal y como está descrito en (Barroso-González et al., 2009). Brevemente, el cubreobjetos con las células adheridas en su superficie se pone en contacto con el objetivo del microscopio a través de aceite de inmersión ($n_{488} = 1,518$; Zeiss). Para la iluminación de campo evanescente, se emplea luz monocromática (488 nm) de un láser de iones de argón (Lasos; Lasertechnik GmbH, Jena, Alemania) filtrada con un filtro pasa banda (488/10; Zeiss) y que utilizamos para excitar de manera específica la EGFP. El haz de luz se centra en una posición en el plano focal posterior del objetivo y después de introducir el cubreobjetos con las células, la luz se somete a la reflexión interna total al chocar contra la interfaz entre el vidrio y la solución de células en un ángulo determinado. La reflexión interna total genera un campo evanescente que disminuye exponencialmente al aumentar la distancia desde la interfaz, dependiendo del ángulo en el que la luz incide en dicho interfaz (Axelrod et al., 1983; Steyer and Almers, 2001). El rayo láser se incide sobre el cubreobjetos a 64-66° respecto a la normal.

La luz de excitación (488 nm) se dirige al objetivo por un espejo dicróico 510 nm y un filtro de emisión HP525/50 BP. Todos los filtros fueron provistos por Chroma Technology (Brattelboro, VT, USA). Las imágenes se proyectan sobre una cámara digital CCD-EM (C9100-13, Hamamatsu Photonics, Japón) y cada imagen se registra usando el software de adquisición HC Image (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japón) durante una exposición de 10 ms a 10 Hz.

La intensidad de fluorescencia se calcula usando el programa Metamorph. Los eventos excitóticos se localizan y se encuadran en una pequeña región circular de 1,38 μm de diámetro para calcular la fluorescencia media dentro de la misma. El ruido de fondo se calcula dibujando una región circular de 5,53 μm de diámetro en torno a la primera, calculando la fluorescencia media de esa región mayor y finalmente, substrayendo una de otra.

3.10. Determinación de la actividad de la luciferasa.

La determinación cuantitativa de la luciferasa expresada en células PC12, tras la transfección de dichas células, se realiza mediante un ensayo de detección de bioluminiscencia. Dicha bioluminiscencia es emitida tras la reacción entre la D-luciferina y el ATP, mediada por la enzima luciferasa (fig. 3.1).

Usando el kit de determinación de luciferasa (Steady-Glo[®] Luciferase Assay System, Promega) con las indicaciones del fabricante, se realiza la medición en una placa blanca de 96 pocillos a la que se añaden 50 μL de la solución estándar de ATP y luciferina y el mismo volumen de la muestra a determinar. El luminómetro estándar empleado (VICTOR[™] X5 Multilabel Reader, Perkin Elmer, USA) nos da la medida de la bioluminiscencia en cada pocillo.

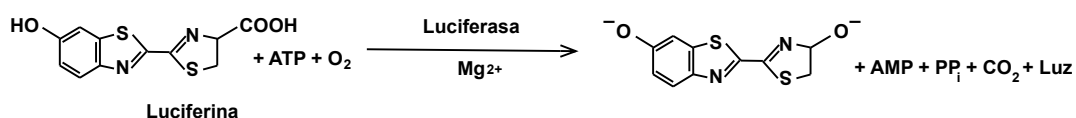


Figura 3.1. Reacción catalizada por la luciferasa. La mono-oxigenación de la luciferina es catalizada por la luciferasa en presencia de Mg²⁺, ATP y oxígeno.

3.11. Cromatografía líquida de alta presión con detección electroquímica (HPLC-ED).

Para el análisis de las CAs mediante HPLC-ED, los lisados de glándulas adrenales o de células se diluyen en 0,05N de PCA y 200 nM de DHBA como estándar interno.

Las muestras se separan con una columna cromatográfica (Tracer Analítica, Teknokroma, Barcelona) de 12,5 cm de largo y rellena con Spherisorb ODS-2 de un tamaño de partícula de 5 μm . La fase móvil para la separación de CA que se emplea es un tampón fosfato: 9,66 g/L de NaH_2PO_4 : 3,72 mg/L de EDTA y 1 g/L de heptasulfonato sódico. El pH se ajusta a 3,1 con ácido fosfórico y se añade metanol al 7-10% (v/v). La mezcla se filtra mediante un filtro de 0,22 mm (Millipore) y se desgasifica mediante el burbujeo con helio (Borges et al, 1986).

Se emplea un equipo cromatográfico (fig. 3.2) que consta de una bomba (modelo LC-6^a, Shimadzu) que bombea la fase móvil a un flujo constante de 1 mL/min hacia un inyector automático (modelo SIL-6B, Shimadzu) a través del cual se inyectan las muestras. Las muestras se pasan por la columna antes mencionada y se dirigen hacia un detector electroquímico (modelo LC-4B, Bioanalytical Sciences, USA). La señal resultante de la oxidación de las CAs se digitaliza a una frecuencia de 1 Hz empleando un programa de adquisición desarrollado en nuestro laboratorio por el Dr. Yézer González.

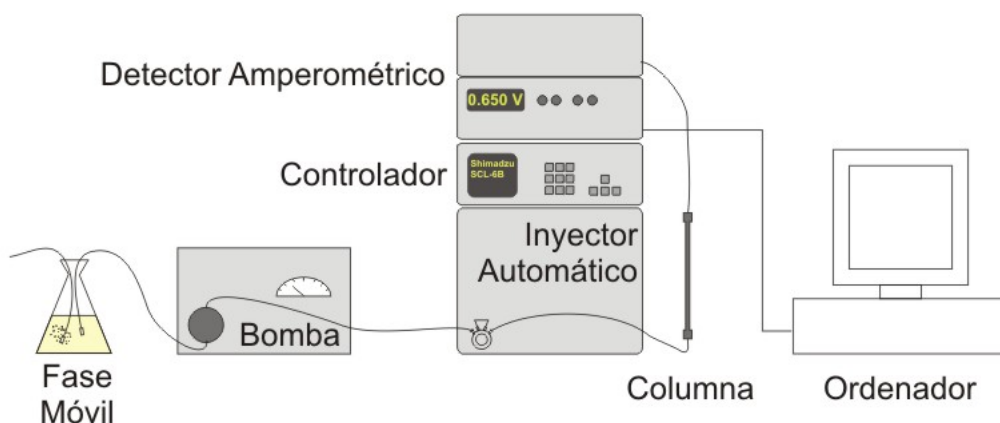


Figura 3.2. Esquema del equipo cromatográfico.

Las CAs poseen dos residuos en su anillo catecol que son fácilmente oxidables, dando lugar a la liberación de dos protones y dos electrones por cada molécula oxidada (fig. 3.3). Para ello aplicamos un voltaje constante de +650 mV frente a un electrodo de referencia, lo cual es suficiente para oxidar las CAs, ya que su potencial redox está en torno a +500 mV (Kissinger et al., 1977; Leszczyszyn et al, 1990). Los electrones liberados por la reacción son los que se detectan por el electrodo del detector amperométrico.

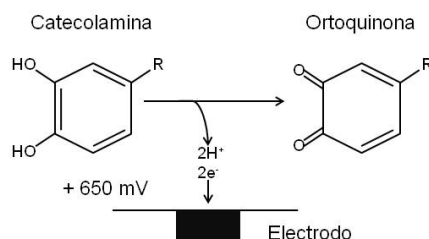


Figura 3.3. Esquema de la reacción de oxidación de las CAs ante un potencial de oxidación.

Para el análisis de los picos cromatográficos de las CAs se utiliza como estándar interno el DHBA, a una concentración conocida de 200 nM. Debido a que cada molécula se comporta de manera diferente al pasar por la columna (en tiempo de retención y en área bajo la curva), hay que calcular el factor de corrección (FC) para cada una de las moléculas. Para ello se inyecta una mezcla de estándares (adrenalina, noradrenalina, dopamina y DHBA) a una concentración de 200 nM. Una vez obtenida el área bajo la curva de cada pico, se normaliza por el área del DHBA obteniendo así cada FC. En cada muestra se mide el área bajo la curva de la molécula de interés y se utiliza el área de DHBA para conocer la concentración de la CA en cuestión.

$$\text{Concentración (nM)} = \frac{\text{área CA} \times \text{FC} \times [\text{DHBA}]}{\text{área DHBA}}$$

donde,

área CA, es el área bajo la curva de cada una de las CA; FC, es el factor de corrección para cada CA (área DHBA / área CA); [DHBA], es la concentración del estándar interno; área DHBA, es el área bajo la curva del estándar interno.

Una vez calculada la concentración de las moléculas de interés se normalizan los datos por las proteínas totales de la muestra (determinado por el método del ácido bicinónico) y así se pueden comparar las diferentes condiciones experimentales. Las comparaciones se realizaron con el test *U*-Mann-Whitney.

3.12. Estudio de secreción de CAs a tiempo real.

Con este ensayo se pretende medir la cantidad de CAs secretadas por una población de células cromafines. Para ello, 4×10^6 células cromafines bovinas se siembran en placas de Petri de 92 mm de diámetro y se mantienen en estufa a 5% de CO₂ y 37°C. En el momento del ensayo, las células se levantan con ayuda de una espátula y se pasan a un filtro Whatman de 22 μm de tamaño de poro. Las células son retenidas en ese filtro mientras se perfunden con una solución de Krebs-HEPES a 2 mL/min (fig. 3.4).

Un sistema de electroválvulas controla el momento en el que se hace pasar un secretagogo sobre las células. Se utiliza una solución de 10 μM de DMPP disuelto en solución Krebs-HEPES como secretagogo y se hace pasar sobre las células cada 5 min, mediante pulsos de 10 segundos de duración. Las CAs secretadas se registran al llegar a un detector electroquímico (LC-4B, BioAnalytical Systems) con un potencial de oxidación de +650 mV, conectado a un sistema de adquisición PowerLab 8/30 (ADInstruments). La secreción de CAs se cuantifica mediante la integración de cada espiga amperométrica obtenida.

Además, la solución secretada es recolectada para posteriormente determinar las proteínas presentes en ella por medio de *dot-blot* (comentado en el apartado 3.13).

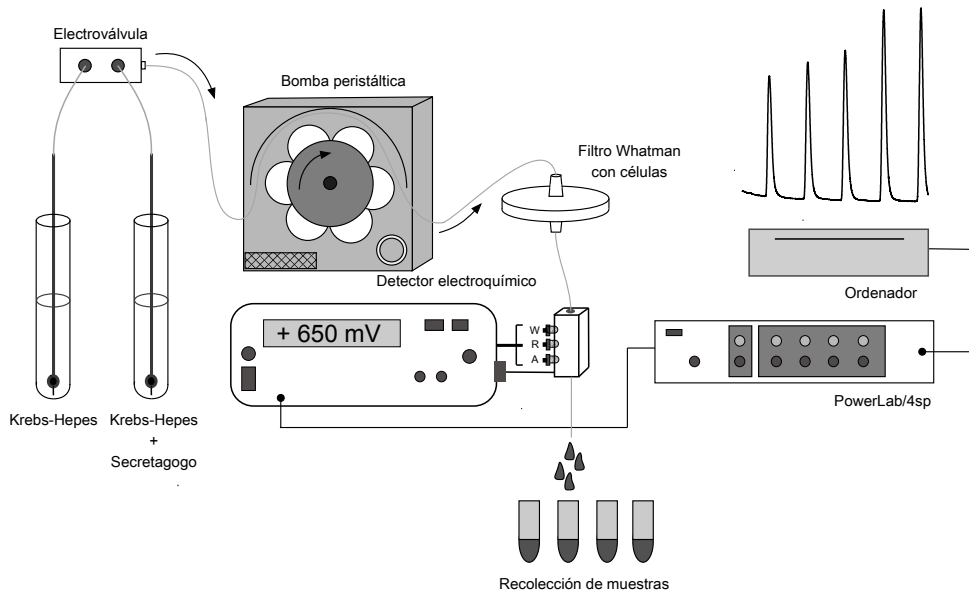


Fig. 3.4. Esquema del equipo utilizado para la determinación de la secreción a tiempo real. Por medio de una bomba peristáltica se bombea solución de Krebs-HEPES (solo o con los fármacos disueltos) a las células. El estímulo secretagogo aplicado a las células es DMPP 10 μ M. Una electroválvula controlada por el ordenador ajusta qué solución pasa en cada momento y durante cuánto tiempo. A continuación, la solución secretada pasa por el detector amperométrico (detector: W-trabajo, R-referencia, A-auxiliar) para finalmente, ser recolectada y analizada por *dot-blot*. El PowerLab/4sp permite la adquisición de los datos que se almacenan en el ordenador para su posterior análisis.

3.13. Detección de proteínas mediante *Dot-blot*.

Las muestras secretadas por las células cromafines bovinas en los ensayos de secreción a tiempo real (en el apartado 3.13) se concentran en una membrana de PVDF colocada en una cubeta de *dot-blot* (Slotblot, GE Healthcare, Europe GmbH). Dicha cubeta consta de tres soportes: el primero constituido por 48 pocillos donde se colocan las muestras, el segundo hace de soporte para la primera placa y ajusta la membrana de PVDF colocada entre ambas y el tercero recolecta el eluido. Este sistema se conecta a una bomba de vacío que obliga a las muestras a atravesar la membrana quedando, de esa forma, las proteínas retenidas en ella. Una vez que pasan las muestras, se realizan 3 lavados con solución Krebs-HEPES, la misma solución donde están resuspendidas las muestras.

A continuación, la membrana se trata para la hibridación con anticuerpos como se detalló en el apartado 3.8.3.

3.14. Test de tolerancia a la insulina.

Se realiza un test de tolerancia a la insulina a ratones WT (129x1/SvJ) y PNMT-KO. Los ratones se mantienen en ayuno durante 14 h. Al iniciar el test, se corta 0,3 cm de cola para tomar muestras de sangre y así medir la glucemia usando un glucómetro estándar. A continuación, se inyecta un bolo de insulina bovina por vía intraperitoneal (0,75 UI/kg de peso corporal, en 0,9 % de NaCl). Seguidamente se toman muestras de ~ 20 µL de sangre de la cola a diferentes tiempos (0, 30, 60, 90, 120 y 210 min) para la determinación de glucosa en sangre.

3.15. Monitorización de las CAs contenidas en la adrenal tras la hipoglucemia inducida por insulina.

Se realizan medidas de glucosa en sangre, siguiendo el procedimiento indicado en el apartado anterior, a los 0, 60, 120, 180 y 450 min, tras la inyección de insulina bovina. Al menos 3 ratones de cada grupo temporal se sacrifican por dislocación cervical y las adrenales se aíslan, se lisan en PCA frío y se centrifugan a 13.000 rpm durante 5 min en una centrífuga refrigerada a 4°C. El pellet resultante de esa centrifugación corresponde a restos celulares, que se desechan, y las CAs se encuentran en el sobrenadante. Dicho sobrenadante se mezcla con DHBA a una concentración final de 200 nM, usado como estándar interno, y se analiza el contenido de CAs por HPLC-ED.

3.16. Detección de CAs por medio de amperometría en célula única.

3.16.1. Elaboración de los electrodos de carbono.

3.16.1.1. Fabricación.

La fabricación de los microelectrodos se lleva a cabo siguiendo el proceso descrito por (Kawagoe et al., 1993) con las modificaciones que se describen en (Machado et al., 2008). Brevemente, con una bomba de aire se aspira una fibra de carbono de 5 µm (Thornel P-55; Amoco Corp., Greenville, SC) en el interior de un capilar de borosilicato (WPI Ref. IB120-4, World Precision Instruments, Hitchin, UK). El capilar se estira y separa en dos partes iguales con un estirador de pipetas (PC-10, Narishige, Tokio, Japón). Se corta la fibra de carbono de tal manera que se

aproxime al extremo del capilar. Se examinan en un microscopio (Erma, Opticalworks, Japón) rechazando aquellos que, en la punta del capilar, posean un diámetro superior a $\approx 15 \mu\text{m}$.

Para conseguir un sellado adecuado entre la fibra de carbono y las paredes del capilar, la punta de los electrodos se sumerge en una resina tipo epoxi (*Epo-tek[®] 301*) durante ≈ 40 s. Esta resina consta de dos componentes que deben mezclarse a temperatura ambiente en una relación 4:1 (por peso) hasta que quede totalmente homogénea. Después la resina colocada en los electrodos endurece durante toda la noche en un horno a 150°C .

Para conseguir un microelectrodo de superficie activa uniforme se pule con un ángulo de 45° en una pulidora de diamante negro (modelo *EG-40*, Narishige) utilizando 2-propanol como lubricante que contribuye a eliminar grasa (fig. 3.6). Una descripción detallada sobre la construcción de electrodos puede encontrarse en (Machado et al., 2008).

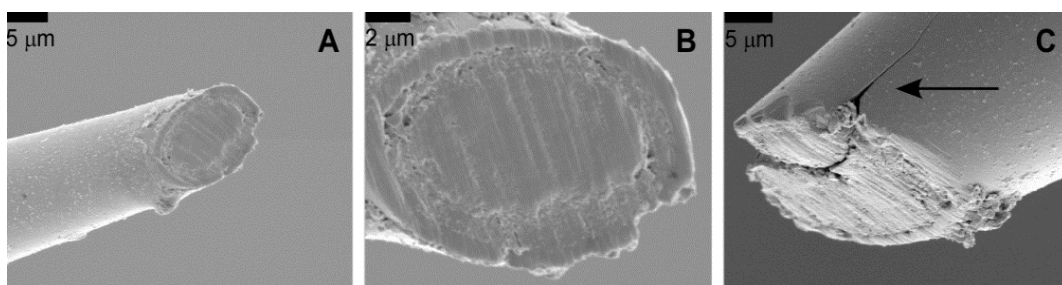


Figura 3.5. Apariencia de un microelectrodo de carbono ya pulido. Imagen tomada mediante microscopía electrónica de barrido. **A y B.** Vista a distinto aumento de un electrodo pulido. **C.** grieta en otro electrodo imperceptible bajo el microscopio óptico (Tomado de Machado et al., 2008).

3.16.1.2. Calibración.

La calibración de cada electrodo se realiza antes de cada experimento y cada vez que se lava la superficie del electrodo con 2-propanol. Es importante para comprobar el estado de la superficie activa, asegurando así que las respuestas sean reproducibles, que la proporción señal-ruido sea adecuada y la corriente basal estable. Para la calibración se utiliza un sistema de inyección con parada de flujo (FIA: *Flow Injection Analysis*), lo que permite exponer el electrodo, de forma rápida

a las CAs que en nuestro caso es NA, a una concentración de $50 \mu\text{M}$. Con este sistema se comprueban las características del electrodo en *flujo continuo*, lo que nos da una idea del comportamiento del electrodo frente a una concentración constante de CA, y en *parada de flujo*, que nos da una idea de las características propias del electrodo, ya que en este caso no está condicionada por el flujo. Lo ideal es que existan pocas diferencias entre la señal máxima en flujo continuo y en parada de flujo, y que las respuestas se detecten en el rango de milisegundos (fig. 3.6).

La señal amperométrica se acondiciona en un potenciostato (EI400, Ensmann Instrumentation, Bloomington, IN, USA) y se digitaliza a través de un conversor, USB-6009 de 14 bits (National Instruments, Austin, Texas, USA), controlada por un software con la plataforma LabView de National Instruments realizado por el Dr. Yézer González en nuestro laboratorio, con el cual la señal se registra en la pantalla de un ordenador Mac Mini (Apple Computer, Cupertino, USA).

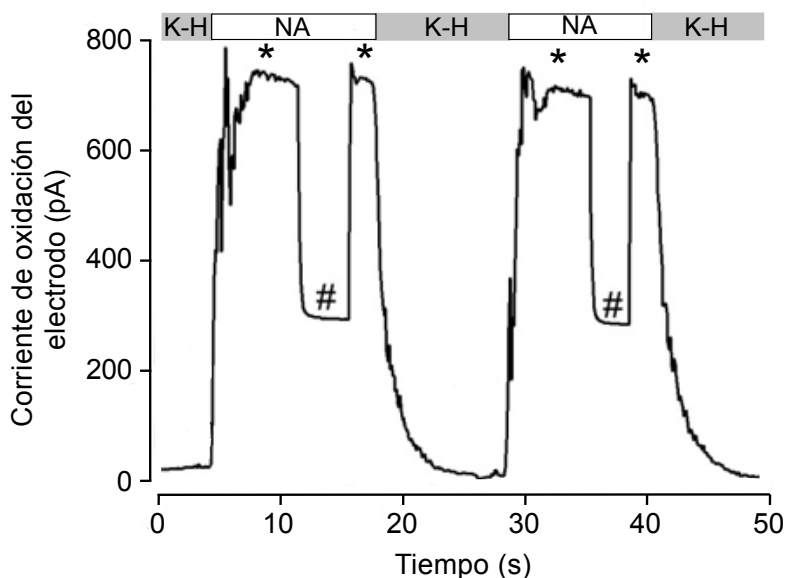


Figura 3.6. Calibración de un electrodo en el sistema de perfusión con $50 \mu\text{M}$ de NA. En el registro se pueden apreciar 2 pulsos de NA, cada uno de ellos con dos alturas de corriente. La altura mayor (*) corresponde a un estado de flujo continuo y la segunda altura (#) a un estado de parada de flujo. Este segundo estado advierte de las propiedades del electrodo, ya que no está sujeto a flujo. Tras aplicar NA y parar el flujo, se aplica con la solución de Krebs-HEPES (K-H) para lavar el sistema y la corriente vuelve a la señal basal. Como se puede apreciar las respuestas son reproducibles y la corriente basal es pequeña y estable.

3.16.2. Construcción de micropipetas para aplicar sustancias.

Las micropipetas para la aplicación de sustancias, a diferencia de los sistemas de perfusión tradicionales, permiten controlar el tiempo de aplicación y la distancia a la célula. La construcción sigue un procedimiento sencillo: un capilar de borosilicato, idéntico a los descritos en la construcción de electrodos (WPI #Ref IB120F-4, World Precision Instruments, Hitchin, UK) se escinde, en un proceso de dos pasos en un estirador de pipetas (PC-10, Narishige, Narishige, Japón). De esta manera conseguimos dos micropipetas, cada una de ellas con una punta de un diámetro aproximado de 5 μm . Las micropipetas se rellenan con la solución de secretagogo y se sitúan lateralmente a $\approx 40 \mu\text{m}$ de la célula. La liberación de estas sustancias se lleva a cabo mediante aplicación de aire con presión positiva mediante una electroválvula.

3.16.3. Detección amperométrica de la exocitosis.

Los registros amperométricos se llevan a cabo en el interior de una jaula de Faraday provista de una toma de tierra, usando un amplificador (VA-10X, NPI Electronic GmbH, Tamm, Alemania). El electrodo de trabajo se coloca en el portaelectrodo del preamplificador y se monta sobre un micromanipulador monitorizado (MS 314, Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co.KG, Wetzlar, Alemania) unido a la platina de un microscopio invertido (IX51, Olympus, Waltham, MA, USA). Un sistema similar se monta en el otro lado de la platina del microscopio para colocar la micropipeta con la que se aplican sustancias por presión positiva. Este sistema de inyección por presión, fabricado en nuestro laboratorio, está regulado por electroválvulas (Lee, Westbrook, USA), que pueden ser controladas manualmente o por ordenador, acopladas a un compresor. El cubreobjetos con las células se coloca en una cámara de metacrilato que tiene incorporado un electrodo de referencia de microagregados de plata (Ag/AgCl) (WPI #Ref EP2). Entre los dos electrodos se ajusta el potencial de oxidación a +650 mV. La frecuencia de muestreo es de 4 KHz, dando así una buena resolución temporal. La señal se filtra a 1 KHz (filtro tipo Bessel 8 polos) haciendo uso del programa de adquisición y control del amplificador Power Lab/LabChart (ADInstruments, New South Wales, Australia).

3.16.4. Análisis de los datos amperométricos.

El análisis de los datos amperométricos se lleva a cabo usando ficheros con formato binario de IGOR-Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA) y empleando una serie de programas desarrollados en nuestro laboratorio, que permiten la automatización del proceso de análisis, el programa se denomina “Spike 32” desarrollado por el Dr. Miguel Ángel Brioso (Segura et al., 2000).

Estos programas nos permiten: calibrar la señal adquirida según la ganancia del potencióstato; filtrar digitalmente la señal amperométrica, pudiendo elegir entre varios tipos de filtros, mejorando así la relación señal/ruido sin añadir artefactos de sobrefiltrado; identificar los picos amperométricos de forma automática y objetiva, mediante un algoritmo de búsqueda basado en la primera derivada; obtención de los parámetros cinéticos de cada evento; revisión manual de los registros y realización de un estudio estadístico preliminar del conjunto de experimentos seleccionados. En este caso, la estadística puede ser aplicada a los datos agrupados por células o directamente al total de los eventos amperométricos, sin agrupar, obtenidos durante un experimento individual (Colliver et al., 2000).

3.16.5. Parámetros cinéticos de las espigas amperométricas.

En la figura 3.7. se puede ver un fragmento de un registro amperométrico, obtenido de una única célula cromafín después de la aplicación de un estímulo secretagogo. La secreción de CAs es discontinua y cada deflexión o “espiga” se corresponde con la medición de CAs secretadas desde una sola vesícula (Whightman et al., 1991).

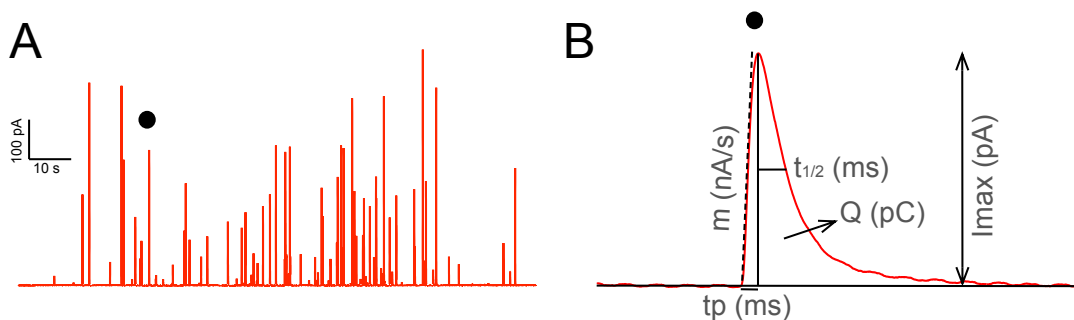


Figura 3.7. Registro amperométrico. A. Fragmento de un registro amperométrico típico. B. Ampliación de una de las deflexiones o espigas del registro, y los parámetros que se obtienen para caracterizar su morfología y cinética (explicación en el texto).

Una vez identificadas las espigas, de forma automática con el programa, se obtienen los parámetros cinéticos, que se describen a continuación para cada evento:

- **Q** , se obtiene por integración del área bajo la curva y se corresponde con el contenido de CAs oxidadas provenientes de una vesícula. Se expresa en pC.
- **I_{max}** , es la amplitud máxima de corriente e indica la concentración máxima alcanzada en la superficie del electrodo expresada en pA.
- **$t_{1/2}$** , se define como el ancho de la espiga a la mitad de la amplitud máxima, expresada en ms.
- **m** , es la pendiente media de ascenso entre el 25 y el 75% del valor máximo de amplitud, expresado en nA/s.
- **t_p** , es el tiempo al pico, es decir, el tiempo necesario en alcanzar la amplitud máxima, expresado en ms.

Una vez determinados estos parámetros, el programa permite su exportación a otros programas para la cuantificación de la secreción total por integración de la señal y su posterior análisis estadístico.

3.16.6. Criterios de selección de espigas amperométricas.

Para la determinación de los parámetros cinéticos se debe seguir una serie de criterios que nos aseguren la objetividad del análisis. Por lo tanto, debemos excluir del análisis aquellas espigas que no cumplan los siguientes criterios:

- Cuya morfología no permita cuantificar sin error alguno de los parámetros indicados en el apartado anterior.
- Que tengan un valor de Q inferior a 0,015 pC y superior a 7 pC, el rango en el que se encuentra el contenido de CA (Machado et al., 2008).
- Que tengan un valor de I_{max} inferior a 3 pA. En condiciones normales y tras filtrar el registro amperométrico, se obtiene un ruido de 1,1 pA de amplitud media y 0,32 pA de desviación estándar (SD). Si establecemos como límite 10 veces la SD, 3 pA es un buen límite de corte inferior.
- Que tengan un “pie” de altura igual o superior a 1/3 del valor de I_{max} , ya que puede tratarse de dos espigas superpuestas.

3.17. Patch-clamp en configuración de célula completa.

3.17.1. Fabricación de las pipetas de patch-clamp.

Para la fabricación de las pipetas de *patch-clamp*, se emplearon capilares de borosilicato (World Precision Instruments, Hitchin, UK) estirados y divididos con un estirador vertical de pipetas (PC-10, Narishige, Tokio, Japón). Con la ayuda de una aguja, se coloca y extiende una cera comercial (Sylgard® 184, Dow Corning, MI) en la punta de cada pipeta, con el fin de reducir la capacidad eléctrica de las mismas, gracias al engrosamiento de las paredes. Para facilitar el endurecimiento de la cera, ésta se calienta con una resistencia acoplada a una fuente de alimentación. A continuación, se pule la punta de cada pipeta con calor en usando una *microforja*. De esta forma, también conseguimos eliminar la cera que haya podido quedar obstaculizando la punta, alisar la punta de las pipetas para facilitar la realización del gigasello y reducir el diámetro de la punta de las mismas. La resistencia eléctrica final de las pipetas, una vez rellenas con la solución correspondiente e introducidas en el baño, debe estar comprendida ente 1 y 5 M Ω .

3.17.2. Determinación de la capacidad celular por medio de patch-clamp.

Los registros de *patch-clamp* se llevaron a cabo en el interior de una jaula de Faraday usando un amplificador (HEKA EPC-10, HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemania). La pipeta se acopla al portaelectrodo, se coloca en el preamplificador y se monta sobre un micromanipulador monitorizado (World Precision Instruments,

Hitchin, UK) unido a la platina de un microscopio invertido (Zeiss Axiovert, Jena, Alemania). El cubreobjetos con las células se coloca en una cámara que tiene incorporado un electrodo de microagregados de plata (Ag/AgCl), que sirve de electrodo de referencia. Las medidas de capacidad se llevan a cabo en la configuración de célula completa de acuerdo a la técnica desarrollada por (Lindau & Neher, 1988) usando el modo “sine+dc” (técnica de dominio de la frecuencia, aplicando un voltaje en forma de onda sinusoidal) en la extensión “Lock-in” del programa PatchMaster (HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemania) (Para más información véase anexo VI). La frecuencia y la amplitud de la onda sinusoidal es 1042 Hz y 70 mV, respectivamente, a un potencial de reposo de -70 mV. La frecuencia de muestreo es de 12,5 KHz y la señal se filtra a 2,9 kHz.

La pipeta se llena con una solución intracelular y el cubreobjetos con las células se sumerge en una solución extracelular (la composición de ambas soluciones se muestra en el anexo I). Todos los experimentos se llevan a cabo a temperatura ambiente, entre 21-25°C.

3.17.3. Análisis de los datos de capacidad.

El análisis de los datos de *patch-clamp* se llevaron a cabo con el programa PatchMaster, el mismo con el que se realizaron los experimentos.

3.18. Análisis estadístico.

Los conjuntos de datos están expresados como las medias \pm SEM. La significación estadística entre los grupos experimentales fue obtenida mediante el test *t* de Student o el no paramétrico de *U*-Mann Withney. Las diferencias fueron consideradas significativas a un nivel de $p < 0,05$. Los datos fueron analizados por el programa Prism (Graphpad Software, San Diego, USA).

Resultados

4. RESULTADOS.

4.1. ESTUDIO DEL GLP-1R EN CÉLULAS CROMAFINES.

4.1.1. El receptor de incretinas GLP-1R se expresa en las células cromafines.

Para determinar si el receptor de la hormona peptídica GLP-1 se expresa en las células cromafines, diseñamos oligonucleótidos específicos que tienen como diana un fragmento de los exones 5 y 6 de la secuencia de RNA mensajero (RNAm) del GLP-1R bovino. Empleando estos oligonucleótidos se realizó una PCR convencional usando como molde el cDNA obtenido por medio de la retrotranscripción del RNA aislado de células cromafines bovinas. En la fig. 4.1 se muestra un gel de electroforesis donde aparecen las bandas correspondientes al receptor de GLP-1 comparadas con la amplificación de un gen de expresión constitutiva, la hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HPRT), amplificado a partir de la misma muestra.

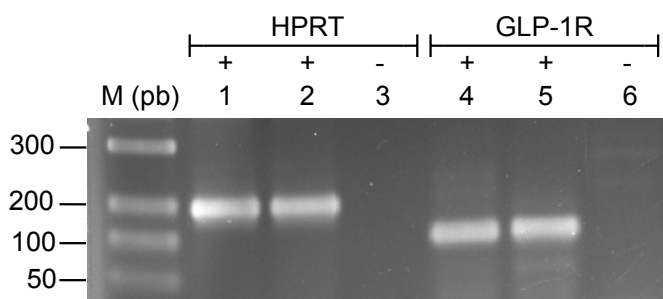


Fig. 4.1. Expresión del mRNA del GLP-1R en células cromafines. Productos de PCR observados en un gel de agarosa. Los carriles 1 y 2 muestran la expresión de HPRT de 195 pb, usado como gen de expresión constitutiva. Los carriles 4 y 5 muestran la expresión del GLP-1R de 136 pb. Los carriles 3 y 6 son controles negativos de la PCR para ambos genes. M, marcador de pares de bases. Las muestras de los carriles 1 y 2 son réplicas de muestras procedentes de células de cultivos distintos obteniéndose resultados similares. Lo mismo ocurre para las muestras de los carriles 4 y 5. Se muestra un experimento representativo de n=2.

Una vez comprobada la expresión del RNAm del GLP-1R en células cromafines bovinas, quisimos determinar la presencia y localización del receptor en las mismas. Para ello se emplearon técnicas inmunocitoquímicas y microscopía confocal. Se utilizó un anticuerpo contra el epítipo presente en la región carboxilo terminal localizada en el dominio extracelular del receptor. Como se puede

observar en la figura 4.2, el GLP-1R se distribuye en la membrana plasmática de las células no permeabilizadas. Además, se llevó a cabo un marcaje con anticuerpos contra una enzima específica de las células cromafines, la enzima tirosina hidroxilasa (TH). Al tratarse de una enzima citoplasmática, solo se detecta en células que han sido permeabilizadas. La localización del receptor en estas células permeabilizadas es predominantemente en el citoplasma celular apareciendo una distribución punteada en el mismo, a diferencia de la TH que presenta un patrón difuso (fig. 4.2).

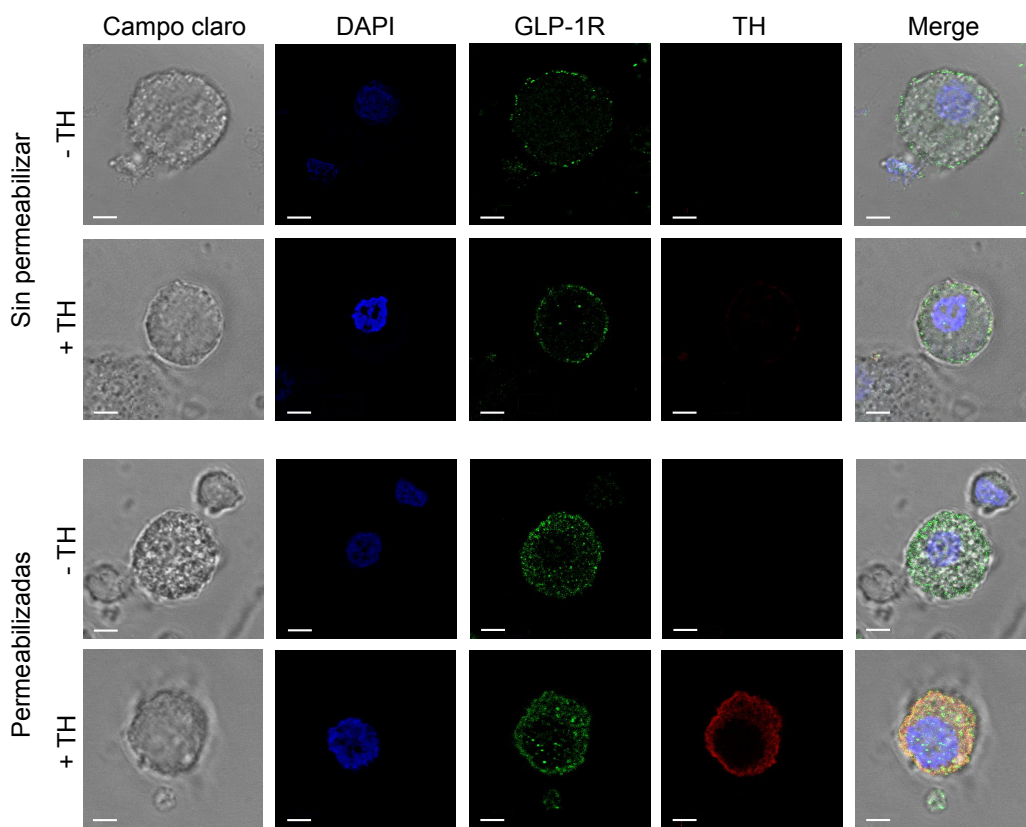


Fig. 4.2. El GLP-1R se localiza en la membrana plasmática y en el citoplasma celular. Imágenes de microscopía confocal realizadas en células cromafines bovinas. En la primera columna se muestran las células en campo claro; en la segunda observamos los núcleos celulares marcados en azul (DAPI), el cual se detecta por medio de excitación a 405 nm; la tercera columna corresponde al marcaje con el receptor GLP-1R. Se observa fluorescencia verde debido al uso de Alexa 488 como anticuerpo secundario, para lo cual se excitaron las muestras con un haz de luz láser utilizando la línea de 488 nm y se recoge la fluorescencia emitida entre 500-600 nm; en la cuarta columna aparecen las imágenes de las células excitadas con un haz de láser de 543 nm, recogiendo la fluorescencia emitida ente 600-700 nm. Se observa así la fluorescencia emitida por el anticuerpo secundario Alexa 568

utilizado para marcar la enzima TH. Las dos primeras filas corresponden a células sin permeabilizar para comprobar la presencia del receptor en membrana. No aparece la TH marcada debido a que se trata de una enzima citoplasmática. La tercera y cuarta fila incluyen las imágenes de células que fueron permeabilizadas con el fin de observar el marcaje de la enzima TH (control positivo de tratarse de células cromafines). En la tercera fila no aparece TH debido a que no se incubó con dicho anticuerpo (control negativo de marcaje específico de TH). En las células permeabilizadas el receptor se localiza principalmente en el citoplasma. Barra de escala 4 μm .

4.1.2. La activación del receptor de GLP-1 con Ex-4 induce el incremento de la síntesis de las CAs y un aumento en la expresión de la enzima TH.

La primera estrategia llevada a cabo para comprobar la posible modulación de la secreción de CAs fue estudiar la producción de las mismas después de un tratamiento crónico con Ex-4 a células cromafines en cultivo. Tratamos ≈ 4 millones de células con Ex-4 (100 nM), durante 0, 1 y 24 horas. Transcurrido ese tiempo lisamos las células y las centrifugamos para descartar los restos celulares. Los sobrenadantes fueron diluidos para alcanzar una concentración de PCA al 0,05 N y DHBA a 200 nM (estándar interno). Las muestras fueron analizadas por HPLC acoplado a detección electroquímica (HPLC-ED) para cuantificar la cantidad de adrenalina y noradrenalina contenidas en las células.

En la figura 4.3 se muestran ejemplos de muestras provenientes de células en ausencia y presencia del fármaco durante 24 horas. Los cromatogramas representan la noradrenalina (sombreado rojo), adrenalina (sombreado azul) y DHBA (sombreado verde).

La cantidad de CAs contenidas en los ≈ 4 millones de células cromafines no tratadas con Ex-4 fueron ≈ 46 moles/ng de proteína, en el caso de las células tratadas con el fármaco durante 1 hora fueron ≈ 41 moles/ng de proteínas y aquellas tratadas durante 24 horas fueron ≈ 63 moles/ng de proteína. A las 24 horas de tratamiento, la cantidad de CAs llegan a ser significativamente mayor respecto a los otros tiempos estudiados (fig. 4.3, B).

Ocurre lo mismo cuando separamos la respuesta de la A y la NA, el tratamiento con Ex-4 durante 24 horas produce un incremento significativo en ambas CAs comparadas con la cantidad de esas CAs en las células no tratadas o las que fueron tratadas durante 1 hora (fig. 4.3, C y D).

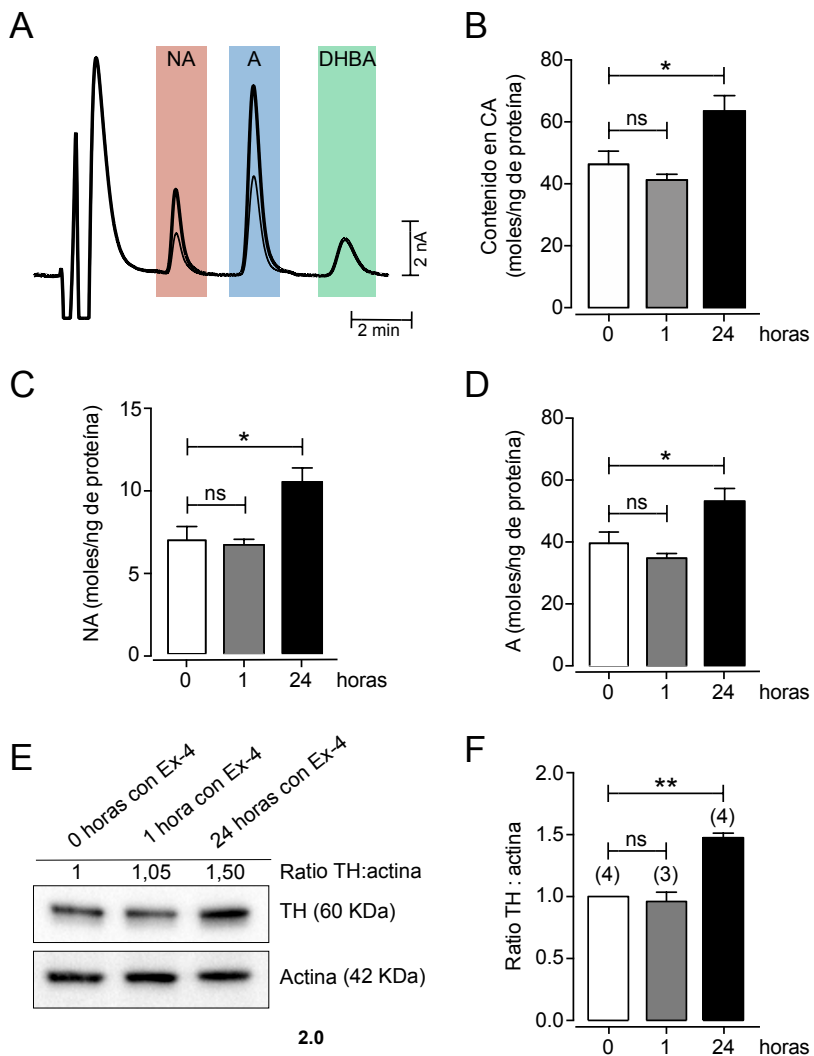


Fig. 4.3. Análisis del tratamiento con Ex-4 en las células cromafines bovinas. **A.** Cromatograma de HPLC-ED que muestra trazos ejemplo de la detección de aminas contenidas en las células no tratadas con Ex-4 (trazo fino) y las tratadas durante 24 horas (trazo grueso). **B.** Contenido total medio de CAs en los lisados de las células no tratadas con Ex-4 (0 horas) y las tratadas durante 1 y 24 horas. **C y D.** Contenido de los transmisores NA y A en las células no tratadas con Ex-4 y las tratadas durante 1 y 24 horas. Los datos mostrados en B, C y D son valores medios \pm SEM. de 6 células para cada condición experimental. Las células fueron obtenidas del mismo cultivo. El test estadístico usado es el *t* de Student. * $p < 0,05$. **E.** *Western-blot* representativo del tratamiento con Ex-4 durante 0 horas (carril 1), 1 hora (carril 2) y 24 horas (carril 3). Se cargó 21 μ g de proteína en cada carril. El efecto de la Ex-4 sobre el gen de la TH se cuantificó como la ratio entre las intensidades de las bandas de TH/actina. **F.** Análisis cuantitativo del curso temporal de la expresión de la TH después del tratamiento con el fármaco. Los datos mostrados en E y F son valores medios de un $n = 3$ o 4, según se indica en la gráfica, procedentes de 3 cultivos distintos. El test estadístico usado en F es el *t* de Student con la corrección de Welch. ** $p < 0,01$.

De estos resultados concluimos que la activación del receptor GLP-1 con Ex-4 en células cromafines bovinas produce un incremento del contenido de CAs.

Si hay un incremento en la cantidad de CAs con el tratamiento con Ex-4, probablemente se deba a un aumento en la actividad o cantidad de la principal enzima responsable de la síntesis de CAs, la TH (ya que se trata de la enzima limitante de la ruta). Con el fin de comprobar dicha hipótesis, realizamos un *western blot* con los lisados de las células que fueron tratadas 0, 1 y 24 horas con la Ex-4 y marcamos con anticuerpos específicos dirigidos contra la TH. Se observó que el tratamiento con el fármaco durante 24 horas incrementó la expresión de la TH en $\approx 46\%$, no encontrándose diferencias con 1 hora de tratamiento. Este incremento de expresión se determinó mediante la relación entre la intensidad de la banda de TH con respecto a la de la banda de proteína empleada como control de carga, la actina (fig. 4.3, E y F).

4.1.3. La Ex-4 activa la expresión del gen de la TH en PC12.

El tratamiento de células cromafines bovinas con Ex-4 produjo un aumento en la expresión de la enzima TH como pudimos comprobar con los resultados del apartado anterior. Nos planteamos llevar a cabo otra estrategia para corroborar si un aumento de la expresión enzimática se correlaciona con un aumento de la regulación del gen.

Disponemos de un plásmido que porta el promotor del gen de la TH en pauta de lectura con el gen de la luciferasa, el p5' TH-Luc (-272/+27). El promotor del gen de la TH tiene elementos de respuesta al AMPc (Fader & Lewis, 1990) por lo que un incremento del AMPc inducido por la activación del receptor GLP-1 produciría la activación del promotor del gen de la TH y, por tanto, la expresión del gen de la luciferasa. Midiendo la luz emitida por la luciferasa podemos conocer la expresión del gen de la TH.

El promotor del gen de la TH presente en el plásmido se trata de un promotor de rata por lo que se realizó la transfección en células de feocromocitoma de rata (PC12), en las cuales fue descrita la presencia del RNAm receptor GLP-1 por (Perry et al., 2002). Además de la transfección con el plásmido descrito, se llevó a

cabo una doble transfección con otro que expresa el GLP-1R en pauta de lectura con la proteína verde fluorescente (GLP-1R-EGFP), con el fin de sobreexpresar el receptor, o con el plásmido EGFP en las células usadas como control.

Aquellas células que fueron tratadas con 100 nM de Ex-4 durante 24 horas presentaron un incremento significativo de la actividad de la luciferasa medida con un luminómetro. Ese incremento fue de aproximadamente el doble (fig. 4.4, A) para el caso de las células donde no se sobreexpresó el receptor y de aproximadamente el triple en el caso de las células con el GLP-1R sobreexpresado. No hubo diferencias significativas entre las células tomadas como control (sin tratar con Ex-4 ni sobreexpresar el receptor) y aquellas en las que se sobreexpresó el receptor, pero no se trataron con el fármaco. Con fines comparativos entre experimentos realizados con cultivos celulares diferentes, se normalizó a 1 la respuesta de las células control.

Para completar este estudio, quisimos relacionar directamente el incremento de la expresión de la TH con la síntesis de nuevas CAs. A diferencia de las células cromafines, la línea celular PC12 de la que disponemos en nuestro laboratorio no sintetiza NA y A, la síntesis de CA sólo llega a la DA. Por medio de HPLC-ED se realizó un análisis cuantitativo de la DA. Las células que fueron tratadas con Ex-4 y en las que no se sobreexpresó el receptor GLP-1, incrementaron la cantidad de DA un $\approx 12\%$ con respecto a las células consideradas control. Aquellas en las que se sobreexpresó el receptor y se trataron con el fármaco incrementaron al doble la cantidad de DA (fig. 4.4, B).

Estos datos estuvieron en concordancia con los obtenidos mediante el tratamiento con Ex-4 a células cromafines bovinas en cultivo. La activación del receptor de incretinas GLP-1 indujo un incremento en la cantidad de CAs sintetizadas por las células a través de un incremento en la expresión de la TH (fig. 4.3, B y E).

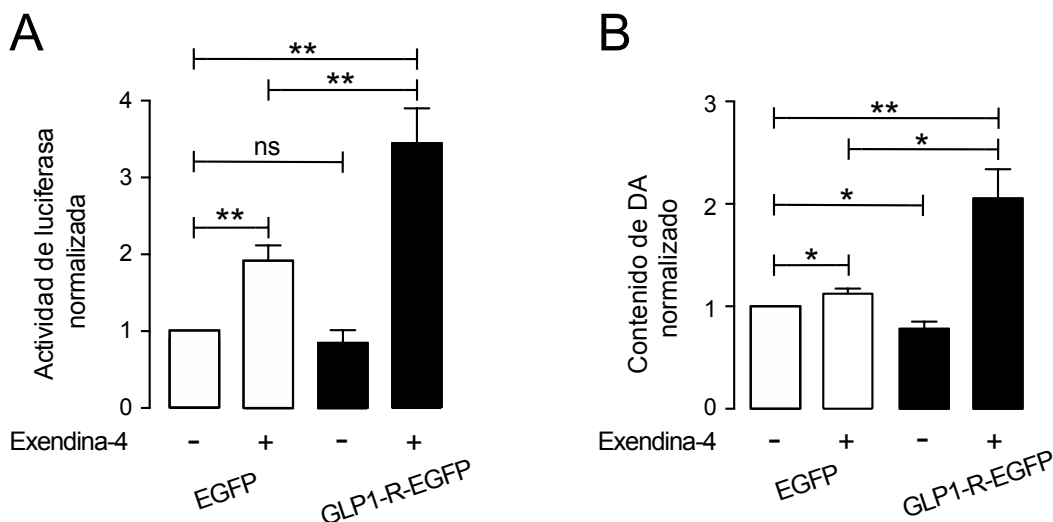


Fig. 4.4. Células PC12, transfectadas con p5' TH-Luc (-272/+27) y EGFP o GLP1-R-EGFP, fueron tratadas durante 12 h con Ex-4 (100 nM) y comparadas con células no tratadas (Control). A. Análisis de la actividad luciferasa de lisados celulares (n=10 de cada condición, células procedentes de dos cultivos distintos) \pm SEM. B. Contenido total de DA analizado por medio de HPLC-EC. Se representan las medias de células (n=7 de cada condición, células procedentes de dos cultivos distintos) \pm SEM. El test estadístico utilizado fue la *t* de Student con la corrección de Welch; **p*<0,05, ***p*<0,01.

4.1.4. La amperometría en célula única revela un aumento en la cantidad de CAs liberadas por cada vesícula en las células tratadas con Ex-4.

La amperometría en célula única permite el estudio de las CAs liberadas, el modo en el que cada vesícula libera su contenido y la frecuencia con la que las vesículas secretoras liberan su contenido. Consiste en registrar la oxidación de las CAs cuando entran en contacto con la superficie de un electrodo que se encuentra a un potencial de +650 mV (fig. 4.5, A). Esta técnica proporciona la resolución temporal necesaria para analizar la forma en la que ese contenido es liberado por exocitosis (Whigtman et al., 1991). El estudio de estas características es lo que se denomina cinética de la exocitosis y se aborda midiendo los parámetros que se muestran en la figura 4.5 (E), de cada una de las deflexiones de corriente o espigas amperométricas (fig. 4.5, B). Cada una de estas espigas corresponde con la oxidación del contenido de las CAs liberadas de forma cuántica por una vesícula secretora.

Para estimular la secreción de las CAs, se aplicó BaCl₂ 5mM durante 5 s con una micropipeta localizada a $\approx 40 \mu\text{m}$ de la célula (fig. 4.5, A). Este secretagogo es especialmente útil dado que no requiere la activación de receptores y produce una baja frecuencia de exocitosis. Esta baja frecuencia de exocitosis permite el estudio de los parámetros de cada espiga de forma individual, ya que la probabilidad de solapamiento de dos eventos independientes, en estas condiciones experimentales, es muy baja.

Las medidas fueron realizadas en el mismo día usando el mismo electrodo de fibra de carbono calibrado y alternando registros de las células control y las tratadas con Ex-4 (100 nM) durante 20 min.

El tratamiento con Ex-4 produjo un incremento del $\approx 75\%$ del tamaño cuántico, o cantidad de CAs liberadas, de las vesículas fusionadas tras el estímulo secretor (ver Q, tabla 4.1). Con respecto a la frecuencia de exocitosis, definida como el número de espigas por unidad de tiempo, y representada en un histograma de distribución en la figura 4.5 (D), no se observaron diferencias con el tratamiento con el fármaco (fig.). No obstante, sí se observó un incremento del $\approx 35\%$ de la secreción de las CAs totales registradas en un periodo de tiempo de 120 s (211 pC en células controles vs. 285,2 pC en células incubadas con Ex-4/100 pC en células controles vs. 135,2 pC en células incubadas con Ex-4) (fig. 4.5, C).

El tratamiento con Ex-4 resultó en un incremento neto de la I_{max} y de la Q de las espigas amperométricas individuales, con una disminución de su $t_{1/2}$ (tabla 4.1). En la gráfica de la figura 4.5 (F) se representan los valores de I_{max} de las espigas amperométricas en el eje de ordenadas y los valores de Q en el de abscisas. Se observa que existe una relación lineal entre las espigas correspondientes a las exocitosis de cada grupo experimental, es decir, en células sin tratar con el fármaco, a medida que incrementa la altura de la espiga, incrementa su carga. Lo mismo ocurre con las células tratadas con Ex-4. Si comparamos esta relación entre la I_{max} y la Q de ambos grupos, vemos que, a mismos valores de Q, la I_{max} del grupo tratado es mayor, indicando que las espigas son más rápidas.

Estos resultados apuntan a que el incremento en las CAs liberadas tras la activación del GLP-1R posiblemente se deba a un mayor vaciamiento de CAs de cada vesícula, y no a un aumento de las vesículas que realizan exocitosis.

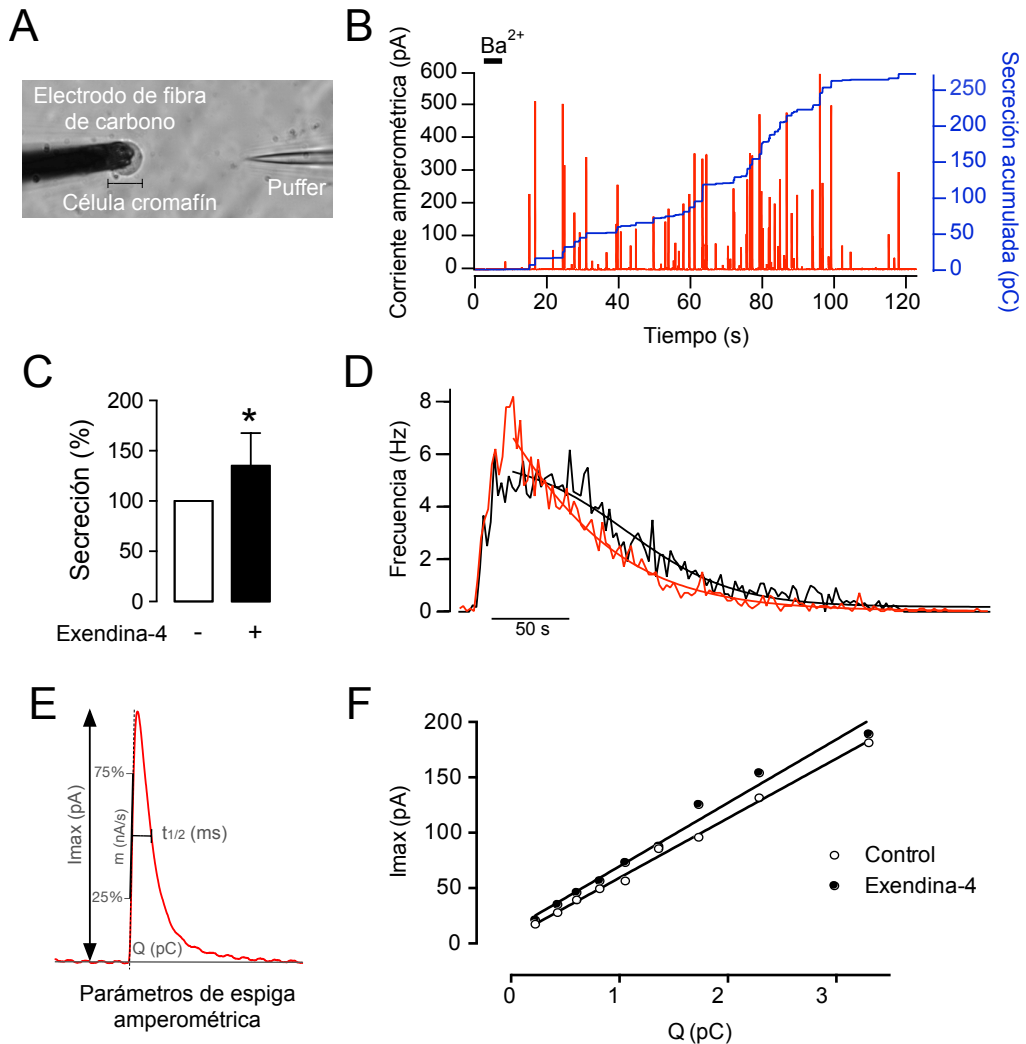


Fig. 4.5. Incremento en la secreción de CAs en células cromafines tras la activación del receptor de GLP-1. **A.** Imagen de un electrodo de carbono sobre una célula cromafín usado para la detección amperométrica de CAs; a la derecha de la imagen se muestra un puffer con el que se aplica el secretagogo. Barra de escala de 15 μm . **B.** Registro amperométrico típico en el que cada espiga (representadas en rojo) corresponden a las CAs liberadas por cada vesícula individual. La secreción acumulada se representa con el trazo en azul. La exocitosis es inducida aplicando un pulso de 5 s con BaCl_2 (5 mM) en ausencia y presencia de distintos fármacos. **C.** Secreción normalizada de CAs, a los 120 s después de la exposición al secretagogo, medida en los registros amperométricos (media \pm SEM) comparando 12 células preincubadas con Ex-4 (100 nM) con 10 células controles. Todas las

células proceden del mismo cultivo y mismo día de experimento. El test estadístico utilizado en C fue el *t* de Student, **p*<0,05. **D.** Análisis amperométrico de la frecuencia de eventos exocitóticos en células control (trazo rojo) y células tratadas con Ex-4 (trazo negro). Registros ajustados a una función sigmoidea. **E.** Ejemplo de una espiga amperométrica en la que se ilustran los parámetros cinéticos. **F.** Efecto de la Ex-4 en la relación entre el contenido de CAs de las vesículas (Q) y la concentración máxima alcanzada por el electrodo (*I*_{max}). Los puntos muestran la relación entre la amplitud de las espigas vs. contenido cuántico en ausencia (control) y después de la incubación con 100 nM de Ex-4 (n = 647 espigas de 10 células control y 1166 espigas de 12 células tratadas con el fármaco). No existen diferencias significativas entre las células controles y tratadas con el fármaco. El test estadístico utilizado en F fue la prueba *U* Mann-Whitney con la corrección de Bonferroni.

Tabla 4.1. Características de las espigas secretoras obtenidas en las células cromafines bovinas tratadas con Ex-4.

	<i>I</i> _{max} (pA)	Q (pC)	<i>t</i> _{1/2} (ms)	<i>m</i> (pA/ms)	N	n
Control	85,6 ± 11,9	1,2 ± 0,1	19,4 ± 2,4	18,8 ± 3,2	10	647
Ex-4	126,4 ± 13,9 *	2,1 ± 0,3 *	15,1 ± 1,1	29,8 ± 3,1 *	12	1166
% Cambio	47,7 %	75 %	-22,2 %	58,5 %		

Para más detalle, ver el apartado de material y métodos (3.16.5). Los experimentos fueron repetidos usando células de dos cultivos diferentes obteniéndose resultados similares. Los datos medios mostrados corresponden a las células procedentes de un cultivo y el mismo día de experimento. N = número de células y n = número de espigas utilizados en el análisis. Los datos se expresan en las unidades indicadas entre paréntesis. El test estadístico utilizado (*U* Mann-Whitney) se llevó a cabo a partir de los datos originales agrupados por células. Se establecieron las diferencias significativas **p*<0,05.

4.1.5. La sobreexpresión del receptor de GLP-1 intensifica el efecto de la Ex-4.

Una comprobación adicional del efecto de la Ex-4 incrementando la secreción de CAs en las células cromafines y que este efecto es mediado por la activación del receptor de GLP-1, presente en la membrana plasmática, es sobreexpresar dicho receptor en la célula y comprobar cómo esta maniobra incrementa la respuesta secretora.

Para ello se nucleofectaron células cromafines bovinas con el plásmido GLP-1R-EGFP, que porta la secuencia del gen humano del receptor de GLP-1. Aquellas células que sobreexpresan el receptor podemos detectarlas debido a la fluorescencia emitida por la EGFP (fig. 4.6, A). Utilizando solo las células marcadas, se empleó la amperometría en célula única para comparar células tratadas con Ex-4 (100 nM) durante 20 min con células sin tratar o controles.

El tratamiento con Ex-4 sobre las células que sobreexpresan el GLP-1R se tradujo en un incremento del $\approx 38\%$ del tamaño cuántico (ver Q, tabla 4.2), siendo éste un incremento menor que el que ocurre en las células cromafines tratadas con Ex-4 pero sin sobreexpresar el receptor. No obstante, el análisis de la frecuencia de exocitosis muestra mayores diferencias entre células controles y tratadas, en comparación con aquellas que no sobreexpresan el receptor (fig. 4.6, B). Observamos un incremento en la frecuencia de exocitosis y, como consecuencia, un aumento del $\approx 70\%$ de la secreción de CAs totales (142,4 pC en células controles vs. 242,5 pC en células tratadas con Ex-4) (fig. 4.6, C).

El tratamiento con Ex-4 en células con el receptor sobreexpresado resultó, al igual que lo que ocurrió en células sin el receptor sobreexpresado, en un incremento neto de la I_{max} y de la Q, con una disminución no significativa de la $t_{1/2}$ (ver tabla 4.2). Comparando espigas amperométricas con la misma Q, las procedentes de células tratadas con Ex-4 tienen valores mayores de I_{max} . Esto indica que las espigas amperométricas en células tratadas son más rápidas que las obtenidas en células controles. Sin embargo, estas diferencias en la velocidad de las espigas no llegan a ser significativas (fig. 4.6, D).

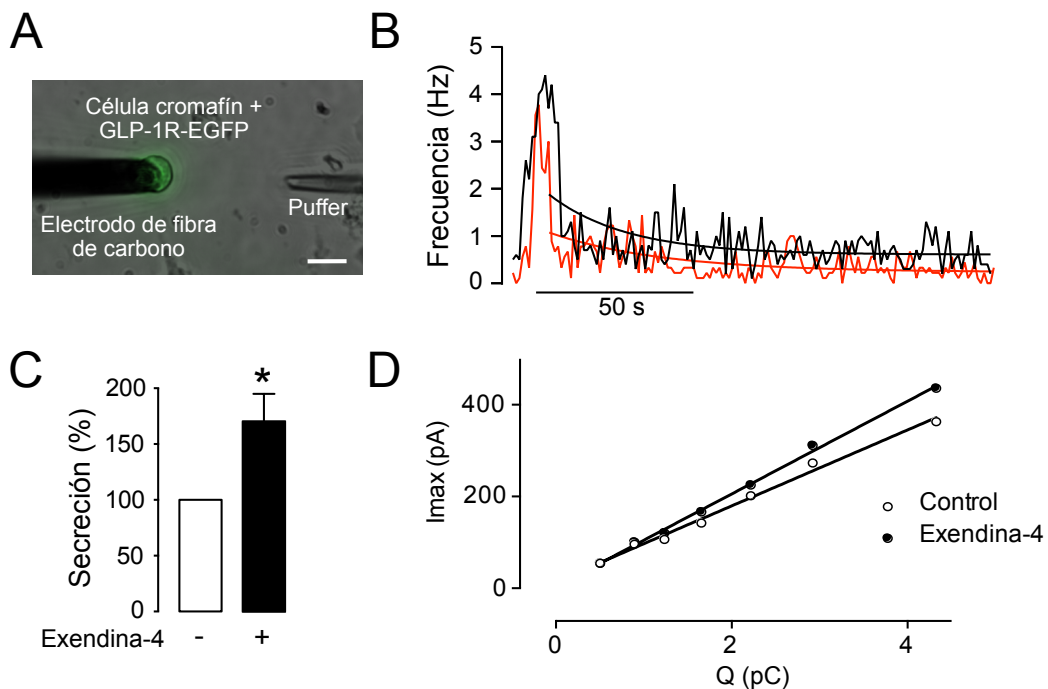


Fig. 4.6. La sobreexpresión del GLP-1R en células cromafines bovinas produce un incremento de las CAs secretadas. **A.** Imagen de una célula cromafín expresando el plásmido GLP-1R-EGFP cuya exocitosis está siendo registrada con un microelectrodo de carbono. La micropipeta (puffer) localizada $\approx 40\mu\text{m}$ de distancia de la célula permite la inyección de la solución de estimulación. Barra de escala de $15\mu\text{m}$. **B.** Análisis amperométrico de la frecuencia de eventos excitóticos en células control (trazo rojo) y células tratadas con Ex-4 (trazo negro), sobreexpresando todas ellas el receptor de GLP-1. Se representa también una función sigmoide ajustada a cada trazo. **C.** Secreción normalizada de CAs, a los 120 s desde la exposición al secretagogo, en células cromafines que sobreexpresan el GLP-1R en ausencia y presencia de Ex-4. El test estadístico utilizado fue la prueba *U* Mann-Whitney; $*p < 0,05$. **D.** Amplitud de las espigas vs liberación cuántica de CAs de células control o incubadas con Ex-4. No existen diferencias significativas entre las células controles y tratadas con el fármaco. El número de muestras utilizado en todos los experimentos de amperometría sobreexpresando el GLP-1R fueron $n=336$ espigas de 9 células control y $n=594$ espigas de 10 células incubadas con Ex-4.

Tabla 4.2. Características de las espigas secretoras obtenidas en las células cromafines bovinas nucleofectadas con el plásmido que porta el receptor GLP-1.

	I_{max} (pA)	Q (pC)	$t_{1/2}$ (ms)	m (pA/ms)	N	n
Control + GLP-1R-EGFP	$186,0 \pm 14,6$	$2,1 \pm 0,2$	$10,9 \pm 1,1$	$58,1 \pm 7,5$	9	336
Ex-4 + GLP-1R-EGFP	$249,8 \pm 17,8 *$	$2,9 \pm 0,3 *$	$10,1 \pm 1,0$	$70,1 \pm 9,2$	10	594
% Cambio	34,3 %	38,1 %	-7,3 %	20,7 %		

Los experimentos fueron repetidos usando células de dos cultivos diferentes obteniéndose resultados similares. Los datos mostrados corresponden a valores medios procedentes de células del mismo cultivo y el mismo día de experimento. N = número de células y n = número de espigas utilizados en el análisis. Los datos se expresan en las unidades indicadas entre paréntesis. El test estadístico utilizado fue la prueba *U* Mann-Whitney partiendo de los datos originales agrupados por células; * $p < 0,05$.

4.1.6. El incremento en la secreción de CAs se debe a la activación de la ruta intracelular mediada por PKA y no por la vía EPAC.

Los resultados anteriores muestran que la activación farmacológica del GLP-1R en células cromafines bovinas produce un incremento en la síntesis de CAs (fig. 4.3 y 4.4), en la secreción total de CAs (fig. 4.5, C y 4.6, C) y en el tamaño cuántico de liberación de las mismas (tablas 4.1 y 4.2). Por tanto, nos planteamos cuál sería la ruta intracelular que tiene lugar tras la activación del receptor para promover dicho mecanismo.

El receptor GLP-1 pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G. Su activación induce un incremento de la adenilato ciclasa y de los niveles citosólicos de AMPc. En otros tipos celulares, como las células β -pancreáticas, el AMPc modula la secreción por medio de las proteínas PKA y/o EPAC. Nuestro grupo ha descrito la modulación de la exocitosis mediada por la vía PKA en células cromafines. Sin embargo, la vía EPAC aún no ha sido explorada en células cromafines.

Para dilucidar la ruta intracelular que está activando el receptor GLP-1R en células cromafines tras la activación con Ex-4, tratamos las células con diferentes fármacos y realizamos amperometría en célula única para determinar cómo se ve modificada la secreción de CAs. El 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX) es un inhibidor de fosfodiesterasas (PDE). Éstas son las principales enzimas que degradan el AMPc por lo que, al inhibirlas, incrementan los niveles celulares de AMPc produciendo un incremento en la secreción de CAs (Machado et al., 2001). Cuando se incuban las células con Ex-4 (100nM) e IBMX (500µM), ambas durante 20min, el incremento en la secreción de CAs es de dos veces más con respecto a las células control. Tanto la I_{max} como la Q están incrementadas en las células tratadas (ver tabla 4.3).

También se utilizó el H-89, el cual es un inhibidor de la actividad catalítica de PKA. Se sabe que la vía PKA en células cromafines provoca un incremento en la secreción de CAs y modifica la cinética del último paso de la exocitosis (Machado et al., 2001). La inhibición de esa vía produce una disminución en la exocitosis de las CAs. Al incubar las células con Ex-4 (100nM) y H-89 (50nM), ambas durante 20min, si la ruta activada tras la estimulación del GLP-1R cursa vía PKA esperaríamos ver una reducción de la secreción de CAs y esto es lo que ocurre, hay una reducción del $\approx 50\%$. Además, se observa una disminución del $\approx 36\%$ del tamaño cuántico de las espigas amperométricas en las células incubadas con Ex-4 y H-89.

Por último, se utilizó un fármaco que activa de forma selectiva el EPAC, el 8-(4-Chlorofeniltio)-2'-O-metiladenosina-3',5'-monofosfato cíclico acetilo metil-éster (8-pCPT) de manera que, si la vía EPAC tiene lugar en células cromafines, cuando se incuban las células con 8-pCPT (100µM) esperaríamos un incremento en las CAs secretadas. No obstante, no observamos diferencias respecto a las células control.

Estos datos indican que la activación del GLP-1R dan lugar al incremento de la secreción de CAs a través de la activación de una ruta de segundos mensajeros mediada por AMPc y PKA, sin implicación aparente de la vía EPAC.

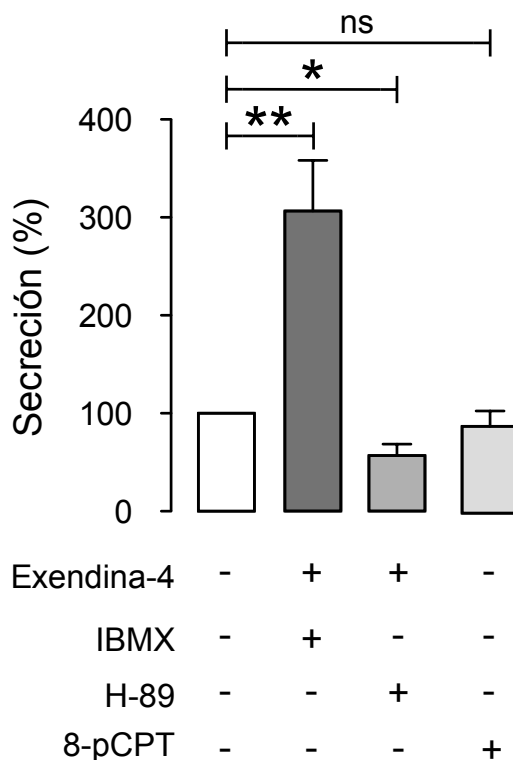


Fig. 4.7. Secreción de CAs obtenida por amperometría en célula única en células cromafines tratadas con IBMX, H-89 y 8-pCPT. La gráfica muestra la secreción de CAs de células cromafines bovinas obtenida en ausencia y presencia de Ex-4 (100nM) e incubadas con IBMX (500 μ M), H89 (50nM) o 8-pCPT (100 μ M). Cada barra representa los valores medios de la secreción de CAs a los 120s desde la exposición al secretagogo por células cromafines de un mismo cultivo. Las diferentes condiciones farmacológicas se representan normalizadas frente a sus respectivos controles. El n de células y espigas de cada condición aparecen en la tabla 4.3. El test estadístico utilizado fue la prueba *U* Mann-Whitney; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Tabla 4.3. Características de las espigas secretoras obtenidas en las células cromafines bovinas tratadas los fármacos IBMX, H-89 y 8pCPT-cAMP.

	I_{\max} (pA)	Q (pC)	$t_{1/2}$ (ms)	m (pA/ms)	N	n
Control	58,9 ± 3,80	1,4 ± 0,1	19,5 ± 1,9	8,5 ± 0,7	9	467
IBMX + Ex-4	110,7 ± 13,1 **	2,2 ± 0,3 *	16,4 ± 1,5	18,2 ± 2,3 **	10	1644
% Cambio	87,9 %	57,1 %	-15,9 %	114,1 %		
	I_{\max} (pA)	Q (pC)	$t_{1/2}$ (ms)	m (pA/ms)	N	n
Control	67,9 ± 10,1	1,4 ± 0,2	17,5 ± 1,1	8,1 ± 1,1	13	1195
H-89 + Ex-4	52,5 ± 5,65	0,9 ± 0,1 *	14,1 ± 0,8 *	6,9 ± 0,7	14	820
% Cambio	-22,7 %	-35,7 %	-19,4 %	-14,8 %		
	I_{\max} (pA)	Q (pC)	$t_{1/2}$ (ms)	m (pA/ms)	N	n
Control	57,4 ± 9,4	0,9 ± 0,1	13,6 ± 0,9	12,3 ± 2,1	13	811
8pCPT-cAMP	63,4 ± 6,1	1,2 ± 0,1	14,7 ± 1,0	14,1 ± 1,8	17	560
% Cambio	10,4 %	33,3 %	8,1 %	14,6 %		

N = número de células y n = número de espigas utilizadas en el análisis. Los datos se expresan en las unidades indicadas entre paréntesis. Cada condición farmacológica fue realizada con células procedentes de cultivos distintos. El análisis estadístico utilizado (*U* Mann-Whitney) se realizó a partir de los datos originales agrupados por células; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.1.7. Medidas de la capacidad eléctrica de las membranas y las corrientes de Ca^{2+} no muestran diferencias entre células cromafines tratadas con Ex -4 y células controles.

Otra forma de comprobar si el incremento en la secreción de CAs, mediado por la activación del GLP-1R, se debe a un aumento en el número de vesículas fusionándose con la membrana o a un mayor vaciamiento de cada vesícula, y dado que la amperometría permite medir la exocitosis de CAs únicamente en la región celular en contacto con el electrodo amperométrico, medimos la capacidad eléctrica de la membrana celular por medio de *patch-clamp* en configuración de célula completa. La capacidad de la membrana celular es una característica de las membranas posible gracias a que existe una diferencia de cargas eléctricas a ambos lados de la misma. Si se puede separar una carga, Q , por la aplicación de un potencial eléctrico, V , a través de la membrana, ésta se comporta como un condensador $C = Q/V$. La capacidad celular es proporcional al área de la superficie celular y, junto con la resistencia de la membrana, determina las variaciones en el potencial de la membrana en respuesta al flujo de corriente a través de los canales iónicos. Por tanto, midiendo el área de la membrana bajo la estimulación con pulsos despolarizantes, se puede determinar el balance entre eventos de exocitosis/endocitosis.

Para medir la capacidad eléctrica de las membranas, se sometieron las células a 6 pulsos despolarizantes de 10 ms cada uno y a continuación, 4 pulsos despolarizantes de 100 ms cada uno. Observamos que en presencia de Ex-4, la capacidad celular fue mayor respecto a las células control, sobre todo durante los pulsos despolarizantes de 100 ms. En el segundo pulso despolarizante de 100ms, la capacidad registrada es de $85,73 \pm 14,5$ fF en células controles y aumenta a $106,1 \pm 20,6$ fF en las células tratadas con Ex-4. Sin embargo, estas diferencias no son significativas (fig. 4.8, A).

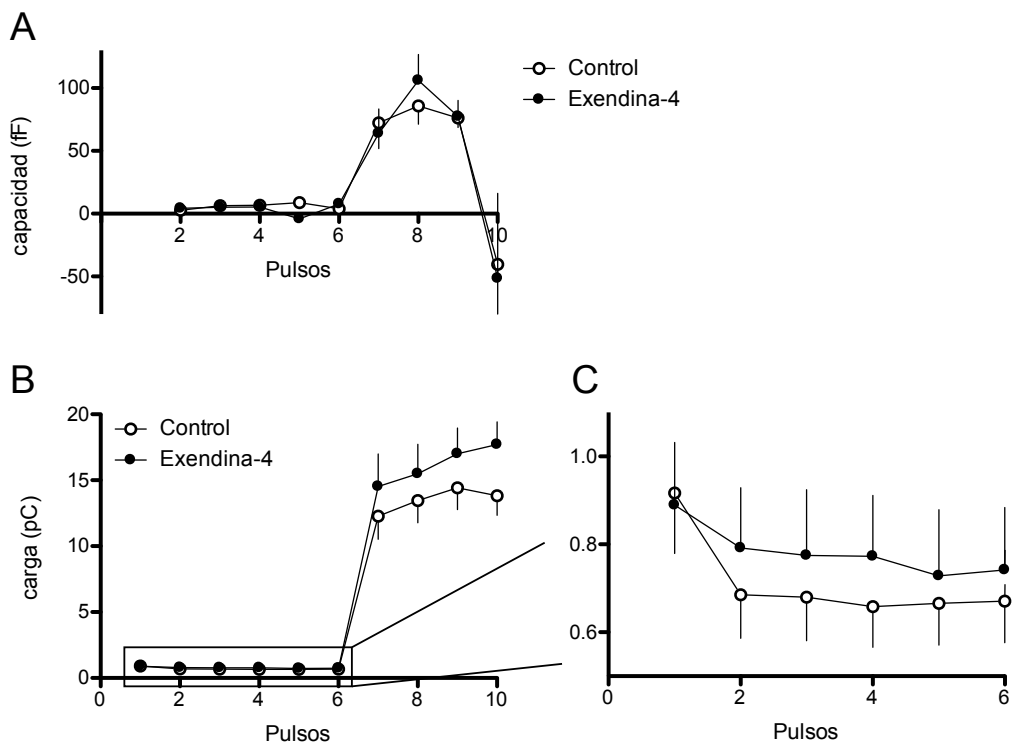


Fig. 4.8. Registro de *patch-clamp* en células cromafines bovinas tratadas con Ex-4. **A.** Cambio en la capacidad de la membrana después de la aplicación de 10 pulsos despolarizantes (6 pulsos de 10 ms seguidos de 4 pulsos de 100 ms) en presencia y ausencia de Ex-4. **B.** Cambio en la corriente de Ca^{2+} usando el mismo protocolo que la figura A (diferencias observadas no significativas). **C.** Ampliación de los 6 primeros pulsos de la gráfica mostrada en B. El número de muestras usadas en todas las gráficas fueron $n=16$ células controles y $n=11$ células incubadas con Ex-4. No existen diferencias significativas entre las células controles y tratadas con el fármaco usando test estadístico de *U* Mann-Whitney.

Utilizando el mismo protocolo que el usado para el estudio de la capacidad celular se midieron también las corrientes de Ca^{2+} . Cuando se aplican pulsos despolarizantes en la célula se produce la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje dejando entrar Ca^{2+} en la célula. Ese ión es el principal responsable de la inducción de la exocitosis.

Se midieron las corrientes de Ca^{2+} en condiciones basales y en células tratadas con Ex-4 (fig. 4.8, B). Las corrientes de Ca^{2+} en las células tratadas fueron mayores que en caso de los controles sin llegar a ser significativas las diferencias. Esto se debe al efecto, ya bien documentado, del AMPc sobre las corrientes de Ca^{2+} (Cachelin et al., 1983; De Jongh et al., 1996; Szappanos et al., 2018).

Con estos experimentos de *patch-clamp* concluimos que el número de vesículas fusionadas con la membrana plasmática no es significativamente mayor en las células tratadas con Ex-4 ya que, midiendo la capacidad eléctrica de la membrana, no se detecta un aumento la superficie de la misma (fig. 4.8, A). Esto está en concordancia con el análisis de frecuencia de las espigas amperométricas obtenido en los experimentos de amperometría (fig. 4.5, D).

4.1.8. El aumento de CAs liberadas con el tratamiento con Ex-4 e IBMX se corresponde con un aumento en la liberación de CgA.

Con el fin de conocer cómo es la respuesta secretora, a tiempo real, de las células cromafines bovinas, se desarrolló un sistema que usa una cámara de perfusión conectada a un detector amperométrico que registra las CAs liberadas (Green and Perlman, 1981; Herrera et al., 1985; Borges et al., 1986; Kumakura et al., 1986). Con estos experimentos de secreción a tiempo real se evita el efecto de una regulación autocrina y/o paracrina en caso de que existiese, ya que la perfusión hace que se laven continuamente las sustancias secretadas (Gandia et al., 1993).

Para estimular la secreción de CAs de una población de células cromafines, sometimos a las células a administraciones repetitivas de DMPP 10 μ M de 10 s de duración en solución de Krebs-HEPES con intervalos de lavado de 5 min. En la figura 4.9; A, se muestra un registro representativo de la respuesta secretora de las células donde se observa que el primer pulso de DMPP causó una secreción de 242 nA. La cantidad de CAs liberadas en el segundo pulso fue mayor que en el primer pulso en la mayoría de los registros y, a continuación, disminuyó gradualmente. En el caso de las células tratadas con Ex-4 e IBMX, el tratamiento con dichos fármacos comenzó a partir del sexto pulso con DMPP y se mantuvo hasta el décimo. La respuesta secretora en los 5 primeros pulsos con DMPP fue similar a la de los registros controles debido a que en ambos casos no estaba presente la Ex-4. Sin embargo, en los pulsos en los que las células estuvieron en contacto con el fármaco, la cantidad de CAs liberadas incrementó (fig. 4.9; B).

Las muestras eluidas fueron recolectadas durante el protocolo de estimulación y se analizaron por medio de *dot-blot* para cuantificar la cantidad de CgA de cada fracción. En la figura 4.9; D se representa una gráfica con los valores

medios de la intensidad de las bandas de *dot-blot* de cada fracción observando que el tratamiento con los fármacos da lugar a un incremento en la cantidad de cromogranina A (CgA) liberada. La CgA es una proteína de ≈ 80 KDa cuya mayor o menor liberación va a depender del tamaño y la longevidad del poro de fusión.

Lo que podemos concluir con estos experimentos de secreción a tiempo real y *dot-blot* es que el aumento de CAs liberadas por las células que fueron incubadas con el agonista del GLP-1R se corresponde con el aumento de proteínas liberadas, en concreto, de la CgA.

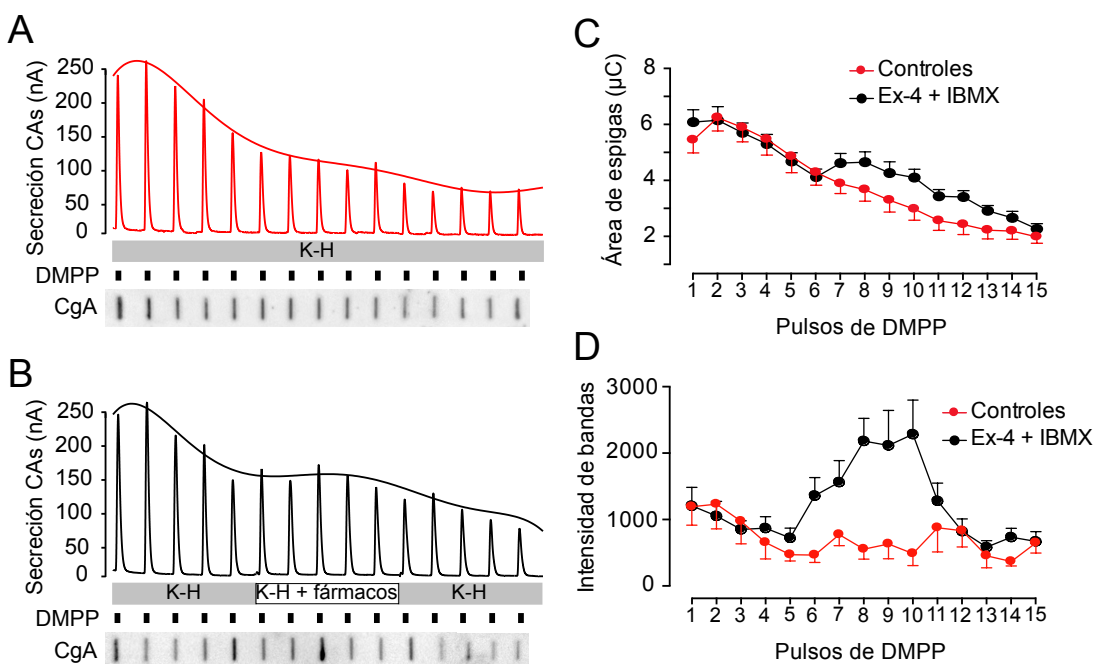


Fig. 4.9. El tratamiento con Ex-4 e IBMX produce un incremento de las CAs y las proteínas secretadas por una población de células cromafines. **A y B.** Registros representativos de la secreción de CAs producida por la estimulación con DMPP 10 μ M en células cromafines control o tratadas con Ex-4 e IBMX. Debajo de cada registro aparece la imagen de *dot-blot* realizado con las muestras eluidas en cada fracción marcando en ellas CgA. **C.** Representación de la media del área de cada espiga de los registros de secreción online de todas las células controles (n=14) y tratadas con los fármacos (n=10). Las diferencias entre los 5 primeros pulsos controles y problemas muestran un $p=0,27$, los 5 pulsos intermedios muestran un $p=0,04^*$ y los últimos 5 pulsos un $p=0,09$. El test estadístico utilizado fue el *t* de Student; $*p<0,05$. **D.** Representación de la media de la intensidad de bandas del *dot blot* de células controles (n=8) y tratadas con los fármacos (n=8). Las diferencias entre los 5 primeros pulsos controles y problemas muestran un $p=0,87$, los 5 pulsos intermedios muestran un $p=0,003^{**}$ y los últimos 5 pulsos un $p=0,19$. El test estadístico utilizado fue el *t* de Student; $*p<0,05$; $**p<0,01$.

4.1.9. El tratamiento con Ex-4 incrementa la liberación de CgA-EGFP de los gránulos cromafines.

Realizamos microscopía TIRF con el fin de estudiar la exocitosis de gránulos cromafines que contienen CgA-EGFP. Las células fueron estimuladas con DMPP 10 μ M durante 3 de los 5 min que se mantuvo en perfusión. Cuando los gránulos que contienen la CgA-EGFP se fusionan con la membrana, el aumento de pH vesicular da lugar a un incremento de la intensidad de fluorescencia y se mantiene mientras ocurre la liberación del contenido del gránulo.

Con el fin de sincronizar todos los eventos de exocitosis, cuajamos el momento de la fusión del gránulo al segundo 0. Un análisis secuencial de los eventos exocitóticos mostraron que, en el caso de las células controles, aproximadamente la mitad de los eventos representaron exocitosis parciales y la otra mitad representaron exocitosis completas. Consideramos exocitosis parciales aquellos eventos en los que, después del incremento de fluorescencia debido a la fusión de los gránulos con la membrana plasmática, las vesículas siguen mostrando fluorescencia. Esto indica que liberaron parte de su contenido, sin llegar a vaciarse por completo. Consideramos exocitosis completas aquellas en las que la intensidad de fluorescencia del gránulo, después de fusionarse con la membrana plasmática, desaparece por completo. En el caso de las células tratadas con Ex-4, las exocitosis parciales disminuyeron al 29,4% del total de eventos exocitóticos representando las exocitosis completas un 70,6%. Sin embargo, en células controles, la proporción de ambos tipos de exocitosis es similar (un 52,9% de exocitosis parciales frente a un 47% de exocitosis completas). El curso temporal de la fluorescencia de una exocitosis parcial y una exocitosis completa se representó en la fig. 4.10, A.

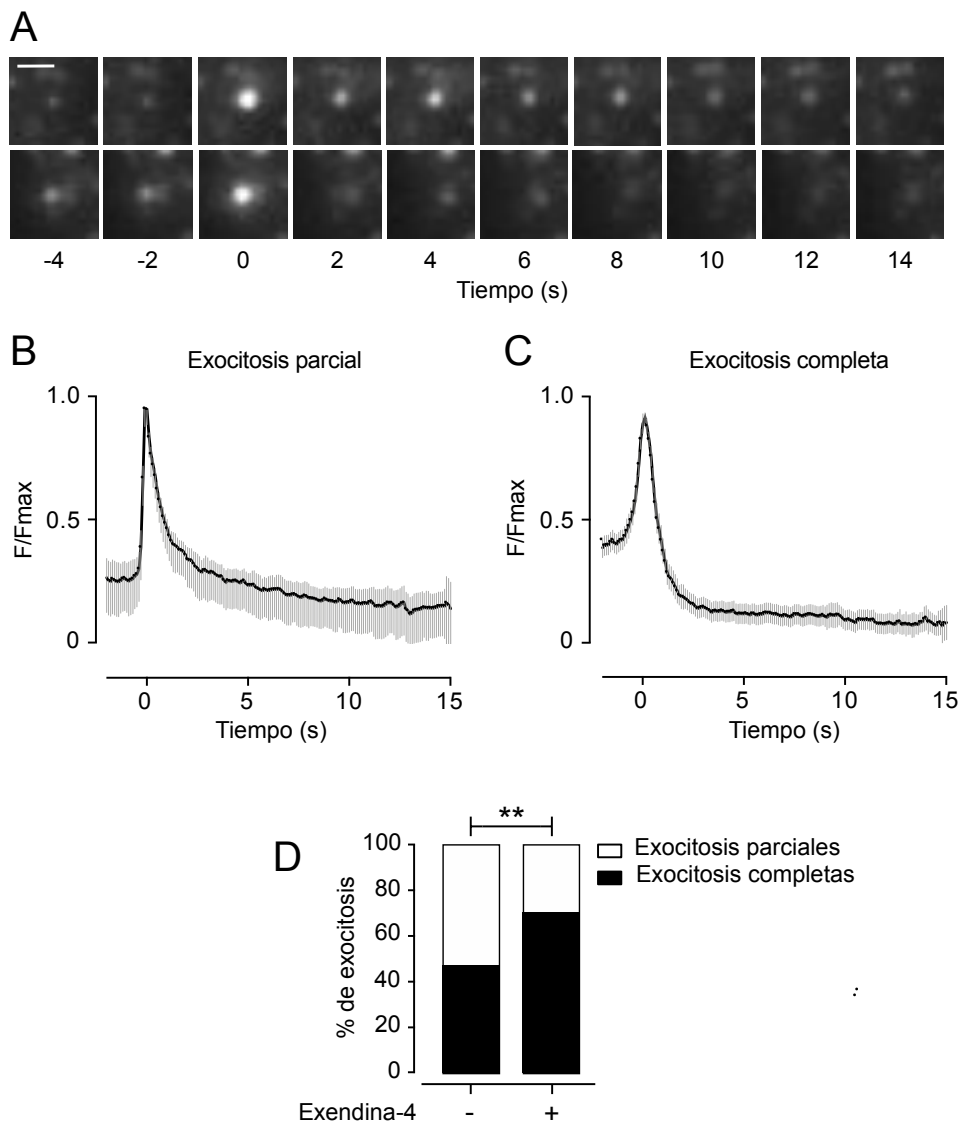


Fig. 4.10. Características de la exocitosis de CgA-EGFP en células cromafines bovinas examinadas por TIRFM. A. Ejemplos demostrando que las células cromafines bovinas llevan a cabo dos tipos de exocitosis de gránulos conteniendo CgA-EGFP. Los cuadros superiores muestran la secuencia de una exocitosis parcial y los inferiores corresponden a una exocitosis completa. Barra de escala = 1 μ m. **B y C.** Representación de la media de la señal de fluorescencia de los dos tipos de exocitosis mostrados en A. En el panel B se muestra la media de las exocitosis parciales de las células tratadas con Ex-4 y el panel C corresponde a la media de las exocitosis completas de las células tratadas. **D.** De un total de 17 eventos exocitóticos analizados en 10 células controles, el 52,9% de las exocitosis fueron parciales y el 47% restante fueron completas. En el caso de los 34 eventos exocitóticos analizados en 15 células tratadas con Ex-4, el 29,4% fueron parciales y el 70,6% fueron completas. La diferencia en la proporción de exocitosis parciales y completas entre células controles y tratadas con Ex-4 muestran un p valor de 0,0047**. El test estadístico utilizado fue el test binomial; **p<0,01.

4.2. ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN Y EXOCITOSIS DE CATECOLAMINAS EN RATONES PNMT-KO, CARENTES DE ADRENALINA.

4.2.1. Las glándulas adrenales de ratones PNMT-KO no contienen adrenalina y tienen un 50 % más de noradrenalina.

Los ratones PNMT-KO exhiben características fenotípicas similares a los ratones WT (129x1/SvJ) y no se observan problemas aparentes respecto a su desarrollo, incluyendo alteraciones de crecimiento o de conducta. No obstante, el peso de los ratones PNMT-KO a los tres meses de edad es significativamente menor (30,2 g en WT vs. 25,7 g en PNMT-KO). Así mismo, son capaces de sobrevivir hasta edades adultas cumpliendo sin dificultad sus funciones vitales de nutrición, relación y reproducción (Ebert et al., 2004).

Todos los ratones utilizados en este estudio fueron genotipados utilizando DNA genómico extraído de cada ratón (ver Anexo III), con el fin de verificar que los genotipos eran correctos. A continuación, se llevó a cabo la homogeneización tisular de médulas adrenales procedentes de ratones WT y PNMT-KO y las CAs presentes en dichos lisados se analizaron por medio de HPLC-ED.

En la figura 4.11 se muestran ejemplos de cromatogramas correspondientes a la inyección de 50 μ L de estándares de NA, A y DHBA a una concentración de 200 nM cada uno (trazo rojo) y muestras provenientes de ratones WT (trazo gris) y de ratones PNMT-KO (trazo negro) (fig. 4.11, A).

La falta de la enzima PNMT funcional produce la ausencia de A en la glándula adrenal. La consecuencia en el almacenamiento de CAs es el incremento de dos veces el contenido de NA (fig. 4.11, C). No obstante, este incremento en NA no compensa la falta de A, siendo el total de CAs en la médula adrenal de ratones PNMT-KO \approx 30% menor que los WT (fig. 4.11, B).

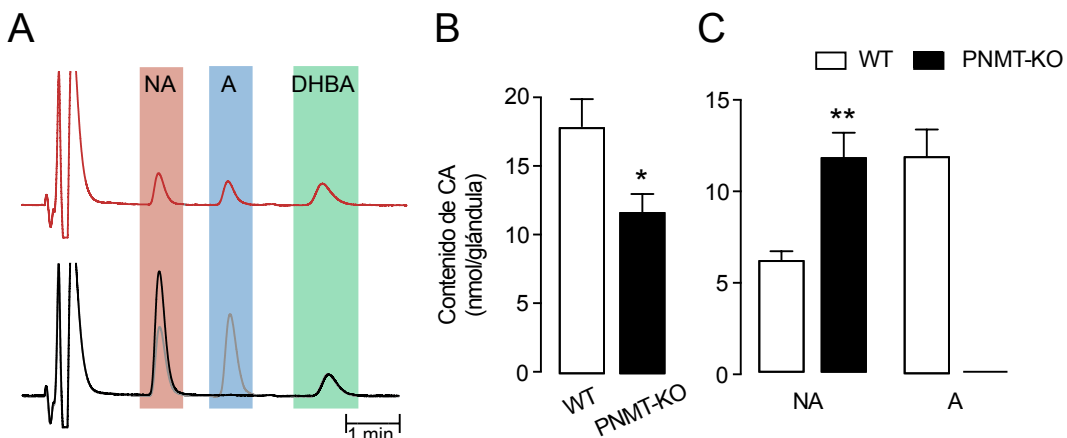


Fig. 4.11. Contenido de CAs en la médula adrenal. **A.** Cromatograma representativo de HPLC-ED mostrando trazos ejemplo de la detección de NA, A y DHBA en un estándar (trazo rojo) y las CAs contenidas en las glándulas adrenales de los animales WT (trazo gris) y PNMT-KO (trazo negro). **B.** Gráfico que muestra el contenido total de CAs en nmol/glándula de WT (n=13, columna blanca) y PNMT-KO (n=13, columna negra). Los datos se muestran como las medias \pm SEM. * $p < 0,05$ (test t Student). **C.** Cuantificación de A y NA por separado en ratones WT y PNMT-KO. Los datos se muestran como las medias \pm SEM. ** $p < 0,01$ (test t Student con la corrección de Welch).

4.2.2. Regulación homeostática de la glucosa en ratones PNMT-KO.

La A es una de las principales hormonas contra-reguladoras de la insulina. En individuos PNMT-KO, uno de los efectos de la ausencia de A debería ser la alteración en el control de la glucemia incrementada en condiciones de estrés, tales como la hipoglucemia. Con el fin de comprobar tal efecto, se realizó un test de tolerancia a la insulina midiendo la glucosa en sangre a diferentes tiempos tras una inyección de 2 UI/Kg de insulina intraperitoneal.

Las medidas de sangre a tiempo 0 muestran que los ratones PNMT-KO tienen una glucemia basal en condiciones de ayuno significativamente mayor que los individuos WT (70,4 en WT vs. 91,9 en PNMT-KO) (Todos los valores de glucemia expresados en mg/dL). Sin ayuno, la glucemia en ratones WT es más alta que en condiciones de ayuno (121,7 sin ayuno vs. 70,4 en ayuno), sin embargo, esas diferencias en la glucemia entre ayuno y no ayuno no son significativas en el caso de los ratones PNMT-KO (103,4 sin ayuno vs. 91,9 en ayuno) (fig. 4.12, A). Estos resultados indican que la regulación de la glucosa en ratones WT y PNMT-KO es diferente.

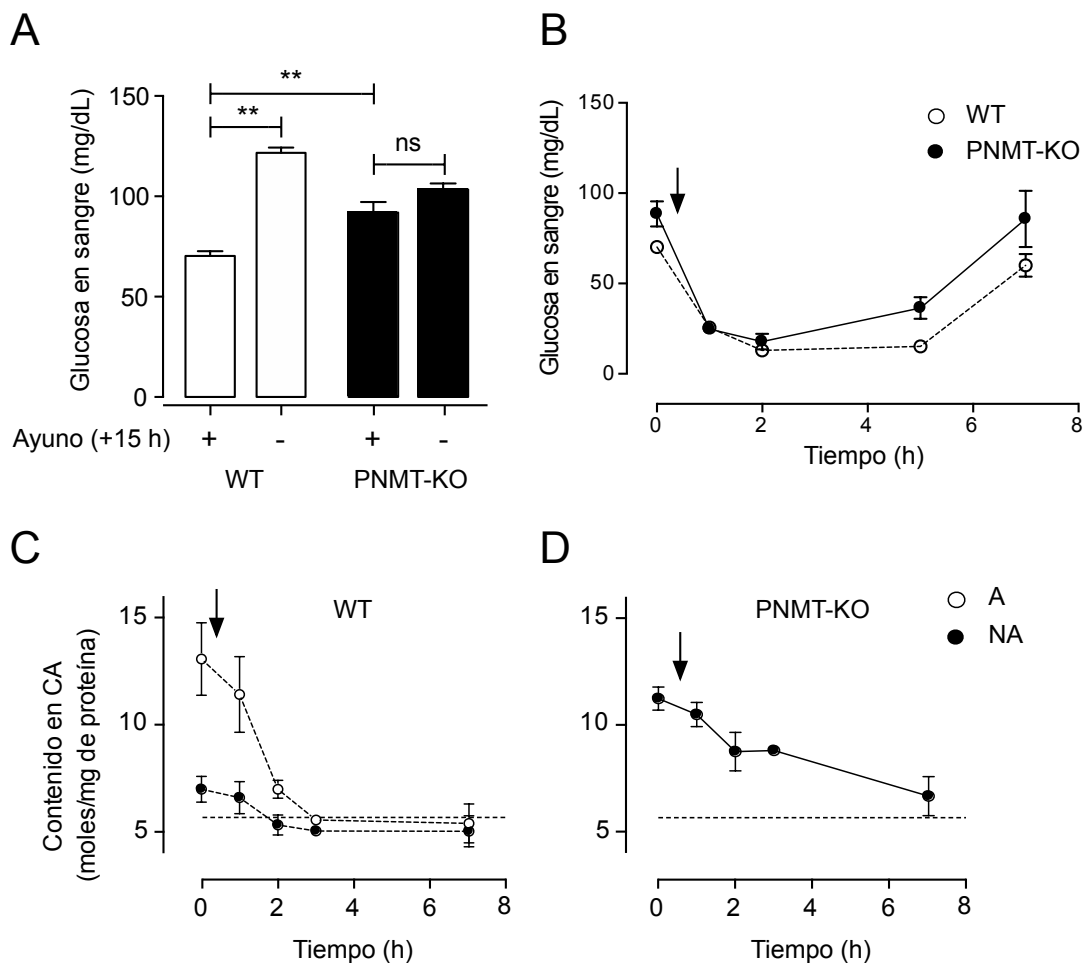


Fig. 4.12. Efecto de la ausencia de adrenalina en la respuesta a la hipoglucemia. **A.** Concentración de glucosa en sangre de ratones WT y PNMT-KO sometidos a ayuno y sin ayuno ($n=25$ WT con ayuno, $n=33$ WT sin ayuno, $n=28$ PNMT-KO con ayuno y $n=32$ PNMT-KO sin ayuno). Los datos se muestran como las medias \pm SEM. $*p<0,05$; $**p<0,01$ (test t Student). **B.** Test de tolerancia a la insulina en individuos WT y PNMT-KO. La administración de 2 UI/Kg de insulina se representa con una flecha negra. Los círculos blancos unidos por la línea discontinua se corresponden con los valores medios de glucosa en sangre de ratones WT y los puntos negros unidos con línea continua son las medidas de los PNMT-KO ($n=18$ WT; $n=18$ PNMT-KO). **C.** y **D.** Curso temporal del contenido de catecolaminas de la adrenal después de la administración de 2 UI/Kg de insulina (señalado con una flecha negra) en ratones WT (panel C; La A se representa con puntos blancos unidos por una línea discontinua y la NA se representa con puntos negros unidos por una línea discontinua) y PNMT-KO (panel D; La NA de los individuos PNMT-KO se representa con puntos negros unidos por una línea continua). Las CAs fueron medidas por medio de HPLC-ED a partir del lisado de glándulas adrenales de los ratones sacrificados al final del experimento ($n=18$ WT; $n=18$ PNMT-KO). Los datos se muestran como las medias \pm SEM.

La inyección intraperitoneal de 2 UI/Kg de insulina causó la disminución de la glucemia tanto en ratones WT y PNMT-KO. Transcurridas 2 h, la glucemia desciende a 13 en WT y a 17,9 en PNMT-KO. Después de 7 h. tras la inyección de insulina, la glucemia alcanza niveles cercanos a los basales, 60 en WT y 85,7 en PNMT-KO (Todos los valores de glucemia expresados en mg/dL) (fig. 4.12, B).

Sabemos que la hipoglucemia desencadenada por la insulina activa el sistema simpatoadrenal a través del nervio esplácnico, resultando en una liberación de CAs. En condiciones fisiológicas, la respuesta de la adrenal es principalmente la liberación de A (Yoshimatsu et al., 1987; Borg et al., 1994). Nos preguntamos si los ratones PNMT-KO son capaces de liberar NA bajo esas condiciones.

Para intentar responder a esta pregunta se inyectó 2 UI/kg de insulina intraperitonealmente a ratones WT y PNMT-KO y, transcurridas 1, 1,5, 2, 3 y 7 horas, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. A continuación, se extrajeron y lisaron sus glándulas adrenales con el fin de medir el contenido de CAs por HPLC-ED.

En ratones WT, la insulina produce la secreción de A resultando en una fuerte disminución del contenido de esta CA en la adrenal. Por el contrario, se observa una menor reducción del contenido de NA (fig. 4.12, C). Sin embargo, en los individuos que carecen de A, las adrenales liberan en su lugar NA, resultando en una reducción significativa de esta CA durante 2 h después de la administración de insulina (fig. 4.12, D). Como se comentó anteriormente, la respuesta de la adrenal a la hipoglucemia está mediada por la activación selectiva del nervio esplácnico, principalmente en las células adrenales, estos resultados indican que la NA es acumulada y liberada por células adrenérgicas.

4.2.3. La liberación de CAs es menor en las células cromafines de los ratones PNMT-KO.

Se llevaron a cabo experimentos de amperometría en célula única con células procedentes de ratones PNMT-KO, y sus correspondientes controles, con el fin de estudiar la secreción y los parámetros de la cinética de exocitosis de CAs. Se usaron dos tipos de secretagogos: ACh, neurotransmisor natural liberado por el nervio esplácnico que actúa sobre receptores nicotínicos y muscarínicos y el BaCl₂, el cuál promueve exocitosis de forma independiente de receptores.

En el panel A de la figura 4.13 se muestra el curso temporal típico de secreción evocada por BaCl₂, el cuál da lugar a una respuesta secretora prolongada en el tiempo y con baja frecuencia de espigas. Esto lo hace un secretagogo idóneo para cuantificar los parámetros de la cinética de exocitosis y el tamaño cuantal, es decir, la cantidad de CAs liberadas por vesícula. El panel B de la figura 4.13 representa un registro amperométrico típico obtenido con la estimulación con ACh. La unión de la ACh a sus receptores desencadena la exocitosis de CAs inmediatamente después de la aplicación del secretagogo. Aproximadamente 1 min después de la aplicación de la ACh, la respuesta secretora se reduce fuertemente como consecuencia de la desensibilización de los receptores, es decir, la célula deja de responder a la acción del ligando como método de protegerse frente a una estimulación excesiva o prolongada.

La frecuencia de eventos exocitóticos en el caso de los ratones PNMT-KO es menor que la de los individuos WT, tanto cuando se usa el BaCl₂ como secretagogo como cuando se usa la ACh (fig. 4.13, C y D).

Cuando usamos BaCl₂ para estimular la exocitosis, observamos que la secreción total de CAs, cuantificada por la integración de las espigas amperométricas, se reduce un ≈45% en el caso de las células cromafines procedentes de ratones PNMT-KO, siendo esta disminución significativa. Al utilizar ACh como secretagogo, la disminución de la secreción de CAs no llega a ser significativa, siendo un ≈23% menor en células cromafines de individuos PNMT-KO. (fig. 4.13, E).

En la tabla 4.4 se muestran los parámetros cinéticos de las espigas amperométricas obtenidas en en las células cromafines de individuos WT y PNMT-KO. Observamos que, usando BaCl₂ como secretagogo, la altura de las espigas (I_{max}) y su carga (Q) se reducen en la condición PNMT-KO (tabla 4.4). Estas diferencias en los parámetros cinéticos no se observan cuando se utiliza la ACh para estimular la exocitosis. No obstante, haciendo una relación entre los parámetros cinéticos comentados, I_{max} y Q, se obtienen diferencias significativas entre individuos WT y PNMT-KO, bajo la estimulación con ambos tipos de secretagogos. Es decir, si representamos gráficamente los valores de I_{max} , en el eje de ordenadas, y de Q, en el de abscisas, vemos que a medida que incrementa la altura de las espigas, incrementa su carga (fig. 4.14). No obstante, a un mismo valor de carga, las espigas procedentes de células PNMT-KO tienen valores mayores de I_{max} , indicando que las espigas son más altas y, por tanto, más rápidas. Todo ello indica que existen diferencias en la cinética de liberación de CAs entre las células cromafines de ratones WT y PNMT-KO.

Teniendo en cuenta que la diferencia que hay entre las células cromafines aisladas de ratones WT y PNMT-KO, es que las adrenérgicas procedentes de los PNMT-KO acumulan NA, en vez de A, podemos pensar que la afinidad de la matriz vesicular de las células adrenérgicas por la NA, es distinta a la afinidad que tiene por la A. Es por esto que se observan esas diferencias en la cinética de liberación de las CAs entre ambos fenotipos.

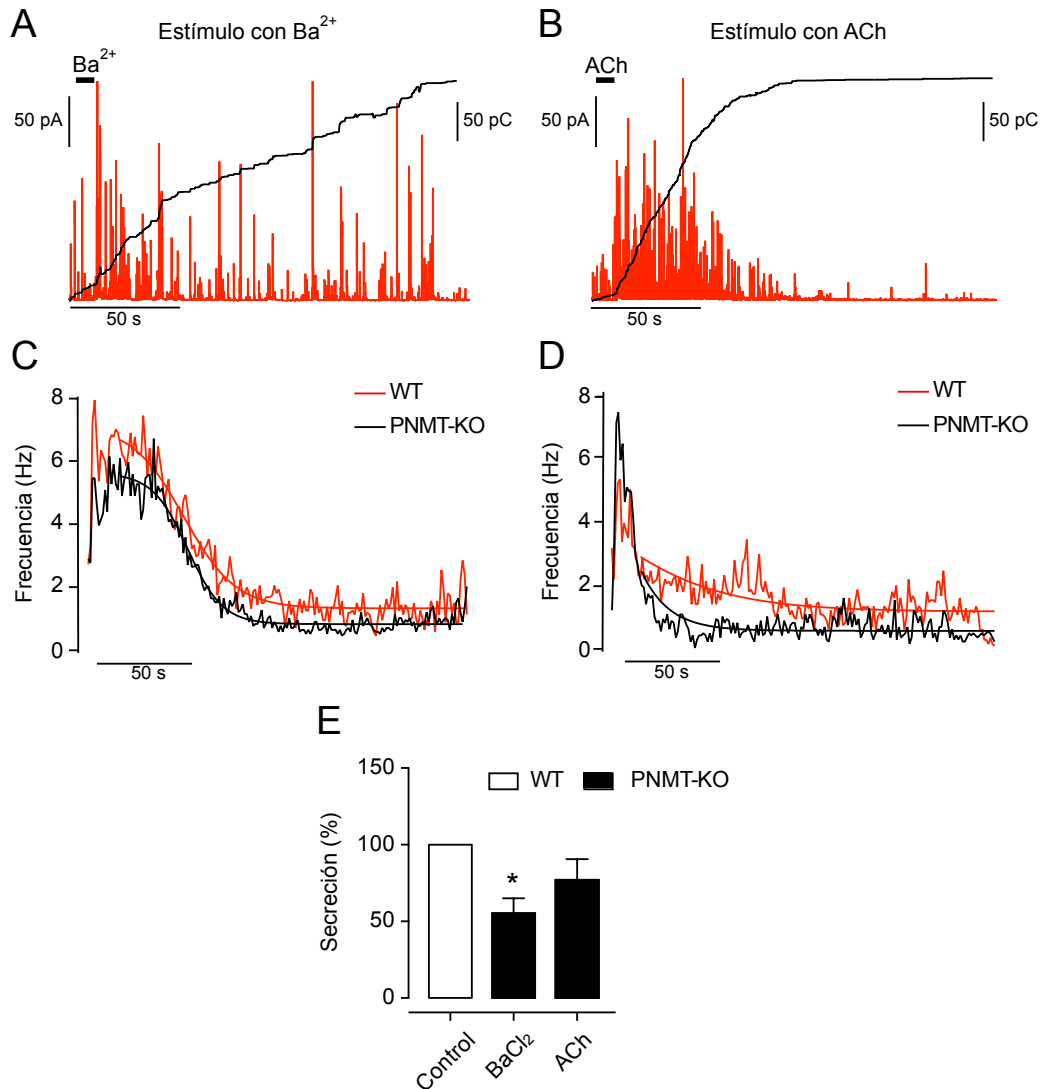


Fig. 4.13. Disminución en la secreción de CAs en células cromafines de ratones PNMT-KO. A y B. Registros amperométricos típicos en el que cada espiga (representadas en rojo) corresponden a las CAs liberadas de una única vesícula. La secreción acumulada se representa con el trazo en negro. La exocitosis es provocada aplicando un pulso de 5 s con $BaCl_2$ (5 mM) en el caso del panel A y con ACh (10 μ M) en el caso del panel B. Ambos registros pertenecen a individuos WT. C y D. Análisis amperométricos de la frecuencia de eventos excitotóxicos en ratones WT (trazo rojo) y PNMT-KO (trazo negro). El panel C corresponde a los registros en los que se usó $BaCl_2$ como secretagogo y el panel D a aquellos en los que se usó ACh. Registros ajustados a una función sigmoide. E. Secreción normalizada de CAs medida en los registros amperométricos (media \pm SEM), a los 120 s después de la exposición al secretagogo, comparando células de ratones WT con células de ratones PNMT-KO y comparando la respuesta frente a dos tipos de secretagogos ($BaCl_2$ y ACh). La cantidad de células y espigas utilizadas de cada condición se muestra en la tabla 4.4. El test estadístico utilizado fue la prueba *U* Mann-Whitney; * $p < 0,05$.

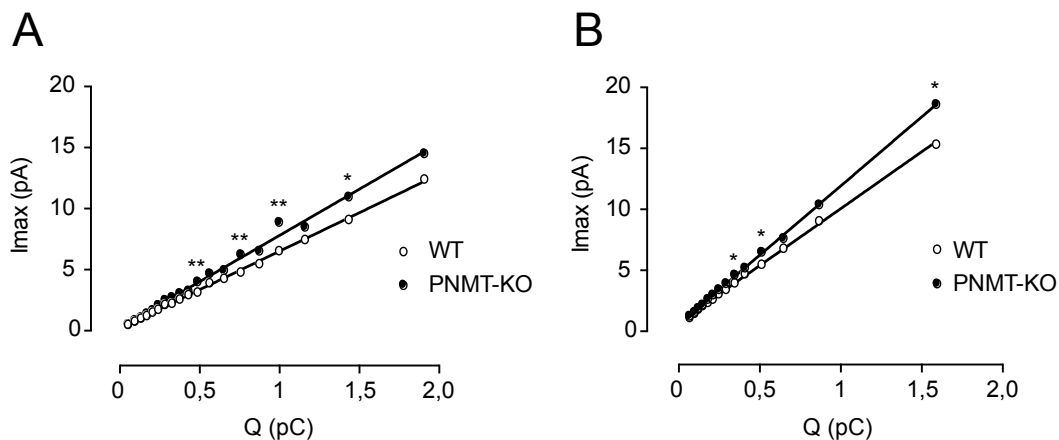


Fig. 4.14. Efectos del BaCl₂ y la ACh en la relación entre la amplitud de las espigas secretoras y el tamaño cuantal de ratones PNMT-KO y WT. **A.** Se utilizó como secretagogo BaCl₂. Todas las espigas (2566 de ratones WT y 1822 de ratones PNMT-KO) se agruparon independientemente en 20 intervalos de carga en incremento conteniendo el mismo número de espigas cada uno. Las espigas se dividieron en WT y KO y se analizaron su I_{max}. **B.** Se usó ACh para inducir la secreción. Las espigas (1915 de ratones WT y 911 de ratones PNMT-KO) se agruparon en 14 intervalos de incrementos de carga con el mismo número de espigas cada uno. Test de *U* de Mann-Whitney con la corrección de Bonferroni; **p*<0,005; ***p*<0,001.

Tabla 4.4. Características de las espigas secretoras obtenidas en las células cromafines de ratones WT y PNMT-KO estimuladas con dos tipos de secretagogos.

	I_{\max} (pA)	Q (pC)	$t_{1/2}$ (ms)	m (pA/ms)	N	n
Control/BaCl₂	51,2 ± 5,2	0,8 ± 0,1	12,5 ± 1,0	15,4 ± 2,0	16	2566
PNMT-KO/BaCl₂	40,2 ± 3,7	0,5 ± 0,1 *	10,8 ± 0,8	12,8 ± 1,7	17	1822
% Cambio	-21,4 %	-29,5 %	-13,6 %	-17,0 %		
	I_{\max} (pA)	Q (pC)	$t_{1/2}$ (ms)	m (pA/ms)	N	n
Control/ACh	53,6 ± 5,8	0,5 ± 0,1	7,5 ± 0,4	18,3 ± 2,0	15	1915
PNMT-KO/ACh	58,0 ± 6,3	0,5 ± 0,1	6,9 ± 0,1	18,9 ± 2,5	15	911
% Cambio	8,3 %	-0,8 %	-1,5 %	3,3 %		

N = número de células y n = número de espigas utilizados en el análisis. Los datos se expresan en las unidades indicadas entre paréntesis. Los valores mostrados cuando se usa BaCl₂ como secretagogo provienen de células del mismo cultivo y de un experimento de amperometría realizado el mismo día. Este experimento se realizó por duplicado a partir de dos cultivos distintos obteniendo datos similares. Los datos mostrados cuando se usa la ACh como secretagogo provienen de células del mismo cultivo y de un experimento de amperometría realizado el mismo día. Este experimento se realizó por triplicado a partir de dos cultivos distintos obteniendo datos similares. El test estadístico utilizado (*U* Mann-Whitney) se realizó a partir de los datos originales agrupados por células; *p<0,05.

Discusión

5. DISCUSIÓN.

En esta Tesis doctoral, hemos descubierto un mecanismo hasta ahora desconocido por el cual la célula cromafín es capaz de modular la cantidad de neurotransmisores que libera en respuesta a la activación del receptor GLP-1. La forma en la que modula la liberación de los neurotransmisores parece ser una mayor expansión del poro de fusión o bien a una modificación de la agregación de la matriz vesicular durante la exocitosis. Este proceso cursa una ruta clásica de segundos mensajeros mediada por el AMPc.

Por otro lado, estamos más cerca de responder una pregunta que suscita curiosidad a los fisiólogos desde hace mucho tiempo: ¿las células adrenérgicas lo son porque tienen adrenalina o son así a pesar de la CA que acumula? El uso de ratones PNMT-KO nos ha permitido demostrar que, a pesar de no tener A, siguen teniendo células adrenérgicas que acumulan y liberan NA. La reducción del tamaño cuántico de liberación de CAs en células procedentes de estos ratones indica que la matriz de una célula adrenérgica no es capaz de retener NA con la misma afinidad con la que retiene A. Existe, por tanto, una fuerte especialización de las vesículas secretoras con respecto al tipo de CA que acumula.

5.1. ESTUDIO DEL GLP-1R EN CÉLULAS CROMAFINES.

5.1.1. ¿El receptor de GLP-1 se expresa en células cromafines?

Nos planteamos la posibilidad de que GLP-1R pueda expresarse en las células cromafines. Ha sido descrita la presencia de varios receptores metabotrópicos en las células cromafines, tales como los receptores de adenosina (Chern et al., 1988), los receptores de histamina (Marley et al., 1991), los receptores GABA (Oset-Gasque et al., 1993) o los receptores PACAP (Przywara et al., 1996). Todos ellos tienen en común la capacidad de modificar la secreción cuántica de las CAs por medio de la regulación de segundos mensajeros intracelulares. Algunos de estos receptores también se expresan en las células β -pancreáticas estando implicados, en este caso, en la regulación de la liberación de insulina. Uno de estos receptores, que interviene en la regulación de la secreción de insulina, es el GLP-1R, el cual, además, ha sido descrito en células PC12 (Perry et al., 2002). Estas

células de feocromocitoma de rata se originaron a partir de células cromafines y todavía comparten muchas características en común con ellas (Greene and Tischler, 1976). Es debido a este parentesco entre las células PC12 y las cromafines por lo que en esta tesis nos planteamos que el GLP-1R pueda expresarse en las células cromafines.

Para confirmarlo, hemos llevado a cabo experimentos de PCR a partir de muestras de cDNA procedentes del RNA total de células cromafines bovinas. Dichos experimentos han puesto de manifiesto que estas células expresan el receptor GLP-1 (fig. 4.1). También quisimos comprobar dónde se localiza el receptor en la célula. Con técnicas inmunocitoquímicas comprobamos que está ubicado en la membrana plasmática, como es de esperar para un receptor. Sin embargo, también aparece ampliamente distribuido en el citoplasma de la célula, probablemente en el interior de algún compartimento celular (fig. 4.2). ¿Cuál puede ser el motivo por el que el receptor, cuya función se lleva a cabo en la membrana plasmática, está presente en el citoplasma? Varias posibilidades podrían dar explicación a esta observación. Puede tratarse de un mecanismo de reciclaje del receptor, de internalización debido a la unión de su ligando o es posible que el receptor se mantenga en compartimentos celulares preparados para dirigirse a la membrana plasmática en respuesta determinados estímulos, como por ejemplo situaciones de estrés crónico, diabetes o ejercicio intenso. El grupo de Alessandro Bisello estudió la localización del GLP-1R en células HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293*) y MIN6 (*Mouse Insulinoma-6*) transfectadas con plásmidos que portan la secuencia del receptor asociada a EGFP (Syme et al., 2006). Observaron que se localiza en membrana plasmática y en compartimentos intracelulares asociados con caveolina-1, necesaria para la internalización y el reciclaje del receptor tras la estimulación con su agonista. En el 2009 se publicó otro artículo acerca de la localización del GLP-1R marcado con EGFP en células CHO (*Chinese Hamster Ovary*). Detectaron el receptor principalmente en el citoplasma celular, siendo su concentración en la membrana plasmática más baja. Propusieron que el GLP-1R que aparece en membrana plasmática es la forma activa y glucosilada del receptor preparado para unirse a su agonista. El GLP-1R que aparece en citoplasma es receptor no glucosilado (Bavec and Licar, 2009).

A continuación, tratamos células cromafines con Ex-4 con el fin de activar el GLP-1R. Se ha descrito la capacidad de este fármaco para actuar como agonista del receptor (Göke et al., 1993) y, además, muestra ventajas respecto al agonista fisiológico del mismo, el GLP-1, debido a su mayor vida media en plasma (Greig et al., 1999). Como se comentó anteriormente, la activación de determinados receptores metabotrópicos en las células cromafines, tales como los receptores de adenosina, los GABA o los PACAP, potencian la secreción de CAs a través del aumento de AMPc. Esto lo hacen activando canales de Ca^{2+} (Morita et al., 1987; Doupnik and Pun, 1992; Artalejo et al., 1990; Parramón et al., 1995), bloqueando canales de K^+ (Garber et al., 1990), alterando la organización del citoesqueleto (Perrin et al., 1992), modificando el pH vesicular (Camacho et al., 2006) o interaccionando con componentes de la maquinaria exocitósica (Risinger and Bennett, 1999; Chheda et al., 2001; Hepp et al., 2002; Nagy et al., 2004; Gao et al., 2015). Es posible que la activación del GLP-1R con Ex-4, como ocurre con los receptores metabotrópicos comentados, dé lugar a un incremento en las concentraciones intracelulares de AMPc aumentando la cantidad de CAs liberadas. Medidas realizadas con HPLC-ED demuestran que ocurre un aumento en el contenido de CAs de las células tratadas con agonistas del GLP-1R.

Si hay mayor contenido de CAs, sería lógico pensar que se debe a un aumento en la síntesis de las mismas. Sabemos que la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) es el paso limitante en la ruta de síntesis de CAs (Levitt et al., 1965) por lo que, para comprobar si la activación del GLP-1R potencia la síntesis de las mismas, realizamos medidas de la TH por medio de WB. En caso de que hubiera un incremento en la síntesis de la TH inducida por el receptor, podríamos afirmar que su activación potencia la síntesis de CAs. Los resultados de WB revelan un incremento en la cantidad de TH cuanto mayor es el tiempo de incubación con el agonista del receptor (fig. 4.3, C y D). Por otro lado, transfecciones de células PC12 con plásmidos que portan la secuencia de la TH asociada a un gen reportero muestran que la activación del GLP-1R produce un aumento en la expresión de la TH (fig. 4.4).

Al menos dos mecanismos podrían explicar el motivo por el que la activación del GLP-1R da lugar al aumento de la TH. Por un lado, ha sido demostrado que el gen de la TH porta secuencias que se ven activadas por acción del AMPc (Harrington

et al., 1987; Fader and Lewis, 1990), incrementando su expresión por la acción del receptor. Por otro lado, el AMPc, a través de PKA, puede incrementar directamente la actividad de la TH por medio de la fosforilación de su residuo ser40 (Joh et al., 1978; Kim et al., 1993). En nuestro caso, solo hemos observado un incremento en la expresión del gen de la TH, no obstante, es posible que también esté ocurriendo un incremento de su actividad por medio de su fosforilación.

Es importante destacar que 1 hora de incubación con agonistas del GLP-1R no es suficiente para que ocurra mayor síntesis de CAs, según muestran las medidas realizadas con HPLC-ED. El incremento de la síntesis de CAs requiere la potenciación de la expresión del gen de la TH, que sea transcrita la proteína TH y que las CAs formadas se acumulen en el interior de las vesículas. Es necesaria más de 1 hora para producir un incremento significativo en el contenido neto de CAs en el interior de las vesículas (Machado et al., 2001). A pesar de ello, los experimentos de amperometría revelan un aumento de las CAs liberadas tras apenas 20 minutos de incubación. Por tanto, el incremento de CAs liberadas no puede deberse solo a la potenciación de su síntesis, sino que debe haber otro mecanismo mediando dicha respuesta.

5.1.2. ¿Qué vía de segundos mensajeros se pone en marcha tras la activación del GLP-1R en las células cromafines?

En el presente trabajo hemos empleado la amperometría en célula única en combinación con tratamientos farmacológicos para comprobar la vía de segundos mensajeros que tiene lugar tras la estimulación de GLP-1R en células cromafines. Parece claro que, tratándose de un receptor acoplado a proteína G, la unión de su agonista producirá un incremento de AMPc a través de AC. Han sido descritas varias cascadas de señalización intracelular activadas por AMPc. Por un lado, el AMPc podría activar la vía de la PKA (Álvarez et al., 1997; Morita et al., 1987). En células cromafines también se ha descrito otra vía mediada por el AMPc, independiente de PKA, que requiere la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Emery and Eiden, 2012). En el caso de las células β -pancreáticas, el AMPc producido a partir de la activación de GLP-1R, puede interactuar con PKA (Gromada et al., 1995) o con EPAC (Renström et al., 1997) (fig. 1.9).

Hemos incubado células cromafines con agonistas del GLP-1R, en presencia de inhibidores específicos de fosfodiesterasas que degradan el AMPc -el IBMX-. Estudios previos demostraron que el tratamiento con IBMX no causa ningún efecto en la modulación de la secreción de CAs en células cromafines (Machado et al. 2001) pero en nuestros experimentos, combinando este tratamiento con Ex-4, incrementa 3 veces la secreción de CAs. Confirmamos, como ya habían hecho estudios previos, que el AMPc es clave en el efecto mediado por el receptor. Por otro lado, cuando se activa el GLP-1R en presencia de inhibidores de PKA -el H-89-, la secreción de CAs se reduce a la mitad respecto a las células control (fig. 4.7). Si el aumento de la liberación de CAs al activar el GLP-1R no dependiera de la vía PKA, la incubación con H-89, en presencia de Ex-4, no debería afectar dicho incremento. Demostramos que la estimulación del GLP-1R potencia la exocitosis de CAs por medio de la activación de la PKA.

Además, activando la ruta EPAC con análogos de AMPc selectivos para EPAC -el 8-pCPT-, no observamos diferencias en la secreción de CAs (fig. 4.7). Se ha descrito la presencia de EPAC en tejido adrenal (Kawasaki et al., 1998) y cómo la activación de esta vía, por medio de la estimulación de receptores PACAP o por medio del 8-pCPT, activa ciertos grupos de proteínas Rap1 en células cromafines (Emery et al., 2013). Sin embargo, hasta ahora no había sido estudiada su implicación en la secreción de CAs en células cromafines. Bajo nuestras condiciones experimentales, la vía de señalización mediada por EPAC no es activada en estas células estimulando la exocitosis de CAs (fig. 5. 1).

Rëstrom y colaboradores propusieron en 1997 que la secreción de insulina en las células β -pancreáticas podía ocurrir por un mecanismo independiente de PKA (Rëstrom et al., 1997). Fue Kashima y colaboradores quienes demostraron que ese mecanismo independiente de PKA potenciando la secreción de insulina era la vía EPAC. La afinidad del AMPc es muy distinta con PKA y con EPAC, siendo la K_d de ≈ 100 nM y ≈ 10 μ M, respectivamente (Kashima et al., 2001). Esto supone que cantidades muy bajas de AMPc es suficiente para activar la PKA y, sin embargo, es necesaria mayores concentraciones de AMPc para activar EPAC, al menos en células β -pancreáticas. Es posible que, en nuestros experimentos, la concentración de AMPc fuera muy baja cuando activamos EPAC y, por tanto, no fuera suficiente para estimular dicha vía. Si activáramos el GLP-1R por medio de Ex-4 o utilizáramos

IBMX, conseguiríamos aumentar los niveles de AMPc y no descartamos que, bajo esas condiciones experimentales, viéramos activación de EPAC.

Otro trabajo publicado por Islam y colaboradores puso de manifiesto que la vía EPAC era capaz de estimular la síntesis pero no la liberación de glucagón y GLP-1 en las líneas celulares endocrinas InR1-G9 (células α -pancreáticas aisladas de hámster) y GLUTag (células L-intestinales productoras de glucagón aisladas de ratón). Por el contrario, la activación de PKA incrementó tanto la síntesis como la secreción de esas hormonas peptídicas (Islam et al., 2009). En esta tesis, no hemos estudiado la implicación de la PKA o EPAC en la síntesis de CAs en las células cromafines, pero parece ocurrir lo mismo que en las células InR1-G9 y GLUTag con respecto a la secreción. La PKA interviene en la liberación de las CAs, no habiendo mediación aparente de la vía EPAC en este proceso.

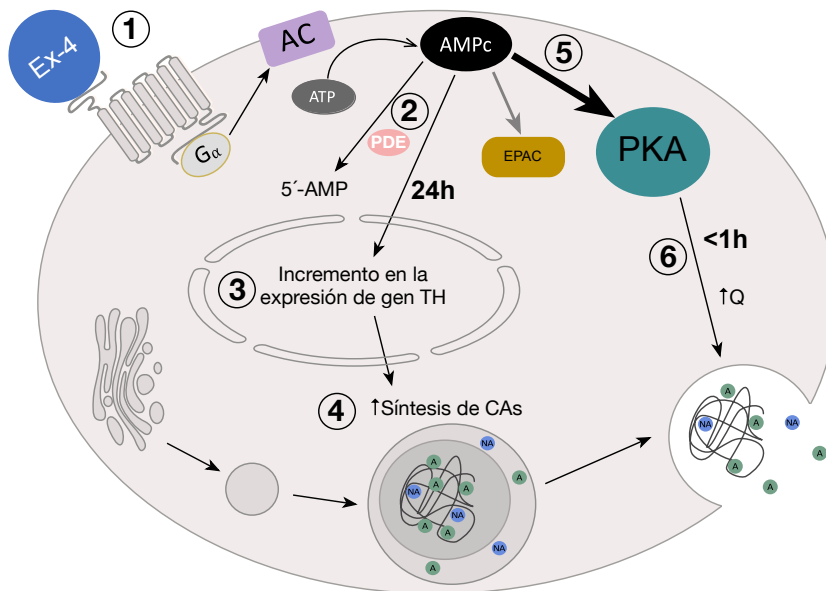


Figura 5.1. Modelo de la ruta intracelular que ocurre tras la activación del receptor GLP-1. 1, la unión de Ex-4 al GLP-1R produce el incremento de AMPc mediado por la AC. 2, AMPc es degradado a 5'-AMP por la acción de las fosfodiesterasas (PDE). 3, AMPc puede actuar incrementando la expresión del gen de la TH por medio de la activación de los elementos CREB presentes en la región promotora del mismo. 4, dicho aumento de la expresión del gen de la TH induce la potenciación de la síntesis de CAs, lo cual se hace evidente tras 24 horas de tratamiento con Ex-4. 5, AMPc también activa la vía PKA, pero no muestra variaciones en la activación de la vía EPAC en estas células. 6, PKA aumenta el tamaño cuántico de liberación de CAs (Q) por medio de su interacción con la maquinaria exocitótica. Esto último ocurre en un periodo de tiempo inferior a 1 hora.

5.1.3. La activación de GLP-1R modifica el tamaño cuántico de la liberación de catecolaminas.

La activación de GLP-1R en células cromafines no solo incrementa la síntesis y la liberación de CAs, sino que también modifica la cinética de la exocitosis.

Los experimentos de amperometría en célula única nos permiten obtener datos acerca de los parámetros cinéticos de los eventos individuales de la exocitosis. El análisis de la liberación de CAs de cada vesícula (Q) muestra que ocurre un incremento en el tamaño cuántico de liberación de las mismas cuando se incuban durante 20 min con agonistas del GLP-1R. También se produce un incremento de la corriente máxima de las espigas amperométricas (I_{max}) y una disminución del tiempo que tarda en alcanzar la mitad de su amplitud máxima ($t_{1/2}$) (tabla 4.1). Esto indica que las espigas tienen una tendencia a ser más rápidas en las células en las que se activa el receptor, aunque las diferencias en el $t_{1/2}$ no llegan a ser significativas.

El incremento de secreción de CAs que hemos registrado (fig. 4.5, C) podría ser explicado por varios mecanismos: un aumento del número de vesículas reclutadas para ser liberadas, un mayor relleno de las vesículas antes de ser liberadas, una variación de la estabilidad de la matriz vesicular o un mayor vaciado de las CAs liberadas por cada vesícula cuando se fusiona con la membrana plasmática. Analizando la frecuencia de exocitosis en los experimentos de amperometría, revela que el número de vesículas que se fusionan con la membrana plasmática es similar en células incubadas con agonistas del GLP-1R y en células controles. Además, las medidas de capacidad de las membranas celulares por medio de *patch-clamp* no revelan cambios significativos en las células en las que se activa el GLP-1R (fig. 4.8, A), indicando que no hay un mayor número de vesículas llevando a cabo la exocitosis.

La ruta de segundos mensajeros activada tras la incubación de las células cromafines con agonistas del GLP-1R podría incrementar la cantidad de CAs dentro de las vesículas secretoras antes de ser liberadas. Esto explicaría tanto el aumento de la secreción total de CAs como el incremento en el tamaño cuántico medidos por amperometría (tabla 4.1). No obstante, si la explicación de ese incremento, que

ocurre después de 20 minutos de incubación con agonistas del GLP-1R, fuera la mayor cantidad de CAs contenidas en las vesículas, 1 hora de incubación también debería mostrar un incremento de las mismas y no es así, como indican los resultados de HPLC (fig. 4.3).

Otra posibilidad que podría explicar una mayor liberación de CAs mediada por la activación del GLP-1R sería una variación de la agregación de la matriz vesicular. Esa variación podría ser debida a un cambio del pH vesicular. Se ha propuesto que ciertas rutas de segundos mensajeros implicadas en la modulación de la cinética de exocitosis podrían actuar sobre el pH de las vesículas. Es posible que las proteínas quinasas sean capaces de fosforilar la subunidad V_1 de la V-ATPasa (Camacho et al., 2006). Este complejo es uno de los principales responsables del mantenimiento del gradiente de pH en las vesículas. Si dicho gradiente es afectado, la capacidad de retención de CAs por la matriz vesicular será menor. Esta menor retención podría permitir la salida de mayor cantidad de CAs durante la exocitosis. No obstante, varias publicaciones demuestran que la variación del pH vesicular produce una disminución del tamaño cuantal, no un incremento del mismo (Hong, 2001; Mundorf et al., 1999; Machado et al., 2001; Camacho et al., 2006). Esto se explica porque los neurotransmisores son desplazados al citosol antes de que ocurra la exocitosis (Camacho et al., 2006). No obstante, un cambio en la matriz vesicular durante el proceso de fusión de la vesícula con la membrana plasmática podría dar lugar a un mayor vaciamiento de CAs de cada vesícula durante la exocitosis. Esto sería consistente con datos publicados por Gong y colaboradores en el 2007, donde demuestran que el cociente de liberación de CAs a través del poro de fusión está acoplado a la entrada de iones Na^+ a través del mismo. Esta entrada de Na^+ podría dar lugar a la disociación de Ca^{2+} de la matriz de los gránulos permitiendo la liberación de CAs asociadas a la misma (Gong et al., 2007).

Nuestros ensayos de secreción a tiempo real con poblaciones de células cromafines estimuladas con DMPP, muestran que la potenciación de la secreción de CAs cuando se activa el GLP-1R, está acompañada del incremento en la secreción de CgA (fig. 4.9). Además, los experimentos de microscopía TIRF con células cromafines transfectadas con CgA-EGFP mostraron que la incubación con agonistas del receptor de GLP-1 daba lugar a un incremento en la liberación de dicha proteína (fig. 4.10). La EGFP nos permite visualizar las vesículas que contienen el constructo

CgA-EGFP y, además, nos permite detectar fenómenos de exocitosis. Cuando ocurre la fusión de la vesícula con la membrana plasmática, el cambio de pH de la vesícula da lugar al aumento de la intensidad de fluorescencia de la EGFP. De esta forma, si la vesícula libera toda la CgA-EGFP contenida, la fluorescencia después del evento de fusión desaparece. Por el contrario, si conserva parte del constructo tras la exocitosis, se mantiene la fluorescencia. Por tanto, esta técnica permite distinguir entre exocitosis parcial o completa (Domínguez et al., 2014). La activación del GLP-1R da lugar a un incremento del número de exocitosis completas respecto a las que ocurren cuando no se activa el receptor.

En el 2004, el grupo de Wolfhard Almers publicó un artículo donde proponen que, durante la exocitosis, tanto las CAs como las proteínas de pequeño peso molecular, tales como el neuropéptido Y asociado a EGFP (NPY-EGFP), se liberan en pequeñas fracciones de segundos. Sin embargo, proteínas de mayor peso molecular como el activador tisular del plasminógeno asociado a EGFP (tPA-EGFP), permanecen en los gránulos durante minutos, mientras se mantiene el poro de fusión abierto (Perrais et al., 2004). Estas observaciones las llevaron a cabo por medio de TIRFM y concluyen que ciertas proteínas pueden ser selectivamente retenidas en el interior de los gránulos por medio de su agregación a la matriz vesicular o bien, por un mecanismo de re-sellado de las vesículas antes de liberar la totalidad de su contenido. En nuestros experimentos, hemos utilizado una proteína de mayor peso molecular comparada con el NPY-EGFP y el tPA-EGFP. CgA-EGFP tiene ≈ 100 kDa frente al NPY-EGFP, cuyo peso molecular es 34-42 kDa y el tPA, que es 97 kDa. El diámetro del poro de fusión determina la cantidad y el tipo de moléculas que son liberadas por lo que si el poro es estrecho resultará más difícil que salga la CgA-EGFP en comparación con una proteína pequeña como el NPY-EGFP. Por el contrario, poros de fusión más dilatados facilitarían la salida de proteínas grandes. Es posible que el incremento de la liberación de CAs y CgA que hemos detectado cuando activamos el GLP-1R se deba a una mayor expansión del poro de fusión o bien a una modificación de la agregación de la matriz vesicular durante la exocitosis (fig. 5.2).

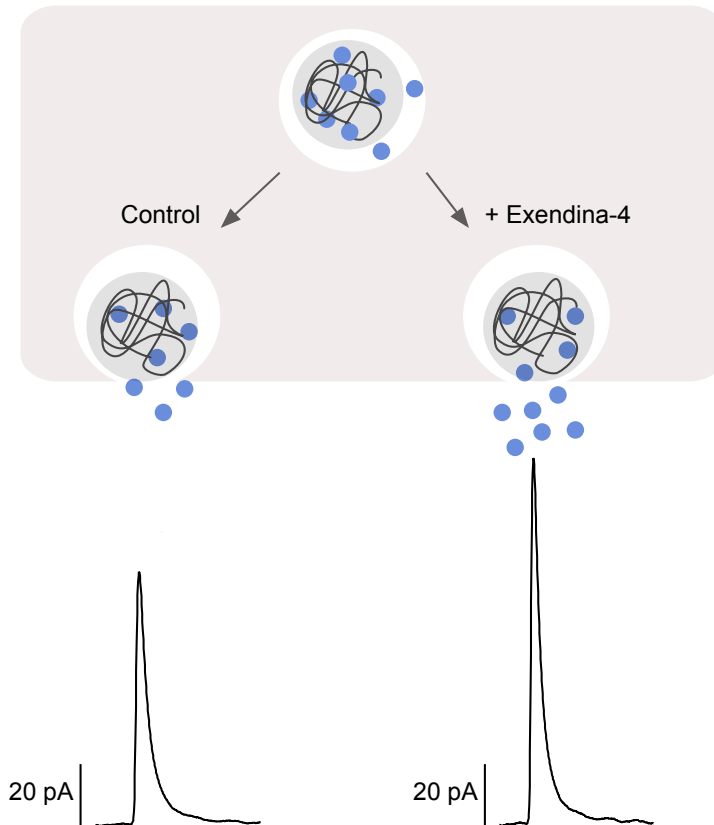


Figura 5.2. Modelo de los cambios en la cinética de la exocitosis en una célula cromafín incubada con 100 nM de Ex-4 respecto a una célula control sin tratar. La activación del GLP-1R por medio de la Ex-4 produce un incremento de las CAs liberadas. Las espigas representadas son las medias obtenidas de cada condición respetando las escalas reales de I_{max} en pA.

Se conocen varios mecanismos que regulan el tamaño cuántico de neurotransmisores en células cromafines. Dichos mecanismos incluyen cambios en el pH vesicular (Camacho et al., 2006); regulación de los sistemas de captación de neurotransmisores (Kozminski et al., 1998; Pothos et al., 2000); cambios en la matriz vesicular, ya sea modificando el pH (Jankowski et al., 1994), eliminando las cromograninas (Montesinos et al., 2008; Díaz-Vera et al., 2010, 2012) o variando la cantidad de ATP (Estévez-Herrera, 2016); o la acción de segundos mensajeros intracelulares, tales como el GMPc o el AMPc (O'Sullivan and Burgoyne, 1990; Machado et al., 2000). Sin embargo, hasta ahora era desconocido el papel que tienen los segundos mensajeros, activados a través del GLP-1R en células cromafines, modificando la cinética de exocitosis e incrementando la cantidad de neurotransmisores liberados por las vesículas secretoras.

Recientemente, el grupo de Ronald Holz publicó un artículo en el que demostraron que la CgA es capaz de controlar la expansión del poro de fusión. Llevaron a cabo microscopía TIRF con células cromafines transfectadas con CgA-EGFP y observaron que la CgA estabiliza la curvatura del poro de fusión, haciendo que su expansión sea más lenta y evitando que la membrana de la vesícula colapse por completo con la membrana plasmática (Abbineni et al., 2018). Es posible que la estabilización del poro de fusión llevada a cabo por la CgA nos haya ayudado a discriminar las exocitosis parciales respecto a las completas en los experimentos en los que sobreexpresamos la CgA-EGFP. No obstante, dicha estabilización ocurre de la misma forma en células en las que se activa el GLP-1R como en las que no se activa el receptor, puesto que en ambos casos fueron transfectadas con CgA-EGFP.

Por otro lado, se sabe que la PKA es capaz de fosforilar la proteína SNAP-25 en su residuo de treonina 138 (Risinger and Bennett, 1999; Chheda et al., 2001; Hepp et al., 2002; Nagy et al., 2004; Gao et al., 2015). La SNAP-25 es una proteína que forma parte del complejo SNARE por lo que su modulación podría explicar los cambios en la cinética de exocitosis. El grupo de Reinhard Jahn demostró que la neurotoxina botulínica A produce la proteólisis selectiva de la SNAP-25 dando lugar a una disminución significativa de la liberación de neurotransmisores (Blasi et al., 1993). Una posible estrategia para comprobar si el incremento en la cantidad de CAs liberadas tras la activación del GLP-1R se produce por medio de la interacción PKA-SNAP-25 sería tratarlas con dicha neurotoxina. Esperaríamos que ocurriera una disminución similar de la secreción de CAs en las células tratadas con la toxina, tanto con el GLP-1R activado como sin activar.

Además, Washbourne y colaboradores publicaron en el 2002 un artículo donde presentaban el desarrollo de un ratón deficiente de SNAP-25. Los ratones homocigotos para la mutación en la SNAP-25 no sobreviven, sin embargo, los heterocigotos son sanos, fértiles y fenotípicamente indistinguibles de los ratones controles. A pesar de ser heterocigotos, análisis de *WB* y PCR a tiempo real mostraron cantidades de proteína y RNA mensajero de la SNAP-25 menores respecto a los individuos controles (Washbourne et al., 2002). Sería interesante utilizar cromafines aisladas de estos individuos con la SNAP-25 mutada y comprobar la proporción de exocitosis parciales y completas tras la activación del receptor GLP-

1. Esperaríamos observar una reducción de las exocitosis completas en las células cromafines que presentan la SNAP-25 mutada, a pesar de activar el GLP-1R.

5.1.4. ¿Qué consecuencias funcionales puede tener el GLP-1R en células cromafines?

Si una de las principales funciones del GLP-1R es su implicación en la secreción de insulina en células β -pancreáticas, su presencia en las células cromafines estaría desencadenando el efecto opuesto ya que la A es una de las principales hormonas contra-reguladoras de la insulina. Lo cierto es que no sabemos cuál es la respuesta exacta a esta pregunta, pero podemos pensar que se trata de un mecanismo de compensación de la respuesta insulínica, es decir, una de las formas de compensar una secreción excesiva de insulina sería aumentar la liberación de A, la cual ejerce el efecto contrario a la primera.

La insulina regula el metabolismo de la glucosa incrementando la cantidad que entra en las células, respecto a la que entraría en ausencia de la misma. La relación entre la insulina y las CAs se conoce desde que, en 1923, Harold Burn observó que la ergotoxina, un alcaloide que inhibe la acción hiperglucémica de la A, incrementaba la hipoglucemia desencadenada por la insulina en el conejo (Burn, 1923). A partir de ese momento, el modelo más usado para determinar los mecanismos de regulación de la glucosa fue medir el nivel de este azúcar en sangre después de una hipoglucemia inducida por la inyección de insulina (Burn and Marks, 1925; Gohar, 1933; Burn et al., 1950). Años después, Philip Cryer propuso que la A y el glucagón son las principales hormonas que participan en la contra-regulación de la hipoglucemia (Cryer, 1981). El efecto hiperglucémico desencadenado por las CAs ocurre por la activación de receptores α - y β -adrenérgicos que dan lugar a la glucogenólisis hepática (Ellis et al., 1967; Haylett & Jenkinson, 1972; Morgan et al., 1982), el incremento de la gluconeogénesis, la disminución de la utilización de la glucosa periférica (HimmsHagen, 1967; Potter et al., 1977), la inhibición de la insulina y la estimulación de la secreción de glucagón (Moratinos et al., 1977; Potter et al., 1978).

La regulación de la glucemia es un proceso muy complejo y su mal funcionamiento conduce no solo a problemas metabólicos crónicos, como la

diabetes, sino a situaciones agudas graves como la hipoglucemia, que eventualmente pueden causar situaciones de urgencia vital. En esta regulación intervienen numerosas hormonas, entre ellas la A. La respuesta secretora de A, bajo condiciones de hipoglucemia, es causada por la actividad esplácnica. La hormona GLP-1 se libera en el organismo en respuesta a la ingesta de alimentos y actúa sobre múltiples dianas como son las células β -pancreáticas, estimulando la secreción de insulina, o las células cromafines, estimulando la secreción de CAs. Es posible que, bajo condiciones de estrés, tales como una hipoglucemia, se produzca una potenciación de la secreción de CAs, modulada por el GLP-1R. El mismo estímulo que incrementa la secreción de insulina en las células β -pancreáticas, el GLP-1, podría también estimular la secreción de CAs de la médula adrenal como un mecanismo contra-regulador, pero con una potenciación mucho menor. Ha sido muy estudiado el papel de la Ex-4 en la estimulación de la secreción de insulina al activar el receptor GLP-1. La Ex-4 es capaz de potenciar enormemente la secreción de insulina hasta una ratio de 10 veces respecto a la secreción basal en islotes pancreáticos aislados (Parkes et al., 2001). Nuestros resultados midiendo la secreción de CAs por medio de amperometría en células cromafines, muestran que la potenciación de la secreción de CAs al incubar con Ex-4 es del orden de 2 veces mayor respecto a la secreción basal.

Si estamos en lo correcto y la función del GLP-1R en células cromafines es la modulación de la secreción de A como mecanismo contra-regulador de la secreción de insulina, es posible que el GLP-1 tenga un efecto directo sobre las células adrenérgicas o bien que la expresión de su receptor en estas células sea mayor. Esta sería una interesante línea de estudio que aún no hemos explorado. Además, disponemos en nuestro laboratorio de ratones que han sido modificados para que sus células no puedan sintetizar A, los ratones PNMT-KO. Haciendo uso de ellos podríamos comprobar si la ausencia de A modifica de algún modo la respuesta a agonistas del GLP-1R o altera la expresión del mismo.

5.2. ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN Y EXOCITOSIS DE CATECOLAMINAS EN RATONES PNMT-KO, CARENTES DE ADRENALINA.

5.2.1. ¿Son los ratones PNMT-KO un buen modelo de estudio de las diferencias entre células adrenérgicas y noradrenérgicas?

Los ratones PNMT-KO no expresan la enzima PNMT, la cual cataliza la conversión de NA en A, por lo que estos ratones carecen de A (Ebert et al., 2004). Desde que Ebert y colaboradores desarrollaron la cepa de ratones PNMT-KO, han sido utilizado en numerosos estudios. Todos ellos tienen en común comprobar cuál es el papel de la A en determinados procesos fisiológicos como su implicación en el desarrollo de los efectos mediados por los receptores β_2 -adrenérgicos (cuyo principal agonista es la A) (Moreira-Rodrigues et al., 2014), el desarrollo de la memoria (Toth et al., 2013; Alves et al., 2016) o en el remodelado hipertrófico del tejido cardíaco en respuesta a ejercicio crónico (Mendes et al., 2018). En esta tesis, hemos utilizado los ratones PNMT-KO como modelo de estudio para ahondar en las diferencias que existen entre células adrenérgicas y noradrenérgicas. Además, hemos querido estudiar las características de la exocitosis de CAs en ambos fenotipos celulares.

Además de presentar una CA distinta, existen diferencias anatómicas y fisiológicas entre las células adrenérgicas y noradrenérgicas. En las médulas adrenales de los mamíferos, las células cromafines se distribuyen en grupos homotípicos de acuerdo a su fenotipo catecolaminérgico. La proporción relativa de ambos tipos celulares y su distribución en la médula varía entre especies. También existen diferencias fisiológicas que demuestran que son controladas de forma diferente. Así, por ejemplo, la hipoglucemia incrementa la liberación selectiva de A, mientras que la exposición al frío incrementa la liberación de NA (Feuerstein and Gutman, 1971; Vollmer et al., 1992). Además, algunas moléculas estimuladoras tales como la histamina, la angiotensina II o la bradiquinina inducen diferente liberación de cada CA (Borges, 1994; Álvarez et al., 1997; Aunis and Langley, 1999; Kuwashima, 2000). Estas observaciones indican que la innervación y la expresión de los receptores presentes en la superficie celular varía entre ellas. Todas estas diferencias entre los dos fenotipos celulares son difíciles de explicar únicamente por la presencia de una enzima citosólica que media la conversión de la NA en A.

Nos planteamos la posibilidad de que las células adrenérgicas no deben considerarse adrenérgicas sólo por la presencia de A, sino que se trata de un tipo celular distinto a las noradrenérgicas con una fuerte especialización de la CA que acumula. Los ratones PNMT-KO son un buen modelo de estudio para dar respuesta a esta hipótesis puesto que, según nuestro planteamiento, seguirían teniendo células adrenérgicas, pero sin A.

5.2.2. ¿Las células adrenérgicas lo son porque acumulan adrenalina o es un tipo celular distinto al de una célula noradrenérgica a pesar de la CA que acumula?

Los ratones PNMT-KO, a pesar de carecer de A y presentar una disminución del 30% de sus CAs totales respecto a los ratones WT (fig. 4.11), tienen una esperanza de vida similar a estos, no muestran alteraciones en su desarrollo y pueden reproducirse en homocigosis (Ebert et al., 2004). El único cambio fenotípico aparente en comparación con los ratones WT es una disminución moderada del peso corporal del ratón adulto. Sin embargo, el manejo y metabolismo de la glucosa es distinto al de los ratones WT. Por un lado, los ratones PNMT-KO tienen una glucemia basal en condiciones de ayuno significativamente mayor que los individuos WT (fig. 4.12, A). Si nos centramos en cada cepa por separado, observamos que la glucemia en los ratones WT en condiciones de ayuno es más alta que sin ayuno, lo cual es de esperar. Sin embargo, en ratones PNMT-KO, la glucemia en ayuno y sin ayuno no son significativamente diferentes. Esto quiere decir que bajo condiciones en las que no hay aporte de glucosa externa procedente de la ingesta de alimentos, estos ratones no consumen la glucosa disponible. Probablemente obtengan la energía necesaria de una fuente diferente al metabolismo de la glucosa. Es posible que la principal fuente de energía en los ratones que carecen de A es el metabolismo de los ácidos grasos. Haciendo medidas del índice Q/R en estos individuos cuando son sometidos a ejercicio intenso muestran que prevalece en ellos un metabolismo graso frente al metabolismo de glucosa que predomina en los ratones WT. Además, el porcentaje de grasa de los individuos PNMT-KO es menor que el de los WT, probablemente debido a que están usando esas reservas como fuente principal de energía y también es consistente con los datos del peso, los PNMT-KO son más delgados. Las medidas del índice Q/R así como los porcentajes de grasa de individuos PNMT-KO son resultados preliminares que debemos confirmar y por eso no se han presentado en esta tesis.

Por otra parte, realizamos medidas de las CAs contenidas en la adrenal de ratones WT y PNMT-KO, después de haber sido sacrificados a diferentes tiempos tras una inyección de 2 UI/Kg de insulina intraperitoneal. Midiendo las CAs contenidas en las adrenales, podemos saber el grado de vaciamiento de las mismas como consecuencia de la hipoglucemia desencadenada por la insulina. Dicha hipoglucemia causa un rápido vaciamiento de A de la médula adrenal en ratones WT, siendo el vaciamiento de NA mucho menor (fig. 4.12, C). Esto ocurre durante un periodo aproximado de 3 horas. En el caso de los ratones PNMT-KO, las adrenales liberan NA en lugar de A y lo hacen más lentamente que los individuos WT, en un periodo que puede alcanzar 7 horas tras la inyección de insulina (fig. 4.12, D). Como ya se comentó en la introducción y resultados de esta tesis, la hipoglucemia activa selectivamente las neuronas preganglionares colinérgicas simpáticas que inervan las células adrenérgicas (fig. 1.3). Esto puede explicar que en ratones WT se produzca la secreción principalmente de la A contenida dentro de sus células adrenérgicas. La NA secretada por los ratones PNMT-KO es probablemente la que está contenida en células adrenérgicas que, por no tener la enzima que la transforma en A, se secreta como NA. El hecho de que se libere más lentamente que la A en individuos WT podría deberse a que la afinidad que tienen las células adrenérgicas para retener y secretar A o NA es diferente.

También hemos explorado las características secretoras de las células cromafines de ratones PNMT-KO por medio de la amperometría y estimulando la exocitosis por medio de ACh o BaCl₂. Observamos que la cantidad de CAs liberadas, así como la frecuencia con la que se liberan, es menor en ratones PNMT-KO en comparación con los individuos WT (fig. 4.13). Además, haciendo una relación entre la I_{max} de las espigas amperométricas y la Q, vemos que las espigas correspondientes a las exocitosis de células de ratones WT y las correspondientes a los ratones PNMT-KO tienen una relación claramente lineal; sin embargo, si comparamos las pendientes de cada grupo, vemos que son diferentes (fig. 4.14). Dicho de otra forma, espigas con una misma Q tienen mayor I_{max} en los ratones PNMT-KO. Esto indica que la ausencia de A en las células cromafines adrenérgicas de ratones PNMT-KO hace que las espigas sean más rápidas, es decir, las CAs se liberan más rápido en los individuos PNMT-KO.

Estos resultados también son factibles con la idea de que la matriz vesicular de las células adrenérgicas de ratones PNMT-KO no es capaz de retener NA de forma eficiente. Se sabe que la presencia de una matriz proteica en los gránulos cromafines ayuda al almacenamiento y liberación de componentes solubles en la misma (Estévez-Herrera et al., 2016). Por otra parte, el componente mayoritario de esta matriz granular son las cromograninas. Estudios realizados con ratones knock-out para la CgA demuestran que la falta de la misma acelera la exocitosis como consecuencia de su menor capacidad para retener aminas (Montesinos et al., 2008). Además, la captación de neurotransmisores recién sintetizados por las vesículas fue menor en esos individuos CgA-KO obteniendo resultados similares con ratones CgB-KO (Díaz-Vera et al., 2010) y con ratones knock-out para ambas cromograninas (Díaz-Vera et al., 2012). Análisis cualitativos de las CAs contenidas en la adrenal de ratones CgB-KO medidas con HPLC mostraron que dicha reducción se debe a la disminución en la cantidad de A, permaneciendo la DA y NA inalteradas (Díaz-Vera et al., 2010). Por tanto, probablemente el cambio en la matriz vesicular en ratones PNMT-KO como consecuencia de la falta de A da lugar una disminución de las CAs que no es compensada por un incremento en la NA. Por eso observamos una reducción del 30% de sus CAs totales. Dicho de otra manera, células adrenérgicas a las que les falta A, no son capaces de retener mayor cantidad de NA para suplir la falta de la primera. Probablemente esto ocurre por la diferente afinidad que tiene la matriz de células adrenérgicas y noradrenérgicas por A o NA.

Además, ha sido demostrado que los sistemas de transporte de las CAs hacia el interior de la vesícula difieren entre células adrenérgicas y noradrenérgicas (Tillinger et al., 2010). Así, el VMAT2 se expresa en células noradrenérgicas y el VMAT1 en tanto en las adrenérgicas como en las noradrenérgicas. El VMAT2 tiene 3 veces más afinidad por la DA, NA y A de lo que lo tiene el VMAT1 y, además, se recicla con mayor frecuencia de lo que lo hace el VMAT1 (Peter et al., 1994; Erickson et al., 1996). Por tanto, una célula adrenérgica que almacene NA, lo hará con menor afinidad de lo que lo hace una célula noradrenérgica ya que no expresa VMAT2.

En el 2013, el grupo de Steven Ebert publicó un artículo donde describen el desarrollo de una nueva cepa de ratón que lleva inserto el gen del EGFP en el del PNMT. De esta manera obtienen ratones cuyas células adrenérgicas están marcadas y además carecen de A, tanto en estadios embrionarios como en la edad

adulto (Xia et al., 2013). Un planteamiento futuro sería utilizar estos ratones para realizar los mismos experimentos de amperometría en célula única que hemos llevado a cabo con los ratones PNMT-KO. El principal problema de nuestros experimentos es que no podemos distinguir entre células adrenérgicas sin A y células noradrenérgicas. Observamos una disminución del tamaño cuántico de liberación de CAs en ratones PNMT-KO, pero estos valores hacen referencia a términos medios de lo obtenido con ambos fenotipos celulares. Si midiéramos el tamaño cuántico medido exclusivamente en células adrenérgicas de ratones sin adrenalina y lo comparáramos con el obtenido en células adrenérgicas de individuos normales, probablemente obtendríamos diferencias mayores.

Conclusiones/Conclusions

6. CONCLUSIONES

- 1.** GLP-1R se expresa en células cromafines bovinas.
- 2.** GLP-1R está localizado tanto en la membrana plasmática como en el interior de compartimentos intracelulares de las células cromafines.
- 3.** La estimulación del GLP-1R promueve la síntesis de CAs y su exocitosis a través de la activación de la ruta de segundos mensajeros mediada por AMPc y PKA, sin implicación aparente de EPAC.
- 4.** La activación de GLP-1R acelera la exocitosis en células cromafines.
- 5.** La activación de GLP-1R incrementa el tamaño cuántico aparente de liberación de CAs y CgA.
- 6.** Los ratones PNMT-KO no son capaces de compensar la falta de A acumulando más NA, resultando en un 30% de reducción del contenido de CAs totales.
- 7.** La matriz de los gránulos cromafines parece estar especializada en retener la CA que le es propia.

6. CONCLUSIONS

- 1.** GLP-1R is expressed in bovine chromaffin cells.
- 2.** GLP-1R is located both in the plasma membrane and the intracellular compartments of chromaffin cells.
- 3.** The stimulation of GLP-1R promotes the potentiation of synthesis and exocytosis of CAs through the activation of a second messenger route mediated by cAMP and PKA, with no apparent involvement of EPAC.
- 4.** The activation of GLP-1R accelerates the exocytosis in chromaffin cells.
- 5.** The activation of GLP-1R increases the apparent quantum CA size and CgA release.
- 6.** The PNMT-KO mice are not able to compensate for the lack of A accumulating more NA, resulting in a 30% reduction of total CAs.
- 7.** Chromaffin granule matrix seems to be specialized in retaining each CA.

Anexos

7.ANEXOS.

ANEXO I. Soluciones de trabajo empleadas

SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN	APLICACIÓN
Locke	154 mM de NaCl; 5,6 mM de KCl; 3,6 mM de NaHCO ₃ ; 10 mM de HEPES y 11 mM de glucosa; pH 7,3. Se esteriliza por el paso a través de un filtro de Ø 0,02 µm. Se añade luego 50 UI/L de penicilina y 40 mg/L de gentamicina.	Cultivos celulares
Colagenasa	2 mg/mL de colagenasa tipo IA (300-480 UI/mg) y 4 mg/mL de BSA	Cultivos primarios de células cromafines bovinas
Krebs-HEPES	140 mM de NaCl; 5,9 mM de KCl; 1,2 mM de MgCl ₂ ; 2 mM de CaCl ₂ ; 10 mM de HEPES y 11 mM de glucosa; pH 7,4	Amperometría Secreción
PBS	136,9 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 8,1 mM de Na ₂ PO ₄ ; pH 7,4	<i>Western-blot</i> Inmunofluorescencia <i>Dot-blot</i>
TENT 1%	50 mM de Tris-HCl a pH7,4; 5 mM de EDTA; 150 mM de NaCl y 1% de Tritón-X 100	Lisados celulares
LB	10 g de triptona; 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl; pH 7. Se esteriliza mediante autoclave.	Medio de cultivo para bacterias
Laemmli 6X	10% de SDS; 20% de glicerol; 10% de β-mercaptoetanol; 0,004% de azul de bromofenol y 0,125 M de Tris-HCl	<i>Western-blot</i> . Tampón de carga en electroforesis SDS-PAGE
Gel stacking	Poliacrilamida al 4%; 0,13 M de Tris-HCl a pH 6,8; 0,1% de SDS; 0,12% de APS y 0,13% de TEMED	<i>Western-blot</i> . SDS-PAGE

Gel resolving	Poliacrilamida al 7,5%; 0,38 M de Tris-HCl a pH 8,8; 0,1% de SDS; 0,08% de APS y 0,08% de TEMED	<i>Western-blot. SDS-PAGE</i>
Solución interna	145 mM de glutamato de cesio; 10 mM de HEPES; 9,5 mM NaCl; 0,3 mM BAPTA y 2 mM de ATP-Mg; se ajusta el pH a 7,3 con CsOH.	<i>Patch-clamp</i>
Solución externa	140 mM de NaCl; 5 mM NaHCO ₃ ; 2 mM KCl; 1 mM MgCl ₂ ; 10 mM glucosa; 10 mM HEPES y 2,5 mM CaCl ₂ ; pH ajustado a 7,3 con NaOH	<i>Patch-clamp</i>

ANEXO II. Listado de anticuerpos utilizados, aplicación y dilución de uso.

NOMBRE Nº Catálogo	Empresa	Observaciones	Técnica y dilución de uso
GLP-1R ab-39072	Abcam	Anticuerpo policlonal de conejo	WB (1:20000) IF (1:200)
TH T-1299	Sigma-Aldrich	Anticuerpo monoclonal de ratón	WB (1:2000) IF (1:500)
Actina T-6074	Sigma-Aldrich	Anticuerpo monoclonal de ratón	WB (1:10000)
Cg-A sc-1488	Santa Cruz Biothecnology	Anticuerpo policlonal de cabra	WB (1:200)
Anti-conejo NA934	Amersham GE Helthcare	Anticuerpo policlonal	WB (1:10000)
Anti-ratón NA931	Amersham GE Helthcare	Anticuerpo policlonal	WB (1:10000)
Alexa Fluor® 568 A21124	Life Technologies	Anti-IgG anti-ratón de cabra	IF (1:500)
Alexa Fluor® 488 A21206	Life Technologies	Anti-IgG anti-conejo de burro	IF (1:500)

ANEXO III. Extracción de DNA y PCR para el genotipado de ratones.

I. Extracción de DNA genómico

El DNA genómico se obtiene a partir de 1 cm de cola de cada ratón. Para ello, se lleva a cabo dos etapas: una etapa de disgregación del tejido con proteinasa K para obtener DNA libre de proteínas, y otra de purificación del mismo mediante el método fenol-cloroformo.

Primero, se prepara una solución lisis que contiene: 100 mM de Tris-HCl a pH 8,5; 5 mM de EDTA a pH 8,0; 200 mM de NaCl; 0,2% de SDS y 100 µg/mL de proteinasa K. Se cubre cada trozo de cola con esa solución y se deja digiriendo a 55°C durante 12 h. Una vez disgregado el tejido, la muestra se agita fuertemente sin utilizar vórtex y se centrifuga a 14.000 rpm para sedimentar el tejido no digerido. A continuación, se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio y se añade un volumen igual al volumen de sobrenadante recogido de una mezcla de fenol-cloroformo. Se agita el contenido hasta que la mezcla adquiera un aspecto lechoso y se centrifuga a 14.000 rpm durante 5 min. Tras centrifugarse, se diferencian tres capas: una superior acuosa (que contiene el DNA), una intermedia (de desecho) y una inferior densa (fenol).

Posteriormente, se extrae con cuidado la fase clara y se añade una décima parte del volumen recuperado de acetato de sodio 3 M a pH 5,2 y dos veces el volumen total (capa acuosa + acetato de sodio) de etanol absoluto. Se mezcla hasta formar un anillo de DNA que se vuelve a centrifugar a 14.000 rpm durante 15 min para precipitar en el fondo del tubo el DNA genómico. Se desecha el sobrenadante y se añade etanol 75% para hidratarlo y eliminar las sales restantes.

Por último, se centrifuga a 14.000 rpm durante 5 min y se extrae el sobrenadante nuevamente, obteniendo el DNA purificado. Se deja secar y se resuspende en agua milli Q que se conserva a 4°C. De este modo, se consigue un DNA listo para ser cuantificado en el Nanodrop conociendo así su concentración y pureza.

II. Amplificación por PCR

El genotipado se realizó mediante PCR (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler). Las secuencias de los cebadores fueron las siguientes (Ebert et al., 2004):

5'-CAG GCG CCT CAT CCC TCA GCA GCC-3'

5'-CTG GCC AGC GTC GGA GTC AGG GTC-3' y

5'-GGT GTA CGG TCA GTA AAT TGG ACA CCG TCC TC-3'.

La mezcla de reacción consistió en un volumen total de 25 μ L: 11 μ L de agua milli Q, 5 μ L de tampón de carga (1,75 M de sacarosa y 0,4 mg/mL de rojo cresol), 2,5 μ L de tampón 10 X de la polimerasa, 0,5 μ L de $MgCl_2$ a 50 mM, 1 μ L de la mezcla de dNTPs (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) a 2,5 mM cada uno, 1 μ L de cada cebador a 20 μ M, 1 μ L de Taq polimerasa (Green Taq Polimerase, GenScript) y 1 μ L de DNA genómico total (300-500 ng de DNA).

La reacción se realizó en un termociclador (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler) y las condiciones de PCR fueron: 6 min a 94 °C; 34 ciclos de 45 s a 95 °C, 45 s a 62 °C, 50 s a 72 °C; 8 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en un gel del 2% de agarosa y se visualizaron mediante marcaje con Gel Red. Se usó un marcador de pesos moleculares de 100 pb para determinar el tamaño de los fragmentos amplificados. Esperamos que el alelo WT presente un tamaño de 200 pb y el alelo PNMT-KO de 160 pb (fig. 7.1, C).

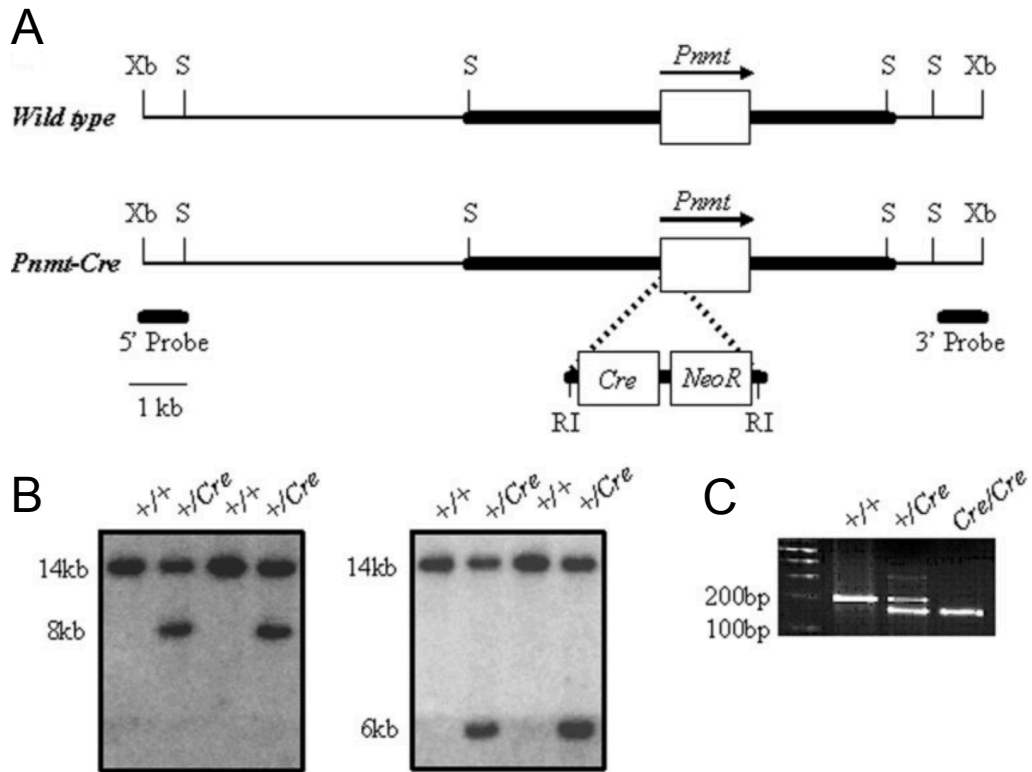


Figura 7.1. Construcción y verificación del alelo PNMT-Cre. **A.** Representación de los alelos WT y PNMT-Cre. Las secuencias que codifican para el RNA del PNMT se representan como rectángulos abiertos con la dirección de transcripción indicada por la flecha. Las líneas de puntos indican el lugar de la secuencia del PNMT donde se introducen el gen Cre-recombinasa (Cre) y el gen de resistencia a la neomicina (NeoR) por recombinación homóloga. El gen Cre está fusionado con la secuencia 5' del PNMT por lo que su transcripción depende de los elementos reguladores del PNMT. Ese gen también tiene secuencias de parada de transcripción. El NeoR tiene su propio promotor. Se representan también los alelos 5' y 3' usados para verificar los alelos. **B.** Análisis Southern de las líneas celulares mutadas identifica aquellos clones que contienen el alelo PNMT-Cre. Cuando se digieren con XbaI y EcoRI aparece una banda de 8 kb (en caso de que se use el cebador 5'/panel izquierdo) o una banda de 6 kb (en caso de que se use el cebador 3'/panel derecho), además de la banda de 14 kb perteneciente al cromosoma WT. **C.** Análisis por PCR distingue el homocigoto WT (+/+), el mutante heterocigoto (+/Cre) y el homocigoto mutante (Cre/Cre). RI, EcoRI; C, SacI; Xb, XbaI. (Tomado de Ebert et al., 2004).

ANEXO IV. Cultivo primario de células cromafines bovinas.

Los pasos seguidos para el aislamiento y cultivo de las células cromafines bovinas se detallan a continuación (fig. 7.2):

A) Se elimina la grasa que rodea la glándula con ayuda de unas tijeras estériles y a continuación se rocía etanol al 70% sobre la misma. Con una jeringa se inyectan 3-5 mL de una solución precalentada a 37°C de Locke: 154 mM de NaCl; 5,6 mM de KCl; 3,6 mM de NaHCO₃; 10 mM de HEPES y 11 mM de glucosa; sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ y pH de 7,3. Se suplementa con 40 mg/L de gentamicina y 100 UI/L de penicilina. Las glándulas se colocan en un vaso de precipitado tapado y se incuban a 37°C durante 10 min. La inyección de solución Locke permite lavar restos de sangre presentes en la glándula. Una vez realizado este lavado, se repite el paso anterior, esta vez añadiendo a la solución de Locke 2 mg/mL de colagenasa tipo IA (300-480 UI/mg) y 4 mg/mL de albúmina de suero bovino (BSA; fracción V) y se mantiene en incubación a 37°C durante 20 min (fig. 7.2; paso A). El objetivo de este paso con colagenasa y albúmina es la disgregación de la médula adrenal. Esta incubación se repite 2 veces más siendo cuidadoso para evitar la rotura, ya que la glándula está parcialmente digerida.

B) Sobre una de placa Petri, la glándula adrenal se corta sagitalmente con unas tijeras estériles y se extrae el máximo tejido medular (color crema) con ayuda de un bisturí, evitando coger tejido cortical (color morado) (fig. 7.2; paso B). A continuación, se disgrega el tejido medular facilitando así el progreso de la digestión enzimática.

C) El tejido cromafín se pasa a un tubo de centrifuga de 50 mL con solución de colagenasa fresca y se deja incubando 10 min a 37°C, tras lo cual se disgrega mediante pipeteo (fig. 7.2; pasos C y D). Este paso puede obviarse en caso de que el tejido medular tras las primeras incubaciones con colagenasa se encuentre suficientemente disgregado.

D) Se filtra la suspensión de tejido con una malla de gasa estéril, para eliminar trozos de tejido no digeridos (fig. 7.2; paso E).

E) El material filtrado y lavado con la solución Locke es centrifugado a 900 xg durante 5 min. De esta forma se elimina la colagenasa. El precipitado resultante se resuspende en 50 mL de solución de Locke y se repite el proceso de centrifugación (fig. 7.2; paso E).

F) El nuevo precipitado se resuspende en 10 mL de Locke, se pasa a través de una malla de nilón de 200 μm de diámetro de poro (fig. 7.2; paso F), para eliminar agregados celulares, y se lava con Locke para recuperar el máximo de células posible. La solución filtrada está enriquecida en células cromafines; sin embargo, existe una contaminación por la presencia de restos celulares y otros tipos celulares como los fibroblastos o las células sanguíneas.

En nuestro laboratorio realizamos purificaciones adicionales que permiten el enriquecimiento de los cultivos primarios de células cromafines empleando gradientes de densidad con Urografin[®].

Purificación de células cromafines empleando gradientes discontinuos de Urografin[®].

Para purificar las células cromafines empleando este método, la suspensión celular obtenida del paso F es sometida a un gradiente de densidad discontinuo. El gradiente se realiza mezclando 10 mL de la suspensión de células con 10 mL de Urografin[®] al 15% (preparado a partir de 20 mL de la solución comercial al 76%, a la que se le añaden 81 mL de agua filtrada). La solución resultante tendrá ahora una concentración de Urografin[®] al 7,5%.

Se toman dos tubos de centrifuga de policarbonato estériles de 30 mL y se cargan con 20 mL de solución de Urografin[®] al 15% cada uno. A continuación, lentamente y evitando romper la interfase, se va añadiendo la solución de Urografin[®] al 7,5%, que contiene las células, hasta completar los 10 mL restantes. Es preciso realizar la adición con mucho cuidado para lograr una interfase limpia. A continuación, se equilibra el peso de los tubos y se centrifuga a 7500 xg durante 20 min a 18°C. Como el gradiente es discontinuo, las células cromafines se localizan en la interfase, en el fondo los hematíes y en la superficie del tubo restos celulares y grasa (fig. 7.2; pasos G y H).

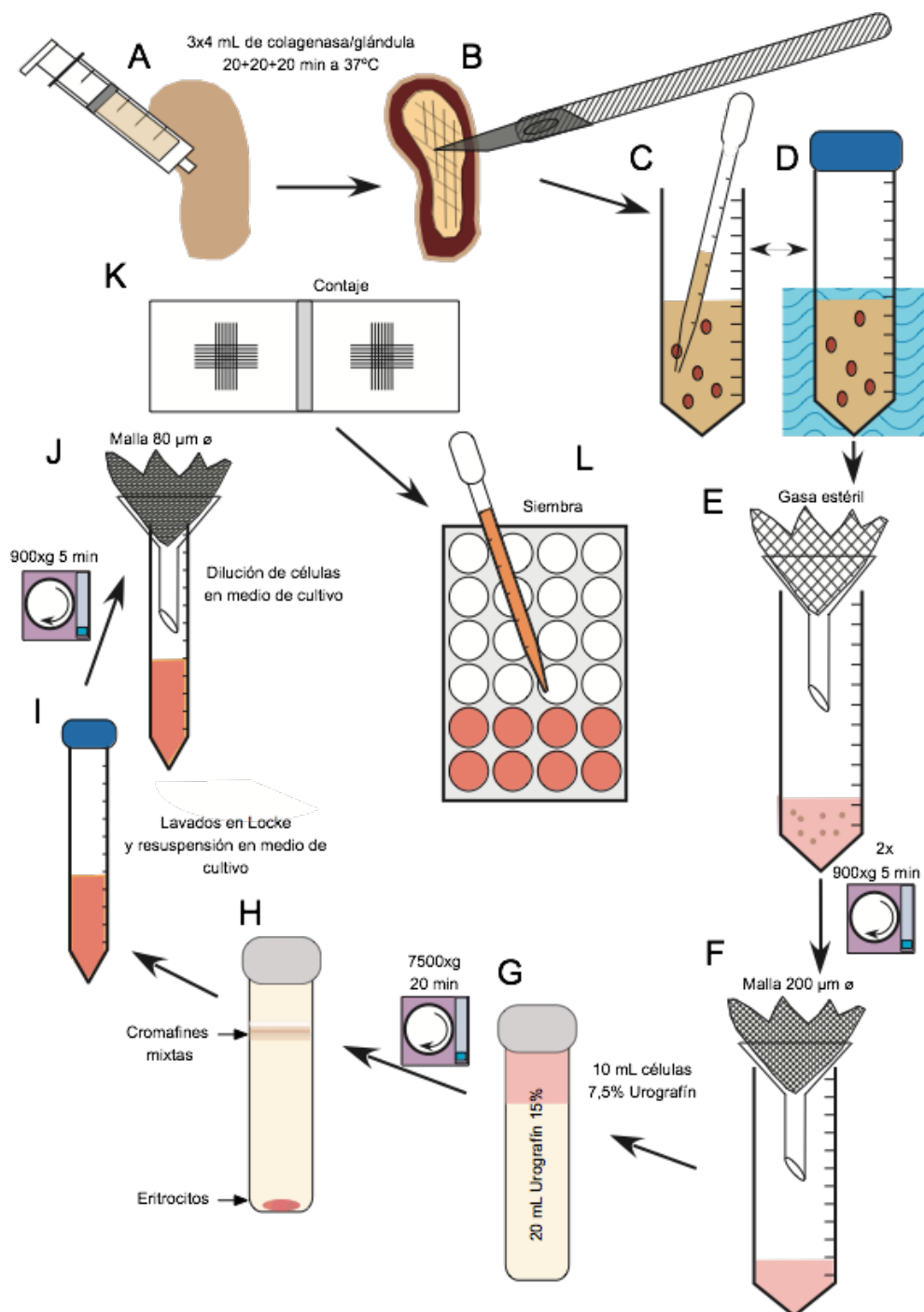


Figura 7.2. Representación esquemática de los procedimientos de aislamiento y cultivo de las células cromafines a partir de glándulas adrenales bovinas. Los detalles del procedimiento de purificación de las células cromafines mediante Urografin® se detallan en el texto.

Las células que se localizan en la interfase, formando una banda difusa, se recogen con una pipeta de Pasteur de plástico y se resuspenden en solución Locke. Para eliminar el Urografin® se centrifuga a 900 xg durante 5 min (fig. 7.2; paso I).

Se elimina el sobrenadante y se vuelve a resuspender, esta vez con medio de cultivo DMEM: Ham's F12 (proporción 1:1) suplementado con FBS 10% y los antibióticos gentamicina (40 mg/mL) y penicilina (100 UI/L). Se filtra con una malla de 90 µm para retener en ella los agregados de células y dejar pasar células individuales (fig. 7.2; paso J).

La densidad de células se determina realizando su conteo por medio del uso del colorante vital azul de tripán (fig. 7.2; paso K). La suspensión celular se diluye a 1:10 con el azul de tripán (37%) y se mezcla con suavidad para ser analizada en un hemocitómetro (cámara de *Neubauer*). El recuento se realiza de las células que no están teñidas por el colorante, ya que son las que permanecen vivas. La media del número de células obtenida en los cuatro cuadrantes es entonces multiplicada por el factor de dilución y por el volumen de la cámara, para obtener así el número de células por mL de suspensión celular.

La siembra de las células cromafines bovinas se realiza sobre placas de cultivo o en cubreobjetos de vidrio de diferente diámetro (World Precision Instruments, Hitchin, UK) para experimentos electrofisiológicos y de microscopía (fig. 7.2; paso L).

ANEXO V. Cultivo primario de células cromafines murinas.

El protocolo para el cultivo de las células cromafines murinas se detalla a continuación:

A) Se extraen las glándulas suprarrenales de ratón y se ponen en una placa de Petri de Ø 35 mm con solución de Locke fría.

B) Bajo una lupa binocular y con la ayuda de la punta de un bisturí, primero se elimina la grasa y después se retira la cápsula y la corteza.

C) Se pasan las médulas a un tubo de 15 mL con 200 µL de solución de Locke a la que se le ha añadido papaína (25 UI/mg) y se incuban en un baño a 37°C durante 20 min.

D) Se retiran los 200 µL de solución con la ayuda de una micropipeta de 1000 µL. En este punto, las médulas están parcialmente digeridas por lo que se aspira el medio lentamente y con cuidado de no arrastrar las médulas.

E) Se lavan dos veces con 800 µL de solución Locke. La solución Locke se añade deslizándolo por las paredes y se retira de la misma forma que B.

F) Una vez realizado el último lavado, se retira toda la solución de Locke y se añade 200 µL de medio de cultivo DMEM : Ham's F12 (proporción 1:1). Esta cantidad de medio depende del número de glándulas que se pongan por tubo y del rendimiento de células del propio cultivo.

G) Con ayuda de una micropipeta de 1000 µL se disgregan mecánicamente las médulas, con cuidado de no formar burbujas, hasta que la solución se torne turbia y ligeramente viscosa.

H) Se repite el proceso con una micropipeta de 100 µL continuando la disgregación mecánica hasta que desaparezcan por completo los trozos de tejido.

I) Se van añadiendo gotas de solución celular sobre cada cubreobjetos de Ø 5 mm (dado que el objetivo de estos cultivos de cromafines de ratón fueron siempre utilizarlos para amperometría en célula única, no es necesario realizar el conteo de las mismas; sólo se utiliza una célula por cubreobjetos). Se mantiene la placa en una estufa a 37°C durante 30 minutos. Ese tiempo es necesario y suficiente para que las células se adhieran a la superficie del pocillo.

J) Finalmente se rellena cada pocillo con 200 µL de medio DMEM : Ham's F12.

ANEXO VI. Amplificador “Lock-in”.

Para medir la capacidad de una célula, se aplica un voltaje a la misma que da lugar a una corriente eléctrica, la cual es la suma del componente resistivo y capacitativo. Los amplificadores “Lock-in” permiten medir la capacidad aplicando un voltaje en forma de onda sinusoidal, lo que se conoce como la “Técnica del dominio de la frecuencia”.

Se aplica un voltaje en forma de onda sinusoidal, de amplitud V_0 y frecuencia f , dando lugar a una corriente total también sinusoidal, con la misma frecuencia, de amplitud I_0 , pero con diferente fase (fig. 7.3).

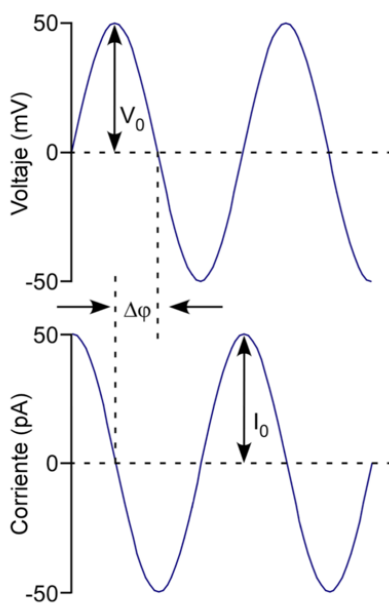


Fig. 7.3. Voltaje aplicado y corriente obtenida. En la parte superior se representa el voltaje de referencia, de amplitud V_0 , aplicado en forma de onda sinusoidal a la célula. En la parte inferior se representa la corriente proveniente de la célula, de amplitud I_0 , que representa la misma frecuencia que el voltaje aplicado pero desfasada un cierto ángulo $\Delta\varphi$.

En un experimento típico, se aplica a la célula un voltaje de referencia, con una frecuencia conocida:

$$V = V_0 \cos(\omega t + \varphi)$$

siendo $\omega = 2\pi f$ y φ la fase de la señal de referencia, y el “Lock-in” detecta la corriente que proviene de la célula como:

$$I = I_0 \cos (\omega t + \varphi + \Delta\varphi)$$

siendo $\Delta\varphi$ el desfase entre el voltaje aplicado y la corriente registrada. Este desfase es la suma de dos componentes, el desfase debido al parche de membrana en el interior de la pipeta ($\Delta\varphi_c$) y el desfase debido a los diferentes filtros y amplificadores del equipo experimental ($\Delta\varphi_F$):

$$\Delta\varphi = \Delta\varphi_c + \Delta\varphi_F$$

El “Lock-in” amplifica la corriente registrada y la multiplica por la señal de referencia, usando para ello el detector sensible a fase. Este detector descompone la corriente en sus componentes resistivos y capacitivos (fig. 7.4, A). La corriente resistiva es considerada como la *parte real* del sistema (Re) y se encuentra en fase con el voltaje de referencia, mientras que la corriente capacitiva, que sería la *parte imaginaria* (Im) se encuentra desfasada 90° con respecto al mismo (fig. 7.4, B y C).

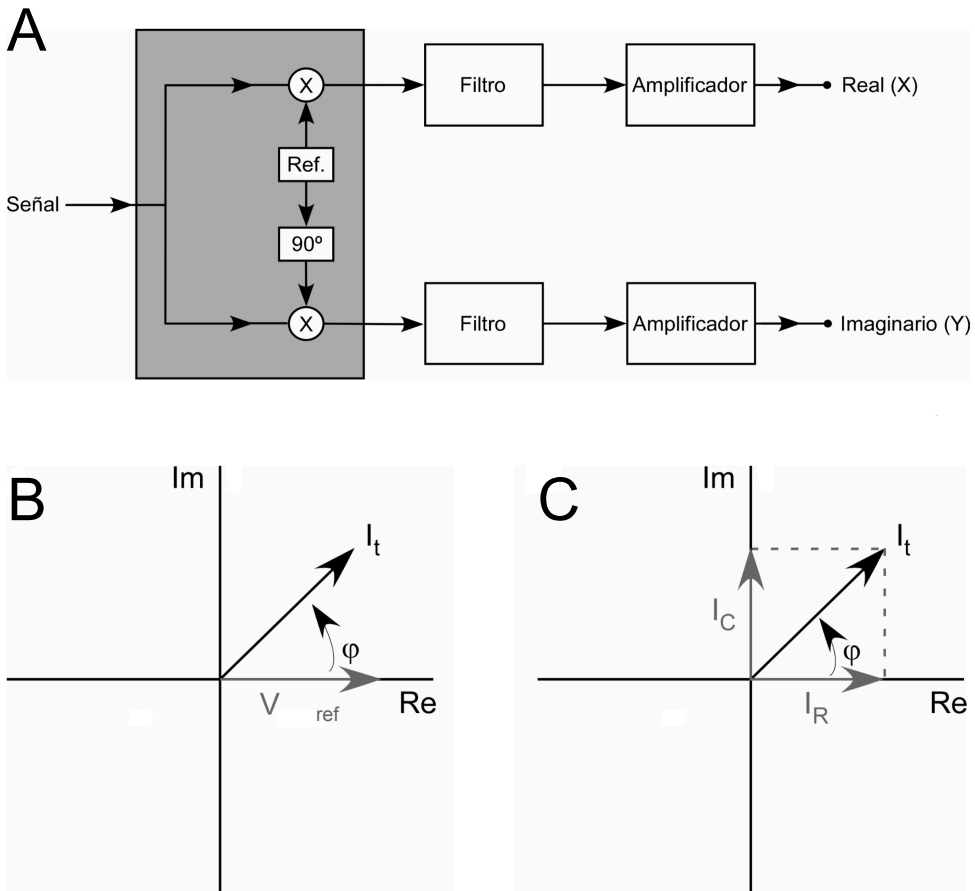


Fig. 7.4. Esquema del funcionamiento del amplificador “Lock-in” y corriente representada de forma vectorial. A. Representación de la descomposición de la señal llevada a cabo por el amplificador “Lock-in” (parte sombreada). **B.** Corriente total (I_t) representada como un vector, determinado por su magnitud y ángulo de fase (φ). El voltaje de referencia se caracteriza por tener un ángulo de fase de 0° . **C.** Representación de los componentes vectoriales (I_C e I_R) de la corriente total.

La parte real refleja los cambios en la conductancia de la membrana (G_m) y en la resistencia de acceso de la pipeta (R_A). La parte imaginaria refleja los cambios en la capacidad de la membrana (C_m).

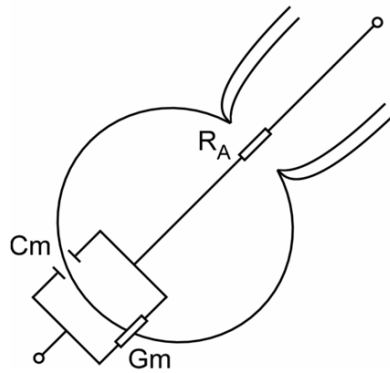


Fig. 7.5. Esquema de la configuración célula entera y su circuito equivalente. R_A es la resistencia de acceso a la pipeta, que depende de la geometría de la punta de la pipeta. G_m se corresponde con la conductancia de la membrana y está determinada por los canales iónicos de la misma. C_m es la capacidad de la membrana.

Bibliografía

8. BIBLIOGRAFÍA.

Abbineni, P. S., Bittner, M. A., Axelrod, D., & Holz, R. W. (2019). Chromogranin A, the major luminal protein in chromaffin granules, controls fusion pore expansion. *The Journal of general physiology*, 151(2), 118-130.

Albillos, A., Dernick, G., Horstmann, H., Almers, W., Alvarez de Toledo, G., & Lindau, M. (1997). The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature*, 389(6650), 509-512.

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

Allen, J. M., Adrian, T. E., Polak, J. M., & Bloom, S. R. (1983). Neuropeptide Y (NPY) in the adrenal gland. *Journal of the autonomic nervous system*, 9(2-3), 559-563.

Álvarez, C., Lorenzo, C., Santana, F., & Borges, R. (1997). Interaction between G protein-operated receptors eliciting secretion in rat adrenals. A possible role of protein kinase C. *Biochemical pharmacology*, 53(3), 317-325.

Álvarez de Toledo, G., Fernández-Chacón, R., & Fernández, J. M. (1993). Release of secretory products transient vesicle fusion. *Nature*, 363(6429), 554-558.

Álvarez de Toledo, G., Montes, M. Á., Montenegro, P. & Borges, R. (2018). Phases of the fusion pore. *Federation of European Biochemical Societies*, 592(21), 3532-3541.

Alves, E., Lukoyanov, N., Serrao, P., Moura, D., & Moreira-Rodrigues, M. (2016). Epinephrine increases contextual learning through activation of peripheral β_2 -adrenoceptors. *Psychopharmacology*, 233(11), 2099-2108.

Archer, D.A., Graham, M. E., & Burgoyne, R. D. (2002). Complexin regulates the closure of the fusion pore during regulated vesicle exocytosis. *The Journal of biological chemistry*, 277(21), 18249-18252.

Artalejo, C. R., Ariano, M. A., Perlman, R. L., & Fox, A. P. (1990). Activation of facilitation calcium channels in chromaffin cells by D1 dopamine receptors through a cAMP/protein kinase A-dependent mechanism. *Nature*, *348*(6298), 239-242.

Ashery, U., Varoqueaux, F., Voets, T., Betz, A., Thakur, P., Koch, H., Neher, E., Brose, N., & Rettig, J. (2000). Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *The EMBO journal*, *19*(14), 3586-3596.

Aunis, D., & Bader, M. F. (1988). The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells. *The Journal of experimental biology*, *139*, 253-266.

Aunis, D., & Langley, K. (1999). Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta physiologica scandinavica*, *167*(2), 89-97.

Axelrod, D., Thompson, N. L., & Burghardt, T. P. (1983). Total internal inflection fluorescent microscopy. *Journal of microscopy*, *129*(Pt 1), 19-28.

Baggio, L. L., & Drucker, D. J. (2007). Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, *132*(6), 2131-2157.

Baggio, L. L., Kim, J. G., & Drucker, D. J. (1999). Chronic exposure to GLP-1R agonists promotes homologous GLP-1 receptor desensitization in vitro but does not attenuate GLP-1R-dependent glucose homeostasis in vivo. *Diabetes*, *53*(Suppl3), 205-214.

Ballesta, J. J., Borges, R., García, A. G., & Hidalgo, M. J. (1989). Secretory and radioligand binding studies on muscarinic receptors in bovine and feline chromaffin cells. *Journal of Physiology*, *418*, 411-426.

Barg, S., Olofsson, C. S., Schriever-Abeln, J., Wendt, A., Gebre.Medhin, S., Renström, E., & Rorsman, P. (2002). Delay between fusion pore opening and peptide release from large dense-core vesicles in neuroendocrine cells. *Neuron*, *33*(2), 287-299.

Barroso-González, J., Machado, J. D., García-Expósito, L., & Valenzuela-Fernández, A. (2009). Moesin regulates the trafficking of nascent clathrin-coated vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(4), 2419-2434.

Bavec, A., & Licar, A. (2009). Functional characterization of N-terminally GFP-tagged GLP-1 receptor. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2009, doi: 10.1155/2009/498149.

Berridge, M. J. (2012). Cell signalling biology; doi: 10.1042/csb0001003.

Betz, A., Thakur, P., Junge, H. J., Ashery, U., Rhee, J. S., Scheuss, V., Rosenmund, C., Rettig, J., & Brose, N. (2001). Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming. *Neuron*, 30(1), 183-196.

Blaschko, H., & Welch, A. D. (1953). Localization of adrenaline in cytoplasmic particles of the bovine adrenal medulla. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 219(1-2), 17-22.

Blasi, J., Chapman, E. R., Link, E., Binz, T., Yamasaki, S., De Camilli, P., Südhof, T. C., Niemann, H., & Jahn, R. (1993). Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature*, 365(6442), 160-163.

Bolli, G. B., & Fanelli, C. G. (1999). Physiology of glucose counterregulation to hypoglycemia. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 28(3), 467-493.

Borges, R. (1994). Histamine H1 receptor activation mediates the preferential release of adrenaline in the rat adrenal gland. *Life sciences*, 54(9), 631-640.

Borges, R., Sala, F., & Garcia, A. G. (1986). Continuous monitoring of catecholamine release from perfused cat adrenals. *Journal of neuroscience methods*, 16(4), 289-300.

Borg, W. P., Durinh, M. J., Sherwin, R. S., Borg, M. A., Brines, M. L., & Shulman, G. I. (1994). Ventromedial hypothalamic lesions in rats suppress counterregulatory responses to hypoglycemia. *The Journal of clinical investigation*, 93(4), 1677-1682.

Bornstein, S. R., Ehrhart-Bornstein, M., & Scherbaum, W. A. (1997). Morphological and functional studies of the paracrine interaction between cortex and medulla in the adrenal gland. *Microscopy research and technique*, 36(6), 520-533.

Brailowsky, S. (1995). Las sustancias de los sueños: neuropsicofarmacología. Fondo de cultura económica. Recuperado de: <http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx>.

Brewer, K. D., Bacaj, T., Cavalli, A., Camiloni, C., Swarbrick, J. D., Liu, J., Zhou, A., Zhou, P., Barlow, N., Xu, J., Seven, A. B., Prinslow, E. A., Voleti, R., Häussinger, D., Bonvin, A. M., Tomchick, D. R., Vendruscolo, M., Graham, B., Südhof, T. C., & Rizo, J. (2015). Dynamic binding mode of a synaptotagmin-1-SNARE complex in solution. *Nature structural & molecular biology*, 22(7), 555-564.

Britsch, S., Krippeit-Drews, P., Lang, F., Gregor, M., & Drews, G. (1995). Glucagon-like peptide-1 modulates Ca^{2+} current but not K^+ ATP current in intact mouse pancreatic β -cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 207(1), 33-39.

Buraei, Z., & Yang, J. (2010). The β subunit of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Physiological reviews*, 90(4), 1461-1506.

Burgess, T. L., & Kelly, R. B. (1987). Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annual review of cell biology*, 3(1), 243-293.

Burgoyne, R. D. (1991). Control of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1071(2), 174-202.

Burgoyne, R. D., & Morgan, A. (2003). Secretory granule exocytosis. *Physiological reviews*, 83(2), 581-632.

Burmeister, M. A., Bracy, D. P., James, F. D., Holt, R. M., Ayala, J., King, E. M., Wasserman, D. H., Drucker, D. J., & Ayala. (2012). Regulation of glucose kinetics during exercise by the glucagon-like peptide-1 receptor. *The Journal of physiology*, 590(20), 5245-5255.

Burn, J. H. (1923). The modification of the action of insulin by pituitary extract and other substances. *The Journal of physiology*, 57(5), 318-329.

Burn, J. H., Hutcheon De, & Parker, R. H. (1950). Adrenaline and noradrenaline in the suprarenal medulla after insulin. *British journal of pharmacology and chemotherapy*, 5(3), 417-423.

Burn, J. H., & Marks, H. P. (1925). The relation of the tyroid gland to the action of insulin. *The Journal of physiology*, 60(3), 131-141.

Butcher, R. W., & Sutherland, E. W. (1962). Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. *The Journal of biological chemistry*, 237, 1244-1250.

Cachelin, A. B., de Peyer, J. E., Kokubun, S., & Reuter, H. (1983). Ca²⁺ channel modulation by 8-bromocyclic AMP in cultured heart cells. *Nature*, 304(5925), 462-464.

Calebiro, D., & Maiellaro, I. (2014). cAMP signaling microdomains and their observation by optical methods. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8(350), doi: 10.3389/fncel.2014.00350.

Camacho, M., Machado, J. D., Montesinos, M. S., Criado, M., & Borges, R. (2006). Intragranular pH rapidly modulates exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Journal of neurochemistry*, 96(2), 324-334.

Cannon, W. B. (1915). Bodily changes in pain, hunger, fear and rage: an account of recent researches into the function of emotional excitement. New York and London, D. Appleton and Company.

Carbone, E., Borges, R., Eiden, L., García, A., & Hernandez-Cruz, A. (2019). Chromaffin cells of the adrenal medulla: physiology, pharmacology and disease. *Comprehensive Physiology*, artículo en impresión.

Cárdenas, A. M., & Marengo, F. D. (2016). How the stimulus defines the dynamics of vesicle pool recruitment, fusion mode, and vesicle recycling in neuroendocrine cells. *Journal of neurochemistry*, 137(6), 867-879.

Carmichael, S. W., & Winkler, H. (1985). The adrenal chromaffin cell. *Scientific American*, 253, 40-49.

Chheda, M. G., Ashery, U., Thakur, P., Rettig, J., & Sheng, Z. H. (2001). Phosphorylation of Snapin by PKA modulates its interaction with the SNARE complex. *Nature cell biology*, 3(4), 331-338.

Chern, Y. J., Kim, K. T., Slakey, L. L., & Westhead, E. W. (1988). Adenosine receptors activate adenylate cyclase and enhance secretion from bovine adrenal chromaffin cells in the presence of forskolin. *Journal of neurochemistry*, 50(5), 1484-1493.

Chin, K. V., Yang, W. L., Ravatn, R., Kita, T., Reitman, E., Vettori, D., Cvijic, M. E., Shin, M., & Iacono, L. (2002). Reinventing the wheel of cyclic AMP: novel mechanisms of cAMP signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 968, 49-64.

Chow, R. H., Klingauf, J., & Neher, E. (1994). Time course of Ca²⁺ concentration triggering exocytosis in neuroendocrine cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(26), 12765-12769.

Chow, R. H., von Rüden, L., & Neher, E. (1992). Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature*, 356(6364), 60-63.

Clapham, D. E. (1995). Calcium signaling. *Cell*, 80(2), 259-268.

Colliver, T. L., Pyott, S. J., Achalabun, M., & Ewing, A. G. (2000). VMAT-mediated changes in quantal size and vesicular volume. *The Journal of Neuroscience*, 20(14), 5276-5282.

Coupland, R. E. (1965). Electron microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla. *Journal of anatomy*, 99(2), 231-254.

Coupland, R. E., & Hopwood, D. (1966). The mechanism of the differential staining reaction for adrenaline-and noradrenaline-storing granules in tissues fixed in glutaraldehyde. *Journal of anatomy*, 100(Pt 2), 227.

- Crivellato, E., Nico, B., & Ribatti, D. (2008). The chromaffin vesicle: advances in understanding the composition of a versatile, multifunctional secretory organelle. *The Anatomical Record*, *291*(12), 1587-1602.
- Cryer, P. E. (1981). Glucose counterregulation in man. *Diabetes*, *30*(3), 261-264.
- D'Andrea, P., & Grohovaz, F. (1995). $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in rat chromaffin cells: frequency and amplitude modulation by Ca^{2+} and $InsP_3$. *Cell Calcium*, *17*(5), 367-374.
- Daily, N. J., Boswell, K. L., James, D. J., & Martin, T. F. (2010). Novel interactions of CAPS (Ca^{2+} -dependent activator protein for secretion) with the three neuronal SNARE proteins required for vesicle fusion. *The Journal of biological chemistry*, *285*(46), 35320-35329.
- Dale, H. H., Feldberg, W., & Vogt, M. (1936). Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *The Journal of physiology*, *86*(4), 353-380.
- Daubner, S. C., Le, T., & Wang, S. (2011). Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Archives of biochemistry and biophysics*, *508*(1), 1-12.
- Davis, A. F., Bai, J., Fasshauer, D., Wolowick, M. J., Lewis, J. L., & Chapman, E. R. (1999). *Neuron*, *24*(2), 363-376.
- De Jongh, K. S., Murphy, B. J., Colvin, A. A., Hell, J. W., Takahashi, M., & Catterall, W. A. (1996). Specific phosphorylation of a site in the full-length form of alpha 1 subunit of the cardiac L-type calcium channel by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Biochemistry*, *35*(32), 10392-10402.
- De Robertis, E. D. P., and Bennett, H. S. (1954). Submicroscopic vesicular component in the synapse. *Federation proceedings*, *13*, 35.
- De Rooij, J., Zwartkruis, F. J., Verheijen, M. H., Cool, R. H., Nijman, S. M., Wittinghofer, A., & Bos, J. L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*, *396*(6710), 474-477.

De Wit, H., Walter, A. M., Milosevic, I., Gulyás-Kovács, A., Riedel, D., Sørensen, J. B., & Verhage, M. (2009). Synaptotagmin-1 docks secretory vesicles to syntaxin-1/SNAP-25 acceptor complexes. *Cell*, 138(5), 935-946.

Díaz-Vera, J., Camacho, M., Machado, J. D., Domínguez, N., Montesinos, M. S., Hernández-Fernaud, J. R., ... & Borges, R. (2012). Chromogranins A and B are key proteins in amine accumulation, but the catecholamine secretory pathway is conserved without them. *The FASEB Journal*, 26(1), 430-438.

Díaz-Vera, J., Morales, Y. G., Hernández-Fernaud, J. R., Camacho, M., Montesinos, M. S., Calegari, F., ... & Machado, J. D. (2010). Chromogranin B gene ablation reduces the catecholamine cargo and decelerates exocytosis in chromaffin secretory vesicles. *The Journal of Neuroscience*, 30(3), 950-957.

Díaz-Flores, L., Gutiérrez, R., Varela, H., Valladares, F., Alvarez-Argüelles, H., & Borges, R. (2008). Histogenesis and morphofunctional characteristics of chromaffin cells. *Acta physiologica*, 192(2), 145-163.

Dolphin, A. C. (2006). A short history of voltage-gated calcium channels. *British journal of pharmacology*, 147(1), 56-62.

Domínguez, N., Estévez-Herrera, J., Borges, R., & Machado, J. D. (2014). The interaction between chromogranin A and catecholamines governs exocytosis. *The FASEB Journal*, 28(11), 4657-4667.

Domínguez, N., Rodríguez, M., Machado, J. D., & Borges, R. (2012). Preparation and culture of adrenal chromaffin cells. *Methods in molecular biology*, 846, 223-234.

Douglas, W. W., & Rubin, R. P. (1961). The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *The Journal of physiology*, 159(1), 40-57.

Douppnik, C. A., & Pun, R. Y. (1992). Cyclic AMP-dependent phosphorylation modifies the gating properties of L-type Ca²⁺ channels in bovine adrenal chromaffin cells. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, 420(1), 61-71.

- Drucker, D. J., Philippe, J., Mojsov, S., Chick, W. L., & Habener, J. F. (1987). Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(10), 3434-3438.
- Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Südhof, T. C., & Rizo, J. (1999). A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc 18. *The EMBO journal*, 18(16), 4372-4382.
- Duncan, R. R., Greaves, J., Wiegand, U. K., Matskevich, I., Bodammer, G., Apps, D. K., Shipston, M. J. and Chow, R. H. (2003). Functional and spatial segregation of secretory vesicle pools according to vesicle age. *Nature*, 422(6928), 176-180.
- Dzhura, I., Chepurny, O. G., Leech, C. A., Roe, M. W., Dzhura, E., Xu, X., Lu, Y., Schwede, F., Genieser, H. G., Smrcka, A. V., & Holz, G. G. (2011). Phospholipase C links Epac2 activation to the potentiation of glucose-stimulated insulin secretion from mouse islets of Langerhans. *Islets*, 3(3), 121-128.
- Eberhard, D. A., & Holz, R. W. (1987). Cholinergic stimulation of inositol phosphate formation in bovine adrenal chromaffin cells: Distinct nicotinic and muscarinic mechanisms. *Journal of Neurochemistry*, 49(5), 1634-1643.
- Ebert, S. N., Rong, Q., Boe, S., Thompson, R. P., Grinberg, A., & Pfeifer, K. (2004). Targeted insertion of the Cre-recombinase gene at the phenylethanolamine n-methyltransferase locus: a new model for studying the developmental distribution of adrenergic cells. *Developmental dynamics*, 231(4), 849-858.
- Edwards, S. L., Anderson, C. R., Southwell, B. R., & McAllen, R. M. (1996). Distinct preganglionic neurons innervate noradrenaline and adrenaline cells in the cat adrenal medulla. *Neuroscience*, 70(3), 825-832.
- Elhamdani, A., Azizi, F. & Artalejo, C. R. (2006). Double patch clamp reveals that transient fusion (kiss-and-run) is a major mechanism of secretion in calf adrenal chromaffin cells: high calcium shifts the mechanism from kiss-and-run to complete fusion. *The Journal of neuroscience*, 26(11), 3030-3036.

Elliot, T. R. (1904). On the action of adrenalin. *Classic Article Collection*, 190. <https://digitalcommons.ohsu.edu/hca-cac/190>.

Ellis, S., Kennedy, B. L., Eusebi, A. J., & Vincent, N. H. (1967). Autonomic control of metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 139(3), 826-832.

Emery, A. C., Eiden, M. V., Mustafa, T., Eiden, L. E. (2013). Rapgef2 connects GPCR-mediated cAMP signals to ERK activation in neuronal and endocrine cells. *Science signaling*, 6(281), ra51.

Emery, A. C., & Eiden, L. E. (2012). Signaling through the neuropeptide GPCR PAC, induces neuritogenesis via a single linear cAMP- and ERK-dependent pathway using a novel cAMP sensor. *FASEB journal*, 26(8), 3199-3211.

Eng, J., Kleinman, W. A., Singh, L., Singh, G., & Raufman, J. P. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. *The Journal of biological chemistry*, 267(11), 7402-7405.

Erickson, J. D., Schafer, M. K., Bonner, T. I., Eiden, L. E., & Weihe, E. (1996). Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(10), 5166-5171.

Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., Hofman, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwatz, A., Snutch, T. P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R. W., & Catterall, W. A. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 25(3), 533-535.

Estévez-Herrera, J., González-Santana, A., Baz-Dávila, R., Machado, J. D., & Borges, R. (2016). The intravesicular cocktail and its role in the regulation of exocytosis. *Journal of neurochemistry*, 137(6), 897-903.

Fader, D., & Lewis, E. J. (1990). Interaction of cyclic AMP and cell-cell contact in the control of tyrosine hydroxylase RNA. *Brain research. Molecular brain research*, 8(1), 25-29.

Fatt, P., & Katz, B. (1952). Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *The Journal of physiology*, 117(1), 109-128.

Feldberg, W., Minz, B., & Tsudzimura, H. (1934). The mechanism of the nervous discharge of adrenaline. *The Journal of physiology*, 81(3), 286-304.

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

Feuerstein, G., & Gutman, Y. (1971). Preferential secretion of adrenaline or noradrenaline by the cat adrenal in vivo in response to different stimuli. *British journal of pharmacology*, 43(4), 764-775.

Filipsson, K., Sundler, F., Hannibal, J., & Ahrén, B. (1998). PACAP and PACAP receptors in insulin producing tissues: localization and effects. *Regulatory peptides*, 74(2-3), 167-175.

Fineman, M. S., Bicsak, T. A., Shen, L. Z., Taylor, K., Gaines, E., Varns, A., Kim, D., & Baron, A. D. (2003). Effect on glycemic control of exenatide (synthetic exendin-4) additive to existing metformin and/or sulfonylurea treatment in patients with type 2 diabetes. *Diabetes care*, 26(8), 2370-2377.

Forkuo, G. S., Kim, H., Thanawala, V. J., Al-Sawalha, N., Valdez, D., Joshi, R., Parra, S., Pera, T., Gonnella, P. A., Knoll, B. J., Walker, J. K., Penn, R. B., & Bond, R. A. (2016). Phosphodiesterase 4 inhibitors attenuate the asthma phenotype produced by β_2 -adrenoceptor agonists in phenylethanolamine N-methyltransferase-knockout mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 55(2), 234-242.

Foster, M. (1987). A text book of physiology. New York, The Macmillan company.

Fujimoto, K., Shibasaki, T., Yokoi, N., Kashima, Y., Matsumoto, M., Sasaki, T., Tajima, N., Iwanaga, T., & Seino, S. (2002). Piccolo, a Ca^{2+} sensor in pancreatic β -cells. Involvement of cAMP-GEFII.Rim2.Piccolo complex in cAMP-dependent exocytosis. *The Journal of biological chemistry*, 277(52), 50497-50502.

Fulop, T., Radabaugh, S., & Smith, C. (2005). Activity-dependent differential transmitter release in mouse adrenal chromaffin cells. *The Journal of neuroscience*, 25(32), 7324-7332.

Gandia, L., Garcia, A. G., & Morad, M. (1993). ATP modulation of calcium channels in chromaffin cells. *The Journal of physiology*, 470(1), 55-72.

Gao, J., Hirata, M., Mizokami, A., Zhao, J., Takahashi, I., Takeuchi, H., & Hirata, M. (2016). Differential role of SNAP-25 phosphorylation by protein kinases A and C in the regulation of SNARE complex formation and exocytosis in PC12 cells. *Cellular signaling*, 28(5), 425-437.

Garber, S. S., Hoshi, T., & Aldrich, R. W. (1990). Interaction of forskolin with voltage-gated K⁺ channels in PC12 cells. *The Journal of neuroscience*, 10(10), 3361-3368.

García, A. G., García-De-Diego, A. M., Gandía, L., Borges, R., & García-Sancho, J. (2006). Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiological Reviews*, 86(4), 1093-1131.

Gedulin, B., Jodka, C., Hoyt, J. (1999). Exendin-4 (AC2993) decreases glucagon secretion during hyperglycemic clamps in diabetic fatty Zucker rats. *Diabetes* 48 (Suppl. 1): A199.

Giarudo, C. G., Eng, W. S., Melia, T. J., & Rothman, J. E. (2006). A clamping mechanism involved in SNARE-dependent exocytosis. *Science*, 313(5787), 676-680.

Gimenez-Molina, Y., Villanueva, J., Francés, M. M., Viniestra, S., & Gutiérrez, L. M. (2018). Multiple mechanisms driving F-actin-dependent transport of organelles to and from secretory sites in bovine chromaffin cells. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12(344), doi: 10.3389/fncel.2018.00344.

Gohar, H. A. (1933). The effect of diet, of insulin and of thyroxine upon the adrenaline content of the suprarenal glands. *The Journal of physiology*, 80(3), 305-313.

- Göke, R., Fehmann, H. C., Linn, T., Schmidt, H., Krause, M., Eng, J., & Göke, B. (1993). Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells. *The Journal of biological chemistry*, 268(26), 19650-19655.
- Gong, L.W., de Toledo, G.A., & Lindau, M. (2007). Exocytotic catecholamine release is not associated with cation flux through channels in the vesicle membrane but Na⁺ influx through the fusion pore. *Nature cell biology*, 9(8), 915-922.
- Green, D. J., & Perlman, R. L. (1981). On-line measurement of catecholamine secretion. *Analytical biochemistry*, 110(2), 270-276.
- Greene, L. A., & Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Science*, 73(7), 2424-2428.
- Greig, N. H., Holloway, H. W., De Ore, K. A., Jani, D., Wang, Y., Zhou, J., Garant, M. J., & Egan, J. M. (1999). Once daily injection of exendin-4 to diabetic mice achieves long-term beneficial effects on blood glucose concentrations. *Diabetologia*, 42(1), 45-50.
- Gromada, J., Dissing, S., Bokvist, K., Renström, E., Frøkjær-Jensen, J., Wulff, B. S., & Rorsman, P. (1995). Glucagon-like peptide I increases cytoplasmic calcium in insulin-secreting beta TC3-cells by enhancement of intracellular calcium mobilization. *Diabetes*, 44(7), 767-774.
- Grynszpan-Winograd, O. (1974). Adrenaline and noradrenaline cells in the adrenal medulla of the hamster: a morphological study of their innervation. *Journal of neurocytology*, 3(3), 341-361.
- Guimaraes, S., & Moura, D. (2001). Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacological reviews*, 53(2), 319-356.
- Gündisch, D., & Eibl, C. (2011). Nicotinic acetylcholine receptor ligands, a patent review (2006-2011). *Expert opinion on therapeutic patents*, 21(12), 1867-1896.

Harrington, C. A., Lewis, E. J., Krzemien, D., & Chikaraishi, D. M. (1987). Identification and cell type specificity of the tyrosine hydroxylase gene promoter. *Nucleic acids research*, 15(5), 2363-2384.

Haylett, D. G., & Jenkinson, D. H. (1972). The receptors concerned in the actions of catecholamines on glucose release, membrane potential and ion movements in guinea-pig liver. *The Journal of physiology*, 225(3), 751-772.

Heinemann, C., von Rüden, L., Chow, R. H., & Neher, E. (1993). A two-step model of secretion control in neuroendocrine cells. *Pflügers Archiv*, 424(2), 105-112.

Heinrich, G., Gros, P., Lund, P. K., Bentley, R. C., & Habener, J. F. (1984). Pre-proglucagon messenger ribonucleic acid: nucleotide and encoded amino acid sequences of the rat pancreatic complementary deoxyribonucleic acid. *Endocrinology*, 115(6), 2176-2181.

Helle, K. B., & Serck-Hanssen, G. (1969). Chromogranin: the soluble and membrane-bound lipoprotein of the chromaffin granule. *Pharmacological Research Communications*, 1(1), 25-29.

Helle, K. B., Reed, R. K., Pihl, K. E., & Serck-Hanssen, G. (1985). Osmotic properties of the chromogranins and relation to osmotic pressure in catecholamine storage granules. *Acta physiologica scandinavica*, 123(1), 21-33.

Heppner, K. M., & Perez-Tilve, D. (2015). GLP-1 based therapeutics: simultaneously combating T2DM and obesity. *Frontiers in neuroscience*, 9(92), doi: 10.3389/fnins.2015.00092.

Hepp, R., Cabaniols, J. P., & Roche, P. A. (2002). Differential phosphorylation of SNAP-25 in vivo by protein kinase C and protein kinase A. *FEBS letters*, 532(1-2), 52-56.

Heuser, J. E., & Reese, T. S. (1973). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *The Journal of cell biology*, 57(2), 315-344.

- Hillarp, N. Å., & Nilson, B. (1954). Some quantitative analyses of the sympathomimetic amine containing granules in the adrenal medullary cell. *Acta Physiologica Scandinavica*, 32(1), 11-18.
- Himms-Hagen, J. (1967). Sympathetic regulation of metabolism. *Pharmacological reviews*, 19(3), 367-461.
- Hodel, A., Schäfer, T., Gerosa, D., & Burger, M. M. (1994). In chromaffin cells, the mammalian Sec1p homologue is a syntaxin 1A-binding protein associated with chromaffin granules. *Journal of Biological Chemistry*, 269(12), 8623-8626.
- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology*, 117(4), 500-544.
- Holst, J. J., Orskov, C., Nielsen, O. V., & Schwartz, T.W. (1987). Truncated glucagon-like peptide I, an insulin-releasing hormone from the distal gut. *FEBS letters*, 211(2), 169-174.
- Holz, G. G., Kühtreiber, W. M., & Habener, J. F. (1993). Pancreatic beta-cells are reentered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37). *Nature*, 361(6410), 362-365.
- Hong, S. J. (2001). Reduction of quantal size and inhibition of neuromuscular transmission by bafilomycin A. *Neuropharmacology*, 41(5), 609-617.
- Hook, V., Bark, S., Gupta, N., Lortie, M., Lu, W. D., Bandeira, N., Funkelstein, L., Wegrzyn, J., O'Connor, D. T., & Pevzner, P. (2010). Neuropeptidomic components generated by proteomic functions in secretory vesicles for cell-cell communication. *The AAPS journal*, 12(4), 635-645.
- Horrigan, F. T., & Bookman, R. J. (1994). Releasable pools and the kinetics of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Neuron*, 13(5), 1119-1129.
- Huttner, W. B., Schiebler, W., Greengard, P., & De Camilli, P. (1983). Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with

synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *The Journal of cell biology*, 96(5), 1374-1388.

Inda, C., Dos Santos Claro, P. A., Bonfiglio, J. J., Senin, S. A., Maccarrone, G., Turck, C. W., Silberstein, S. (2016). Different cAMP sources are critically involved in G protein-coupled receptor CRGR1 signaling. *The Journal of cell biology*, 214(2), 181-195.

Inoue, R., Tanabe, M., Kono, K., Maruyama, K., Ikemoto, T., & Endo, M. (2003). Ca²⁺-releasing effect of cerivastatin on the sarcoplasmic reticulum of mouse and rat skeletal muscle fibers. *Journal of Pharmacological Science*, 93(3), 279-288.

Islam, D., Zhang, N., Wang, P., Li, H., Brubaker, P. L., Gaisano, H. Y., Wang, Q., & Jin, T. (2009). Epac is involved in cAMP-stimulated proglucagon expression and hormone production but not hormone secretion in pancreatic alpha- and intestinal L-cell line. *American journal of physiology*, 296(1), 174-181.

Jahn, R., & Fasshauer, D. (2012). Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature*, 490(7419), 201-207.

Jankowski, J. A., Finnegan, J. M., & Wightman, R. M. (1994). Extracellular ionic composition alters kinetics of vesicular release of catecholamines and quantal size during exocytosis at adrenal medullary cells. *Journal of neurochemistry*, 63(5), 1739-1747.

Jodka, C., Parkes, D., & Young, A. (2000). Hypoglycemic override of inhibition of gastric emptying by exendin-4. *Diabetes*, 49, A285.

Joh, T. H., Park, D. H., & Reis, D. J. (1978). Direct phosphorylation of brain tyrosine hydroxylase by cyclic AMP-dependent protein kinase: mechanism of enzyme activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(10), 4744-4748.

Johnson, R. G., & Scarpa, A. (1976). Internal pH of isolated chromaffin vesicles. *The Journal of Biological Chemistry*, 251(7), 2189-2191.

- Kaneko, M., & Takahashi, T. (2004). Presynaptic mechanism underlying cAMP-dependent synaptic potentiation. *The Journal of neuroscience*, 24(22), 5202-5208.
- Kanno, T., Suga, S., Wu, J., Kimura, M., & Wakui, M. (1998). Intracellular cAMP potentiates voltage-dependent activation of L-type Ca²⁺ channels in rat islet beta-cells. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, 435(4), 578-580.
- Kao, L. S., & Schneider, A. S. (1985). Muscarinic receptors on bovine chromaffin cells mediate a rise in cytosolic calcium that is independent of extracellular calcium. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(4), 2019-2022.
- Karlin, A. (1993). Structure of nicotinic acetylcholine receptors. *Current opinion in neurobiology*, 3(3), 299-309.
- Kashima, Y., Miki, T., Shibasaki, T., Ozaki, N., Miyazaki, M., Yano, H., & Seino, S. (2001). Critical role of cAMP-GEFII-Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(49), 46046-46053.
- Kawagoe, K. T., Zimmerman, J. B., & Wightman, R. M. (1993). Principles of voltammetry and microelectrode surface states. *Journal of neuroscience methods*, 48(3), 225-240.
- Kawasaki, H., Springett, G. M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D. E., & Graybiel, A. M. (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science*, 282(5397), 2275-2279.
- Kieffer, T. J., & Habener, J. F. (1999). The glucagon-like peptides. *Endocrine reviews*, 20(6), 876-913.
- Kim, K. S., Lee, M. K., Carroll, J., & Joh, T. H. (1993). Both the basal and inducible transcription of the tyrosine hydroxylase gene are dependent upon a cAMP response element. *The Journal of biological chemistry*, 268(21), 15689-15695.
- Kim, T., Tao-Cheng, J. H., Eiden, L. E., & Loh, Y. P. (2001). Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell*, 106(4), 499-509.

Kissinger, P. T., Bruntlett, C. S., Davis, G. C., Felice, L. J., Riggin, R. M., & Shoup, R. E. (1977). Recent developments in the clinical assessment of the metabolism of aromatics by high-performance, reversed-phase chromatography with amperometric detection. *Clinical chemistry*, 23(8), 1449-1455.

Klinterberg, K. A., Karlsson, S., Ahrén, B. (1996). Signaling mechanisms underlying the insulinotropic effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in HIT-T15 cells., *Endocrinology*, 137(7), 2791-2798.

Knight, D. E., & Baker, P. F. (1986). Observations on the muscarinic activation of catecholamine secretion in the chicken adrenal. *Neuroscience*, 19(1), 357-366.

Kobayashi, S. (1977). Adrenal medulla: chromaffin cells as paraneurons. *Archivum Histologicum Japonicum*, 40, 61-79.

Koval, L. M., Yavorskaya, E. N., & Lukyanetz. (2001). Electron microscopic evidence for multiple types of secretory vesicles in bovine chromaffin cells. *General and comparative endocrinology*, 121(3), 261-277.

Kozminski, K. D., Gutman, D. A., Davila, V., Sulzer, V., & Ewing, A. G. (1998). Voltammetric and pharmacological characterization of dopamine release from single exocytotic events at rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Analytical chemistry*, 70(15), 3123-3130.

Kumakura, K., Ohara, M., & Satô, G. P. (1986). Real-time monitoring of the secretory function of cultured adrenal chromaffin cells. *Journal of neurochemistry*, 46(6), 1851-1858.

Kuo, J. F., Lee, T. P., Reyes, P. L., Walton, K. G., Donnelly, T. E. Jr., Greengard, P. (1972). Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. An assay method for the measurement of guanosine 3',5'-monophosphate in various biological materials and a study of agents regulating its levels in heart and brain. *Journal of Biological Chemistry*, 247(1), 16-22.

Kuwashima, H., Matsumura, C., & Kimura, T. (2000). Differential secretion of adrenaline and noradrenaline in response to various secretagogues from bovine

chromaffin cells. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 27(7), 494-499.

Kvetnansky, R., Sabban, E. L., & Palkovits, M. (2009). Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiological reviews*, 89(2), 535-606.

Kwan, E. P., Xie, L., Sheu, L., Ohtsuka, T., & Gaisano, H. Y. (2007). Interaction between Munc13-1 and RIM is critical for glucagon-like peptide-1 mediated rescue of exocytotic defects in Munc13-1 deficient pancreatic β -cells. *Diabetes*, 56(10), 2579-2588.

La Barre, J., & Still, E. U. (1930). Studies on the physiology of secretin. *American Journal of physiology*, 91, 649-653.

Ledbetter, F. H., & Kirshner, N. (1974). Studies of chick adrenal medulla in organ culture. *Biochemical Pharmacology*, 24(9), 967-974.

Lenartowski, R., & Goc, A. (2011). Epigenetic, transcriptional and posttranscriptional regulation of the tyrosine hydroxylase gene. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 29(8), 873-883.

Leszczyszyn, D. J., Jankowski, J. A., Viveros, O. H., Diliberto, E. J., Near, J. A., & Wightman, R. M. (1990). Nicotinic receptor-mediated catecholamine secretion from individual chromaffin cells. Chemical evidence for exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 265(25), 14736-14737.

Lever, J. D. (1955). Electron microscopic observations on the normal and denervated adrenal medulla of the rat. *Endocrinology*, 57(5), 621-635.

Levitt, M., Spector, S., Sjoerdsma, A., & Udenfriend, S. (1965). Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 148(1), 1-8.

Lewis, E. J., Harrington, C. A., & Chikaraishi, D. M. (1987). Transcriptional regulation of the tyrosine hydroxylase gene by glucocorticoid and cyclic AMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(11), 3550-3554.

Lewis, R. V., Stern, A. S., Rossier, J., Stein, S., & Udenfriend, S. (1979). Putative enkephalin precursors in bovine adrenal medulla. *Biochemical and biophysical research communications*, *89*(3), 822-829.

Lindau, M., & Neher, E. (1988). Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells. *Pflügers Archiv*, *411*(2), 137-146.

Lingg, G., Fischer-Colbrie, R., Schmidt, W., & Winkler, H. (1983). Exposure of an antigen of chromaffin granules on cell surface during exocytosis. *Nature*, *301*(5901), 610-611.

Liu, J., Guo, T., Wei, Y., Liu, M., & Sui, S. F. (2006). Complexin is able to bind to SNARE core complexes in different assembled states with distinct affinity. *Biochemical and biophysical research communications*, *347*(2), 413-419.

Livett, B. G. (1984). Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiological Reviews*, *64*(4), 1103-1161.

Lonart, G., Schoch, S., Kaeser, P.S., Larkin, C. J., Südhof, T. C., & Linden, D. J. (2003). Phosphorylation of RIM1 alpha by PKA triggers presynaptic long-term potentiation at cerebellar parallel fiber synapses. *Cell*, *115*(1), 49-60.

Ma, C., Li, W., Xu, Y., & Rizo, J. (2011). Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin-Munc18 complex to the SNARE complex. *Nature structural & molecular biology*, *18*(5), 542-549.

Machado, D. J., Montesinos, M. S., & Borges, R. (2008). Good practices in single-cell amperometry. *Methods in molecular biology*, *440*, 297-313.

Machado, J. D., Morales, A., Gomez, J. F., & Borges, R. (2001). cAMP modulates exocytotic kinetics and increases quantal size in chromaffin cells. *Molecular Pharmacology*, *60*(3), 514-520.

Machado, J. D., Segura, F., Brioso, M. A., & Borges, R. (2000). Nitric oxide modulates a late step of exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20274-20279.

Marengo, F. D., & Cárdenas, A. M. (2018). How does the stimulus define exocytosis in adrenal chromaffin cells?. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, 470(1), 155-167.

Marley, P. D., Thomson, K. A., Jachno, K., & Johnston, M. J. (1991). Histamine-induced increases in cyclic AMP levels in bovine adrenal medullary cells. *British journal of pharmacology*, 104(4), 839-846.

Mendes, P., Martunho, R., Leite, S., Maia-Moço, L., Leite-Moreira, A. F., Lourenço, A. P., & Moreira-Rodrigues, M. (2018). Chronic exercise induces pathological left ventricular hypertrophy in adrenaline-deficient mice. *International journal of cardiology*, 253, 113-119.

Miura, Y., & Matsui, H. (2003). Glucagon-like peptide-1 induces a cAMP-dependent increase of $[Na^+]_i$ associated with insulin secretion in pancreatic beta-cells. *American journal of physiology*. 285(5), 1001-1009

Mohrman, R., de Wit, H., Connell, E., Pinheiro, P. S., Leese, C., Bruns, D., Davletov, B., Verhage, M., & Sørensen, J. B. (2013). Synaptotagmin interaction with SNAP-25 governs vesicle docking, priming, and fusion triggering. *The Journal of Neuroscience*, 33(36), 14417-14430.

Mojsov, S., Weir, G. C., & Habener, J. F. (1987). Insulinotropin: glucagón-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. *The Journal of clinical investigation*, 79(2), 616-619.

Montesinos, M. S., Machado, J. D., Camacho, M., Diaz, J., Morales, Y. G., Álvarez de la Rosa, D., Carmona, E., Castañeyra, A., Viveros, O. H., O'Connor, D. T., Mahata, S. K., & Borges, R. (2008). The crucial role of chromogranins in storage and exocytosis revealed using chromaffin cells from chromogranin A null mouse. *The Journal of Neuroscience*, 28(13), 3350-3358.

Moratinos, J., Ellis, S., & Potter, D. E. (1977). Catecholamine-induced changes in plasma glucose and insulin levels in the unanesthetized rabbit. *Pharmacology*, *15*(5), 407-414.

Moreira-Rodrigues, M., Graça, A. L., Ferreira, M., Afonso, J., Serrao, P., Morato, M., Ferreirinha, F., Correia-de-Sá, P., Ebert, S. N., & Moura, D. (2014). Attenuated aortic vasodilation and sympathetic prejunctional facilitation in epinephrine-deficient mice: selective impairment of β_2 -adrenoceptor responses. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, *351*(2), 243-249.

Morgan, A., & Burgoyne, R. D. (1995). A role for soluble NSF attachment proteins (SNAPs) in regulated exocytosis in adrenal chromaffin cells. *The EMBO Journal*, *14*(2), 232-239.

Morgan, N. G., Shuman, E. A., Exton, J. H., & Blackmore, P. F. (1982). Stimulation of hepatic glycogenolysis by alpha 1- and beta 2-adrenergic agonists. Evidence against short term agonist-induced desensitization of the responses. *The Journal of biological chemistry*, *257*(23), 13907-13910.

Morita, K., Dohi, T., Kitayama, S., Koyama, Y., & Tsujimoto, A. (1987). Stimulation-evoked Ca^{2+} fluxes in cultured bovine adrenal chromaffin cells are enhanced by forskolin. *Journal of neurochemistry*, *48*(1), 248-252.

Moro, M. A., López, M. G., Gandía, L., Michelena, P., & Garcia, A. G. (1990). Separation and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medullae. *Analytical biochemistry*, *185*(2), 243-248.

Mundorf, M. L., Hochstetter, S. E., Wightman, R. M. (1999). Amine weak bases disrupt vesicular storage and promote exocytosis in chromaffin cells. *Journal of neurochemistry*, *73*(6), 2397-2405.

Nagy, G., Reim, K., Matti, U., Brose, N., Binz, T., Rettig, J., Neher, E., & Sørensen, J. B. (2004). Regulation of releasable vesicle pool sizes by protein kinase A-dependent phosphorylation of SNAP-25. *Neuron*, *41*(3), 417-429.

Nakashima, A., Ota, A., & Sabban, E. L. (2003). Interactions between Egr1 and AP1 factors in regulation of tyrosine hydroxylase transcription. *Brain research. Molecular brain research*, *112*(1-2), 61-69.

Neher, E., & Marty, A. (1982). Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *79*(21), 6712-6716.

Neher, E., & Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, *260*(5554), 799-802.

Neher, E., & Zucker, R. S. (1993). Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron*, *10*(1), 21-30.

O'Connor, D. T., & Frigon, R. P. (1984). Chromogranin A, the major catecholamine storage vesicle soluble protein. Multiple size forms, subcellular storage, and regional distribution in chromaffin and nervous tissue elucidated by radioimmunoassay. *Journal of Biological Chemistry*, *259*(5), 3237-3247.

Oelkers, M., Witt, H., Halder, P., Jahn, R., & Janshoff, A. (2016). SNARE-mediated membrane fusion trajectories derived from force-clamp experiments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(46), 13051-13056.

Oset-Gasque, M. J., Parramón, M., & González, M. P. (1993). GABA_B receptors modulate catecholamine secretion in chromaffin cells by a mechanism involving cyclic AMP formation. *British journal of pharmacology*, *110*(4), 1586-1592.

O'Sullivan, A. J., & Burgoyne, R. D. (1990). Cyclic GMP regulates nicotine-induced secretion from cultured bovine adrenal chromaffin cells: effects of 8-bromo-cyclic GMP, atrial natriuretic peptide, and nitroprusside (nitric oxide). *Journal of neurochemistry*, *54*(5), 1805-1808.

Paiva, M. Q., Moura, D., Vaz-da-Silva, M. J., Guimaraes, S. (1994). Postnatal development of vascular beta-adrenoreceptor-mediated responses and the increase in the adrenaline content of the adrenal gland have a parallel time course. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, *350*(1), 28-33.

Parkes, D. G., Pittner, R., Jodka, C., Smith, P., & Young, A. (2001). Insulinotropic actions of exendin-4 and glucagón-like peptide-1 in vivo and in vitro. *Metabolism*, 50(5), 583-589.

Parramón, M., González, M. P., & Oset-Gasque, M. J. (1995). A reassessment of the modulatory role of cyclic AMP in catecholamine secretion by chromaffin cells. *British journal of pharmacology*, 114(2), 517-523.

Pasche, M., Matti, U., Hof, D., Rettig, J., & Becherer, U. (2012). Docking of LDCVs is modulated by lower intracellular $[Ca^{2+}]$ than priming. *PLoS ONE*, 7(5), e36416. doi: 10.1371/journal.pone.0036416.

Pereira, L., Métrich, M., Fernández-Velasco, M., Lucas, A., Leroy, J., Perrier, R., Morel, E., Fischmeister, R., Richard, S., Bénitah, J. P., Lezoualc'h, F., & Gómez, A. M. (2007). The cAMP binding protein Epac modulates Ca^{2+} sparks by a Ca^{2+} /calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes. *The Journal of physiology*, 583(Pt2), 685-694.

Pérez-Lara, Á., Thapa, A., Nyenhuis, S. B., Nyenhuis, D. A., Halder, P., Tietzel, M., Tittmann, K., Cafiso, D. S., & Jahn, R. (2016). PtdInsP₂ and PtdSer cooperate to trap synaptotagmin-1 to the plasma membrane in the presence of calcium. *eLife*, 5. pii: e15886. doi: 10.7554/eLife.15886.

Perone, M. J., Windeatt, S., & Castro, M. G. Intracellular trafficking of prohormones and proneuropeptides: cell type-specific sorting and targeting. *Experimental physiology*, 82(4), 609-628.

Perrais, D., Kleppe, I. C., Taraska, J. W., & Almers, W. (2004). Recapture after exocytosis causes differential retention of protein in granules of bovine chromaffin cells. *The Journal of physiology*, 560(Pt 2), 413-428.

Perrin, D., Möller, K., Hanke, K., & Söling, H. D. (1992). cAMP and Ca^{2+} -mediated secretion in parotid acinar cells is associated with reversible changes in the organization of the cytoskeleton. *The Journal of cell biology*, 116(1), 127-134.

- Perry, T., Lahiri, D. K., Chen, D., Zhou, J., Shaw, K. T., Egan, J. M., & Greig, N. H. (2002). A novel neurotrophic property of glucagon-like peptide 1: a promoter of nerve growth factor-mediated differentiation in PC12 cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 300(3), 958-966.
- Peter, D., Jimenez, J., Liu, Y., Kim, J., & Edwards, R. H. (1994). The chromaffin granule and synaptic vesicle amine transporters differ in substrate recognition and sensitivity to inhibitors. *The Journal of biological chemistry*, 269(10), 7231-7237.
- Phillips, J. H. (1982). Dynamic aspects of chromaffin granule structure. *Neuroscience*, 7(7), 1595-1609.
- Phillips, J. H., Burridge, K., Wilson, S. P., & Kirshner, N. (1983). Visualization of the exocytosis/endocytosis secretory cycle in cultured adrenal chromaffin cells. *The Journal of cell biology*, 97(6), 1906-1917.
- Pihel, K., Walker, Q. D., & Wightman, R. M. (1996). Overoxidized polypyrrole-coated carbon fiber microelectrodes for dopamine measurements with fast-scan cyclic voltammetry. *Analytical chemistry*, 68(13), 317-326.
- Plattner, H., Artalejo, A. R., & Neher, E. (1997). Ultrastructural organization of bovine chromaffin cell cortex – Analysis by cryofixation and morphometry of aspects pertinent to exocytosis. *The Journal of Cell Biology*, 139(7), 1709-1717.
- Pollard, H. B., Stopak, S. S., Pazoles, C. J., & Creutz, C. E. (1979). A simplified, one-step method for radiometric analysis of phenylethanolamine-N-methyltransferase in adrenal chromaffin cells. *Analytical biochemistry*, 99(2), 281-282.
- Pothos, E. N., Larsen, K. E., Krantz, D. E., Liu, Y., Haycock, J. W., Seltlik, W., Gershon, M. D., Edwards, R. H., Sulzer, D. (2000). Synaptic vesicle transporter expression regulates vesicle phenotype and quantal size. *The Journal of neuroscience*, 20(19), 7297-7306.
- Potter, D. E., Barnett, J. W., & Woodson, L. C. (1978). Catecholamine-induced changes in plasma glucose, glucagon and insulin in rabbits: effects of somatostatin. *Hormone and metabolic research*, 10(5), 373-377.

Potter, D. E., Wilson, L. M., & Ellis, S. (1977). Changes in plasma glucose and insulin levels induced by adrenergic agents in normal and alloxan-diabetic rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 154(3), 337-340.

Przywara, D. A., Guo, X., Angelilli, M. L., Wakade, T. D., & Wakade, A. R. (1996). A non-cholinergic transmitter, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, utilizes a novel mechanism to evoke catecholamine secretion in rat adrenal chromaffin cells. *The Journal of biological chemistry*, 271(18), 10545-10550.

Pugazhenthii, U., Velmurugan, K., Tran, A., Mahaffey, G., & Pugazhenthii, S. (2010). Anti-inflammatory action of exendin-4 in human islets is enhanced by phosphodiesterase inhibitors: potential therapeutic benefits in diabetic patients. *Diabetologia*, 53(11), 2357-2368.

Rall, T. W., & Sutherland, E. W. (1959). Action of epinephrine and norepinephrine in broken cell preparations. *Pharmacological reviews*, 11(2), 464-465.

Renström, E., Eliasson, L., & Rorsman, P. (1997). Protein kinase A-dependent and -independent stimulation of exocytosis by cAMP in mouse pancreatic β -cells. *The Journal of physiology*, 502(1), 105-118.

Rettig, J., & Neher, E. (2002). Emerging roles of presynaptic proteins in Ca^{2+} -triggered exocytosis. *Science*, 298(5594), 781-785.

Risinger, C., & Bennett, M. K. (1999). Differential phosphorylation of syntaxin and synaptosome-associated protein of 25 KDa (SNAP-25) isoforms. *Journal of neurochemistry*, 72(2), 614-24.

Roth, D., & Burgoyne, R. D. (1994). SNAP-25 is present in a SNARE complex in adrenal chromaffin cells. *FEBS letters*, 351(2), 207-210.

Ruiz-Grande, C., Alarcón, C., Alcántara, A., Castilla, C., López Novoa, J. M., Villanueva-Peñacarrillo, M. L., Valverde, I. (1993). Renal catabolism of truncated glucagón-like peptide 1. *Hormone and metabolic research*, 25(12), 612-616.

Sakaba, T. & Neher, E. (2001). Preferential potentiation of fast-releasing synaptic vesicles by cAMP at the calyx of Held. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(1), 331-336.

Schaub, J. R., Lu, X., Doneske, B., Shin, Y. K., & McNew, J. A. (2006). Hemifusion arrest by complexin is relieved by Ca²⁺-synaptotagmin I. *Nature structural & molecular biology*, *13*(8), 748-750.

Schmidt, M., Dekker, F. J., & Maarsingh, H. (2013). Exchange protein directly activated by cAMP (epac): a multidomain cAMP mediator in the regulation of diverse biological functions. *Pharmacological reviews*, *65*(2), 670-709.

Segura, F., Brioso, M. A., Gomez, J. F., Machado, J. D., & Borges, R. (2000). Automatic analysis for amperometrical recordings of exocytosis. *Journal of neuroscience methods*, *103*(2), 151-156.

Seino, S., & Shibasaki, T. (2005). PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiological reviews*, *85*(4), 1303-1342.

Serezani, C. H., Ballinger, M. N., Aronoff, D. M., & Peters-Golden, M. (2008). Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, *39*(2), 127-132.

Söllner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H., & Rothman, J. E. (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*, *75*(3), 409-418.

Sørensen, J. B. (2004). Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflügers Archiv*, *448*(4), 347-362.

Sørensen, J. B., Nagy, G., Varoqueaux, F., Nehring, R. B., Brose, N., Wilson, M. C., & Neher, E. (2003). Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23. *Cell*, *114*(1), 75-86.

Sørensen, J. B., Wiederhold, K., Müller, E. M., Milosevic, I., Nagy, G., de Groot, B. L., Grubmüller, H., & Fasshauer, D. (2006). Sequential N-to C-terminal SNARE complex

assembly drives priming and fusion of secretory vesicles. *The EMBO journal*, 25(5), 955-966.

Stevens, D. R., Schirra, C., Becherer, U., & Rettig, J. (2011). Vesicle pools: lessons from adrenal chromaffin cells. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 3(2), doi: 10.3389/fnsyn.2011.00002.

Steyer, J. A., & Almers, W. (2001). A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(4), 268-275.

Südhof, T. C., & Rizo, J. (2011). Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(12), a005637.

Südhof, T. C., & Rothman, J. E. (2009). Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science*, 323(5913), 474-477.

Sutherland, E. W., Rall, T. W., & Menon. T. (1962). Adenyl cyclase. I. Distribution, preparation and properties. *The Journal of biological chemistry*, 237(4), 1220-1227.

Syme, C. A., Zhang, L., & Bisello, A. (2006). Caveolin-1 regulates cellular trafficking and function of the glucagon-like Peptide-1 receptor. *Molecular endocrinology*, 20(12), 3400-3411.

Szappanos, H. C., Muralidharan, P., Ingley, E., Petereit, J., Millar, A. H., & Hool, L. C. (2017). Identification of a novel cAMP dependent protein kinase A phosphorylation site on the human cardiac calcium channel. *Scientific reports*, 8(1), doi:10.1038/s41598-017-15087-0.

Tabares, L., Alés, E., Lindau, M., & Álvarez de Toledo, G. (2001). Exocytosis of catecholamine (CA)-containing and CA-free granules in chromaffin cells. *The Journal of biological chemistry*, 276(43), 39974-39979.

Takahashi, H., Shahin, V., Henderson, R. M., Takeyasu, K., & Edwardson, J. M. (2010). Interaction of synaptotagmin with lipid bilayers, analyzed by single-molecule force spectroscopy. *Biophysical journal*, 99(8), 2550-2558.

- Taraska, J. W., Perrais, D., Ohara-Imaizumi, M., Nagamatsu, S., & Almers, W. (2003). Secretory granules are recaptured largely intact after stimulated exocytosis in cultured endocrine cells. *Proceedings of the National Academy of Science*, *100*(4), 2070-2075.
- Thorens, B. (1992). Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(18), 8641-8645.
- Tian, J. H., Wu, Z. X., Unzicker, M., Lu, L., Cai, Q., Li, C., Schirra, C., Matti, U., Stevens, D., Deng, C., Rettig, J., & Shang, Z. H. (2005). The role of Snapin in neurosecretion: snapin knock-out mice exhibit impaired calcium-dependent exocytosis of large dense-core vesicles in chromaffin cells. *The Journal of neuroscience*, *25*(45), 10546-10555.
- Tillinger, A., Sollas, A., Serova, L. I., Kvetnansky, R., & Sabban, E. L. (2010). Vesicular monoamine transporters (VMATs) in adrenal chromaffin cells: stress-triggered induction of VMAT2 and expression in epinephrine synthesizing cells. *Cellular and molecular neurobiology*, *30*(8), 1459-1465.
- Tomé, Â. R., Castro, E., Santos, R. M., & Rosário, L. M. (2007). Functional distribution of Ca²⁺-coupled P2 purinergic receptors among adrenergic and noradrenergic bovine adrenal chromaffin cells. *BMC neuroscience*, *8*(1), 39.
- Toonen, R. F., & Verhage, M. (2007). Munc 18-1 in secretion: lonely Munc joins SNARE team and takes control. *Trends in neuroscience*, *30*(11), 564-572.
- Tooze, S. A., & Huttner, W. B. Cell-free protein sorting to the regulated and constitutive secretory pathways. *Cell*, *60*(5), 837-847.
- Toth, M., Ziegler, M., Sun, P., Gresack, J., & Risbrough, V. (2013). Impaired conditioned fear response and startle reactivity in epinephrine-deficient mice. *Behavioural pharmacology*, *24*(1), 1-9.
- Tsuboi, T., Kitaguchi, T., Karasawa, S., Fukuda, M., & Miyawaki, A. (2010). Age-dependent preferential dense-core vesicle exocytosis in neuroendocrine cells

revealed by newly developed monomeric fluorescent timer protein. *Molecular biology of the cell*, 21(1), 87-94.

Ussher, J. R., & Drucker, D. J. (2012). Cardiovascular biology of the incretin system. *Endocrine reviews*, 33(2), 187-215.

Verberne, A. J., Korim, W. S., Sabetghadam, A., & Llewellyn-Smith, I. J. (2016). Adrenaline: insights into its metabolic roles in hypoglycaemia and diabetes. *British journal of pharmacology*, 173(9), 1425-1437.

Vitale, M. L., Seward, E. P., & Trifaro, J. M. (1995). Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron*, 14(2), 353-363.

Viveros, O. H., Diliberto Jr, E. J., Hazum, E., & Chang, K. J. (1979). Enkephalins as possible adrenomedullary hormones: storage, secretion, and regulation of synthesis. *Advances in biochemical psychopharmacology*, 22, 191-204.

Voets, T. (2000). Dissection of three Ca²⁺-dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron*, 28(2), 537-545.

Voets, T., Neher, E., & Moser, T. (1999). Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron*, 23(3), 607-615.

Vollmer, R. R., Baruchin, A., Kolibal-Pegher, S. S., Corey, S.P., Stricker, E. M., & Kaplan, B. B. (1992). Selective activation of norepinephrine- and epinephrine-secreting chromaffin cells in rat adrenal medulla. *The American journal of physiology*, 263(3 Pt 2), 716-721.

Von Grafenstein, H., & Knight, D. E. (1992). Membrane recapture and early triggered secretion from the newly formed endocytotic compartment in bovine chromaffin cells. *The Journal of physiology*. 453, 15-31.

Walter, A. M., Pinheiro, P. S., Verhage, M., & Sørensen, J. B. (2013). A sequential vesicle pool model with a single release sensor and a Ca²⁺-dependent priming

catalyst effectively explains Ca^{2+} -dependent properties of neurosecretion. *PLoS Computational Biology*, 9(12), e1003362. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003362.

Wang, P., Liu, Z., Chen, H., Ye, N., Cheng, X., & Zhou, J. (2017). Exchange proteins directly activated by cAMP (EPACs): Emerging therapeutic targets. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 27(8), 1633-1639.

Wang, Y., Perfetti, R., Greig, N. H., Holloway, H. W., DeOre, K. A., Montrose-Rafizadeh, C., Elahi, D., & Egan, J. M. (1997). Glucagon-like peptide-1 can reverse the age-related decline in glucose tolerance in rats. *The Journal of clinical investigation*, 99(12), 2883-2889.

Washbourne, P., Thompsom, P. M., Carta, M., Costa, E. T., Mathews, J. R., Lopez-Benditó, G., Molnár, Z., Becher, M. W, Valenzuela, C. F., Partridge, L. D., & Wilson, M. C. (2002). Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis. *Nature neuroscience*, 5(1), 19-26.

Waymire, J. C., Weiner, N., & Prasad, K. N. (1972). Regulation of tyrosine hydroxylase activity in cultured mouse neuroblastoma cells: elevation induced by analogs of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(8), 2241-2245.

Wightman, R. M., Jankowski, J. A., Kennedy, R. T., Kawagoe, K. T., Schroeder, T. J., Leszczyszyn, D. J., Near, J. A., Diliberto, E. J., & Viveros, O. H. (1991). Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(23), 10754-10758.

Winkler, H. (1993). The adrenal chromaffin granule: a model for large dense core vesicles of endocrine and nervous tissue. *Journal of anatomy*, 183(Pt 2), 237.

Winkler, H., & Westhead, E. (1980). Th molecular organization of adrenal chromaffin granules. *Neuroscience*, 5(11), 1803-1823.

Wu, J., & Lukas, R. J. (2011). Naturally-expressed nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Biochemical pharmacology*. 82(8), 800-807.

Xia, J., Varudkar, N., Baker, C. N., Abukenda, I., Martinez, C., Natarajan, A., Grinberg, A., Pfeifer, K., & Ebert, S. N. (2013). Targeting of the enhanced green fluorescent protein reporter to adrenergic cells in mice. *Molecular biotechnology*, 54(2), 350-360.

Yavuz, H., Kattan, I., Hernández, J. M., Hofnagel, O., Witkowska, A., Raunser, S., Walla, P., J., & Jahn, R. (2018). Arrest of *trans*-SNARE zippering uncovers loosely and tightly docked intermediates in membrane fusion. *Journal of Biological Chemistry*, 293(22), 8645-8655.

Yoo, S. H., You, S. H., & Huh, Y. H. (2005). Presence of syntaxin 1A in secretory granules of chromaffin cells and interaction with chromogranins A and B. *Federation of European Biochemical Societies*, 579(1), 222-228.

Yoshimatsu, H., Oomura, Y., Katafuchi, T., Niijima, A. (1987). Effects of hypothalamic stimulation and lesion on adrenal nerve activity. *The American journal of physiology*, 253(3 Pt 2), R418-424.

Young, A. A., Gedulín, B. R., Bhavsar, S., Bodkin, N., Jodka, C., Hansen, B., & Denaro, M. (1999). Glucose-lowering and insulin-sensitizing actions of exendin-4: studies in obese diabetic (ob/ob, db/db) mice, diabetic fatty Zucker rats, and diabetic rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Diabetes*, 48(5), 1026-1034.

Zhang, C. L., Katoh, M., Shibasaki, T., Minami, K., Sunaga, Y., Takahashi, H., Yokoi, N., Iwasaki, M., Miki, T., & Seino, S. (2009). The cAMP sensor Epac2 is a direct target of antidiabetic sulfonylurea drugs. *Science*, 325(5940), 607-610.

Zhou, Q., Lai, Y., Bacaj, T., Zhao, M., Lyubimov, A. Y., Uervirojnangkoorn, M., Zeldin, O. B., Brewster, A. S., Sauter, N. K., Cohen, A. E., Soltis, S. M., Alonso-Mori, R., Chollet, M., Lemke, H. T., Pfuetzner, R. A., Choi, U. B., Weis, W. I., Diao, J., Südhof, T. C., & Brunger, A. T. (2015). Architecture of the synaptotagmin-SNARE machinery for neural exocytosis. *Nature*, 525(7567), 62-67.