

Curso 2009/10  
**CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/22**  
I.S.B.N.: 978-84-7756-966-4

**M<sup>a</sup>. JÉSICA DÍAZ VERA**

**Papel funcional de la matriz  
intravesicular en la exocitosis**

**Directores**

**RICARDO BORGES JURADO  
JOSÉ DAVID MACHADO PONCE**



**SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS**  
**Serie Tesis Doctorales**

*A mis padres y hermanos*

*A mis abuelos*

*A Juan Ramón*

## **Agradecimientos**

Agradezco en especial a mis directores de tesis, los Dres. Ricardo Borges Jurado y José David Machado Ponce, la oportunidad que me han brindado de realizar este trabajo. Gracias por las enseñanzas, el apoyo, el respeto y el cariño mostrado durante estos años.

Además quiero transmitir mi agradecimiento a: los Dres. Daniel T. O'Connor y Sushil K. Mahata por cedernos la cepa de ratones sin cromogranina A, y a los Dres. Federico Calegari y Wieland B. Huttner por la cepa de ratones sin cromogranina B. A los Dres. Marcial Camacho Pérez y Mónica Suárez Montesinos por su colaboración en los experimentos de *western-blot*, amperometría y electroquímica intracelular. A los Dres. José Francisco Gómez González y Yézer González Morales por los programas de adquisición y análisis. A los Dres. Agustín Castañeyra Perdomo y Emilia Carmona Calero por su colaboración en los experimentos de inmunohistoquímica. Al Dr. Juan Ramón Hernández Fernaud por su colaboración en los experimentos de proteómica. Al Dr. Rafael Luján Miras por la elaboración de las imágenes de microscopía electrónica. Al Dr. Reiner Fischer-Colbrie por los experimentos de radioinmunoensayo de secretogranina II. A los profesores del departamento, por su ayuda, sus consejos y la discusión científica de este trabajo. Y por último, al personal del estabulario de la Universidad de La Laguna por el mantenimiento de los animales.

También quiero agradecer a todos mis compañeros, la ayuda, el apoyo, la alegría y la amistad que me han regalado.

Finalmente, quiero recordar a mi familia, mis amigos y mi novio, por apoyarme en los momentos malos y compartir conmigo los buenos.

Gracias a todos.

***“Mantén tu cerebro ilusionado, activo, hazlo funcionar y nunca se degenerará”***

Rita Levi-Montalcini



### Publicaciones:

1. Borges, R., Delgado, G. y **Díaz, J.** (2004) "*New Insights about the Functional Role of Chromogranins in the Latest Steps of Exocytosis*" Current Medicinal Chemistry, 4.
2. Borges, R., **Díaz, J.**, Camacho, M. y Machado, J.D. (2005) "*A simple way to build a grinder for carbon-fibre electrodes for amperometry or voltammetry*" Pflugers Arch, 450, 280-282.
3. Carabelli, V., Marcantoni, A., Comunanza, V., de Luca, A., **Díaz, J.**, Borges, R. y Carbone, E. (2007) "*Chronic hypoxia up-regulates  $\alpha 1H$  T-type channels y low-threshold catecholamine secretion in rat chromaffin cells*". J Physiology. Vol. 584, pp. 149-165.
4. Montesinos, M.S., Machado, J.D., Camacho, M., **Díaz, J.**, Morales, Y.G., Alvarez de la Rosa, D., Carmona, E., Castañeyra, A., Viveros, O.H., O'Connor, D.T., Mahata, S.K. y Borges, R. (2008) "*The crucial role of chromogranins in storage y exocytosis revealed using chromaffin cells from chromogranin A null mouse*". J Neuroscience, 28, 3350-3358.
5. **Díaz-Vera, J.**, G. Morales, Y., Hernández-Fernaud, J.R., Camacho, M., Montesinos, M.S., Calegari, F., Huttner, W.B., Borges, R. y Machado, J.D. (2010) "*Chromogranin B gene ablation reduces the catecholamine cargo y decelerates exocytosis in chromaffin secretory vesicles*". J Neuroscience (en prensa).
6. **Jésica Díaz-Vera**, Marcial Camacho, J. David Machado, Mónica S. Montesinos, Juan R. Hernández-Fernaud, Rafael Luján y Ricardo Borges. "*Chromogranins are key proteins in amine accumulation but not secretory vesicle genesis*" (2010) PNAS (en revisión).
7. Ricardo Borges, **Jésica Díaz-Vera**, Natalia Domínguez y José D. Machado (2010). "*Chromogranins as regulators of exocytosis*" (revisión para el Journal of Neurochemistry en elaboración).

### Capítulos de libro:

Montesinos, M.S., Camacho, M., **Díaz, J.** y Borges, R. (2004) "*Quantal release of catecholamines. A new target for  $\beta$ -adrenergic antagonists*" In Hernando, I.T. (ed.), In Cell Biology of the Chromaffin Cell", Madrid, pp.23-28.

# ***Índice***

## Índice

<b>Abreviaturas y símbolos</b>	VII
<b>Introducción</b>	1
1. El estudio de la exocitosis.	3
2. La célula cromafín.	7
2.1. Características generales.	7
2.2. Función.	9
2.3. Metabolismo de las catecolaminas.	10
2.3.1. Síntesis de las catecolaminas.	10
2.3.2. Almacenamiento de las catecolaminas.	12
2.3.3. Degradación de las catecolaminas.	13
3. El gránulo cromafín.	14
3.1. Características de los gránulos cromafines.	14
3.2. Granulogénesis.	16
3.3. Maduración de los gránulos cromafines.	18
3.4. Exocitosis.	19
3.5. Regulación de la exocitosis.	24
4. La matriz intragranular.	26
4.1. Características generales de la matriz.	26
4.2. Las graninas.	27
4.2.1. Características generales.	27
4.2.2. La cromogranina A.	30
4.2.3. La cromogranina B.	32
4.2.4. La secretogranina II ó cromogranina C.	35
4.2.5. Las otras graninas.	36
4.2.6. La matriz y la exocitosis.	37
<b>Objetivos</b>	39
<b>Material y métodos</b>	43
5. Obtención de las líneas de ratones carentes de CgA y/o CgB.	45

6.	Caracterización de las líneas de ratones knock-out.	48
6.1.	Genotipado.	48
6.1.1.	Extracción ADN genómico.	48
6.1.2.	Reacción en cadena de la polimerasa.	50
6.1.2.1.	Amplificación del gen chga.	50
6.1.2.2.	Amplificación del gen chgb.	52
6.2.	Inmunohistoquímica.	53
6.3.	Western-blot.	53
6.3.1.	Obtención de la muestra.	53
6.3.2.	Separación de proteínas por SDS-PAGE	54
6.3.3.	Transferencia a membrana, visualización y análisis.	55
7.	Seguimiento del peso de la cepa CgA/B-KO.	57
8.	Obtención y aislamiento de células y orgánulos subcelulares.	57
8.1.	Cultivo primario de células cromafines de ratón.	57
8.2.	Obtención, aislamiento y purificación de gránulos cromafines murinos.	59
9.	Elaboración de los electrodos de carbono.	62
9.1.	Fabricación.	62
9.2.	Calibración.	63
9.3.	Fabricación de pipetas para la administración de sustancias.	64
10.	Amperometría	65
10.1.	Detección amperométrica de la exocitosis.	65
10.2.	Análisis de los datos amperométricos.	66
10.3.	Parámetros cinéticos de las espigas.	66
10.4.	Criterios de selección de espigas.	68
10.5.	Análisis estadístico de las señales amperométricas.	69
11.	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y detección electroquímica de catecolaminas.	69
12.	Detección electroquímica intracelular.	71
12.1.	Procedimiento.	71
12.2.	Elaboración del detector.	72
12.3.	Adquisición de los datos.	73
12.4.	Análisis de los datos.	74

12.5. Análisis estadístico.	74
13. Capacidad de membrana en configuración de célula entera o "whole-cell".	75
14. Proteómica.	76
14.1. Tratamiento de la muestra.	76
14.1.1. Captura de la imagen y análisis.	77
14.1.2. MALDI-TOF-MS	78
15. Microscopía electrónica.	79
<b>Resultados</b>	<b>81</b>
16. Las cepas de ratones CgA-KO y CgB-KO carecen de genes funcionales chga y chgb respectivamente.	83
17. Los individuos CgA/B-KO, resultantes del cruce de las cepas CgA-KO y CgB-KO, son viables y fértiles.	84
18. El tejido adrenal de los ratones KO no expresa las cromograninas A y/o B.	85
19. El silenciamiento de la expresión de una cromogranina altera los niveles de expresión de las otras cromograninas.	87
20. Evolución temporal del peso de los ratones CgA/B-KO.	89
21. La cantidad de catecolaminas en la médula adrenal se encuentra alterada.	90
22. La ausencia de cromograninas causa una respuesta secretora menor.	92
23. La frecuencia de las exocitosis sólo se reduce en las células cromafines de los ratones CgA/B-KO.	93
24. La cantidad de catecolaminas liberada por cada vesícula secretora se reduce en las tres cepas de ratones transgénicos.	95
25. La relación entre la concentración de CA que alcanza el electrodo ( $I_{max}$ ) y el contenido en CA de las vesículas secretoras (Q) se encuentra alterada.	97
26. Los gránulos de las células cromafines knock-out han perdido la capacidad de acumular más catecolaminas.	100
27. La relación entre los parámetros $I_{max}$ y Q se pierde por efecto de la incubación con L-DOPA en los ratones knock-out.	102
28. La inducción de la síntesis de catecolaminas produce su acumulación en el citosol ante la imposibilidad de ser incorporadas por los gránulos.	103
29. El aislamiento y la purificación de gránulos cromafines de ratón es factible.	107

30. El análisis del proteoma granular de las cepas de ratones CgB-KO y CgA/B-KO excluye la sobre-expresión de otra granina como mecanismo compensatorio.	111
31. La morfología de los gránulos cromafines en las células adrenomedulares está alterada como consecuencia de la ausencia de CgA y CgB.	118
<b>Discusión</b>	121
32. La ausencia de las cromograninas A y B se relaciona con desórdenes metabólicos.	123
33. La granulogénesis sin cromograninas.	125
34. El manejo de las catecolaminas en las células cromafines de los ratones knock-out.	129
35. La exocitosis sin cromograninas. ¿Son funcionales los gránulos secretores?	130
36. ¿Es funcional la matriz sin CgA ni CgB?	132
36.1. El proceso de concentración de catecolaminas en el interior de los gránulos cromafines de los ratones knock-out.	133
36.2. Liberación de CA durante la exocitosis de las vesículas secretoras de los ratones knock-out.	134
37. ¿Qué otra proteína podría sustituir la CgA y la CgB?	138
<b>Conclusiones</b>	141
<b>Bibliografía</b>	145

### Abreviaturas y símbolos.

A	Adrenalina.
ADN	Ácido desoxiribonucleico.
AMPc	Adenosina-3',5'-monofosfato.
APS	Persulfato amónico.
ATP	Trifosfato de adenosina.
CA	Catecolamina/s.
CgA	Cromogranina A.
CgA/B-KO ó CgA/B <sup>-/-</sup>	<i>Knock-out</i> de la cromogranina A y la cromogranina B.
CgA-KO ó CgA <sup>-/-</sup>	<i>Knock-out</i> de la cromogranina A.
CgB	Cromogranina B.
CgB-KO ó CgB <sup>-/-</sup>	<i>Knock-out</i> de la cromogranina B.
CHCA	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico.
COMT	Catecol-O-metil transferasa.
COX1	Citocromo-C oxidasa.
CV	Vesículas cromafines.
DA	Dopamina.
dATP	Deoxinucleótido trifosfatos de adenosina.
dCTP	Deoxinucleótido trifosfato de citidina.
dGTP	Deoxinucleótido trifosfato de guanidina.
DHBA	3-4 dihidroxibencilamina.
DHPR	Dihidropteridina reductasa.
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfatos.
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético.
DOPEG	3-metoxi-4-hidroxi-fenilglicol.
DTT	Ditiotreitol.
dTTP	Deoxinucleótido trifosfato de timidina.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
ES	Células madres embrionarias ( <i>stem cells</i> ).
Ft <sub>1</sub>	Constante de caída 1. Tiempo transcurrido hasta que la señal se ha reducido hasta el 63,2% ( $1 - 1/e$ ) del valor de amplitud máxima de la espiga ( $I_{max}$ ) expresado en ms.

Ft <sub>2</sub>	Constante de caída 2. Tiempo transcurrido hasta que la señal se ha reducido hasta el 36,8% (1/e) del valor de amplitud máxima (Imax) expresado en ms.
H2B	Dihidrobiopterina.
H4B	Tetrahidrobiopterina.
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfónico.
HSV-TK	Gen de la quinasa del virus del herpes simplex.
HVA	Ácido homovanílico.
IEF	Isoelectroenfoque.
Imax	Amplitud máxima de corriente. Indica la concentración máxima alcanzada en la superficie del electrodo expresada en pA.
LDCV	Vesículas grandes de núcleo denso (Large dense core vesicles).
L-DOPA	L-dihidroxifenilalanina.
m	Pendiente media entre el 25 y 75% del valor máximo de amplitud de la espiga expresado en nA/s.
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a un detector de iones tiempo de vuelo.
MAO	Monoamino oxidasa.
MS	Espectrometría de masas.
MHPG	3-metoxi-4-hidroxifenilglicol.
n	Número de individuos.
NA	Noradrenalina.
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information.</i>
NeoR	Gen de resistencia al antibiótico neomicina.
NSF	Proteína de fusión sensible a N-etilmaleimida.
PC12	Línea celular de feocromocitoma de rata.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ).
pl	Punto isoeléctrico.
PKA	Proteína quinasa A.
PM	Peso molecular.
Q	Contenido de CA oxidadas proveniente de una vesícula expresado en pC.



SD	Desviación estándar.
SDS	Dodecilsulfato sódico.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamina en presencia de SDS ( <i>Sodium dodecil sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis</i> ).
SGC	Célula cromafín de gránulos pequeños.
SgII	Secretogranina II.
SgIII	Secretogranina III.
SNAP-25	Proteína asociada a sinaptosomas de 25 KDa ( <i>Synaptosome-associated protein of 25 KDa</i> ).
SNARE/SNAREs	<i>Soluble NSF attachment protein receptor</i> .
SNC	Sistema nervioso central.
$t_{1/2}$	Ancho de la espiga a la mitad de la amplitud máxima expresada en ms.
Temed	N, N, N',N'-Tetrametiletilendiamina.
TH	Tirosina hidroxilasa.
tp	Tiempo necesario en alcanzar la amplitud máxima de la espiga expresado en ms.
VAMP	Proteína de membrana asociada a la vesícula ( <i>vesicle-associated membrane protein</i> ).
V-ATPasa	Bomba de protones de tipo vacuolar dependiente de ATP
VMA	Ácido vanil mandélico.
VMAT	Transportador específico de monoaminas ( <i>vesicular monoamine transporter</i> ).
WT	Fenotipo control o "salvaje" ( <i>wild type</i> )

# ***Introducción***

## **1. El estudio de la exocitosis.**

El término exocitosis, como indica su raíz latina (Εξω-externo y κύτος-contenedor), es el proceso por el cual las células liberan las moléculas contenidas en sus vesículas secretoras al exterior. Este proceso es esencial para la célula y es el mecanismo por el cual se establece un sistema de comunicación intercelular en organismos pluricelulares. La fusión de vesículas secretoras es un proceso universal y ocurre de manera constitutiva en todas las células. Su objetivo es doble, por un lado reemplazar los componentes de la membrana plasmática y, por otro, secretar moléculas extracelulares de gran importancia como proteínas del plasma, anticuerpos, componentes de la matriz extracelular, etc. Además, en determinados tipos celulares, se da otra vía de exocitosis que está regulada y que consiste en la liberación controlada del contenido de determinadas vesículas o la inserción de nuevos componentes de la membrana. Esto ocurre sólo en respuesta a una señal fisiológica como diferencia con la secreción constitutiva.

El descubrimiento por Henry Dale de que la acetilcolina actúa como molécula mensajera entre el nervio motor y la fibra muscular (Dale et al., 1936), dio pie a que Bernard Katz y sus colaboradores en los años 50 propusieran que la liberación de este neurotransmisor debía darse de manera discreta o en forma de “cuantas” en la placa motora (Del Castillo and Katz, 1954; Fatt and Katz, 1952). Este hecho se vio apoyado por las evidencias bioquímicas que apuntaban al almacenamiento de catecolaminas (CA) en un orgánulo subcelular (Blaschko and Welch, 1953; Hillarp et al., 1953) y las morfológicas que mostraban por primera vez la apariencia de este nuevo orgánulo; la vesícula secretora (Coupland, 1965; Lever, 1955). La evidencia visual más convincente de cómo el contenido era liberado por la fusión de la membrana granular con la membrana plasmática fue dada en 1965 por R.E. Coupland con la microscopía electrónica (Coupland, 1965). Pero esta propuesta no sería aceptada

## Introducción

---

hasta que de nuevo los bioquímicos aportaron evidencias de que el mecanismo requería la fusión de las vesículas con la membrana plasmática; por medio de anticuerpos, fueron capaces de detectar proteínas intragranulares en el perfundido de glándulas adrenales bovinas tras su estimulación (Banks and Helle, 1965). Al mismo tiempo, las proporciones en las que se encontraban las CA, el ATP y dichas proteínas eran las esperadas de una liberación de este tipo (Kirshner et al., 1967).

Los abordajes experimentales para estudiar este fenómeno fueron diversos. En el caso de los tejidos simpáticos, se desarrollaron técnicas que permitieron estudiar la liberación de CA tanto, a partir del órgano, como en poblaciones celulares. Así se desarrollaron métodos de medición de tipo biológico de CA (Douglas and Rubin, 1961b), fluorimétricas (Anton and Sayre, 1962) y métodos de detección electroquímica (Borges et al., 1986; Green and Perlman, 1981; Herrera et al., 1985). Aún aportando un conocimiento valioso acerca del proceso de la exocitosis, todas estas aproximaciones fueron de tipo indirecto.

Paralelamente a la discusión anteriormente expuesta acerca de si el mecanismo de liberación implicaba o no la fusión de las vesículas con la membrana, se trató de averiguar cuáles eran los elementos que participaban en el proceso de la liberación. En 1961 William W. Douglas acuñó la expresión acoplamiento estímulo-secreción como fuente de la secreción de neurotransmisor y hormonas, y propuso el  $\text{Ca}^{2+}$  como agente de acoplamiento entre estos dos procesos (Douglas and Rubin, 1961a).

Haciendo uso de técnicas que permiten permeabilizar la membrana plasmática por medio de descargas eléctricas, fue posible modificar la composición del interior celular (Baker and Knight, 1978). Se demostró de forma definitiva la función del  $\text{Ca}^{2+}$  y se propuso la intervención de los nucleótidos de adenina en el proceso de la exocitosis (Baker and Knight, 1979; Knight and Baker, 1982). Se obtuvo los mismos resultados con un abordaje similar; la incubación de las células con digitonina (Dunn and

Holz, 1983; Wilson and Kirshner, 1983), saponina (Brooks and Carmichael, 1987) o  $\alpha$ -toxina (Bader et al., 1986). El uso de las células permeabilizadas sirvió también para comprender el papel de distintas proteínas quinasas: C, A y G (Burgoyne and Handel, 1994; Knight and Baker, 1983).

Otros dos avances importantes en el estudio del fenómeno de la exocitosis fueron, por un lado, la aparición de las sondas fluorescentes, con las que pudo hacerse un seguimiento de los cambios en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular tras la estimulación (Tsien et al., 1982); y por otro lado, de las técnicas de “patch-clamp”, que posibilitaron la medida de la conductancia al paso de los iones ó/y del área de la membrana plasmática tras las fusiones (Hamill et al., 1981; Neher and Marty, 1982). La aparición de las técnicas de “patch-clamp” abrió la posibilidad de modificar de una forma mucho más controlada el medio intracelular. En sus diferentes configuraciones se pudo medir con alta resolución la conductancia de un único canal, la conductancia de la membrana plasmática completa ó la cantidad de vesículas que se fusionaban tras un determinado estímulo. Dado que se puede tratar la membrana celular como a un condensador cada incorporación de una vesícula se puede detectar (Neher, 1988).

El desarrollo de la amperometría y su aplicación para estudios en célula única, a principios de los años 90, supuso un nuevo impulso en el conocimiento de la exocitosis y sus desencadenantes. La amperometría consiste en la detección electroquímica del contenido de las vesículas secretoras y permite medir directamente las CA liberadas por la célula (Leszczyszyn et al., 1990; Wightman et al., 1991). Se abrió entonces la posibilidad de estudiar un nuevo punto en la regulación de este proceso que comprende los últimos pasos de la exocitosis, es decir, la forma en la que el contenido de la vesícula es liberado (Borges et al., 2002).

En esta década, la atención se centró en identificar la larga lista de proteínas que conforman la maquinaria proteica responsable de la

## *Introducción*

---

exocitosis, denominadas en conjunto complejo SNARE. Las proteínas que se fueron asociando a este proceso estaban involucradas en su regulación o en el mantenimiento de las condiciones idóneas para que éste tenga lugar. Además, se pudo establecer sus distintas fases y su grado de dependencia del  $\text{Ca}^{2+}$  y el ATP (Calakos and Scheller, 1996; Sudhof, 1995). Se estableció que dichas etapas debían comprender la interacción y coordinación de estructuras moleculares en diferentes estados de asociación, el movimiento de vesículas hacia la zona activa, el ataque de las vesículas en las zonas de liberación y, por último, ensamblaje de la maquinaria secretora de fusión (Burgoyne and Morgan, 1998a). Las proteínas implicadas en este proceso y la forma en que éstas interaccionan para vencer las fuerzas de repulsión han sido objeto de estudio estos últimos años (Jahn et al., 2003; Weimer and Jorgensen, 2003). Este conocimiento ha sido utilizado para la elaboración de modelos de interacción temporal de las proteínas de la maquinaria, con los que podría predecirse el resultado de cualquier manipulación de éstas (Mezer et al., 2004).

Paralelamente se fue profundizado en los últimos pasos del proceso de la exocitosis y se llegó a describir diversos mecanismos que pueden modificar la cantidad de contenido liberado y la cinética que sigue esa liberación (Machado et al., 2001; Machado et al., 2000).

El estudio de las últimas etapas de la exocitosis, tanto en células cromafines como en neuronas dopaminérgicas, ha desvelado nuevas formas en las que puede darse la fusión en función de la duración del poro; fusión completa o transitoria (Albillos et al., 1997; Fesce et al., 1994; Staal et al., 2004). La aparición de nuevas técnicas de alto poder resolutivo como la amperometría en parche o “patch-amperometry” (Albillos et al., 1997) ha permitido el estudio de los tipos de fusión, las propiedades del poro de fusión y su regulación (Berberian et al., 2009; Neco et al., 2008; Tabares et al., 2003). Esta técnica electrofisiológica combina la medida simultánea de la conductancia del poro y el tamaño de

las vesículas (capacidad en parche de membrana), con la medida de su contenido y cómo éste es liberado (amperometría).

En los últimos años se ha logrado elaborar un modelo de vesícula secretora basándolo en los datos aportados por nuevas técnicas bioquímicas. Así, se ha podido desvelar la composición proteica de los gránulos cromafines bovinos (Wegrzyn et al., 2007) y las vesículas sinápticas (Takamori et al., 2006). Además, se ha identificado proteínas tan importantes como el transportador responsable del movimiento de nucleótidos en las vesículas secretoras (Sawada et al., 2008). También se ha profundizado en la función del citoesqueleto durante la fusión vesicular, proponiendo la actuación de las miosinas II y V como motores moleculares de la exocitosis (Berberian et al., 2009; Neco et al., 2008; Trifaro et al., 2008).

Actualmente se sigue estudiando aspectos del proceso de la exocitosis que permanecen en discusión tales como: la participación de las proteínas del complejo SNARE y otras proteínas implicadas (Sudhof and Rothman, 2009), la participación de la composición lipídica de la membrana (Darios et al., 2009b; Tajparast and Glavinovic, 2009), la existencia de zonas “calientes” de exocitosis (Monck et al., 1995; Schroeder et al., 1994), la procedencia del  $Ca^{2+}$  que da lugar al movimiento de las vesículas y posterior fusión (Camacho et al., 2008; Garcia et al., 2006; Santodomingo et al., 2008) y, por último, la participación de la matriz intravesicular en la liberación de neurotransmisores (Borges et al., 2004; Díaz-Vera et al., 2010; Montesinos et al., 2008; Reigada et al., 2003; Tabares et al., 2003).

## **2. La célula cromafín.**

### **2.1. Características generales.**

Las células cromafines son células neuroendocrinas excitables y al igual que las neuronas simpáticas derivan de la cresta neural. Aunque

## Introducción

---

recientemente se ha descubierto que el momento del desarrollo en el que los dos linajes se separan es más temprano, por lo que no es correcto agruparlas en un “linaje simpato-adrenal” (Huber, 2006). Sin embargo, durante los últimos 40 años se ha podido comprender los mecanismos moleculares desencadenantes de la exocitosis gracias a su estudio. La posibilidad de aislar, mantener y manipular fácilmente las células en cultivo (Livett, 1984) hace que se les considere un modelo apropiado para el estudio del proceso de acoplamiento excitación secreción.

Dado que el proceso de la exocitosis es común a otras muchas estirpes celulares, su estudio también se ha abordado en células como: las células PC12 (feocromocitoma de rata) (Greene and Tischler, 1976), los mastocitos, las células beta pancreáticas, los lactotrofos, las neuronas serotoninérgicas de Retzius, las plaquetas, los neutrófilos, las neuronas del hipocampo, etc. (Borregaard et al., 1993; Bruns et al., 2000; Cochilla et al., 2000; Chen et al., 2000; Finnegan et al., 1996; Maletic-Savatic and Malinow, 1998). Sin embargo, las células cromafines han sido el modelo celular en el que mayores avances se ha hecho en cuanto a los procesos que comprenden: el movimiento de vesículas hacia zonas especializadas de la membrana plasmática; las corrientes de  $Ca^{2+}$  que disparan la exocitosis regulada; la caracterización estructural y funcional de las proteínas implicadas en el anclaje vesicular; o la regulación de la liberación de neurotransmisores.

Las células cromafines adrenales forman parte de un tejido de naturaleza endocrina que procede de la cresta neural y que se ubica en la zona más interna de la glándula suprarrenal. Estas células se organizan en racimos pericapilares, permitiendo así una respuesta de secreción humoral rápida. El tejido parenquimático adrenal lo forman mayoritariamente dos tipos celulares: las células adrenérgicas, principalmente localizadas en regiones periféricas, y las células noradrenérgicas en zonas centrales de la médula (Diaz-Flores et al., 2008; Livett et al., 1982).

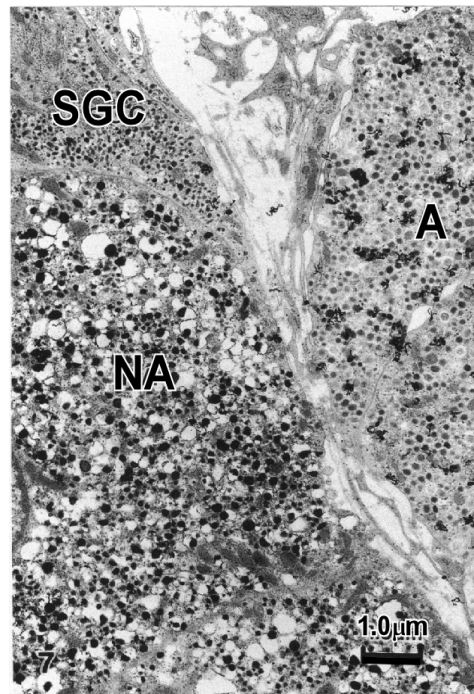


Estas células reciben inervación de fibras preganglionares simpáticas, la mayor parte de ellas procedentes del nervio esplácnico mayor y en menor proporción de los esplácnicos menores y fibras procedentes de los ganglios celíacos lumbares. La mayoría de las fibras son amielínicas, aunque también se pueden observar células de Schwann (Coupland, 1965). La naturaleza química de los nervios esplácnicos es principalmente colinérgica (Yoshizaki, 1974), aunque algunos secretan también encefalina (Pelto-Huikko et al., 1985) y neuropéptidos como la sustancia P (Zhou et al., 1991); la somatostatina y el polipéptido intestinal vasoactivo (Boksa et al., 1982); y el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (Andreis et al., 1995).

## 2.2. Función.

Las células cromafines son integrantes del sistema nervioso simpático y liberan CA en respuesta a un estrés agudo. Su función es, por tanto, la síntesis, almacenamiento y liberación exocitótica a la sangre de adrenalina (A), noradrenalina (NA) y, en menor proporción dopamina. También liberan otras sustancias como péptidos opioides, ATP, cromograninas y sus péptidos derivados.

**Figura 1. Tipos de células cromafines observadas al microscopio electrónico.** NA indica una célula noradrenérgica, A una célula adrenérgica y SGC una célula cromafín de gránulos pequeños. Tomado de Kobayashi et al., 1978 (Kobayashi et al., 1978).



Se ha descrito tres subtipos de células cromafines: las adrenérgicas, las noradrenérgicas y las células cromafines de gránulos pequeños (fig. 1). Estas últimas suponen entre 1,8-4 % del total de las

células cromafines y poseen gránulos cromafines secretores de núcleo denso y pequeñas vesículas sinápticas (Coupland, 1979). Los dos tipos celulares; adrenérgicas y noradrenérgicas, se diferencian en abundancia y en localización en la glándula adrenal. Mientras las cromafines noradrenérgicas se sitúan en el centro de la médula, las adrenérgicas lo hacen preferentemente en las áreas adyacentes al córtex adrenal (Coupland, 1965). Tradicionalmente se consideraba que las células cromafines podían clasificarse en base al tipo de gránulos que poseen, pero se ha descubierto que en ocasiones ambos tipos pueden convivir en la misma célula (Grabner et al., 2005).

### **2.3. Metabolismo de las catecolaminas.**

#### **2.3.1. Síntesis de las catecolaminas.**

Las CA tienen función como hormonas y neurotransmisores. Se ha descrito que en las vesículas cromafines están presentes la adrenalina, la noradrenalina y la dopamina. Químicamente son dihidroxifeniletilaminas y deben su nombre al grupo catecol (3,4-dihidroxifenilo) común a todas ellas. Las CA son sintetizadas por las células cromafines, por las neuronas simpáticas postganglionares y determinados tipos neuronales del sistema nervioso central (Pohorecky and Wurtman, 1971).

La ruta de síntesis de las CA fue propuesta por primera vez por Blaschko (fig. 2) (Blaschko, 1939). La primera enzima participante es la tirosina hidroxilasa (TH), que convierte la tirosina incorporada a partir del plasma en L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Esto lo consigue hidroxilando el anillo fenólico de la L-tirosina. La TH es específica de las células catecolaminérgicas y se encuentra en la fracción libre del citoplasma. Bajo la mayoría de condiciones fisiológicas, esta reacción es el paso limitante de la ruta biosintética (Levitt et al., 1965) dado que la actividad de esta enzima es de 100 a 1000 veces menor que la de las otras enzimas. Son diversos los factores que actúan en su regulación, ya

que es activada por diversos efectores como los glucocorticoides, el AMPc, la nicotina y las hormonas esteroideas (Kumai et al., 1998), e inhibida por el grupo catecol que ejercen un efecto de retroalimentación negativo (Stjärne, 1966). El paso siguiente es catalizado por la L-aminoácido-aromático descarboxilasa, que cataliza la descarboxilación de la L-DOPA en dopamina. Esta enzima se encuentra también en la fracción libre del citoplasma, es poco específica y se puede encontrar en muchas células no catecolaminérgicas del organismo. El tercer paso lo lleva a cabo la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa (D $\beta$ H), esta enzima cataliza la hidroxilación de la dopamina en posición  $\beta$ , dando lugar a noradrenalina. Esto ocurre en el interior de la vesícula ya que la enzima se encuentra ligada a la membrana, y por ello la síntesis final de noradrenalina requiere que la dopamina sea transportada hacia el interior de los gránulos. Sólo en las células productoras de adrenalina, se encuentra la feniletanolamina-N-metil-transferasa, enzima que cataliza la conversión de la noradrenalina en adrenalina mediante la adición de un grupo metilo. Esta enzima se encuentra en la fracción soluble del citoplasma, por lo que la noradrenalina debe salir de los gránulos para ser metilada y convertida en adrenalina. Esta última ha de ser transportada de nuevo al interior de los gránulos para su almacenaje y posterior liberación.

Estas cuatro enzimas no siempre coexisten en las células. Aquellas células donde la ruta es completa producirán adrenalina. Las que carezcan de feniletanolamina-N-metil-transferasa producirán noradrenalina y las que carezcan de D $\beta$ H y feniletanolamina-N-metil-transferasa, serán células dopaminérgicas (Euler, 1972).

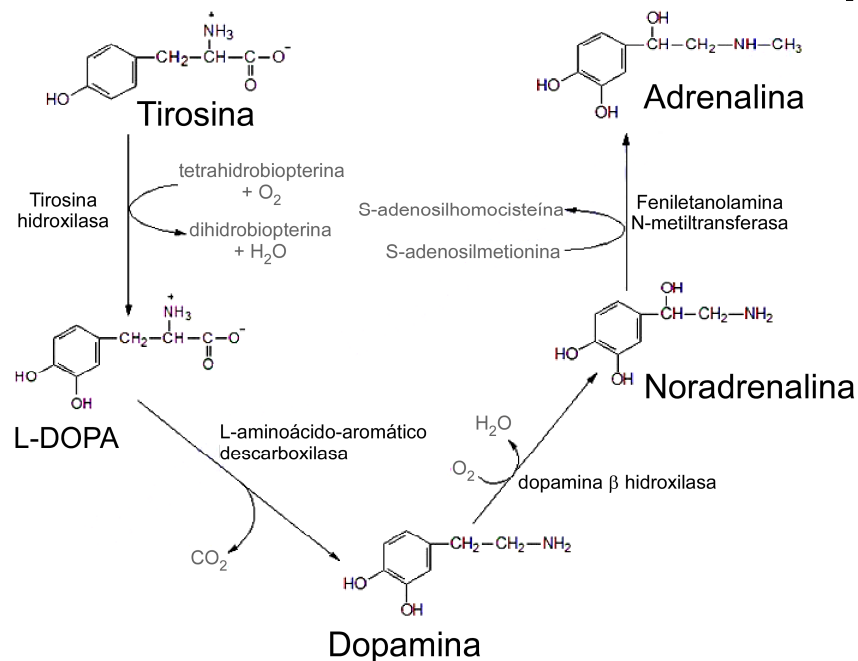


Figura 2. Ruta biosintética de las catecolaminas. Modificada de la página de internet [www.themedicalbiochemistrypage.com](http://www.themedicalbiochemistrypage.com).

### 2.3.2. Almacenamiento de las catecolaminas.

Se estima que el contenido de los gránulos cromafines en CA es de 1,1 a 2,5  $\mu\text{mol/mg}$  de proteína, esto corresponde a una concentración entre 0,5 y 0,6 M y a un número de  $3 \times 10^6$  moléculas por gránulo (Winkler and Westhead, 1980), otros autores han propuesto que la concentración podría variar en un rango de 0,6-1 M dependiendo de la especie (Albillos et al., 1997; Jankowski et al., 1993; Montesinos et al., 2008). El interior granular oscila entre pH 5,5 y 5,7, por lo que el 99% de las CA presentes se encuentran en su forma protonada (Winkler and Westhead, 1980). Dado el gradiente de concentración que hay que vencer para introducir tal cantidad de CA, es necesaria la presencia de un transportador; el transportador vesicular de monoaminas (VMAT). Su fuerza motora utilizada es el gradiente electroquímico generado por la bomba de

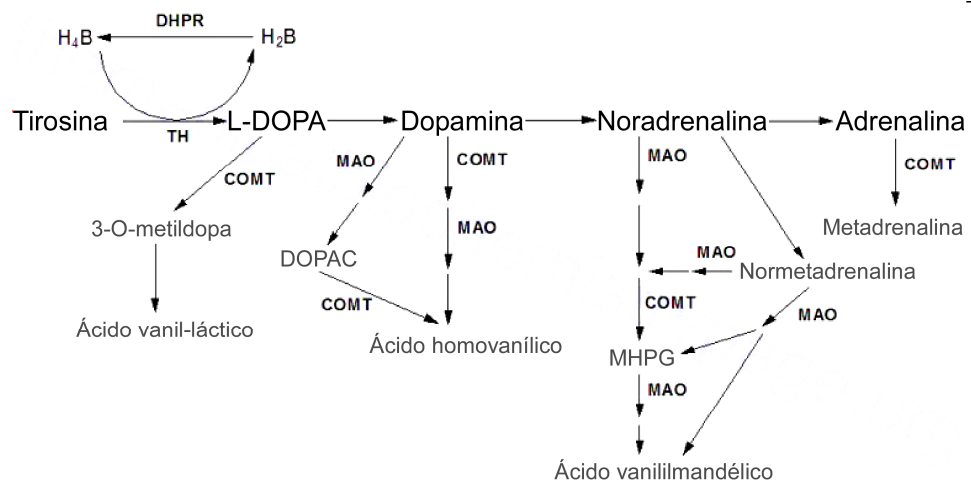
protones dependiente de ATP (V-ATPasa) y que se encuentra situada en la misma membrana que éste. El VMAT es sensible a ambos componentes de la fuerza protón-motriz, el gradiente de pH y el potencial transmembrana creado, y es altamente eficiente. El gradiente que se alcanza es de 5 órdenes de magnitud con respecto al citoplasma (Henry et al., 1994). El VMAT<sub>2</sub> es inhibido farmacológicamente por la reserpina, la tetrabenazina, y la ketanserina, y también por la diciclohexilcarbodiimida (Henry et al., 1994).

### **2.3.3. Degradación de las catecolaminas.**

La finalidad última de la acumulación de CA y otras moléculas en los gránulos secretores es su liberación tras el estímulo adecuado al exterior celular, de este aspecto nos ocuparemos en los siguientes apartados. El 98% de las CA intracelulares se encuentran en el interior de los gránulos (Chien et al., 1990), esto las protege de los mecanismos degradativos que mantienen la homeostasis de la concentración de CA en el citoplasma. El catabolismo de las CA es llevado a cabo principalmente por dos vías: la desaminación por la monoamino oxidasa (MAO) y la O-metilación por la catecol-O-metil transferasa (COMT) (fig. 3), ambas presentes en muchos tejidos entre ellos la médula adrenal. Este mecanismo puede ser inhibido por acción de la pargilina, un inhibidor selectivo de la MAO (Tozer et al., 1966). La noradrenalina es desaminada oxidativamente por la MAO a 3,4-dihidroxifenilglicol antes de ser reducida y O-metilada por COMT a 3-metoxi-4-hidroxi-fenilglicol (DOPEG). La degradación de noradrenalina y adrenalina por COMT lleva a la formación de normetanefrina y metanefrina, respectivamente. Tras su posterior desaminación y oxidación por MAO termina en la formación de ácido vanil mandélico (VMA), el principal producto final del metabolismo de noradrenalina y adrenalina. El metabolismo de la dopamina es semejante; su metabolismo es realizado por la COMT y la MAO que conduce a la formación de la 3-metoxitiramina, el ácido 3,4-dihidroxifenilacético

## Introducción

(DOPAC) y finalmente el ácido homovanílico (HVA) (Kopin, 1985). Tradicionalmente se ha considerado el hígado como principal lugar del catabolismo de las catecolaminas y responsable de la mayoría de metabolitos derivados circulantes en el plasma, actualmente se cree que el 90% de la metanefrina y entre el 23% y el 40% de la normetanefrina circulante son producidas por la degradación que tiene lugar en la glándula adrenal (Eisenhofer et al., 1998). La concentración citosólica de catecoles totales ha sido medida por medio de electroquímica intracelular y se ha calculado que se encuentra entre 50 y 500  $\mu\text{M}$ , de los cuales el 10% son CA (Mosharov et al., 2003).



**Figura 3. Catabolismo de las catecolaminas.** TH, tirosina hidroxilasa; DHPR, dihidropteridina reductasa; H<sub>2</sub>B, dihidrobiopterina; H<sub>4</sub>B, tetrahidrobiopterina; MAO, monoamino oxidasa; COMT, catecolamina-O-metiltransferasa; MHPG, 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol; DOPAC, ácido dihidroxifenilacético. Modificado de [www.themedicalbiochemistrypage.org](http://www.themedicalbiochemistrypage.org).

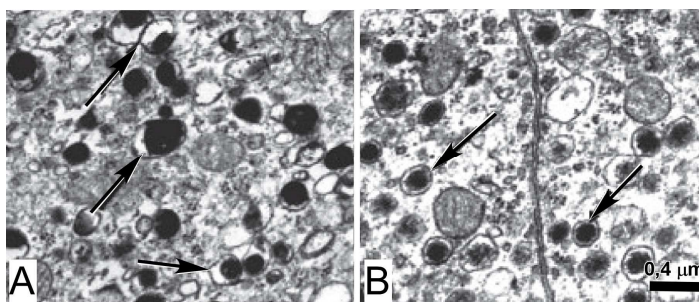
### 3. El gránulo cromafín.

#### 3.1. Características de los gránulos cromafines.

Los gránulos cromafines son orgánulos secretores especializados y se denominan también vesículas grandes de núcleo denso (LDCV) o

simplemente vesículas cromafines (CV). El término cromafín fue acuñado por el histólogo checo Alfred Kohn y deriva de su especial afinidad por las sales de cromo (Kohn, 1902; Unsicker et al., 2005). Cada célula cromafín contiene entre 10000-20000 gránulos, esto supone del 13,5 al 30% del volumen del citoplasma aproximadamente (Crivellato et al., 2008; Plattner et al., 1997).

Al microscopio electrónico se muestran muy electrodensos variando su tamaño, forma y densidad electrónica, incluso en el mismo individuo (Díaz-Flores et al., 2008). Su aspecto tras la fijación con glutaraldehído y electrodeposición con tetróxido de osmio es dependiente de su contenido en aminos; la adrenalina desaparece por acción del fijador, mientras que la noradrenalina precipita proporcionándole apariencia uniforme y densa a los gránulos que la contienen (Coupland et al., 1964). Los gránulos que almacenan adrenalina en modelos murinos varían entre un diámetro de 170 y 350 nm, presentan morfología circular y aspecto interior granulado. Algunos de estos gránulos presentan un halo claro de aspecto uniforme y fino. Por otro lado, los gránulos noradrenérgicos de esta especie, tienen un diámetro mayor entre 185 y 495 nm, poseen morfología irregular, forma ovalada o elíptica, alta densidad electrónica y un núcleo central denso cercano a la membrana (fig. 4) (Díaz-Flores et al., 2008).



**Figura 4. Comparación entre la morfología vista al microscopio electrónico de los gránulos noradrenérgicos frente a los gránulos adrenérgicos. A,** las flechas indican gránulos típicamente noradrenérgicos de núcleo muy electrodenso y halo amplio. **B,** las flechas indican en este caso la situación de típicos gránulos adrenérgicos, de menor tamaño que los anteriores, matriz menos electrodensa y halo muy reducido. Tomado de Díaz-Flores et al. (2008).

La composición y contenido de estos orgánulos ha sido objeto de estudio desde que se descubriera su existencia a mediados del siglo pasado (Hillarp et al., 1953). A partir de aquel momento se realizaron múltiples trabajos describiendo su contenido (Apps, 1997; Winkler, 1993; Winkler and Westhead, 1980). Recientemente se ha determinado el contenido proteico de estos orgánulos haciendo uso de técnicas de espectrometría de masas (Wegrzyn et al., 2007). Según las cuales, los gránulos contienen proteínas que de forma genérica y, atendiendo a su función, se sitúan dentro de las siguientes categorías: pro-hormonas, proteasas, ATPasas, proteínas estructurales, proteínas involucradas en reacciones redox, regulación del  $Ca^{2+}$ , componentes de señalización y proteínas que participan en los mecanismos que conducen a la exocitosis (Wegrzyn et al., 2007).

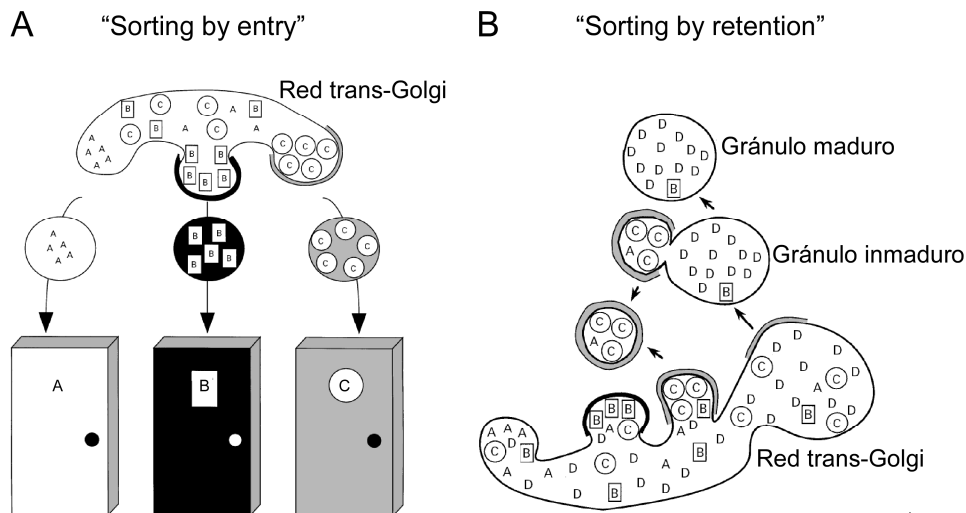
En cuanto al contenido lipídico de los gránulos, se ha descrito que contienen un 19% de colesterol y un 14% de fosfolípidos (Blaschko et al., 1967b). Las membranas de los gránulos cromafines son especialmente ricas en colesterol y lisofosfatidilcolina, y en menor cantidad contienen esfingomiélin y glicoesfingolípidos (Thiele and Huttner, 1998). Se ha propuesto que el colesterol y los esfingolípidos pueden agruparse en determinadas zonas de las membranas granulares formando estructuras denominadas "lipid raft" o balsas de lípidos. Parece ser que los "raft" proporcionan el ambiente adecuado para que se concentren proteínas implicadas en el proceso de la exocitosis. Asimismo, se ha sugerido la participación activa de estos dos lípidos en la fusión de membrana ya que sus características físico-químicas favorecen la fusión (Salaün et al., 2004).

### **3.2. Granulogénesis.**

El mecanismo por el cual los gránulos son originados en la red trans-Golgi, se encuentra aún en discusión. Se ha propuesto dos mecanismos posibles (fig. 5), el primero de ellos denominado en inglés



“sorting by entry”, consiste en la formación y consiguiente clasificación de los gránulos en base a la existencia de un receptor que reconoce algún componente del material que va a contener el gránulo inmaduro. El segundo denominado “sorting by retention” se basa en evidencias experimentales que apuntan hacia una clasificación simultánea a la maduración de los gránulos. Las proteínas intragranulares tienden a agregarse en un ambiente ácido y en presencia de  $Ca^{2+}$ , también puede inducir la condensación el procesamiento proteolítico de alguno de sus componentes; esto ocurre con la pro-insulina. El “sorting by retention” implica que solamente se da la retención en los gránulos maduros de aquellas proteínas que deben seguir la ruta regulada, el resto son excluidas debido a su baja capacidad de retención escindiéndose del gránulo inmaduro en pequeñas vesículas de contenido poco denso (Arvan and Castle, 1998; Dikeakos and Reudelhuber, 2007).



**Figura 5. Ilustración de los dos modelos propuestos para el proceso de la granulogénesis. A,** Modelo de “sorting by entry”; las moléculas contenidas en cada tipo de gránulo son seleccionadas y empaquetadas por acción de un mecanismo de reconocimiento o receptor. **B,** modelo de “sorting by retention”; el contenido definitivo del gránulo maduro es determinado por la capacidad de retención que ese contenido, las moléculas no capaces de ser retenidas, son excluidas al escindirse vesículas más pequeñas similares a las de secreción regulada. Tomado de Arvan et al. (1998).

Las evidencias experimentales apoyan la existencia del mecanismo de “sorting by entry” en el caso de las células neuroendocrinas (Dikeakos and Reudelhuber, 2007). Se ha propuesto que la proteína promotora de la granulogénesis podría ser una de las proteínas constituyentes de la matriz intragranular. Diversos trabajos atribuyen esta función a las graninas; la cromogranina A (CgA) (Hendy et al., 2006; Kim et al., 2005; Mahapatra et al., 2005; Stettler et al., 2009), la cromogranina B (CgB) (Chanat et al., 1993; Huh et al., 2003), la secretogranina II (SgII) (Beuret et al., 2004; Courel et al., 2008) ó la secretogranina (SgIII) (Prasad et al., 2008) han mostrado capacidad de formar gránulos. Se ha relacionado varios dominios de estas proteínas con la granulogénesis y parece ser que la zona N-terminal de la CgA y la CgB común a ambas proteínas, posee un lazo formado por un puente disulfuro que podría actuar como determinante proteico responsable de la formación de gránulos (Courel et al., 2006; Chanat et al., 1993; Kromer et al., 1998; Stettler et al., 2009). Sin embargo, otros trabajos atribuyen la formación de gránulos inducida por la CgA, a un fallo en la granulogénesis y muestran que éstos podrían ser lisosomas y por lo tanto, no ser funcionales (Malosio et al., 2004). Asimismo, hay otros trabajos que proponen que la expresión y consiguiente agregación de estas proteínas en el aparato de Golgi puede ser suficiente para su entrada pasiva en estructuras granulares (Beuret et al., 2004; Chanat and Huttner, 1991). Por lo tanto, la capacidad granulogénica de las cromograninas se encuentra aún en discusión (Dikeakos and Reudelhuber, 2007; Koshimizu et al., 2009).

### **3.3. Maduración de los gránulos cromafines.**

Tras su formación en la red trans-Golgi, los gránulos comienzan su proceso de maduración. La síntesis de CA y su incorporación al interior de éstos, así como la captación de nucleótidos y el procesamiento proteolítico de las pro-hormonas contenidas, son sucesos que ocurren en las siguientes etapas de la maduración.

Sólo el 1-2% de los gránulos cromafines pueden movilizarse en milisegundos para su liberación. En muchas células, los gránulos existen en una variedad de estados; pueden permanecer como no “liberables” o pasar a formar parte de un grupo susceptible de ser liberado después de su reclutamiento para formar parte del llamado “grupo de liberación rápida” (Burgoyne and Morgan, 2003).

Entre estas dos posibilidades han sido descritos cuatro grupos de gránulos secretores dependiendo de sus características cinéticas, morfológicas y reguladoras. El primer grupo se denomina grupo de liberación rápida y contiene vesículas en el último estado de maduración justo antes de la fusión. Ésta es dependiente únicamente de  $\text{Ca}^{2+}$  y pueden ser liberadas en unos pocos milisegundos (Neher, 1998; Trifaro et al., 1997). El segundo grupo se denomina grupo de liberación lenta, comprende las vesículas que se encuentran unidas a la membrana plasmática como resultado de la formación del complejo SNARE y aparece varios segundos después del estímulo debido al tiempo que necesitan para convertirse en vesículas listas para liberar (Gasman et al., 2003). También se ha descrito un tercer grupo correspondiente al grupo de vesículas inmaduras (Voets et al., 1999) y un cuarto grupo denominado grupo de reserva que contiene aquellas vesículas que se encuentran aún unidas al citoesqueleto (Garcia et al., 2006).

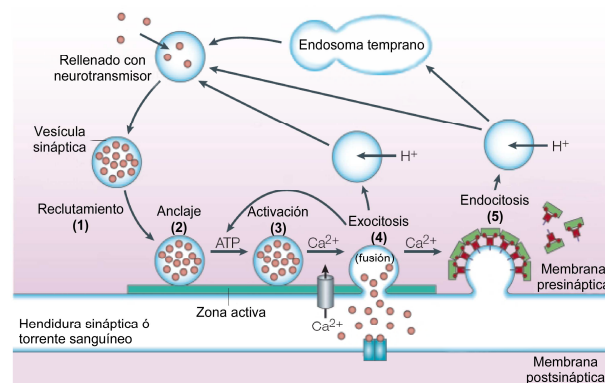
### **3.4. Exocitosis.**

Como hemos descrito anteriormente, las células cromafines se encuentran inervadas por fibras preganglionares simpáticas. La acetilcolina, liberada por éstas, activa el receptor nicotínico permitiendo la despolarización de la membrana plasmática. La despolarización promueve la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje por los que entra  $\text{Ca}^{2+}$  desde el espacio extracelular. El incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la región subplasmalema es la señal que inicia la exocitosis de las vesículas cromafines.

## Introducción

El proceso comprende las siguientes etapas: desensamblaje del citoesqueleto de actina cortical por acción de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , movimiento dependiente de ATP de las vesículas hacia la membrana plasmática, unión, anclaje en la membrana plasmática, conversión al estado de “liberables”, fusión con la membrana plasmática, liberación de contenido de gránulo y, finalmente, recuperación de la membrana del gránulo por endocitosis (fig. 6).

El  $\text{Ca}^{2+}$  es el factor promotor fisiológico de este proceso, siendo necesario para el ensamblaje de los filamentos de actina que conducen a las vesículas hacia la membrana, la fusión en sí misma y también la recuperación posterior de la membrana por endocitosis (Burgoyne, 1995; Engisch and Nowycky, 1998; Marks and McMahon, 1998; Neher and Zucker, 1993; Palfrey and Artalejo, 1998; Smith and Neher, 1997; Thomas et al., 1990). Así mismo, de forma no fisiológica, otros cationes divalentes como el  $\text{Ba}^{2+}$  ó el  $\text{Sr}^{2+}$  pueden entrar por los mismos canales que el  $\text{Ca}^{2+}$  y promover la liberación (Douglas and Rubin, 1964), este catión es utilizado frecuentemente como secretagogo en amperometría con objeto de resolver temporalmente cada evento excitotico (Machado, 2008).



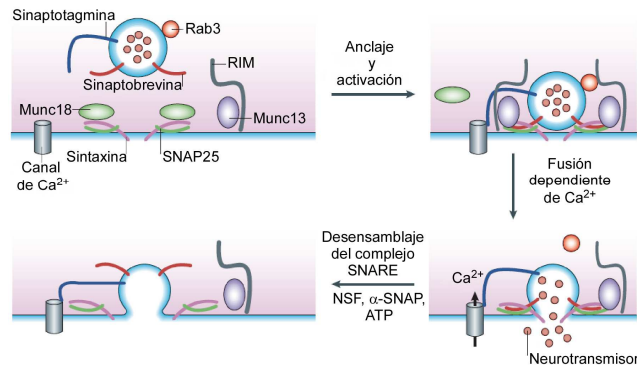
**Figura 6. Ilustración de las etapas en las que se divide el proceso excitotico.** En primer lugar las vesículas son reclutadas hacia la membrana (1), entonces pueden anclarse (2) y sufrir el proceso de activación (3), ante un estímulo, de da la fusión de las membranas y la liberación de su contenido (4) y, por último la endocitosis recicla los materiales (5). Se muestran además las distintas rutas de reciclado de las vesículas secretoras. Modificado de Gundelfinger et al. (2003) (Gundelfinger et al., 2003).

La primera etapa es dependiente de ATP y de  $\text{Ca}^{2+}$  (Holz et al., 1989) y comprende la reorganización de la red de actina para reclutar los gránulos hacia las zonas cercanas a la membrana plasmática (Burgoyne and Cheek, 1987; Cheek and Burgoyne, 1986; Giner et al., 2007; Trifaro et al., 2008; Vitale et al., 1995), la modificación de las proteínas SNARE para la fusión y el mantenimiento de los niveles de polifosfoinosítidos necesarios para la exocitosis (Darios et al., 2009a; Eberhard et al., 1990).

Tras la etapa de preparación llega la etapa de anclaje, en la que las vesículas son ancladas a la membrana plasmática. En esta fase se sitúan muy cerca de la zona activa de la membrana plasmática (Burns and Augustine, 1995). Para ser competentes para la fusión y liberación de su contenido, las vesículas necesitan sufrir un proceso de activación que las convierte en competentes para ello (Augustin et al., 1999). Es el  $\text{Ca}^{2+}$ , sin intervención del ATP, el que desencadena la fusión de los gránulos con la membrana plasmática (Bittner and Holz, 1992; Degtyar et al., 2007; Klenchin and Martin, 2000).

La maquinaria proteica responsable del proceso de la fusión, compuesta por las proteínas SNARE, es común a la exocitosis regulada y a la constitutiva y está muy conservada tanto entre los distintos tipos celulares como entre las distintas especies (Bennett and Scheller, 1993; Burgoyne and Morgan, 2003). Este grupo de proteínas de membrana se localiza en diversas organelas intracelulares y está formado por: la VAMP (“vesicle-associated membrane protein”) o sinaptobrevina (Trimble et al., 1988), sintaxina I (Bennett et al., 1992) y SNAP-25 (“synaptosome-associated protein of 25 kDa”) (Oyler et al., 1989). La VAMP/sinaptobrevina es una proteína vesicular, mientras que la sintaxina y la SNAP-25 son proteínas principalmente de la membrana plasmática. El complejo SNARE se forma cuando los motivos conservados denominados motivos SNARE de estas proteínas se unen para formar un complejo helicoidal paralelo a las dos hemimembranas que permite su acercamiento para la fusión (fig. 7) (Jahn et al., 2003; Wang et al., 2008).

## Introducción



**Figura 7. Ilustración del proceso de anclaje y fusión.** Las proteínas SNARE acercan las membranas para vencer las fuerzas electrostáticas y posibilitar la fusión. Las proteínas no están representadas a escala real Modificado de Gundelfinger et al. (2003) (Gundelfinger et al., 2003).

La familia Sec/Munc es otra familia de proteínas importante en la ejecución y la regulación de este proceso, en especial uno de sus integrantes, la Munc-18-1, que se une a la sintaxina impidiendo la formación del complejo SNARE (fig. 7). La Munc-18-1 se comporta como un regulador negativo a la espera de la señal adecuada para liberar a la sintaxina (Jahn, 2000). Además se ha descrito esta unión como necesaria para la correcta activación de la sintaxina (Dulubova et al., 1999).

En la activación y desactivación de las proteínas de la maquinaria exocitótica participan GTPasas de bajo peso molecular de la familia Rab como Rab3 (Chung et al., 1999). Estas GTPasas controlan diferentes pasos en el tráfico de las vesículas y se ha propuesto que funcionan como interruptores moleculares, determinando cuanto tiempo pueden permanecer las vesículas en el estado activado, antes de que la hidrólisis del GTP las inactive para ser potencialmente liberadas (Rybin et al., 1996). Rab3 interacciona con otra proteína de la familia Sec/Munc llamada Munc-13 a través de una tercera proteína denominada RIM (Dulubova et al., 2005). Cuando se produce la activación, Rab3 se separa de RIM y queda libre para activar a la proteína citosólica Munc-13, ésta libera a la sintaxina provocando su separación de Munc-18 (fig. 7) (Gundelfinger et al., 2003).

Una vez las vesículas se encuentran en este estado de activación, sólo es necesaria la entrada adecuada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto ocurre a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje que permiten su entrada desde el exterior en respuesta a la despolarización de la membrana plasmática. Se ha identificado y clasificado varios subtipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje en función de sus propiedades biofísicas y farmacológicas, son los canales: tipo T, L, N, P/Q y R (Garcia et al., 2006).

La sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  de las proteínas integrantes de la maquinaria de la exocitosis ha sido ampliamente estudiada (Burgoyne and Morgan, 1998b), sin embargo la sinaptotagmina, una proteína de la membrana del gránulo, parece ser la candidata más plausible desde que fue descubierta su condición de proteína de unión a fosfolípidos dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Brose et al., 1992). Aún así, la discusión se mantiene ya que parece controlar los últimos pasos de la fusión, pero las células PC12 sin sinaptotagmina muestran una liberación normal de CA (Burgoyne and Morgan, 2003).

Una vez vencidos el impedimento estérico y las fuerzas electrostáticas, ambas hemicapas se fusionan. Se ha propuesto la existencia de un estado intermediario de fusión que podría ser reversible (Jahn and Sudhof, 1999), aún así esto no explica la fina regulación que parece haber en la apertura y cierre del poro que da lugar a fenómenos de fusión transitoria como el “kiss and run”, el “flickering” ó el “kiss and stay” (Ales et al., 1999; Alvarez de Toledo et al., 1993; Sudhof, 2004; Wang et al., 2003). Ambos procesos consisten en fusiones transitorias que dan lugar a la liberación parcial del contenido granular. Aunque estos fenómenos parecen ser el mecanismo de elección en las sinapsis neuronales, debido a la rapidez que imprimen al proceso de la liberación, también han sido descritos en los gránulos neurosecretorios (Albillos et al., 1997; Fesce et al., 1994; Staal et al., 2004). Estos mecanismos, junto la fusión total y posterior reciclado son los mecanismos propuestos

precedentes a la endocitosis y recuperación del material incorporado a la membrana (Sudhof, 2004).

Por último, cuando la liberación se ha dado, el NSF y la  $\alpha$ -SNAP, dos proteínas solubles, entran en acción para desensamblar el complejo SNARE y que éste pueda ser reutilizado (Sollner et al., 1993). Dada su alta estabilidad, se requiere grandes cantidades de energía proporcionada por NSF que es una ATPasa (Matveeva and Whiteheart, 1998).

### **3.5. Regulación de la exocitosis.**

La cantidad de CA presentes en la médula adrenal es potencialmente mortal, este es el motivo por el que la regulación de su liberación es imprescindible. La regulación ocurre a varios niveles y en distintos puntos del proceso.

El  $\text{Ca}^{2+}$ , como hemos visto, es una molécula mensajera; entra a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes, generando transitoriamente un gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en la región más adyacente a la membrana plasmática. Se ha observado que la situación de estos canales, así como la población de ellos que es activada, podría estar sujeta a regulación (Garcia et al., 2006). Otra fuente de  $\text{Ca}^{2+}$  son los depósitos intracelulares, a este respecto se ha definido lo que se denomina la tríada funcional que incluye los canales dependientes de voltaje, el uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial y el receptor de rianodina del retículo endoplásmico. Este último, interviene en el proceso denominado liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  por el cual la detección por este receptor de una cantidad elevada de  $\text{Ca}^{2+}$ , desencadena su apertura y la consiguiente salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del mismo retículo (Alonso et al., 1999). Se cree que estos tres mecanismos conjuntamente, son capaces de generar transientes locales de  $\text{Ca}^{2+}$ , sin que el resto de la célula se vea afectada dada la toxicidad de este ión (Montero et al., 2000). Así, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  actúan como el disparador del proceso; el receptor de rianodina, como el amplificador de la señal; y el uniportador de la mitocondria diluiría la



concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  generada por los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior celular. He aquí, un punto de regulación de la respuesta exocitótica (García et al., 2006).

Por otro lado, la propia vesícula acumula  $\text{Ca}^{2+}$  en concentraciones milimolares, comportándose como un almacén dinámico de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que está sujeta a los cambios de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Mahapatra et al., 2004; Mitchell et al., 2001; Santodomingo et al., 2008). Recientemente se ha demostrado la implicación del  $\text{Ca}^{2+}$  intragranular en el movimiento en la región del subplasmalema y la exocitosis (Camacho et al., 2008). Este hecho unido a la existencia de receptores de inositol trifosfato en la membrana granular (Yoo and Albanesi, 1990b), indica otro punto susceptible de modulación.

Otras moléculas implicadas en la regulación del proceso, son las proteínas del tipo quinasa como la proteína quinasa C (PKC) (Burgoyne and Morgan, 2003; Knight et al., 1988). Ésta está implicada en la disrupción del citoesqueleto de actina para el reclutamiento de las vesículas (Vitale et al., 1995), así como en el anclaje y activación de éstas a la membrana plasmática (Smith et al., 1998). Esto ocurre por acción sobre proteínas SNAREs como la SNAP-25 y la sinaptotagmina (Sudhof, 1995). Otra proteína implicada es la proteína quinasa A (PKA). Se ha observado que el incremento de los nucleótidos cíclicos de adenina (AMPc), activa estas proteínas con el consiguiente aumento del contenido vesicular y la exocitosis (Machado et al., 2001).

Asimismo, los filamentos de actina del citoesqueleto parecen tener una doble función reguladora, por un lado impiden la liberación de los gránulos no competentes para ello y por el otro, facilitan su llegada a la membrana y su anclaje (Berberian et al., 2009; Burgoyne and Cheek, 1987; Gil et al., 2000; Giner et al., 2007; Vitale et al., 1995). Además, recientemente se ha relacionado las miosinas del tipo II y V con la fusión y más concretamente con la expansión del poro de fusión. Se cree que

actúan generando fuerzas mecánicas que intervienen en la liberación de las CA por parte de la matriz intragranular (Berberian et al., 2009; Jacobs et al., 2009; Neco et al., 2008).

#### **4. La matriz intragranular.**

##### **4.1. Características generales de la matriz.**

Las CA pueden alcanzar concentraciones intragranulares de entre 0,6 y 1 M (Albillos et al., 1997; Jankowski et al., 1993; Montesinos et al., 2008); el ATP podría encontrarse en el orden de 150 mM (Kopell and Westhead, 1982); el  $\text{Ca}^{2+}$  libre intragranular alcanza 50-100  $\mu\text{M}$  (Bulenda and Gratzl, 1985), pero el contenido real que llega a acumular es de 20-40 mM unido a la matriz u otros componentes (Mahapatra et al., 2004); y por último, se alcanza una concentración de 200 mg/ml de proteína (Videen et al., 1992). Tengamos en cuenta el hecho de que estas cantidades podrían lisar los gránulos si se encontraran disueltas. Esta asombrosa capacidad concentradora es posible gracias a la existencia de una matriz intragranular que adsorbe este contenido disminuyendo la osmolaridad en el interior del gránulo.

Muchas vesículas y gránulos secretores contienen una matriz, con características diferentes en cada caso debido a su diferente composición. Es el caso, por ejemplo, de los mastocitos que poseen gránulos con matriz de heparán sulfato (Fernandez et al., 1991) y las vesículas sinápticas del pez torpedo que contienen una matriz de proteoglicanos (Reigada et al., 2003). En ambos casos se ha demostrado la implicación de esta matriz en la liberación del contenido en cuestión. La matriz de los gránulos cromafines está compuesta principalmente por graninas.

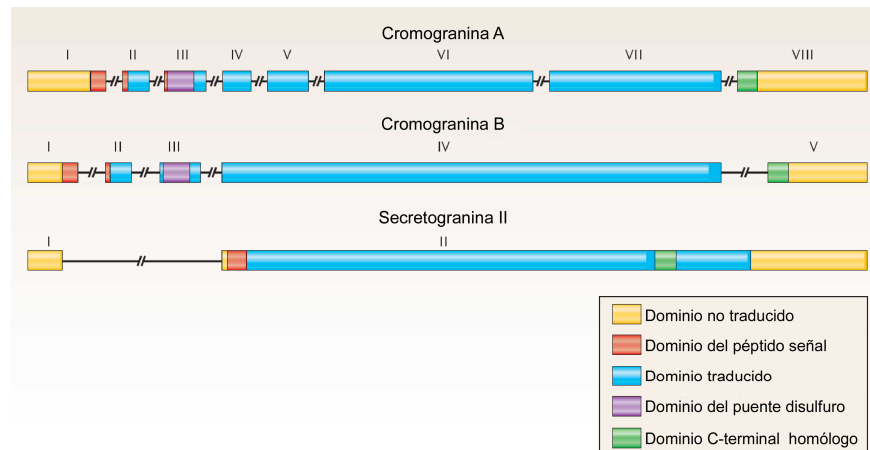
## **4.2. Las graninas.**

### **4.2.1. Características generales.**

Las graninas son glucoproteínas solubles y acídicas pertenecientes a su vez a dos grupos de proteínas; las cromograninas y las secretograninas. Las graninas suponen el 80% del contenido proteico del gránulo (Crivellato et al., 2008) y las tres graninas más abundantes y mejor estudiadas son la cromogranina A (CgA), la cromogranina B (CgB) y la cromogranina C ó secretogranina II (SgII). El término cromograninas incluye exclusivamente la CgA y la CgB (Zhao et al., 2009), usándose “graninas” para referirse al grupo que incluye “cromograninas” y “secretograninas”, y de esta forma nos referiremos a ellas en el presente trabajo.

Evolutivamente la CgA y la CgB pertenecen a un mismo grupo, probablemente, con un precursor ancestral común. Sin embargo, la SgII pertenece a un grupo monofilético distinto. La comparación de las secuencias de estas proteínas entre distintos animales vertebrados muestra su baja homología total; ésta no excede un 40%. Esta comparación desvela un hecho aún más sorprendente, si se comparan determinadas regiones, sobre todo aquellas flanqueadas por señales de corte de tipo dibásico, se observa que se encuentran altamente conservadas. Lo cual sugiere que son regiones que pueden sufrir procesamiento y originar péptidos presentes en todos esos organismos de manera ubicua. Así mismo, las secuencias que se encuentran mejor conservadas en la CgA y CgB se encuentran situadas en los extremos N y C-terminal y muestran hasta un 88% de homología. Mientras, el resto de ambas proteína diverge marcadamente; en la mitad de su secuencia muestran un discreto 10-20% de homología (Montero-Hadjadje et al., 2008).

## Introducción



**Figura 8. Homología entre CgA, CgB y SgII.** En números romanos se muestra los exones de cada gen. El código de colores se indica en la leyenda. Modificado de Taupenot et al. (2003). (Taupenot et al., 2003).

La mayoría de las células endocrinas y neuroendocrinas expresan al menos un miembro de esta familia de proteínas. Las células de la pituitaria, las células C del tiroides, las células del paratiroides, las células neuroendocrinas gastrointestinales y pulmonares, y las células cromafines, producen y almacenan graninas en sus gránulos secretores. En los sistemas nervioso central y periférico, las graninas están ampliamente expresadas en altas concentraciones en determinadas zonas del cerebro como el hipotálamo, hipocampo, amígdala y cerebelo (Helle, 2000; Montero-Hadjadje et al., 2008; Taupenot et al., 2003; Winkler, 1993). La expresión de unas u otras depende de diferentes agentes como AMPc, hormonas esteroideas, factores neurotróficos y esteroides de forbol (Taupenot et al., 2003).

Todas las graninas están formadas por cadenas polipeptídicas simples. En su extremo N-terminal poseen un péptido señal que las dirige tras su síntesis, al retículo endoplásmico y de ahí al complejo de Golgi, donde ocurren las modificaciones postraduccionales correspondientes (tabla 1). Las graninas son procesadas por enzimas contenidas en los gránulos para generar las proteínas maduras. Todas las graninas se

caracterizan por su alto contenido en aminoácidos ácidos y la presencia de múltiples sitios de corte de tipo dibásico. La CgA y la CgB poseen en el extremo N-terminal dos residuos cisteína que forman un puente disulfuro. La alta proporción de residuos ácidos, sugiere que estas proteínas podrían estar involucradas en la granulogénesis y empaquetamiento de hormonas y neuropéptidos en los gránulos secretores.

**Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de las graninas.**

Propiedad	CgA	CgB/SgI	SgII	SgIII (1B1075)	SgIV (HISL-19)	SgV (7B2)	SgVI (NESP55)
Localización en el cromosoma	14 (humano) , 21 (bovino) , 6 (rata) , 12 (ratón)	20 (humano) , 3 (rata) , 2 (ratón)	2 (humano) , 9 (rata) , 1 (ratón)	2 (ratón)	ND	15 (humano) , 2 (ratón)	20 (humano)
Residuos aminoácidos	431–445	626–657	559–586	449–507	ND	185	241
Masa molecular (kDa)							
Calculada	49–52	48–52	67.5	51–57	ND	21	27.5
Aparente	74–80	100–120	86	57	35	23	55
Residuos ácidos (%)	25	24	20	19	ND	16	21
Punto isoeléctrico (pHi)	4.5–5.0	5.1–5.2	5.0	5.1	5.6	5.2	4.4–5.2
Sitios multibásicos	8–10	15–18	9	6–10	ND	3	5
Lazo con puente disulfuro	Sí	Sí	No	No	ND	No	No
Unión a calcio	Sí	Sí	Sí	ND	ND	Sí	ND
Termoestabilidad	Sí	Sí	Sí	ND	ND	Sí	Sí
Fosforilación	Sí	Sí	Sí	ND	ND	Sí	Sí
Sulfataciones	Sí	Sí	Sí	Sí	ND	Sí	ND
O-glicosilaciones	Sí	Sí	Sí	ND	ND	ND	Sí
N-glicosilaciones	No	Sí	No	No	No	No	No

CgA indica cromogranina A; CgB cromogranina B; SgII secretogranina II; SgIII secretogranina III; SgIV secretogranina IV; SgV secretogranina V; SgVI secretogranina VI; y ND no determinado. Los residuos aminoácidos están referidos a la proteína madura sin el péptido señal. La masa molecular fue calculada a partir de la estructura primaria. La masa molecular aparente fue determinada mediante el uso de condiciones desnaturizantes en geles de poliacrilamida tras electroforesis. Los sitios multibásicos se refieren a sitios con dos o más residuos de arginina o lisina consecutivos. Modificado de Taupenot et al. (2003) (Taupenot et al., 2003).

Las cromograninas tienen además la habilidad de unir  $Ca^{2+}$  con alta capacidad pero con baja afinidad (Yoo and Albanesi, 1991). Además, en presencia de  $Ca^{2+}$  y pH bajo, tienden a agregarse (Park et al., 2002; Yoo, 1996; Yoo and Albanesi, 1990a). Se cree que bajo un pH ligeramente ácido y en presencia de  $Ca^{2+}$ , ambiente del aparato de Golgi, las graninas

tienen tendencia a agregarse entre sí y con otros componentes contenidos en los gránulos como el ATP, las CA y otras proteínas (Helle et al., 1985; Videen et al., 1992). Esta capacidad de agregación las ha puesto en un lugar prioritario para estudiar su implicación en la biogénesis, su capacidad concentradora de sustancias y su participación en la liberación de este contenido.

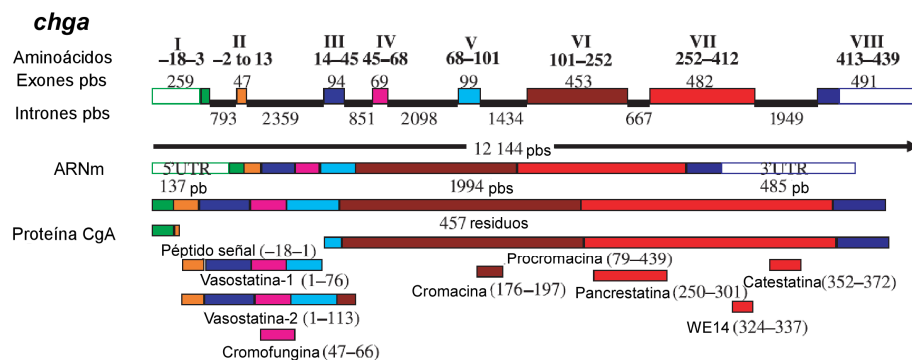
#### **4.2.2. La cromogranina A.**

La cromogranina A es la proteína más abundante en las vesículas de las células cromafines bovinas, constituyendo el 40 % de sus proteínas solubles. Fue descrita por primera vez en el año 1967 (Blaschko et al., 1967a) y es co-almacenada y co-secretada con la adrenalina y la noradrenalina en la médula adrenal (Helle et al., 1993). La CgA es un polipéptido en configuración de espiral aleatoria en un 60-65% de su estructura, con menor contribución de las conformaciones de hélice  $\alpha$  y de lámina  $\beta$  plegada (25-40 %) (Mosley et al., 2007; Yoo and Albanesi, 1990a). Posee entre 431-445 aminoácidos, su peso molecular calculado varía entre 49 y 52 kDa y su punto isoeléctrico (pI) se encuentra entre 4,5 y 5 (Taupenot et al., 2003). La CgA sufre procesamiento postraduccional consistente en fosforilaciones, glicosilaciones y sulfataciones que hacen que su masa tras su migración electroforética se encuentre comprendida entre 74-80 kDa (tabla 1). A pesar de ser una proteína muy bien caracterizada, aún se desconoce su estructura tridimensional completa, pero sí se sabe que es sometida a procesamiento por proteasas (Hook et al., 2008) y que dependiendo de que el pH se encuentre en 7,5 ó 5,5 se puede encontrar en forma dimérica ó monomérica respectivamente (Yoo and Lewis, 1992). Asimismo, puede formar heterodímeros y heterotetrámeros con la CgB (Yoo and Lewis, 1996).

La presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y pH bajo induce considerables cambios conformacionales en la estructura de la CgA; éstos se observan en las estructuras hélice  $\alpha$  y lámina  $\beta$  plegada (Yoo and Albanesi, 1990a). Por

tanto, el grado de agregación de la CgA es dependiente de  $Ca^{2+}$  y sensible al pH; a medida que las cargas negativas se van cubriendo por el aumento de cargas positivas suministradas por el  $Ca^{2+}$ ,  $CA$ ,  $H^+$  y  $ATP$ , la CgA comienza a plegarse y a adoptar una configuración más compacta. Se cree que es esta acidificación, junto con la captación de  $Ca^{2+}$  desde el citoplasma, lo que permite el proceso de condensación del contenido de las vesículas secretoras. La condensación de los componentes no sólo reduce la presión osmótica de las vesículas, sino que además, facilita la incorporación de más moléculas. Por lo tanto, las cromograninas contribuyen a aumentar la capacidad de almacenaje de las vesículas (Yoo and Albanesi, 1990a). Dada su capacidad de agregación, así como el descubrimiento de determinantes proteicos relacionados con la formación de vesículas (Courel et al., 2006; Stettler et al., 2009), se ha estudiado su papel en la granulogénesis (Kim et al., 2001; Kim et al., 2005; Koshimizu et al., 2009; Mahapatra et al., 2005).

Como pro-hormona, la CgA da lugar a una gran variedad de péptidos bioactivos con acciones, autocrinas, paracrinas y endocrinas (fig. 9).



**Figura 9. Representación esquemática del gen *chga*.** Se representan los transcritos correspondientes, las proteínas y péptidos derivados. Los esquemas no han sido dibujados a escala. Los exones están indicados en números romanos y los aminoácidos codificados por cada exón están indicados en negrita. Los péptidos derivados se encuentran coloreados en base al exón del cual proceden y la numeración se refiere a la posición de los aminoácidos en la proteína madura. Modificado de Montero-Hadjadje et al. (2008) (Montero-Hadjadje et al., 2008).

Estos péptidos se generan intragranularmente o bien, una vez liberados, por acción de proteasas. Tienen acciones muy variadas relacionadas con: la inhibición de la liberación de insulina por las células  $\beta$ , la inhibición de la captación de glucosa por los adipocitos y hepatocitos, y la inducción de la glucogenolisis (pancrestatina); la inhibición de la vasoconstricción, la modulación de la adhesión celular, la liberación de la hormona paratiroidea, la interacción de los fibroblastos y las células del músculo liso con la matriz extracelular, la permeabilidad endotelial inducida por el factor de necrosis tumoral en el hígado y en el endotelio de venas y arterias, y la inducción de la apoptosis neuronal (vasostatina); la inhibición de la secreción de CA evocada por nicotina de forma autocrina o paracrina, la vasodilatación por estimulación de la liberación de histamina, la inhibición de la desensibilización de la liberación de CA inducida por nicotina, y la acción antimicrobiana (catestatina); y por último, la acción antibacteriana y antifúngica (cromofungina y cromacina) (Montero-Hadjadje et al., 2008; Zhao et al., 2009). Dada esta gran cantidad de funciones es fácil aventurar la gran cantidad de desordenes asociados a esta proteína, en especial se ha estudiado su implicación en la hipertensión (Takiyyuddin et al., 1990) y la disponibilidad de glucosa (Gayen et al., 2009b).

#### **4.2.3. La cromogranina B.**

La cromogranina B ó secretogranina I fue descrita por primera vez en el año 1985 (Falkensammer et al., 1985), y es otra de las proteínas secretora expresadas en los gránulos cromafines más abundantes. Al contrario que la CgA, que es la proteína mayoritaria en los gránulos cromafines bovinos, la CgB es la proteína más abundante en la rata y el humano (Gasnier et al., 2004). Su secuencia consta de 626-657 aminoácidos y su punto isoeléctrico puede encontrarse entre 5,1 y 5,2. Su peso molecular puede estar entre 100 y 120 KDa, mientras que el calculado es 48-52 KDa (Taupenot et al., 2003), el motivo de esta



discrepancia es, como en el caso de la CgA, el gran número de modificaciones postraduccionales (glicosilaciones, fosforilaciones y sulfataciones) que sufre esta proteína y la gran cantidad de residuos acídicos que provocan el retraso en su migración electroforética (tabla 1) (Gasnier et al., 2004). La CgB posee un péptido señal terminal de 20 residuos aminoacídicos y al ser comparados sus extremos N y C terminales se observan zonas de homología con la CgA, como en el caso de la CgA, en el extremo N terminal se encuentran las dos cisteínas que forman el característico puente disulfuro. La zona central de la CgB, no muestra homología con la CgA pero sí comparte con ésta la gran cantidad de aminoácidos acídicos y dianas de corte de carácter dibásico (Benedum et al., 1987). En cuanto a su estructura hay una gran similitud con la CgA; la espiral aleatoria supone el 65-70% de la molécula y sólo un 15-20% se encuentra en conformación de  $\alpha$  hélice y un 10-15% de lámina  $\beta$  (Yoo, 1995). La CgB también presenta baja afinidad por la unión a  $\text{Ca}^{2+}$  pero alta capacidad de albergar este ión. Asimismo posee la capacidad de agregarse en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y pH ácido, pero su sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  es dos órdenes de magnitud mayor que en la CgA.

Por todas estas características, la CgB ha sido estudiada en base a su posible habilidad para inducir la granulogénesis, proponiéndose incluso como inductor más eficaz que la CgA ya que es capaz de inducir la formación de más del doble de gránulos en células no endocrinas NIH3T3 y COS-7 que la CgA. Del mismo modo la interferencia de su expresión en células PC12, disminuye la cantidad de gránulos secretores (Huh et al., 2003). La presencia del puente disulfuro situado en el extremos N-terminal de la CgB parece ser determinante para su propiedad granulogénica e incluso para que sea correctamente introducida en gránulos secretores en el aparato de Golgi (Chanat et al., 1993). La CgA posee este puente, pero su eliminación no tiene tal efecto (Taupenot et al., 2002).

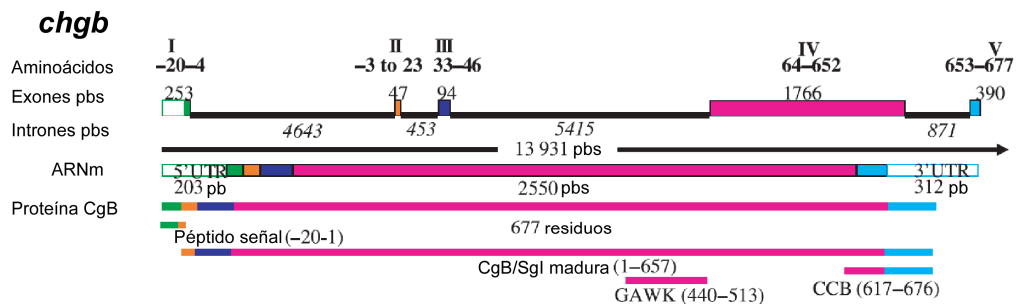
Otra característica común con la CgA, es la unión que se da entre estas dos graninas y el receptor de 1,4,5,-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) de la membrana

## Introducción

granular, lo cual parece sugerir su participación en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a  $\text{IP}_3$  (Yoo, 2000).

La CgB se encuentra, como la CgA, en los gránulos secretores de una amplia variedad de tejidos neuroendocrinos, endocrinos y neuronales y, además, se ha detectado en el núcleo de las células PC12 sugiriendo su participación en la regulación de la expresión de determinados genes (Yoo et al., 2002). Recientemente, también se han encontrado péptidos derivados de la CgA en el núcleo de las células PC12 (Montero-Hadjadje et al., 2008).

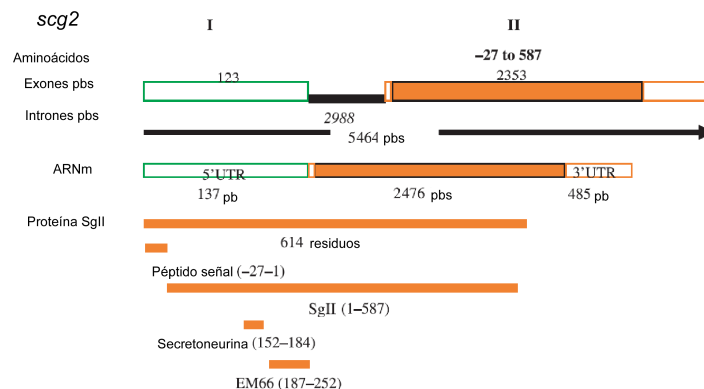
De los péptidos derivados de la CgB, el más conocido es la secretolitina con acción antibacteriana. El resto de péptidos son: GAWK, BAM-1745, SR-17, HQ-34 y PE-11 (Montero-Hadjadje et al., 2008; Zhao et al., 2009) (fig. 10). Algunos polimorfismos en el locus de la CgB han relacionado la CgB, y algunos de sus péptidos, con enfermedades como la esquizofrenia (Zhang et al., 2002), la enfermedad de Alzheimer (Marksteiner et al., 2000), y la epilepsia (Mahata et al., 1992).



**Figura 10. Representación esquemática del gen *chgb*.** Se representan los transcritos correspondientes, las proteínas y péptidos derivados. Los esquemas no han sido dibujados a escala. Los exones están indicados en números romanos y los aminoácidos codificados por cada exón están indicados en negrita. Los péptidos derivados se encuentran coloreados en base al exón del cual proceden y la numeración se refiere a la posición de los aminoácidos en la proteína madura. Modificado de Montero-Hadjadje et al. (2008) (Montero-Hadjadje et al., 2008).

#### 4.2.4. La secretogranina II ó cromogranina C.

La secretogranina II o cromogranina C fue detectada por primera vez en la glándula pituitaria (Rosa and Zanini, 1983) y posteriormente identificada en la glándula adrenal (Fischer-Colbrie et al., 1986). Su secuencia consta de 559-586 aminoácidos, su masa molecular calculada a partir de su secuencia es de 67,5 KDa frente a los 86 KDa aparentes y su pI es de 5 (tabla 1) (Taupenot et al., 2003). Comparte con la CgA y CgB, su riqueza en aminoácidos acídicos, sin embargo carece de la estructura en lazo unido por un puente disulfuro que éstas poseen en su extremo N terminal. Se ha observado que esta granina tiene estructuras en enrollamiento al azar y láminas  $\beta$  a lo largo de su estructura, con una baja contribución de hélices  $\alpha$  (Park et al., 2002). Se ha demostrado que en las condiciones de pH y concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  descritas en los gránulos, la SgII forma agregados (Gerdes et al., 1989). Esta propiedad de la SgII, común a las CgA y CgB, podría de nuevo estar implicada en la granulogénesis y en la formación de la matriz y su correcto empaquetamiento en el gránulo secretor.



**Figura 11. Representación esquemática del gen *scg2*.** Se representan los transcritos correspondientes, las proteínas y péptidos derivados. Los esquemas no han sido dibujados a escala. Los exones están indicados en números romanos y los aminoácidos codificados por cada exón están indicados en negrita. Los péptidos derivados se encuentran coloreados en base al exón del cual proceden y la numeración se refiere a la posición de los aminoácidos en la proteína madura. Modificado de Montero-Hadjadje et al. (2008) (Montero-Hadjadje et al., 2008).

## Introducción

---

Como las otras cromograninas, posee múltiples sitios de corte de tipo dibásico, que dan lugar a péptidos derivados (fig. 11) de su procesamiento, como la secretoneurina. Algunas de sus funciones conocidas son la de atrayente de monocitos y eosinófilos; también se ha detectado en el líquido cerebroespinal y parece estar involucrada en la neurotransmisión y la regulación paracrina del sistema nervioso y neuroendocrino; promueve la liberación de dopamina del estriado y participa en el crecimiento de neuritas en el cerebelo; actúa incrementando la permeabilidad del endotelio de las arterias coronarias y como citoquina, entre otras funciones (Montero-Hadjadje et al., 2008). Otro péptido derivado de la SgII, es el péptido EM66, implicado en el estrés derivado del ayuno y el control de la ingesta de alimento (Boutahricht et al., 2005; Zhao et al., 2009).

La SgII se ha relacionado junto a la CgB con la enfermedad de Alzheimer en un modelo murino; ambas aparecen en las placas neuríticas (Willis et al., 2008). Mas recientemente se ha propuesto que la disminución de SgII, junto a CgA y CgB, en las neuronas motoras, puede estar implicado en la esclerosis amiotrófica lateral (Schrott-Fischer et al., 2009).

### **4.2.5. Las otras graninas.**

El resto de graninas descritas son las secretograninas III, IV, V, VI, VII, también conocidas como 1B1075, HISL-19, 7B2, NESP55 y VGF respectivamente, y la recientemente descubierta pro-SAAS (Helle, 2004; Montero-Hadjadje et al., 2008; Zhao et al., 2009).

La secretogranina III (SgIII) es una proteína de 57 KDa que ha sido recientemente relacionada con la granulogénesis. En los gránulos secretores de los mastocitos esta granina es abundante y al parecer puede unirse con CgA dando lugar a la formación de gránulos. Esta propiedad desaparece al expresar una SgIII carente del dominio de unión a CgA (Prasad et al., 2008). También se ha descrito esta función de la SgIII en células de la pituitaria y del páncreas endocrino (Hosaka et al.,

2002). Recientemente los mismos autores han propuesto que la unión de la SgIII a una metalopeptidasa intragranular, la carboxipeptidasa E (CPE ó CPH), facilita la granulogénesis en una línea celular derivada de células corticotropas de la glándula pituitaria (AtT-20) (Hosaka et al., 2005). Se ha relacionado la SgV ó 7B2 con la inhibición de las enzimas pro-hormonas convertasas 1 y 2 (PC1 y PC2) , a la vez, que con la acción como chaperonas sobre estas mismas proteínas (Lee and Hook, 2009). En cuanto al resto de las graninas el conocimiento es aún escaso (Zhao et al., 2009).

#### **4.2.6. La matriz y la exocitosis.**

Al margen de la implicación atribuida a las cromograninas en la granulogénesis y de la pléyade de funciones fisiológicas de sus péptidos derivados, se ha sugerido su participación en el proceso de la exocitosis como componente activo en el mantenimiento del equilibrio de la fracción libre/unida de moléculas solubles transportadas en las vesículas (Schroeder et al., 1996). Para la célula es imprescindible contar con mecanismos que regulen las concentraciones de sustancias como es el caso del  $\text{Ca}^{2+}$  y las CA (Mitchell et al., 2001), a este respecto las graninas muestran la habilidad de unir CA y  $\text{Ca}^{2+}$  con baja afinidad pero alta capacidad. Asimismo, la interacción de CgA y CgB con el receptor de  $\text{IP}_3$  granular indica su participación en la regulación de la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  más allá de su propiedad acumuladora (Thrower et al., 2003; Yoo, 2000).

Haciendo uso de la amperometría se ha comprobado que la difusión del contenido vesicular es mayor de la esperada dada la concentración de moléculas en el interior (Alvarez de Toledo et al., 1993; Venton et al., 2002; Wightman et al., 1995), además la unión de las CA y el  $\text{Ca}^{2+}$  a las graninas favorecen la agregación de éstas dependiendo del pH intragranular (Videen et al., 1992). También, se ha observado cómo la inducción de la alcalinización o acidificación del interior granular afecta al proceso de la exocitosis, enlenteciéndolo o acelerándolo respectivamente

## Introducción

---

(Camacho et al., 2006). La matriz se comporta en este caso como una matriz de intercambio iónico, retrasando la liberación del contenido (Marszalek et al., 1996; Schroeder et al., 1996). Este fenómeno también ha sido descrito en las vesículas colinérgicas del órgano eléctrico de torpedo (Reigada et al., 2003). Además se ha demostrado que la matriz responde ante el voltaje negativo sufriendo un “hinchamiento” o “swelling” con el consiguiente incremento de la conductancia que facilita la disociación de solutos, y de manera contraria ante potenciales positivos (Nanavati and Fernandez, 1993). Esta respuesta a los gradientes de potencial asociada a la respuesta de la matriz frente a los cambios osmóticos y de pH, cambian drásticamente la forma en la las moléculas son liberadas debido a una acción físico-química directa sobre la matriz (Borges et al., 1997).

Por otro lado, se ha propuesto una interacción aún más directa de las cromograninas A y B con proteínas pertenecientes al complejo SNARE, más concretamente con sintaxina 1A y sinaptotagmina I (Yoo et al., 2005). Este hecho podría sugerir su participación en el proceso de la fusión de las membranas.

Hasta el momento, los abordajes experimentales para el estudio de la función de la matriz intragranular durante el almacenamiento y exocitosis de neurotransmisores, se han realizado obviando su composición ante la imposibilidad de su manipulación, de forma que ésta suponía un factor siempre constante. La reciente elaboración de ratones *knock-out* (Hendy et al., 2006; Kim et al., 2005; Koshimizu et al., 2009; Mahapatra et al., 2005; Zhang et al., 2009) en los que se ha silenciado la expresión de los genes de las cromograninas, ha abierto un nuevo campo de trabajo ante la posibilidad de discriminar la función de cada componentes de la matriz de forma diferencial (Díaz-Vera et al., 2010; Montesinos et al., 2008)

## ***Objetivos***

El equipo de investigación en el que se ha desarrollado el presente trabajo, ha dedicado los últimos años a estudiar la influencia de los factores intravesiculares en la cinética de la liberación cuántica de la exocitosis.

La llegada de los ratones carentes de cromograninas A y B nos ha permitido, por vez primera, alterar el contenido proteico de los gránulos secretores. En el presente estudio haremos uso de técnicas electroquímicas, electrofisiológicas, de espectrometría de masas y de microscopía electrónica para dilucidar la función de las cromograninas A y B en la exocitosis.

Para el desarrollo de esta tesis doctoral nos propusimos:

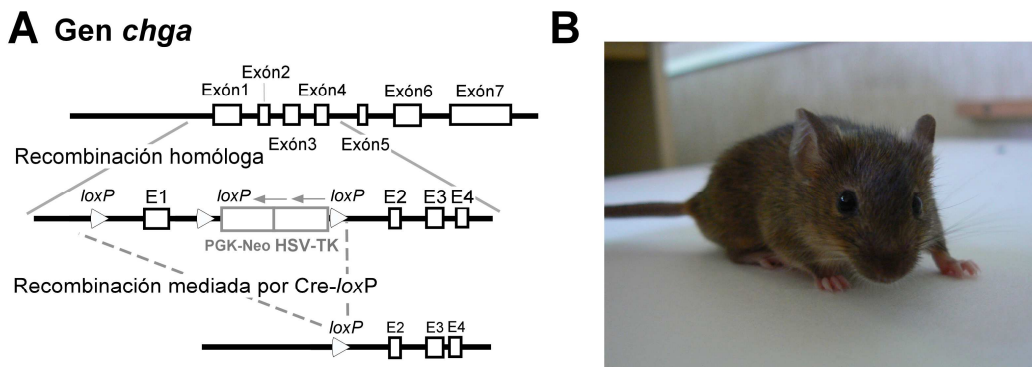
- i. Dilucidar la función de la cromogranina A y la cromogranina B en el almacenamiento de las catecolaminas en los gránulos secretores de la célula cromafín.
- ii. Definir la participación de la matriz intravesicular en la liberación de catecolaminas durante la exocitosis, haciendo distinción entre sus componentes principales, la cromogranina A y la cromogranina B.
- iii. Estudiar los mecanismos proteicos compensadores ante la carencia de cromograninas.



## ***Material y métodos***

## 5. Obtención de las líneas de ratones carentes de CgA y/o CgB.

La línea de ratones carentes de CgA, la cual denominaremos para mayor claridad CgA-KO (*knock-out* de la CgA) (fig. 12), fue generada por los Dres. Daniel T. O'Connor y Sushil K. Mahata de la Universidad de California, en San Diego, EEUU, y amablemente cedida para nuestro estudio. La elaboración de este ratón transgénico fue abordada de la forma descrita en Mahapatra y col., 2005. Muy brevemente, se produjo una deleción en el exón 1 del gen. Mediante recombinación homóloga se produjo la integración del constructo que contiene el gen reportero (HSV-TK) y el marcador de selección (PGK-Neo), además de las regiones *loxP* necesarias para la posterior recombinación mediada por estas secuencias que da lugar a la deleción del gen entre la primera y la tercera secuencia *loxP* (fig. 12). Esta modificación fue insertada en células madre embrionarias (ES) de la cepa 129svJ, seleccionada y posteriormente inyectadas en embriones de ratón C57BL/6. La selección de los individuos con la ablación del gen resultó en el mantenimiento de una cepa con un fondo genético mezcla (129svJ X C57BL/6) proveniente en un 50% de la cepa 129svJ y otro 50% de la C57BL/6 que fue mantenida en homocigosis por el apareamiento de hermanos y hermanas (Mahapatra et al., 2005).



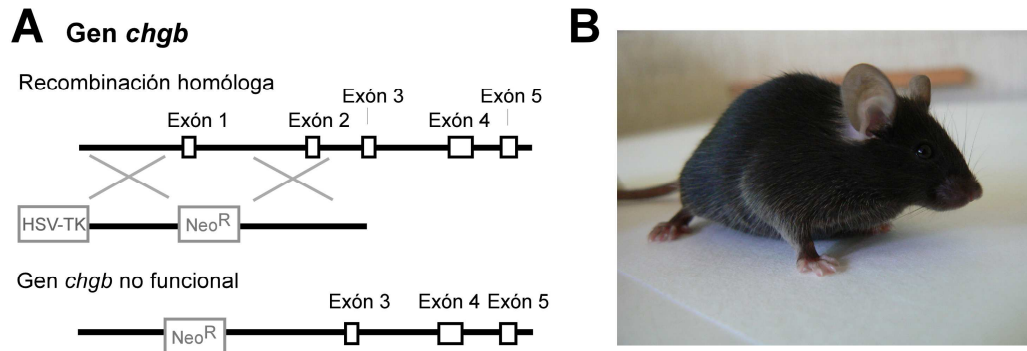
**Figura 12.** **A**, representación esquemática de la estrategia para interrumpir la correcta expresión del gen *chga*. **B**, individuo representativo de la cepa CgA-KO.

## Material y métodos

---

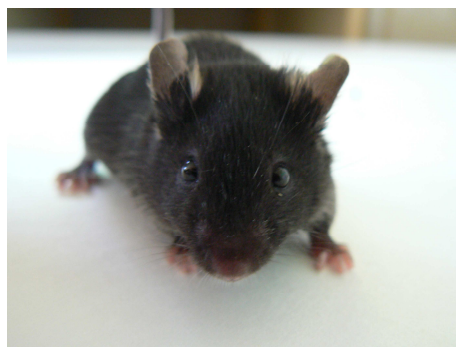
La línea de ratones sin CgB, que denominaremos CgB-KO (*knock-out* de la CgB), fue generada y cedida por los Dres. Wieland B. Huttner y Federico Calegari ambos pertenecientes al “Max Planck Institute for Cell Biology” de Dresden, Alemania.

El ratón CgB-KO fue elaborado mediante la sustitución de 117 bases de la región proximal del promotor y las primeras 29 bases de la secuencia codificadora de la CgB, por el gen de la resistencia a neomicina (fig. 13). Para ello, se elaboró un constructo para la recombinación homóloga en células de la cepa E14.1 procedentes de la cepa 129/Ola contenía: el gen de la timidina quinasa del virus Herpes simplex, 2,8 Kpb de la región promotora proximal del ARNm de la CgB, el gen de resistencia a la neomicina, y la secuencia completa de la región que codifica el intrón 1 y el exón 2 del ARNm de la CgB, flanqueada por dos dianas para las enzimas de restricción BglIII y EcoRI (3,6 Kpb). Los clones de células embrionarias pluripotentes, correctamente transfectados con el constructo, fueron seleccionados en presencia de ganciclovir 2 mM (Syntex Pharmaceuticals) y 300 mg/mL de neomicina (Gibco). Después de esta doble selección los clones de células ES fueron elegidos en función del resultado del análisis por *southern-blot* de digestos de ADN genómico usando como marcador un fragmento de 1,6 Kpb del intrón 1. Se obtuvo cinco clones que fueron inyectados en blastocistos C57BL/6J, resultando cuatro individuos quimeras de esos clones que mostraron transmisión de la modificación introducida en su línea germinal tras el cruce con el ratón “wild type” C57BL/6J. Las siguientes generaciones se obtuvieron por cruces sucesivos y retrocruzamiento con ratones C57BL/6J y se comprobó su genotipo de nuevo por *southern-blot*. Se obtuvo así líneas de ratones CgB “wild type” y “knock-out”, con más de un 95% de fondo genético del tipo C57BL/6J, a partir de 12 individuos fundadores heterocigotos para el gen de la CgB.



**Figura 13. A**, representación esquemática de la estrategia para interrumpir la correcta expresión del gen *chgb*. **B**, individuo representativo de la cepa CgB-KO.

La línea de ratones carentes de CgA y CgB, denominada CgA/B-KO ó doble *knock-out*, fue obtenida en nuestro laboratorio a través del cruce de 3 hembras CgA-KO con 3 machos CgB-KO. Tras sucesivos cruces endogámicos se observó que los individuos CgA/B-KO eran viables y fértiles. Los ratones control se obtuvieron de la misma manera, por el cruce de los dos ratones control de las cepas CgA-KO y CgB-KO. Ambas cepas fueron mantenidas en homocigosis por cruces entre hermanos y hermanas.



**Figura 14.** Individuo representativo de la cepa CgA/B-KO.

## **6. Caracterización de las líneas de ratones *knock-out*.**

### **6.1. Genotipado.**

#### **6.1.1. Extracción ADN genómico.**

Para identificar los individuos que poseían la disrupción en el gen o genes en cuestión, se usó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, previamente fue necesario realizar la extracción de ADN genómico a partir de un fragmento de la cola de cada individuo. El procedimiento de extracción del ADN se realizó por el método del fenol-cloroformo (Sambrook et al., 1989) como se detalla a continuación:

- a. Se corta 0,5 mm de la cola a cada ratón.
- b. Se coloca en el interior de un tubo debidamente identificado.
- c. El tejido es sometido a disgregación de tipo enzimático. La enzima utilizada es la proteinasa-K a una concentración de 100 µg/mL y disuelta en una solución de lisis que contiene: 100 mM de Tris-Cl a pH de 8,5; 5 mM de EDTA a pH 8,0; 200 mM de NaCl; y 0,2 % (p/v) SDS, con esta solución provocamos la ruptura de las células debido a su hipertonidad y la desorganización de las membranas debido a la acción del detergente SDS. La proteinasa K disgrega las proteínas del tejido y de la célula. La incubación con la enzima se lleva a cabo a 55°C durante 12 horas en un termobloque (LabNet), con lo cual se promueve la desnaturalización de las proteínas.
- d. Una vez disgregado el tejido, la muestra se agita fuertemente sin utilizar el vórtex.
- e. Se centrifuga los tubos a 14000 r.p.m. en una centrifuga de sobremesa (Beckman). Con este procedimiento se sedimentó el tejido no digerido, manteniendo en el sobrenadante el ADN.
- f. Entonces transferimos el sobrenadante a un tubo eppendorf limpio y añadimos un volumen igual al recuperado de una mezcla de fenol-

cloroformo (25:25) (Sambrook et al., 1989). Inmediatamente, se agita cada tubo virorosamente hasta que el contenido tome un aspecto lechoso.

g. Se centrifuga a 14000 r.p.m. durante 5 min.

h. Tras la centrifugación se forman tres capas: la fase orgánica, en el fondo, corresponde al fenol; la capa intermedia, corresponde a resto del tejido; y la capa superior, acuosa, que contiene las moléculas de ADN. Dado que el fenol es un solvente orgánico, arrastra consigo las proteínas desnaturalizadas a las fases inferior e intermedia tras la centrifugación. Las moléculas de ADN quedan así mayoritariamente libres de proteínas y se sitúan en la fase superior. El cloroformo es un solvente menos apolar que el fenol y, por tanto, ayuda a eliminar éste último de la fase acuosa.

i. Entonces se añade una décima parte del volumen recuperado de acetato de sodio 3 M a pH 5,2. Así se fuerza la precipitación del ADN ya que la adición de la sal aumenta la fuerza iónica de la solución, esto reduce la repulsión de los grupos fosfato cargados negativamente del ácido nucleico y permite replegarse a las moléculas de ADN.

j. A continuación, se añade dos veces el volumen obtenido (capa superior más acetato de sodio) de etanol absoluto, y se mezcla suavemente por inversión del tubo. El etanol hace más hidrofóbica la solución y por lo tanto menos capaz de solvatar al ácido nucleico cargado. Estos dos pasos combinados reducen la solubilidad de los ácidos nucleicos y producen su precipitación.

k. Se centrifuga nuevamente a 14000 r.p.m. durante 15 min para precipitar en el fondo del tubo la hebra de ADN obtenida.

l. Se retira el sobrenadante y se añade 1 mL de etanol al 75 % para volver a hidratar el ADN y eliminar las sales que puedan quedar.

m. Se centrifuga a 13000 r.p.m. durante 5 min.

## Material y métodos

---

- n. Se extrae completamente el sobrenadante y se deja secar durante 10 min.
- o. Se resuspende el precipitado en 200 µL de agua.
- p. Finalmente, se conserva la disolución del ADN genómico total a -4°C.

### **6.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa.**

#### **6.1.2.1. Amplificación del gen *chga*.**

La PCR permite amplificar una región conocida de ADN de forma teóricamente ilimitada. El procedimiento consiste en hacer copias de una hebra monocatenaria de la región de interés del gen hasta convertirla en detectable mediante electroforesis en gel.

Para amplificar la región en la que se encuentra el gen de la CgA se diseñaron tres “primers” u oligonucleótidos cebadores cuyas secuencias fueron las siguientes:

F-*chga* 5'-CTCCGCCCGCTTCTCTGCTTTATGCTCGTAG-3'

R1-*chga* 5'-GTCATGGGGCTGTTCACAGGAAGGGCAAAAAGT-3'

R2-*chga* 5'-GCCCCTAAATGAGAACCGGCTTCGCG-3'

Los fragmentos cebadores F-*chga* y R1-*chga* flanquean la región delecionada por la recombinación homóloga en la cepa de ratones CgA-KO y los fragmentos producto de la amplificación serán de 2,1 Kpb en el alelo WT ó “wild type” y 200 pb en el caso del alelo mutante. Debido a la dificultad de amplificar y ver posteriormente en un mismo gel ambos fragmentos simultáneamente, fue incluido un tercer fragmento cebador, el R2-*chga*, que anilla dentro de la región delecionada del gen, dando lugar a la amplificación de un fragmento de 400 pb a partir del alelo WT y ningún producto a partir del alelo mutado. Los parámetros de la PCR se

optimizaron para amplificar los productos de 200 y 400 pb (fig. 20 de *Resultados*).

Los reactivos utilizados para una mezcla de reacción que da lugar a la amplificación de la región del gen *chga* (volumen de 25  $\mu$ L) fueron los siguientes:

- 12,75  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O pura.
- 5  $\mu$ L de tampón de carga 5X (Sacarosa 1,75 M y rojo cresol)
- 2,5  $\mu$ L de “buffer” 10X (Contiene MgCl<sub>2</sub>, KCl y Tris-HCl).
- 0,75  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 50 mM.
- 1  $\mu$ L de la mezcla de los dNTPs 2,5 mM (deoxinucleótidos trifosfatos: dATP, dCTP, dGTP y dTTP).
- 0,5  $\mu$ L de cada uno de los tres cebadores: F-*chga*, R1-*chga* y R2-*chga* preparados en soluciones madre de 20  $\mu$ M.
- 0,5  $\mu$ L de Taq polimerasa (Invitrogen).
- 1  $\mu$ L de ADN genómico total, esto equivale a 300-500 ng de ADN.

La reacción se realizó termociclador (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler) y las condiciones de la PCR fueron 95°C, durante 1 min.; 65°C, durante 1 min.; 72°C, durante 0,15 min.; esta secuencia se repitió durante 35 ciclos.

Los productos de la PCR fueron separados mediante electroforesis en un gel de 2 % de agarosa (Sigma) y se visualizaron mediante marcaje con bromuro de etidio. Se usó el marcador de pesos moleculares de 100pb (BioRad) para determinar el tamaño de los fragmentos amplificados.



### **6.1.2.2. Amplificación del gen *chgb*.**

En el caso de la identificación de la interrupción del gen de la CgB, la secuencia de los cebadores (Invitrogen) es la siguiente:

CHGB1443F: 5'-GAG CCG GAC CCT TGT CCC TTC TTG CC-3'

CHGB2006R: 5'-GCC TGA CAT CTC TGC AGA GAA CAC AG-3'

Los productos amplificados en este caso son dos fragmentos de 574 pb en el caso del alelo WT y 1,6 Kpb en el caso del alelo mutante con la inserción (fig. 21 *de Resultados*). Los reactivos utilizados para una mezcla de reacción (volumen de 25  $\mu$ L) fueron los siguientes:

- 11  $\mu$ L H<sub>2</sub>O pura.
- 5  $\mu$ L tampón de carga 5X.
- 2,5  $\mu$ L "buffer" 10X. Concentración final 1X.
- 0,5  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> 50 mM. Concentración final 1mM.
- 1  $\mu$ L dNTPs 2,5 mM. Concentración final 100  $\mu$ M.
- 1  $\mu$ L de primer CHGB1443F stock 20  $\mu$ M. Concentración final 0,8  $\mu$ M.
- 1  $\mu$ L de primer CHGB2006R stock 20  $\mu$ M. Concentración final 0,8  $\mu$ M.
- 1  $\mu$ L de Taq polimerasa.
- 1  $\mu$ L de ADN (300- 500 ng de ADN).

La reacción se realizó en el mismo termociclador que en el caso anterior y las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 95°C, durante 0,25 min.; 65°C, durante 1 min.; 72°C, durante 1,25 min.; esta secuencia se repitió durante 35 ciclos.

Los productos de la PCR fueron separados mediante electroforesis en un gel de 1% de agarosa (Sigma) y se visualizaron mediante marcaje

con bromuro de etidio. El resultado fue la amplificación del fragmento esperado de 1,6 Kb frente al de 574 pb que presentan los individuos homocigóticos del control. Se utilizaron los marcadores de pesos moleculares de 100 pb y 1 Kpb (Biorad) para determinar el tamaño de los fragmentos amplificados.

## **6.2. Inmunohistoquímica.**

Las glándulas adrenales fueron extraídas del animal e inmediatamente fijadas con la solución de Bouin (75 mL de solución acuosa saturada de ácido pícrico, 25 mL de formol y 5 mL de ácido acético glacial) durante 12 horas para conservar la morfología y la composición de los tejidos. Después se procedió a la deshidratación de las muestras con alcohol etílico en concentraciones crecientes y a su inclusión en parafina para permitir el corte del tejido. A partir de los bloques obtenidos, se realizaron cortes seriados de 10  $\mu\text{m}$  que fueron incubados durante 12 h en solución Tris-salino pH 7,6 con el anticuerpo correspondiente diluido a una concentración 1:300. Los anticuerpos utilizados fueron los mismos que el caso del *western-blot* (ver apartado 6.3.3.). El marcaje fue revelado mediante el uso del kit "StreptABComplex Duet Reagent Set Mouse/Rabbit" (Dako, Barcelona). El anticuerpo fue visualizado mediante la reacción de la enzima peroxidasa con la diaminobencidina. También se realizaron experimentos de control omitiendo los anticuerpos primarios para descartar la inespecificidad de estos.

## **6.3. Western-blot.**

### **6.3.1. Obtención de la muestra.**

La glándula suprarrenal se extrajo de los ratones y se sumergió en una solución salina de Locke (154 mM de ClNa, 5,6 mM de ClK, 3,6 mM de  $\text{CO}_3\text{HNa}$ , 5 mM de HEPES y 5,6 mM de glucosa) en hielo para conservar la integridad del tejido. Para estos experimentos se utilizaron 6 individuos de cada clase. La médula suprarrenal se separó del resto del

tejido de la glándula bajo una lupa binocular (Lan Optics). Todo el proceso se realizó manteniendo las glándulas sumergidas en solución de Locke fría en todo momento. Entonces, se procedió a homogenizar las médulas en un homogenizador de vidrio de 100  $\mu$ L de capacidad (Jencons) disolviendo el homogeneizado en solución TENT 1% compuesta por 50 mM de Tris-HCl a pH 7,4, 5 mM de EDTA, 150 mM de ClNa y 1% de Tritón X10, suplementada con un coctel inhibidor de proteasas (COMPLETE, Roche). La cantidad total de proteínas en cada muestra fue determinada, para ello previamente se sometió a ultrasonidos con un sonicador Labsonic® M (Sartorius). El método utilizado para la determinación de proteínas fue el del ácido bicinonínico (Sigma) (Smith et al., 1985).

### **6.3.2. Separación de proteínas por SDS-PAGE.**

La separación de proteínas se realizó por medio de *SDS-PAGE* (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis). Esta técnica consiste en la separación de las proteínas por peso molecular bajo un campo eléctrico.

Teniendo en cuenta que la cantidad final de proteínas cargadas en cada pocillo debía ser 20  $\mu$ g, se realizó una disolución adecuada de cada muestra total en un volumen de tampón de Laemmli (4% de SDS; 20% de glicerol; 10% de 2-mercaptoetanol; 0,004% de azul de bromofenol; y 0,125 M de Tris HCl) tal que, finalmente, quedara al 1,2 X. La adición de este tampón de carga colabora en la desnaturalización de las proteínas ya que contiene SDS y 2-mercaptoetanol. Por otro lado, el glicerol da densidad a la muestra y, por último, el azul de bromofenol facilita el seguimiento de la carrera de las proteínas en el gel. Esta mezcla se disuelve en TENT o H<sub>2</sub>O. Cada muestra se sometió, además, a un choque térmico para la total desnaturalización de las proteínas, esto se realizó concretamente a 95°C durante 3 min haciendo uso de un termobloque (LabNet). Los geles utilizados contenían el 30 % poliacrilamida-SDS y se formaron de forma discontinua; con una zona de empaquetamiento (“stacking”) y otra de separación (“resolving”). Para su elaboración se usó el sistema diseñado

para tal fin (Dual Gel Caster, Amersham) siguiendo las indicaciones del manual. La composición del gel de empaquetamiento fue: acrilamida al 30%; 1,5 M de tampón TrisHCl a pH 8,8; 10% de SDS; 20% de APS; Temed y H<sub>2</sub>O. El gel de separación se compuso de: Acrilamida 30%; tampón 0,5 M de TrisHCl pH 6,8; 10% de SDS; 20% de APS; Temed; y H<sub>2</sub>O.

Se cargó cada muestra en el gel y se utilizó el marcador de pesos moleculares Full-Range Rainbow® (Amersham) y el tampón Laemmli 6x (0,0625 M de Tris-HCl, pH 6,8; 2 % de SDS; 5 % de beta-mercaptoetanol; 10 % de glicerol y 0,002 de % de azul de bromofenol) para rellenar los pocillos vacíos. La electroforesis se llevó a cabo en un sistema de cubeta vertical (Amersham). El tampón de la electroforesis fue *SDS-PAGE* que contiene. La electroforesis se realizó al voltaje adecuado dadas las dimensiones de la cubeta (150-180V).

La visualización directa de las bandas correspondientes al proteoma los gránulos de vaca y ratón, separados por *SDS-PAGE* monodimensional, se realizó mediante el marcaje directo de los geles con azul de coomassie y su posterior digitalización se hizo con el sistema de captura de imagen (Gel Logic 440, Kodak).

### **6.3.3. Transferencia a membrana, visualización y análisis.**

Para realizar el marcaje mediante anticuerpos para proteínas específicas del conjunto de proteínas separadas mediante la electroforesis, las proteínas se transfirieron inmediatamente a una membrana de PVDF ó polivinilideno difluorado (Amersham) para su revelado mediante *western-blot*. Las membranas de este tipo deben ser pretratadas antes de proceder a la transferencia, el objetivo es acondicionar los poros de forma que las moléculas de agua puedan acceder a su interior y permitir el paso de la corriente y por tanto el acceso de las proteínas. Con este fin se sumergieron durante 10 s metanol y luego en agua pura durante 5 min, por último se equilibraron en tampón de

### Material y métodos

---

transferencia (25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina a pH 8,3 y 20% metanol (v/v)) durante 10 min en agitación. Entonces se procedió a la transferencia a membrana de las proteínas bajo un campo eléctrico. Bajo estas condiciones, las proteínas migran del gel hacia el polo positivo donde se sitúa la membrana. Esto se realizó en el sistema provisto por (Amersham) para tal fin. El voltaje al que se realizó la transferencia fue de 100 V durante un tiempo 1-1,5 h. El tiempo se estableció de forma empírica ya que dada la alta masa de las cromograninas su transferencia requiere mayor tiempo.

Previamente al marcaje con el anticuerpo, se bloquearon los sitios de unión inespecífica con 5 % de leche desnatada (Svelty, Nestle) disuelta en TBS-T 1X durante 1 hora en agitación. La composición del es TBS-T (0,005 M de Tris; 0,138 M de NaCl; 0,0027 de KCl; y 0,1 de Tween). Entonces se procedió a la incubación de la membrana con el anticuerpo primario también en tampón TBS-T con 0.5% de leche desnatada durante 1,30 h en agitación. Los anticuerpos y las concentraciones utilizadas fueron anti-CgA, antisuero policlonal de conejo contra un epítipo correspondiente a los aminoácidos 158-457 en el extremo C-terminal de la CgA humana (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz CA, USA, Catalog#sc1309) a 1:4000; anti-CgB, antisuero policlonal de conejo contra los aminoácidos 55-68 de la CgB bovina (cedido por Dr. M.H. Metz-Boutigue, INSERM Unite 575, Strasbourg, France) a 1:4000; anti-SgII, antisuero policlonal contra un fragmento de la secretoneurina de ratón (cedido por Dr. R. Fischer-Colbrie, Universidad de Innsbruck, Austria) at 1:4000 dilución; anti-TH, anticuerpo monoclonal (Sigma, catalogue #T2928) a 1:8000; anti-COX1, un antisuero policlonal contra un péptido del extremo C-terminal de la citocromo oxidasa C (COX1) humana (Santa Cruz Biotechnology, Catalogue #sc23982); y un anticuerpo anti- $\beta$ -tubulina

monoclonal contra la isoforma III de la  $\beta$  tubulina (Chemicon International, Temecula, CA). Después de la incubación con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (“anti-rabbit/anti-mouse/anti-goat”) (1:5000), se trataron con sistema ECL+ (Amersham Biosciences). La señal de quimioluminiscencia emitida por el luminol se detectó con el sistema de captura de imagen (Gel Logic 440, Kodak) y analizado usando el software provisto por el fabricante.

## **7. Seguimiento del peso de la cepa CgA/B-KO.**

El peso de los individuos fue tomado desde la primera semana hasta las 15 semanas de vida, tanto en el grupo de individuos control como en los de la cepa CgA/B-KO, haciendo distinción entre machos y hembras. El número de individuos machos fue de 13 para el grupo control y 12 para el grupo CgA/B-KO. En el caso de las hembras, se hizo el seguimiento de 15 hembras control y 7 hembras CgA/B-KO. Para la comparación de los grupos se utilizó el test de Kruskal-Wallis ( $p < 0,001$ ) para hallar la significación estadística global, las comparaciones entre pares de grupos fue la dada por el test estadístico no paramétrico de la *U* de Mann-Whitney con la corrección de Bonferroni cuyo nivel de significación debió ser inferior a 0,003 (0,05/15 grupos) para ser considerado diferente.

## **8. Obtención y aislamiento de células y orgánulos subcelulares.**

### **8.1. Cultivo primario de células cromafines de ratón.**

El modelo celular elegido en el presente trabajo fueron las células cromafines de la glándula suprarrenal de ratón. El procedimiento para su obtención es el siguiente:

## Material y métodos

---

a. Los ratones son sacrificados mediante dislocación cervical ya que la administración de anestesia puede modificar su respuesta secretora (Herring et al., 2009).

b. Se extraen las glándulas suprarrenales del ratón y se conservan a temperatura ambiente en solución Locke en una placa de Petri de 35 mm de diámetro.

c. Bajo la lupa binocular y con ayuda de unas pinzas de punta muy fina y de una hoja de bisturí, se eliminan la cápsula y la corteza suprarrenal.

d. Proseguimos bajo una campana de flujo laminar vertical (modelo BV-100, Telstar). Las médulas son incubadas durante 15 min en una solución de papaína correspondiente a 15-30 unidades de actividad (Worthington Biochemical Corp.) disuelta en solución de Locke sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ . De esta forma tiene lugar una primera disgregación de tipo enzimático de la matriz extracelular.

e. Tras este periodo de tiempo la solución enzimática es eliminada con una pipeta. Entonces se lavan las glándulas dos veces con la solución salina de Locke y una vez más con medio fresco. Este medio está compuesto por una mezcla de DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) y el medio de Ham F12 (ambos procedentes de Sigma) en una proporción de 1:1, complementado con 10% v/v de suero de ternera fetal (Gibco) y los antibióticos gentamicina (40 mg/L) y penicilina (100.000 UI/L).

f. Se procede entonces a realizar el otro paso de disgregación, pero esta vez de tipo mecánico. Las médulas deben estar resuspendidas en 200  $\mu\text{l}$  de DMEM: HAM-F12. Para ello, se hace pasar las médulas en suspensión a través del orificio de la punta de una micropipeta automática P-1000 y en segundo lugar, a través de una P-100 (ambas Gilson Inc.). Se ha de evitar por todos los medios la aparición de burbujas que destruyan las células.

g. Una vez completamente disgregado el tejido, lo cual se puede comprobar bajo un microscopio invertido, se siembran las células en una placa multipocillos (Nalgene) en la que, previamente, se ha depositado en cada pocillo cubreobjetos de vidrio de 12 ó 5 mm de diámetro estériles (Marienfeld, Lauda- Köenigshofen). Éstos debe haber sido recubierto por una capa de poli-D-lisina (Sigma) para acondicionar la superficie con un sustrato adecuado al que las células puedan adherirse correctamente. Las células se siembran en una densidad aproximada de mil células.

h. Las células se dejan en el volumen de siembra unos minutos en el interior de una estufa de cultivo (Jouan 150) para que se adhieran al fondo del pocillo. Tras este periodo se añade 1mL de medio a cada pocillo y se coloca la placa en una estufa de cultivo con un 5% de CO<sub>2</sub> y atmósfera saturada de humedad a 37°C.

i. Las células son utilizadas durante los dos días siguientes al cultivo.

## **8.2. Obtención, aislamiento y purificación de gránulos cromafines murinos.**

El método seguido consistió en una adaptación del método de Buchanan (Buchanan et al., 2001). Las modificaciones consistieron en estrategias dirigidas a maximizar el rendimiento y la integridad de los gránulos ya que la cantidad de tejido que se obtiene a partir del ratón es muy pequeña. En estos experimentos fueron utilizadas 40 médulas (20 ratones).

a. Se extraen las glándulas suprarrenales del ratón y se depositan en solución de Locke que estará permanentemente en contacto con hielo. Todo el proceso se lleva a cabo en frío para evitar la degradación de la muestra por las distintas proteasas.

b. Se limpia de grasa y restos de otros tejidos bajo una lupa binocular. Para ello, la glándula se sitúa sobre una pieza de papel de filtro



## Material y métodos

---

humedecida en solución de Locke. La cápsula y corteza suprarrenal son eliminadas con ayuda de un bisturí se realiza un corte sagital en la cápsula de forma que se elimina ésta y se extrae la médula envuelta por la corteza suprarrenal. Por último se elimina la corteza.

c. Las médulas limpias se colocan en una nueva placa de Petri con solución de Locke fresca situada sobre hielo en todo momento.

d. Entonces se procede a la homogenización mecánica del tejido haciendo uso de un homogeneizador teflonado de vidrio de 100  $\mu$ L (Jencons). El homogeneizado es resuspendido en 500  $\mu$ L de una solución de homogenización compuesta por: 300 mM de sacarosa; 1 mM de EDTA; 1 mM de  $MgSO_4$ ; y 10 mM de HEPES ajustada a pH 7.

e. Se eliminan los restos celulares y los núcleos sometiendo el homogeneizado a una centrifugación de 1000 xg durante 10 min a 4°C en una centrífuga refrigerada (Sigma 2k15) de rotor de ángulo fijo (Sigma nº 12145). De esta centrifugación se descarta el pellet y se recupera el sobrenadante, denominado en este caso sobrenadante de baja velocidad.

f. Se transfiere el sobrenadante de baja velocidad a un tubo eppendorf limpio y se centrifuga de nuevo, esta vez a 10.000 xg durante 20 min a 4°C. Con este procedimiento conseguimos precipitar en el fondo del tubo la fracción de interés, la granular. Se descarta el sobrenadante denominado sobrenadante de alta velocidad, el cual contiene citosol y microsomas. El pellet obtenido contiene lisosomas, mitocondrias y gránulos cromafines.

Los gránulos cromafines se solapan en densidad con las mitocondrias (Morris et al., 1977). Por este motivo, decidimos purificar la muestra obtenida por medio de un gradiente discontinuo de iodixanol. El iodixanol es una sustancia formadora de gradientes, osmóticamente inactiva, que utilizamos en sustitución de la sacarosa utilizada tradicionalmente para la separación de los gránulos cromafines bovinos (Smith and Winkler, 1967). Basándonos en el método descrito por

O'Connor y Frigon (O'Connor and Frigon, 1984), diseñamos un nuevo método para la purificación de gránulos cromafines de ratón descrito en Díaz- Vera et al. (2010) y que se detalla a continuación:

g. El pellet obtenido mediante el procedimiento anterior se resuspende suavemente en un volumen de 0,2 mL de medio compuesto por: 300 mM de sacarosa, 1 mM de EDTA, 1 mM de MgSO<sub>4</sub> y 10 mM HEPES a pH 7.

h. A continuación se deposita cuidadosamente sobre un gradiente discontinuo de iodixanol (Optiprep®, Nycomed Pharma AS) formado por 0,6 mL de iodixanol al 8% (p/v) sobre 1,2 mL de iodixanol al 18% (p/v), disueltas ambas en una solución compuesta por: 300 mM de sacarosa, 6 mM de EDTA, 6 mM de MgSO<sub>4</sub> y 60 mM HEPES a pH 7. El gradiente fue establecido en tubos LoBin (Eppendorf) para evitar la pérdida de proteínas por adherencia de éstas a las paredes del tubo durante el proceso.

i. Los tubos fueron sometidos a centrifugación a 10000 xg durante 10 h a 4° en una centrifuga refrigerada (SIGMA 2K15; rotor nº:12145).

j. La fracción granular forma un pellet en el fondo del tubo que fue recuperado y resuspendido directamente en 20 µL de tampón desnaturalizante UCTS compuesto por: 8 M de urea; 4% de CHAPS; 40 mM de Tris; 65 mM DTE; y 0,05% SDS con trazas de azul de bromofenol.

k. La muestra fue conservada a -20°C hasta su utilización.

Para comprobar la ausencia de mitocondrias de esta fracción se dividió el tubo en 7 fracciones tras la centrifugación y se tomó cada una de ellas (fig. 43 de *Resultados*). Tras la determinación de la cantidad de proteínas por el método del ácido bicinonínico (Sigma) de cada fracción, se tomaron muestras que fueron preparadas mediante el procedimiento que se describe en el *apartado 6.3.2.*, para la separación de sus proteínas

por *SDS-PAGE* y su posterior visualización mediante *western-blot*. La fracción con mayor contenido en gránulos cromafines fue la situada en el fondo del tubo (nº 7) según reveló el maraje mediante el anticuerpo contra la CgA. La presencia o ausencia de mitocondrias se comprobó mediante el marcador mitocondrial anti-COX1 (para la descripción de los anticuerpos ver el apartado 6.3.3.). Adicionalmente, se utilizó otro marcador mitocondrial, la enzima succinato deshidrogenasa, que se puso de manifiesto según el método colorimétrico descrito anteriormente (Munujos et al., 1993) Se tomó una muestra de cada una de las 7 fracciones y se observó que la ausencia de mitocondrias, según esta prueba, coincidía con los datos del *western-blot* con anti-COX1 (datos no mostrados).

## **9. Elaboración de los electrodos de carbono.**

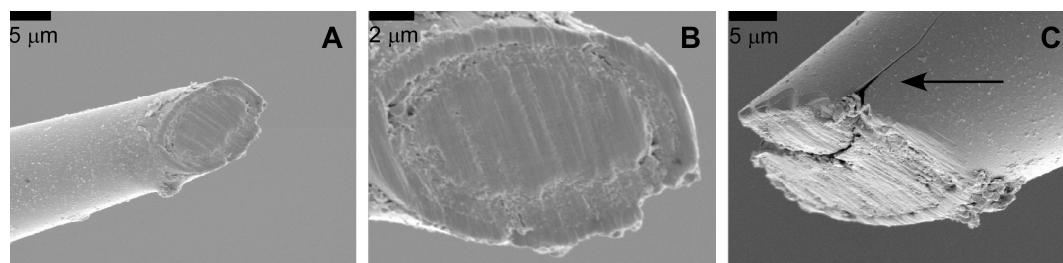
### **9.1. Fabricación.**

La fabricación de microelectrodos se ha llevado a cabo siguiendo el proceso descrito previamente (Kawagoe et al., 1993) con las modificaciones que se describen en Machado et al. (2008). Con una bomba de aire se aspira una fibra de carbono de 6 µm de radio (Thornel P-55; Amoco Corp., Greenville, SC) en un capilar de borosilicato de 1,2 mm de diámetro externo y 0,68 mm de diámetro interno (WPI ref# IB120F-4). El capilar se estira y escinde en 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 el capilar posean un diámetro superior a 25 µm.

Para conseguir un sellado eléctrico adecuado la punta de los electrodos, se sumerge en una resina tipo epoxi (Epon 828, Shell) con un 15% de n-fenilenendiamina (Sigma) a 90°C durante 40 s. Después los

electrodos reposan 12 h a temperatura ambiente y posteriormente endurecen en dos pasos sucesivos de 2 h a 100 y 150°C.

Para conseguir un microelectrodo de superficie activa uniforme se pulen a 45° en una pulidora de diamante negro (Mode lo EG-40, Narishige) utilizando 2-propanol como lubricante que contribuye a eliminar grasa y mejora la ultraestructura en malla del carbono. Ahora la superficie activa es elíptica y pasa a tener aproximadamente 6  $\mu\text{m}$  de radio medio (fig. 15).



**Figura 15. Apariencia de un microelectrodo de carbono ya pulido, imagen tomada mediante microscopía electrónica de barrido. A y B, vista a distinto aumento del electrodo. C, grieta en otro electrodo imperceptible bajo el microscopio. Tomado de Machado et al. (2008) (Machado, 2008).**

## **9.2. Calibración.**

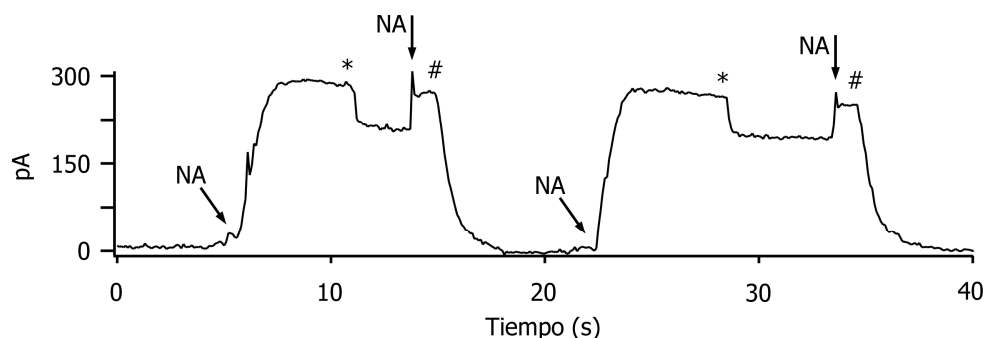
La calibración de cada electrodo se realiza antes de cada experimento. Es importante para comprobar el estado de la superficie activa, asegurando así que las respuestas sean reproducibles, que la proporción señal/ruido sea adecuada y la corriente basal estable. Además se asegura la calidad de detección del electrodo a lo largo del experimento

Para la calibración se utilizó noradrenalina a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ . El capilar se rellena con una solución de KCl 3 M con trazas de Ag para establecer el puente salino. Como electrodo de referencia se utiliza un electrodo de microagregados de Ag/AgCl (WPI #Ref EP2). Para establecer la conexión eléctrica con la fibra se emplea un alambre de Ag cubierto de AgCl que se introduce en el capilar, quedando en contacto con la solución salina y la fibra de carbono. La señal amperométrica se acondiciona en un potenciostato (EI400, Ensmann Instrumentation,

## Material y métodos

Bloomington, IN) y se adquiere a través de una tarjeta, NI USB-6009 de 14 bits (National Instruments. Austin, TEXAS, USA). La señal fue mostrada en un osciloscopio digital integrado en un software diseñado por Yézer González Morales en nuestro laboratorio, mediante el cual se cuantificó la señal.

Un electrodo se considera óptimo si la corriente basal es pequeña y estable, si la respuesta a pulsos, de una concentración dada de noradrenalina, es rápida y constante y si la corriente máxima, cuando se detiene flujo, varía alrededor de 150 pA para un electrodo de 6  $\mu\text{m}$  de radio (fig.16).



**Figura 16. Calibración de un electrodo en el sistema de perfusión con noradrenalina (NA) 50  $\mu\text{M}$ .** En el registro se puede apreciar 4 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. Como se puede apreciar las respuestas son reproducibles y la corriente basal es pequeña y estable.

### **9.3. Fabricación de pipetas para la administración de sustancias.**

El uso de micropipetas para la aplicación de sustancias permite controlar mejor el tiempo de aplicación y la distancia a la célula que los clásicos sistemas de perfusión. Para su construcción se escinde un capilar de borosilicato (WPI ref# IB120F-4) en un proceso de dos pasos en un estirador de pipetas (PC-10, Narishige). De esta manera conseguimos dos

micropipetas, cada una de ellas con una punta de un diámetro aproximado de 2-6  $\mu\text{m}$ .

## **10. Amperometría**

### **10.1. Detección amperométrica de la exocitosis.**

Los registros amperométricos se llevaron a cabo, en el interior de una jaula de Faraday, usando un amplificador EPC10 (Heka). El electrodo de trabajo -microelectrodo- se colocó en el portaelectrodo del preamplificador y se montó sobre un micromanipulador mecánico (Pharma-Robot) unido a la platina de un microscopio invertido (Leica DM-IRB, Wetzlar). Un sistema similar se montó en el otro lado, permitiendo el posicionamiento de la micropipeta para aplicar sustancias por presión positiva. Este sistema de inyección por presión, fabricado en nuestro laboratorio, está regulado por electroválvulas (Lee, Westbrook) que pueden ser controladas manualmente o por ordenador. Las micropipetas se rellenaron con el secretagogo y se situaron lateralmente a 40  $\mu\text{M}$  de la célula. La liberación de estas sustancias se lleva cabo mediante aplicación de presión positiva (gas carbógeno controlado por un sistema de válvulas). Las células se colocaron en una cámara de perfusión de metacrilato que permite el cambio de la solución del baño una solución Krebs-HEPES (140 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1,2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 11 mM de glucosa y 10 mM de HEPES, pH 7.3 (NaOH)) y que tiene incorporado un electrodo de microagregados de plata (Ag/AgCl) (WPI #Ref EP2), que sirve de electrodo de referencia. Entre los dos electrodos se ajustó el potencial de oxidación a +650 mV. La frecuencia de muestreo fue de 4 KHz, que es 10 veces superior a la frecuencia de la señal amperométrica en células cromafines, dando así una buena resolución temporal. La señal se filtró a 1 KHz (filtro tipo Bessel 8 polos) haciendo uso del programa de adquisición y control del amplificador diseñado por HEKA, Patchmaster. Los datos registrados durante 2 min (2 Mb aproximadamente) se almacenaron en el disco duro del ordenador G4 (Macintosh).

Los experimentos de sobrecarga de CA en el citosol se realizaron incubando las células en cultivo con 100  $\mu$ M de L-DOPA en el medio de cultivo durante 90 min (Colliver et al., 2000). La L-DOPA es permeable a la membrana y es el sustrato de la enzima L-aminoácido-aromático descarboxilasa, por lo que provoca el incremento de CA en el citosol.

### **10.2. Análisis de los datos amperométricos.**

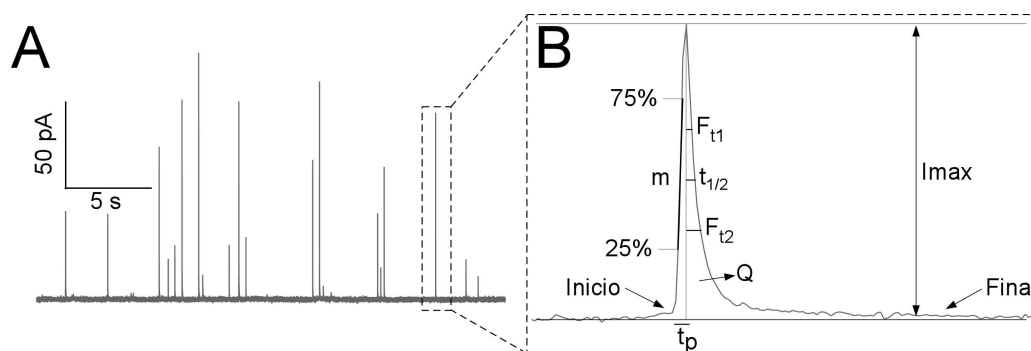
El análisis de datos amperométricos se llevó a cabo usando ficheros con formato binario de IGOR-Pro (Wavemetrics, Oregon) y empleando una serie de programas desarrollados en nuestro laboratorio, que permiten la automatización del proceso de análisis, el programa se denomina “Spike 32” (Segura et al., 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 (ver análisis estadístico).

### **10.3. Parámetros cinéticos de las espigas.**

En la figura 17A se puede ver un fragmento de un registro amperométrico, obtenido de una célula única después de la aplicación de un estímulo secretagogo. La secreción de CA es discontinua, y cada deflexión o “espiga” se corresponde con la medición de CA secretadas desde una sola vesícula (Wightman et al., 1991). En la siguiente imagen

ampliada (fig. 17B), se puede ver una de las deflexiones o espiga amperométrica y los parámetros que caracterizan su morfología y cinética. En algunos casos se puede apreciar lo que se conoce como “pie”, que es una pequeña deflexión que antecede a la fusión completa de la membrana de la vesícula con la membrana celular (Chow et al., 1992), que puede ser apreciada con claridad en los registros en un 30-40% de las espigas de secreción.



**Figura 17. Registro amperométrico.** **A**, fragmento de un registro amperométrico típico. **B**, ampliación de una de las deflexiones o espigas del registro, y los parámetros que caracterizan 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 CA oxidadas proveniente 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.



## Material y métodos

---

- ***m***, es la pendiente media entre el 25 y 75% del valor máximo de amplitud, expresado en nA/s.
- ***tp***, es el tiempo al pico, es decir, el tiempo necesario en alcanzar la amplitud máxima, expresado en ms.
- ***Ft<sub>1</sub>***, tiempo transcurrido hasta que la señal se ha reducido hasta el 63,2% (1-1/e) del valor de amplitud máxima (*I<sub>max</sub>*), expresado en ms.
- ***Ft<sub>2</sub>***, tiempo transcurrido hasta que la señal se ha reducido hasta el 36,8% (1/e) del valor de amplitud máxima (*I<sub>max</sub>*), 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.

### **10.4. Criterios de selección de espigas.**

Para la determinación de los parámetros cinéticos se deben 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 más arriba.
- 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 en CA (Machado, 2008).
- Que tengan un valor de *I<sub>max</sub>* 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<sub>max</sub>*, ya que puede tratarse de dos espigas superpuestas.

### **10.5. Análisis estadístico de las señales amperométricas.**

Los datos se han obtenido de experimentos realizados en el mismo día, con células del mismo cultivo y registrados con el mismo electrodo.

El análisis estadístico utilizado para los parámetros cinéticos es el test de U de Mann-Whitney. Este es un test no paramétrico y tiene como condición que ambas muestras sean independientes y que estén tomados de forma aleatoria. La prueba calcula el llamado estadístico U, cuya distribución para muestras con más de 20 observaciones se aproxima bastante bien a la distribución normal. Se ha utilizado un test no paramétrico ya que los parámetros cinéticos no presentan una distribución normal, sino asimétrica. Para la comparación de más de dos grupos experimentales se ha aplicado la prueba de Kruskal Wallis, equivalente no paramétrico al análisis por ANOVA. En el caso del enfrentamiento de los datos de  $I_{max}$  vs Q el test utilizado fue el U de Mann-Whitney con la corrección de Bonferroni correspondiente.

### **11. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y detección electroquímica de catecolaminas.**

Las dos médulas procedentes de cada animal fueron homogeneizadas con un homogeneizador de vidrio de 100  $\mu$ L (Jencons) en 250  $\mu$ L de una solución que contenía ácido perclórico (0,4 N). El número de glándulas fue de 10 para cada grupo. Tras su paso por el homogeneizador fue añadido a cada tubo un detergente, el Tritón X-100 (Sigma) al 0,05%, para asegurar la rotura de todas las estructuras membranosas y, por lo tanto, la liberación de las CA desde el interior de los gránulos. Tras este paso se centrifugaron todos los tubos a 2264 xg durante 10 min a 4 °C en una centrífuga refrigerada (Sigma 2k15) de rotor de ángulo fijo (Sigma nº 12145). Entonces descartamos el precipitado que contendrá los núcleos y restos celulares y conservamos el sobrenadante con las CA disueltas. De este sobrenadante se tomó 5  $\mu$ L para la medida de la cantidad total de proteínas por el método del ácido bicinconínico.

### Material y métodos

---

Otra porción de 5  $\mu\text{L}$  fue tomada y disuelta en ácido perclórico (0,05 N) más una solución con el estándar interno 3-4 dihidroxibencilamina (DHBA) (100 ng/mL) hasta un volumen total de 1 mL, esta alícuota se usó para determinar la cantidad total de adrenalina y noradrenalina en la muestra. Para la determinación de dopamina, la muestra tomada tuvo que ser aumentada a 50  $\mu\text{L}$ .

Las muestras (25  $\mu\text{L}$  en el caso de la NA y A; y 50  $\mu\text{L}$  para la DA) se inyectaron por medio de un inyector automático (modelo SIL-6B, Shimadzu) y se separaron en un cromatógrafo (modelo 625LC, Waters) a un flujo de 1 mL/min empleando una columna (Tracer Analítica, Teknokroma) de 12,5 cm de largo relleno SPHERISORB ODS-2 con un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ . La fase móvil para la separación de CA que se empleó fue un tampón fosfato en (g/l):  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  9,66; EDTA 0,00372; heptasulfonato sódico 1. El pH se ajustó a 3,1 con ácido fosfórico. Se añadió metanol en cantidad suficiente para acercar los picos al frente de diluyente; la concentración final del metanol varió entre el 1 y el 10 % (v/v). La mezcla se filtró mediante un filtro de 0,22 mm (Millipore) y se desgasificó por burbujeo con helio (Borges et al., 1986).

La detección electroquímica se llevó a cabo a +650 mV (modelo LC-4B, Bioanalytical Sciences) y el registro se digitalizó a una frecuencia de 1 Hz empleando un programa de adquisición desarrollado en nuestro laboratorio por el Dr. José Francisco Gómez González. El tiempo de elución en estas condiciones fue de 200 s para la noradrenalina, 300 s para la adrenalina, 410 s para la DHBA (estándar interno) y 700 s para la dopamina.

La cantidad de cada catecolamina se determinó de acuerdo con la concentración dada a partir de una recta patrón elaborada para cada sustancia. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis para las comparaciones entre grupos independientes ( $p= 0,001$ ).

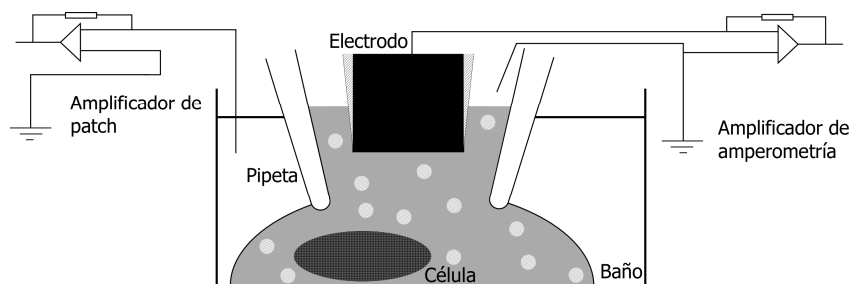
Las comparaciones entre pares de grupos se realizaron con la prueba *U* de Mann-Whitney.

## **12. Detección electroquímica intracelular.**

### **12.1. Procedimiento.**

Esta técnica permite realizar medidas directas de las moléculas oxidables que se encuentran en el citosol celular (Mosharov et al., 2003).

Para llevar a cabo estos experimentos se utiliza la técnica del *patch clamp* que consiste en acercar una pipeta a la superficie celular y sellar la membrana hasta conseguir la resistencia al paso de la corriente de gigaohmios (gigasello). Esto permite el acceso controlado al interior celular. Una vez que se ha llegado a esta configuración se pasa a la configuración de célula entera o *whole-cell* mediante la aplicación de fuerte succión por la pipeta, de forma que no se pierda el gigasello. A partir de este momento, el electrodo de amperometría queda en contacto con el interior de la célula, oxidando todas aquellas moléculas oxidables a un potencial de +700 mV que se encuentren en el citosol (fig. 18). Tras la escisión del parche de membrana, se observa una corriente amperométrica, caracterizada por tener una subida rápida y una bajada más lenta (fig. 19), que se corresponde con las moléculas que difunden desde el citosol hasta el electrodo de amperometría y que están siendo oxidadas. Muchas veces, en esta bajada lenta se observan espigas amperométricas, de características similares a las observadas por amperometría en parche.



**Figura 18. Esquema de la configuración en célula entera utilizada para la realización de los experimentos de detección electroquímica intracelular.** En ella se puede observar cómo el electrodo de amperometría queda en contacto con el interior citoplasmático, una vez roto el parche de membrana. Se representa también el circuito eléctrico de esta configuración.

## 12.2. Elaboración del detector.

El protocolo usado para la fabricación de los electrodos de fibra de carbono es una modificación del descrito por (Chow and von Ruden, 1995; Dernick et al., 2005).

Los electrodos de carbono fueron elaborados bajo una lupa de disección (LAN. OPTICS, Laboran). Para ello se introdujo la fibra de carbono de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro (Thornel P-55, Amoco Corp.) en el tubo de polietileno ( $D=0,80$  mm;  $d=0,40$  mm;  $L=0,5$  mm. Portex) mediante aspiración. La forma y el sellado del electrodo se obtienen mediante calor haciendo uso de una espira hecha de platino/iridio conectada a una fuente de alimentación (Sadelta). La punta del electrodo resultante se corta con un bisturí nuevo antes de cada experimento.

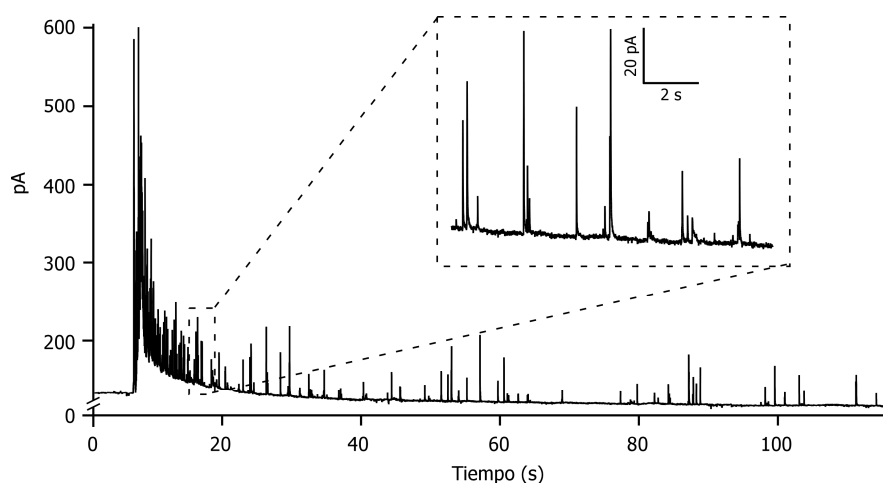
Este electrodo es introducido en el interior de un pipeta de borosilicato ( $D=2$  mm;  $d=1,7$  mm;  $L=100$  mm. Ref.1405076, Hilgenberg GMBH, Alemania), obtenida en un estirador horizontal (P97, Sutter Instrument Company) cuyo diámetro de la punta fue comprobado para cada una y debía estar entre 3-4  $\mu\text{m}$  que finalmente corresponde con una resistencia al paso de la corriente de 1-5  $\text{M}\Omega$ . Para su aislamiento eléctrico, la punta de cada pipeta fue recubierta de cera comercial

(Deliplus, España). La punta de las pipetas fue sometida a un paso de forjado mediante su exposición a una fuente de calor provista por una microforja casera (cedida por el Dr. B. Soria).

### 12.3. Adquisición de los datos.

Mediante la detección electroquímica intracelular en parche se registra la corriente amperométrica debida a la oxidación de las moléculas intracelulares que han difundido hacia el electrodo.

La adquisición se realiza a una frecuencia de 2 KHz y se adquiere mediante una tarjeta de 16 bits (PCI 6025E, NI) controlada mediante un programa creado en Labview en nuestro laboratorio por Yézer González Morales.



**Figura 19. Trazo típico obtenido mediante detección electroquímica intracelular.** El voltaje de oxidación fue de + 700 mV, los catecoles difunden hacia el electrodo, cuantificación se hace mediante la integración de la onda. El momento en el que el sello de membrana se rompe coincide con la elevación brusca de la corriente. En la ampliación se puede observar como se observan espigas amperométricas cuya carga es eliminada mediante un programa creado en nuestro laboratorio.

Los experimentos fueron realizados incubando las células cromafines en cultivo procedentes de los ratones *knock-out* y control con 100  $\mu$ M L-DOPA en el medio de cultivo durante 90 min (Colliver et al., 2000). El inhibidor de la degradación de las CA, pargilina 10  $\mu$ M, estuvo

## Material y métodos

---

presente en el medio durante la incubación con L-DOPA y el tiempo que duró el experimento en la solución Krebs-HEPES de la cámara (Mosharov et al., 2003).

La solución de la pipeta contenía: 140 mM de CsOH; 6 mM de CsCl; 6 mM de HEPES; 0,3 mM de Na-GTP; y 2 mM Mg-ATP. El pH de esta solución se ajustó a pH 7,2 con gluconato de cesio y su osmolaridad final fue 300–315 mOsm.

### **12.4. Análisis de los datos.**

Un programa elaborado en IGOR Pro por Yézer González permite decimar la onda, ya que los archivos son grandes y se hace complicado trabajar con ellos. Además, permite eliminar la carga de las espigas que aparecen en la parte de bajada del registro, asegurando así que sólo estamos contabilizando la corriente oxidativa que proviene del citosol. (fig. 19) y la integración de la onda para determinar la carga total, una vez eliminada la carga de las espigas en la parte de bajada.

### **12.5. Análisis estadístico.**

Los datos se han obtenido de experimentos realizados el mismo día. con células cultivadas el mismo día alternando, entre células de distintos tratamientos, bajo las mismas condiciones y utilizando el mismo electrodo de amperometría.

Para estudiar la carga total en cada tratamiento o grupo experimental, se han tomado los últimos 10 valores de cada integral de la corriente amperométrica (fig. 19).

El análisis estadístico de los datos fue realizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis ( $p= 0,001$ ) como prueba global para las comparaciones entre grupos independientes. Las comparaciones entre pares de grupos se realizaron con la prueba de Mann-Whitney. La corrección para contrastes múltiples se hizo con la prueba de Bonferroni ( $0,05/3= 0,0166$ ).

### 13. Capacidad de membrana en configuración de célula entera o “*whole-cell*”.

Como en el caso de la detección electroquímica intracelular, hicimos uso de la técnica del *patch-clamp*, en su configuración de célula entera, para medir el incremento de la superficie celular debido a la fusión de las vesículas secretoras con la membrana plasmática (Hamill et al., 1981; Neher and Marty, 1982). Esta configuración permite, además, registrar la corriente iónica que resulta del incremento en la conductancia de la membrana celular por el trasiego de iones a través de los canales iónicos.

Las pipetas utilizadas para este experimento fueron elaboradas de la misma manera que las utilizadas para la detección electroquímica intracelular (*ver apartado 12.2.*) con la única diferencia que en este caso se eligió una la punta más cerrada de forma que su resistencia final al paso de la corriente en el baño fue de 3-4 MΩ.

Las células cromafines de ratones procedentes de la cepa CgA/B-KO y su respectivo control, fueron aisladas e incubadas sobre cubreobjetos de 5 mm de diámetro por el procedimiento descrito en el *apartado 8.1*. El día siguiente a su cultivo fueron transferidas en una solución de Krebs-HEPES con 5 mM de Ca<sup>2+</sup> a la cámara de un microscopio invertido con el mismo equipo que el descrito en el *apartado 10.1*. para la amperometría. Los registros de corriente y capacidad fueron obtenidos mediante el programa Patchmaster en el amplificador EPC-10. La configuración fue la de *whole-cell* haciendo uso del Lock-In interno del EPC-10. La solución de la pipeta contenía: 140 mM de CsOH; 6 mM de CsCl; 6 mM de HEPES; 0,3 mM de Na-GTP; y 2 mM Mg-ATP. El pH de esta solución se ajustó a pH 7,2 con ácido glucónico y su osmolaridad final fue 300–315 mOsm. La alta cantidad de Cs en esta solución bloquea las corrientes de salida de K<sup>+</sup> que se dan en las células de ratón. El protocolo de estimulación fue de un pulso cuadrado de 100 ms de duración



## Material y métodos

---

partiendo de un potencial de -80 mV (potencial de reposo de las células cromafines de ratón) hasta -20 mV. Así se produjo la despolarización de la membrana que lleva a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Antes y después de este estímulo se registró la medida continua de la capacidad de membrana a una frecuencia de muestreo de 4 KHz. Sólo aquellos sellos cuya resistencia en serie fue constante y con corrientes de fuga menores de 20 pA, fueron tenidos en consideración.

El análisis se desarrolló mediante la parte de análisis del programa Patchmaster y se realizó comparando la media de la capacidad de la membrana antes y después del estímulo despoarizante, además se tuvo en cuenta eliminación de los artefactos que aparecen antes y después de la medida del registro de corriente. El test estadístico utilizado fue la *U* de Mann-Whitney.

### **14. Proteómica.**

#### **14.1. Tratamiento de la muestra.**

La concentración de proteína óptima para realizar una electroforesis bidimensional de gránulos fue de 100 µg. Estimamos que el número de médulas necesario para obtener esta cantidad de proteína, en ratones control, fue de 40, es decir 20 ratones. Tras establecer esta cantidad no se realizó la determinación de las proteínas en cada muestra para evitar la pérdida de material, por lo que todo el extracto fue utilizado en cada ensayo.

El extracto proteico obtenido a partir de la fracción granular (*apartado 8.2.*) fue centrifugado durante 5 min a 14000 r.p.m. para sedimentar las posibles impurezas. Entonces fue sometido al iosoelectroenfoco (IEF) de las proteínas mediante electroforesis capilar (1,5 mm de diámetro interno y 12 cm de longitud). Para la separación en el rango 4-8 de pH, los capilares fueron llenados con una solución que contenía 3% de acrilamida, 7 M urea, 0,6% de Tritón X-100, 0,75% de

anfolitos pH 5–8, 0,22% de anfolitos pH 3-10 y 0,22% anfolitos de pH 7-9, 0,045% TEMED, y 0,08% de APS. Para la separación de las proteínas en el rango de pH 3-6, la solución contenía la siguiente composición: 0,75% de anfolitos pH 5-8, 0,22% de anfolitos pH 3-5 y 0,22% de anfolitos pH 3-10.

Los tampones anódicos y catódicos fueron 20 mM NaOH y 8,7 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, respectivamente. Las muestras se cargaron en el extremo básico y se sometieron a los pasos del IEF: 1 h a 100 V; 1 h a 300 V; 17,5 h a 1000 V; y 30 min a 2000 V. Después los capilares fueron equilibrados durante 15 min en un tampón reductor que contenía 50 mM de TrisHCl pH 8,8, 30% de glicerol, 6 M de urea, 2% de SDS y 1% de DTT, seguido de un paso de bloqueo en un tampón similar que contenía 2,5% de iodoacetamida en vez de DTT durante otros 15 min. Los geles capilares fueron entonces transferidos a la parte alta de un gel de acrilamida al 10% de medidas 18x18 cm, y grosor 1,5 mm para su separación mediante electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). El gel capilar fue embebido en 0,5 % de agarosa de bajo punto de fusión con trazas de azul bromofenol. El SDS-PAGE fue efectuado a temperatura constante (15°C) y se sometió a: 20 mA durante 15 min y a 50 mA hasta que el frente de azul bromofenol alcanzó el final del gel. Para realizar calibraciones externas, se cargó el marcador de pesos moleculares (Sigma) en la segunda dimensión. Las proteínas separadas fueron visualizadas mediante marcaje con ProtoBlue® Safe (National Diagnost).

#### **14.1.1. Captura de la imagen y análisis.**

Los geles fueron escaneados usando el escáner UMAX (Amersham Biosciences) y las imágenes fueron analizadas con el programa Melanie versión 5.0 (GeneBio, Geneva, Switzerland), que incluye la localización de las bandas, su cuantificación, normalización y el análisis de los datos. Cada asignación de parejas de bandas entre geles fue comprobada

manualmente. Los volúmenes de intensidad de todas las bandas presentes en cada gel fueron normalizadas. Sólo aquellas proteínas que mostraron una expresión diferencial superior a 1,5 veces fueron recortadas del gel y sometidas a su identificación mediante MALDI-TOF-MS.

#### **14.1.2. MALDI-TOF-MS**

Las bandas de proteínas fueron escindidas manualmente del gel marcado con ProtoBlue® Safe. La digestión trípica en gel se realizó en placas de 96 pocillos del tipo ZipPlates (Millipore, Bedford, MA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los péptidos resultantes fueron mezclados con 1  $\mu$ L ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA; 1 mg/mL en 50 % de acetonitrilo y 0,1 % de ácido trifluoroacético). Esta mezcla se distribuyó sobre la placa portamuestras Anchorchip (Bruker-Daltonics). La huella peptídica, en el rango 900-3200 Da, de cada proteína se obtuvo mediante MALDI-TOF-MS (desorción/ionización láser asistida por matriz acoplado a un detector de iones tiempo de vuelo) (modelo Autoflex, Bruker Daltonics). Cada cuatro muestras se calibró el equipo empleando la solución comercial de calibración pepmix (Bruker Daltonics) para calcular la desviación estándar de la masa, que fue menor de 10 ppm en todos los casos. La lista de picos fue creada con el programa Flex Analysis (V2.4).

Los espectros fueron revisados manualmente y sometidos al motor de búsqueda MASCOT para identificación de proteínas usando la base de datos SwisProt. Los parámetros de búsqueda fueron determinados de acuerdo con los siguientes criterios: *Mus musculus* para la taxonomía, carbamidometilación de las cisteínas (C) para las modificaciones fijas, oxidación de las metioninas (M) para las modificaciones variables y  $\pm 100$  ppm para el error de la masa.

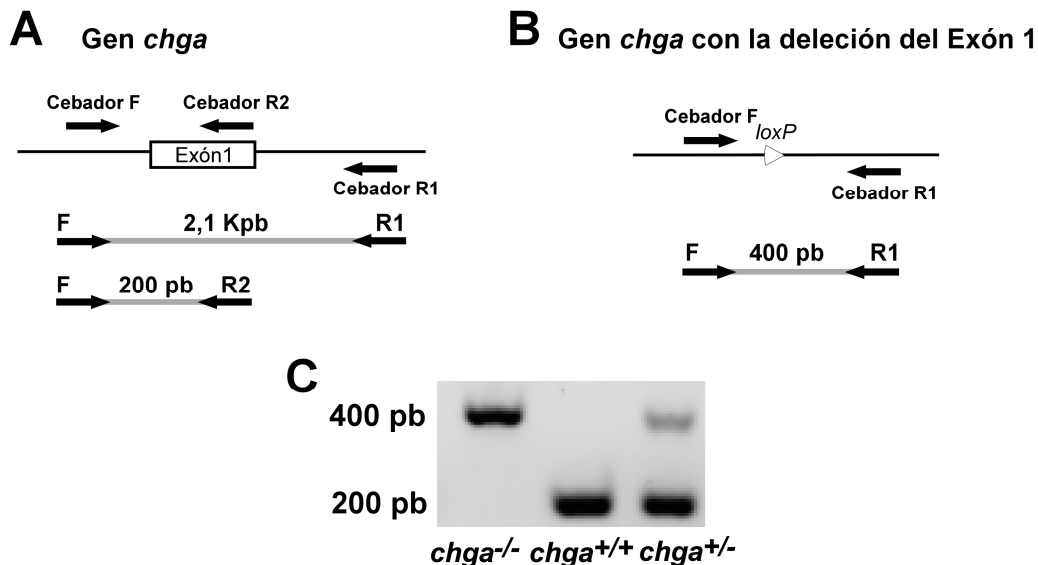
## **15. Microscopía electrónica.**

Los ratones fueron anestesiados por medio de 60 mg/kg de pentobarbital sódico (Doletal, Vétoquinol). Las glándulas fueron extraídas y fijada por inmersión durante 12 horas en 2% de paraformaldehído y 2% de glutaraldehído en 0,1 M de tampón fosfato (pH 7,4) a 4°C. Entonces se siguió un protocolo de preparación de la muestra para microscopía electrónica estándar según se describe por Luján et al. (1996) (Luján et al., 1996). Brevemente, el tejido fue lavado y sometido al proceso de post-fijación en 1% de tetróxido de osmio durante 30 min. Tras el lavado de la preparación, ésta fue tratada con 0,1% de acetato de uranilo y posteriormente deshidratada en concentraciones crecientes de etanol y embebidas en la resina epoxy (Durcupan). Las secciones ultrafinas de 70-90 nm fueron cortadas con un ultramicrotomo (Reichert Ultracut E; Leica) y puestas sobre rejillas de níquel de malla 200. El marcaje fue realizado en gotas de 1% de acetato de uranilo acuoso seguido de citrato de plomo de Reynold. El análisis ultraestructural fue llevado a cabo en un microscopio electrónico de transmisión Jeol-1010.

## ***Resultados***

## 16. Las cepas de ratones CgA-KO y CgB-KO carecen de genes funcionales *chga* y *chgb* respectivamente.

Los individuos identificados como CgA-KO son homocigóticos para la delección que se les produjo en el exón 1, por lo tanto no expresan el gen *chga*. El motivo de que la banda que indica esta condición sea de masa mayor a la que aparece en los individuos de la cepa control (*chga*<sup>+/+</sup>), responde a la estrategia utilizada. Ésta consistió en el uso de tres oligonucleótidos cebadores por el motivo que se explica en el apartado 6.1.2.1. (Material y Métodos) (fig. 20).

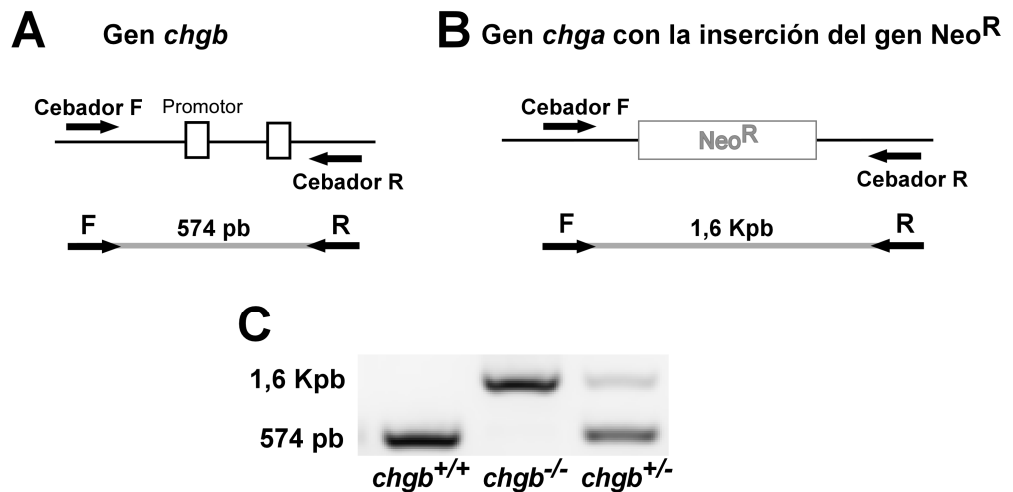


**Figura 20. La cepa de ratones CgA-KO carece de una copia funcional del gen *chga*.** Productos obtenidos tras la amplificación por PCR del gen *chga* haciendo uso de los tres oligonucleótidos cebadores; cebador F, cebador R1 y cebador R2. **A**, los productos que se dan en el caso del gen nativo son dos; 2.1 Kpb y 200 pb. **B**, cuando el exón 1 se encuentra delecionado se amplifica mediante la PCR un único fragmento de 400 pb. **C**, Imagen de los productos amplificados mediante PCR tomando como molde el ADN genómico de cada individuo, tras su separación mediante electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes.

El proceso de genotipado de la cepa CgB-KO se realizó igualmente mediante PCR y el resultado se muestra en la figura 21. Las bandas fueron las esperadas dado el diseño que se siguió para la elaboración de

## Resultados

la cepa de ratones sin CgB, para mayor detalle ver apartado 6.1.2.2. (*Material y Métodos*). La introducción del inserto que interrumpe la correcta transcripción del gen *chgb* en los individuos CgB-KO, tuvo como efecto la amplificación del fragmento esperado de 1,6 Kb frente a las 574 pb que presentan los individuos homocigóticos del tipo control (fig. 21).



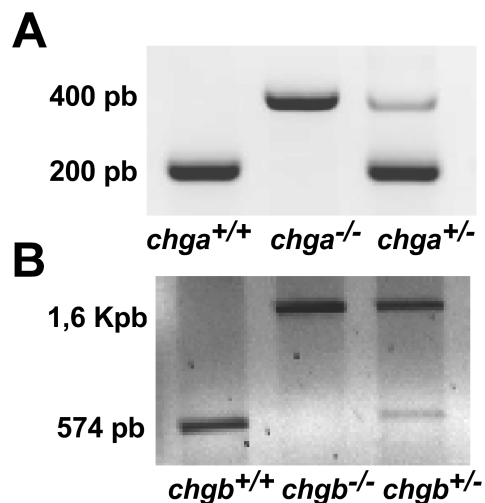
**Figura 21. La cepa de ratones CgB-KO carece de una copia funcional del gen *chgb*.** Productos obtenidos tras la amplificación del gen *chgb* haciendo uso de dos oligonucleótidos cebadores; cebador F (F) y cebador R (R). **A**, la banda que se observa en el caso del gen nativo tiene un tamaño de 574 pb. **B**, por el contrario cuando la región promotora se encuentra interrumpida por el gen de resistencia a la neomicina en los individuos *chgb*<sup>-/-</sup>, se amplifica un fragmento de 1,6 Kpb. **C**, Imagen que muestra los productos amplificados mediante PCR tomando como molde el ADN genómico de cada individuo y separados mediante electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes.

### 17. Los individuos CgA/B-KO, resultantes del cruce de las cepas CgA-KO y CgB-KO, son viables y fértiles.

El cruce de las cepas de ratones *knock-out*, CgA-KO y CgB-KO, dio como resultado individuos viables y fértiles sin CgA ni CgB. Con la única diferencia visible de un incremento en la agresividad de los individuos que hizo necesario en ocasiones el aislamiento de algunos individuos.

La cepa CgA/B-KO se estableció en homocigosis para las dos deleciones durante más de 10 generaciones. Se realizó el mismo

procedimiento para obtener una cepa control con un fondo genético isogénico. Para asegurar el correcto establecimiento de las nuevas cepas, se realizó el genotipado sistemático de los individuos de cada camada, hasta su definitivo establecimiento. El resultado del genotipado por PCR de estos individuos se muestra en la figura 22.



**Figura 22.** La cepa de ratones CgA/B-KO carece de una copia funcional de los genes *chga* y *chgb*. Separación por electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados mediante PCR. **A**, patrón de bandas esperado para la amplificación de la región del gen *chga*. **B**, patrón de bandas esperado para la amplificación del gen *chgb*. Cada carril se corresponde con el mismo individuo en ambos geles.

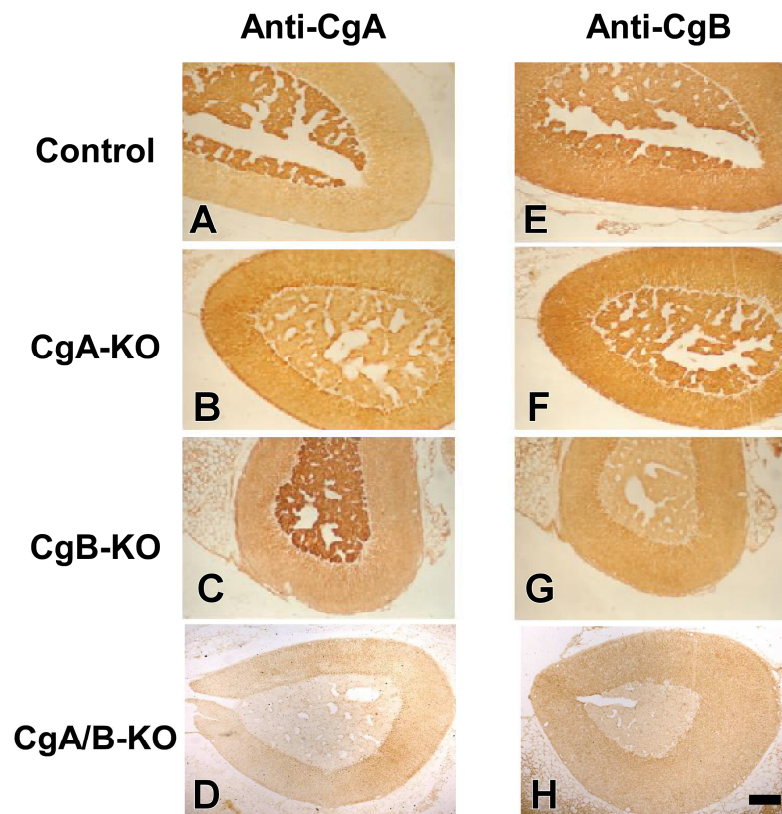
## 18. El tejido adrenal de los ratones KO no expresa las cromograninas A y/o B.

Las glándulas suprarrenales de las tres cepas transgénicas presentaron la misma talla y peso, salvo en el caso de la cepa CgA/B-KO, en la cual las médulas pesan 3 veces más que en el control (1,35 mg frente a 0,45 mg en el control). Con la intención de comprobar que la interrupción de los genes *chga* y *chgb* se traducían efectivamente en la ausencia de la expresión de la CgA y CgB, se procedió al marcaje inmunohistoquímico de cortes de las glándulas adrenales. Éstas procedían



## Resultados

de las cepas CgA-KO, CgB-KO y CgA/B-KO y fueron comparadas con el marcaje por los mismos anticuerpos en sus respectivos controles. El marcaje con los anticuerpos anti-CgA y anti-CgB mostró la ausencia de la CgA en la cepa CgA-KO; de la CgB en la cepa CgB-KO; y de ambas en la cepa CgA/B-KO (fig. 23). En los ratones control de las tres cepas se halló CgA y CgB en todos los casos. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con el Dr. Agustín Castañeyra Perdomo y la Dra. Emilia Carmona Calero.

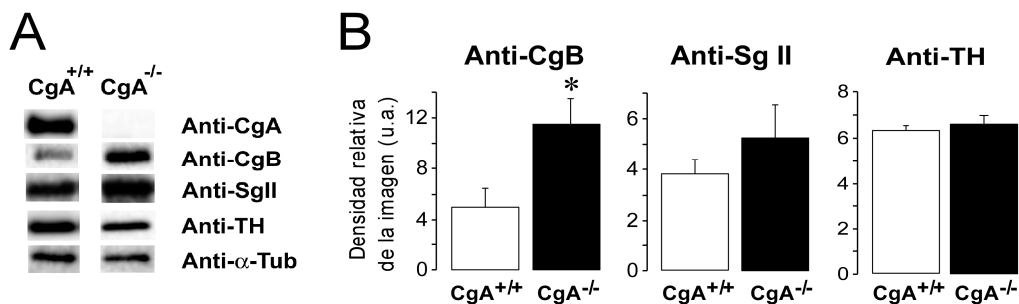


**Figura 23. Las médulas adrenales de los ratones CgA-KO, CgB-KO y CgA/B-KO no expresan CgA o/y CgB.** Hismunohistoquímica de cortes de la glándula adrenal de cada cepa en comparación con el marcaje en la glándula procedente de una cepa control. Nótese cómo los precipitados de DAB que se detectan en el control al reaccionar con los anticuerpos anti-CgA (A) y anti-CgB (F), desaparecen en las glándulas procedentes de las cepas CgA-KO (B) y CgB-KO (G), y en ambos casos en la cepa CgA/B-KO (D y H). La barra indica 150  $\mu$ m.

## 19. El silenciamiento de la expresión de una cromogranina altera los niveles de expresión de las otras cromograninas.

Haciendo uso de la técnica de *western-blot* se caracterizó el perfil de expresión de las principales proteínas que forman la matriz intragranular ante la carencia de las dos graninas mayoritarias; la CgA y la CgB. La separación de las proteínas por *SDS-PAGE* se llevó a cabo a partir de extracto de proteína de la médula adrenal de los ratones *knock-out*, y los resultados fueron enfrentados a los de sus respectivos controles.

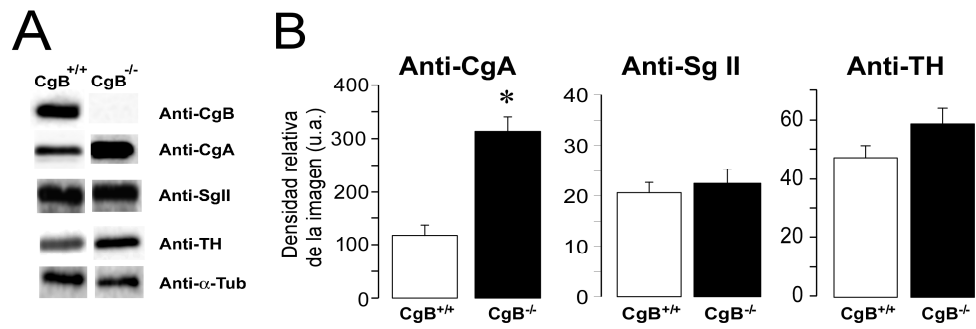
En primer lugar, se confirmó la ausencia total de CgA en el inmunoblot de las médulas adrenales de los individuos CgA-KO (fig. 24A). Además, se puso de manifiesto la sobre-expresión promedio de 2,2 veces de la CgB con respecto al control en dicho tejido (fig. 24B). En cuanto a la expresión de la SgII no se halló cambios estadísticamente significativos, aunque se pudo observar una tendencia hacia la sobre-expresión. Por otro lado, la expresión de la TH no pareció verse afectada por la desaparición de la CgA (fig. 24A y B).



**Figura 24. El perfil de expresión de otras proteínas de la matriz se altera ante la ausencia de CgA.** **A**, expresión de las principales graninas y la enzima TH en los homogeneizados de médula adrenal procedentes de individuos CgA-KO vs. su respectivo control. Como control de carga del *western-blot*, se utilizó el marcaje con anti- $\alpha$ -tubulina de cada carril. **B**, los diagramas de barras mostrados corresponden a la media de la intensidad neta (media  $\pm$  error estándar) de las bandas de tres individuos distintos para cada grupo (dos médulas por individuo). Se corrigió este valor usando la cantidad de  $\alpha$ -tubulina como control interno de carga. La cantidad de proteína total por pocillo fue de 20  $\mu$ g. El test estadístico utilizado fue la prueba *U* de Mann-Whitney. \* $p < 0,05$ .

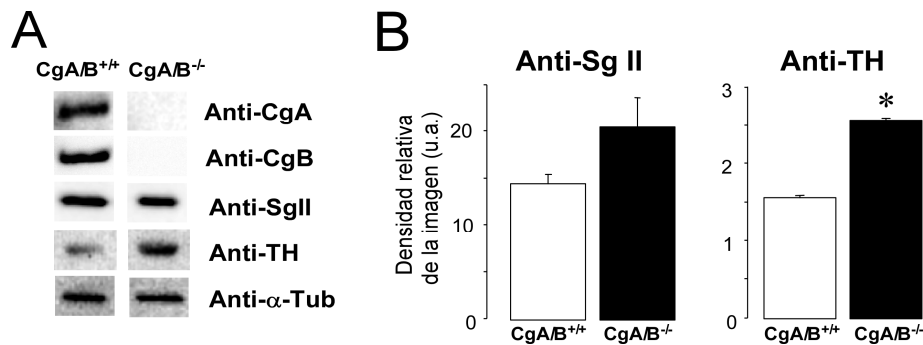
## Resultados

Por otra parte, el estudio mediante la misma técnica de los extractos proteicos procedentes de las médulas adrenales de los individuos CgB-KO, puso de manifiesto la sobre-expresión de 2,6 veces de la CgA en respuesta a la ausencia de CgB. En cuanto a la cantidad de la SgII, tampoco fue posible determinar un cambio en cuanto a su abundancia (fig. 25 A y B).



**Figura 25. El perfil de expresión de otras proteínas de la matriz también se altera ante la ausencia de CgB.** A, expresión de las principales graninas y la enzima TH en los homogeneizados de médula adrenal de homogeneizados de médula adrenal procedentes de individuos CgB-KO vs. su respectivo control. Como control de carga del *western-blot*, se utilizó el marcaje con anti- $\alpha$ -tubulina de cada carril. B, los histogramas mostrados corresponden a la media de la intensidad neta (media  $\pm$  error estándar) de las bandas de tres individuos distintos para cada grupo (dos médulas por individuo). Se corrigió este valor usando la cantidad de  $\alpha$ -tubulina como control interno de carga. La cantidad de proteína total por pocillo fue de 20  $\mu$ g. El test estadístico utilizado fue la prueba *U* de Mann-Whitney. \* $p < 0,05$ .

En los extractos medulares de los ratones CgA/B-KO se reveló de nuevo la ausencia de expresión de las dos graninas mayoritarias; CgA y CgB. En cuanto a los niveles de expresión de la SgII se observó su tendencia hacia el incremento, pero ésta no fue estadísticamente significativa. Es de destacar, la importante variación en la expresión de la TH de forma que su expresión se vio incrementada 1,6 veces con respecto al control (fig. 26).

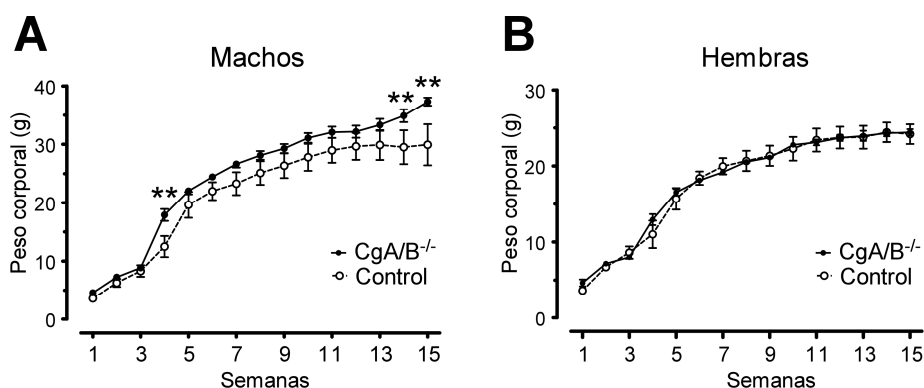


**Figura 26. La expresión de TH se ve alterada ante la carencia de CgA y CgB en la cepa CgA/B-KO.** **A**, Imagen de las principales graninas y la enzima TH en los homogeneizados de médula adrenal procedentes de individuos CgA/B-KO vs. su respectivo control. **B**, los diagramas de barras muestran la media de la intensidad neta (media  $\pm$  error estándar) de las bandas de tres individuos distintos para cada grupo (dos médulas por individuo). Se corrigió este valor usando la cantidad de  $\alpha$ -tubulina como control interno de carga. La cantidad de proteína total por pocillo fue de 20  $\mu$ g. El test estadístico utilizado fue la prueba *U* de Mann-Whitney. \* $p < 0,05$ .

## 20. Evolución temporal del peso de los ratones CgA/B-KO.

La cepa de ratones con la doble delección (CgA/B-KO) mantiene su capacidad de reproducción y su viabilidad. Con objeto de estudiar la evolución temporal del peso de los individuos como indicador de posibles desórdenes asociados a las mutaciones, se procedió a hacer un seguimiento durante las 15 primeras semanas de vida de los ratones de la cepa CgA/B-KO. Los datos fueron promediados y enfrentados a la curva obtenida de los individuos control. Se hizo diferenciación entre los machos (fig. 27A) y las hembras (fig. 27B) de las camadas.

## Resultados



**Figura 27. El peso corporal de los ratones CgA/B-KO machos incrementa a medida que envejecen.** **A**, peso corporal (media  $\pm$  error estándar) de los ratones machos CgA/B-KO (n=12) frente a sus respectivos controles (n=13); los individuos pesados entre la semana 1 y 15 a partir de su nacimiento. **B**, ídem para las hembras de las mismas camadas. Hembras CgA/B-KO (n=7) y control (n=15). La significación estadística global fue la dada por el test de Kruskal-Wallis ( $p < 0,001$ ). Las comparaciones entre pares de grupos se realizaron con la prueba *U* de Mann-Whitney con la corrección de Bonferroni ( $0,05/15 = 0,003$ ).

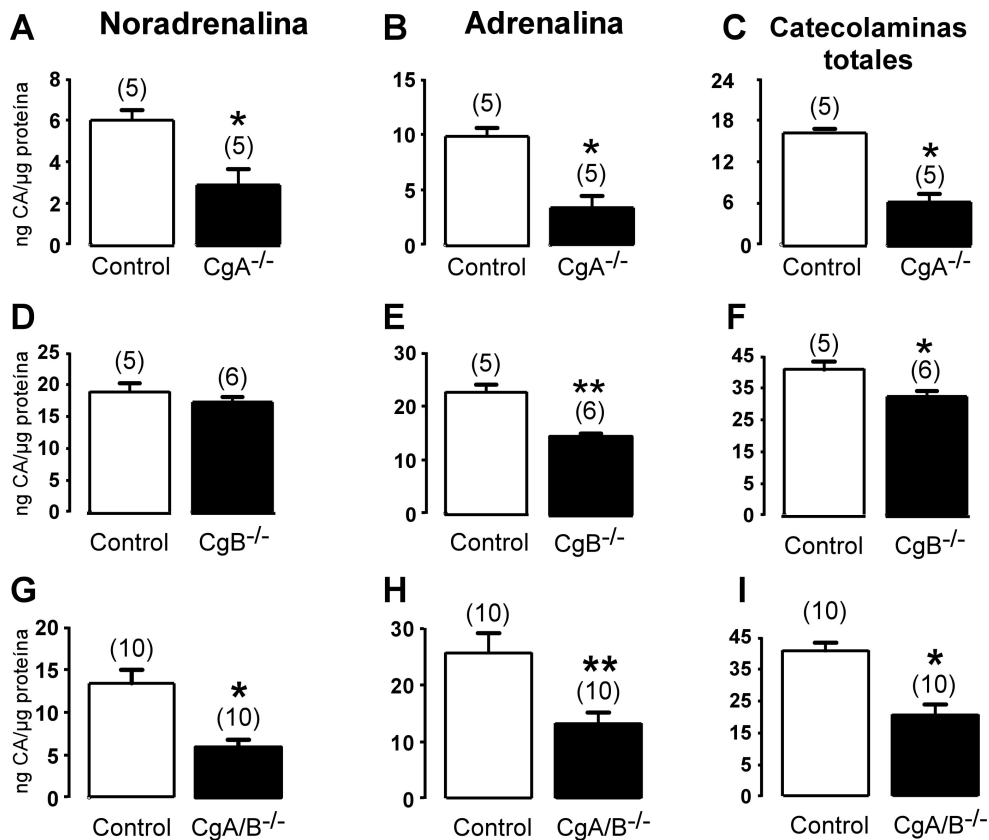
El resultado mostró el incremento de peso corporal en los individuos macho CgA/B-KO, éste se hace significativo a partir de la decimocuarta semana de vida. A pesar de este hecho la tendencia apunta hacia un incremento de peso en los individuos de la cepa CgA/B-KO desde la cuarta semana de vida (fig. 27). El peso en las hembras es similar al encontrado en el grupo control en este periodo de tiempo.

### 21. La cantidad de catecolaminas en la médula adrenal se encuentra alterada.

La detección de las CA presentes en los homogeneizados de las glándulas adrenales de cada cepa se hizo mediante HPLC con detección electroquímica. La reducción de las catecolaminas en el tejido de la médula adrenal ocurre en los tres ratones *knock-out* (fig. 28C, F e I). Si hacemos distinción entre adrenalina y noradrenalina, la adrenalina se redujo un 65% en las glándulas CgA-KO (fig. 28B), un 36% en las CgB-KO (fig. 28E) y un 48% en la CgA/B-KO al comparar con las glándulas de los controles (fig. 28H). En cuanto a la noradrenalina, se redujo sólo en el caso de los animales CgA-KO y CgA/B-KO, un 56% (fig. 28A) y un 52%

(fig. 28G) respectivamente. No hubo variación en la cantidad de dopamina en ninguno de los tres casos (datos no mostrados).

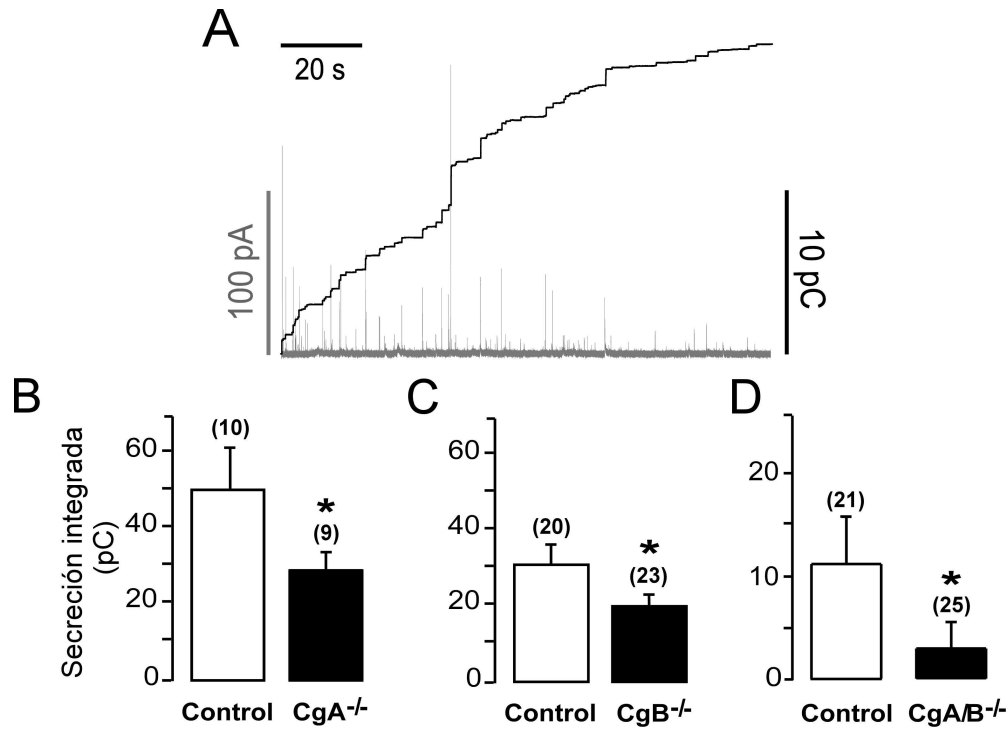
A pesar de esta reducción en el contenido de catecolaminas en la glándula adrenal, la proporción entre las dos especies químicas, NA y A, tiende a mantenerse salvo en el caso de la cepa CgB-KO, en cuyo caso la reducción afecta exclusivamente a la adrenalina (figuras 28D y 28E).



**Figura 28.** La cantidad de catecolaminas se reduce en las glándulas adrenales de las tres cepas de ratones *knock-out*. **A, D y G,** Cantidad de noradrenalina medida (media  $\pm$  error estándar) en homogeneizados procedentes de médulas CgA-KO (**A**), CgB-KO (**D**) y CgA/B-KO (**G**) frente a sus respectivos controles. **B, E y H,** cantidad de adrenalina medida los ratones CgA-KO (**B**), CgB-KO (**E**) y CgA/B-KO (**H**) frente al control. **C, F e I,** cantidad total de CA medida en los ratones CgA-KO (**C**), CgB-KO (**F**) y CgA/B-KO (**I**) frente al control. El número entre paréntesis indica el número de médulas en cada caso y el test estadístico elegido fue la prueba *U* de Mann Whitney \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

## **22. La ausencia de cromograninas causa una respuesta secretora menor.**

La respuesta secretora de las células procedente de las distintas cepas de ratones fue estudiada mediante amperometría en célula única. Esta técnica electroquímica permite la detección de especies oxidables como las CA. A priori, el proceso de liberación no es abolido en ninguno de los tres casos, incluso se da a pesar de la carencia de la CgA y la CgB en la cepa CgA/B-KO. Una vez comprobado esto, se procedió a estimar la cantidad total liberada por célula mediante la integración del área bajo la curva del trazo de corriente (fig. 29). El resultado de esta operación muestra la reducción en la cantidad de CA detectadas durante el tiempo del registro en los tres casos. Por su parte, las células procedentes de la cepa CgA-KO secretan un 40% menos de CA que el control (fig. 29B), las procedentes de la cepa CgB-KO lo hacen en un 33% menos (fig. 29C) y las procedentes de la cepa CgA/B-KO reducen su liberación de forma drástica en un 77% menos (fig. 29D).

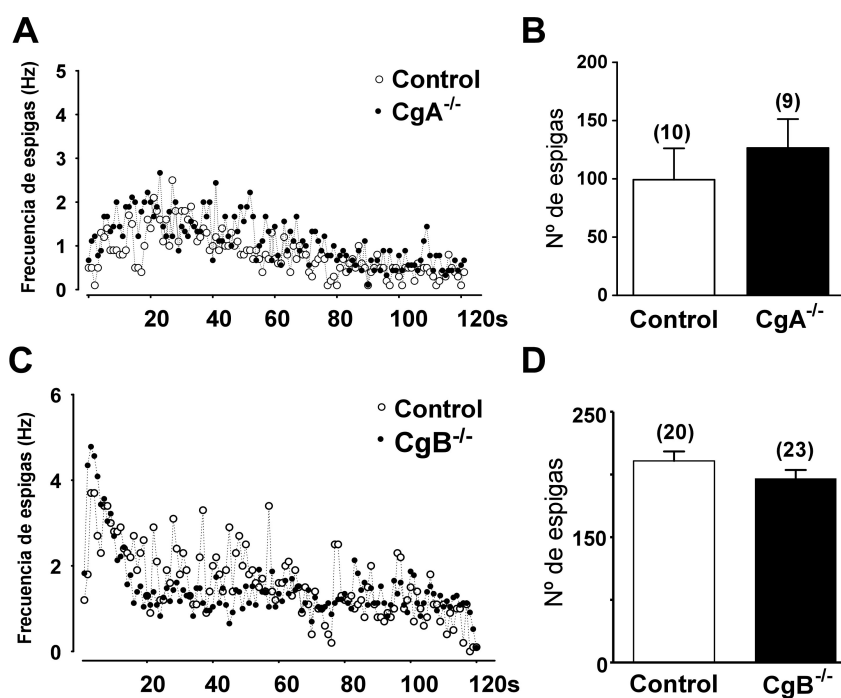


**Figura 29. La secreción total por parte de las células cromafines procedentes de las tres cepas se encuentra reducida.** A, el trazo gris muestra un registro amperométrico típico tras la estimulación con BaCl<sub>2</sub> 5 mM durante 10 s (pA). El trazo negro indica el resultado de la integración del registro de corriente e indica la secreción de forma acumulada (pC). B, secreción total media de las células cromafines de la cepa CgA-KO frente a su control (media ± error estándar). C, ídem para la cepa CgB-KO. D, ídem para la cepa CgA/B-KO. Entre paréntesis se muestra el número de células por grupo. El test estadístico utilizado fue la prueba *U* de Mann-Whitney \**p*<0,05.

### 23. La frecuencia de las exocitosis sólo se reduce en las células cromafines de los ratones CgA/B-KO.

La amperometría permitió también estimar el número y la frecuencia de exocitosis. En las células cromafines procedentes de los ratones CgA-KO y CgB-KO no se observó reducción en el número de eventos (fig. 30B y D), ni en la frecuencia de aparición de estos (fig. 30A y C), por lo que se descartó que fuera la causa de la reducción de la cantidad de CA totales secretadas por las células.



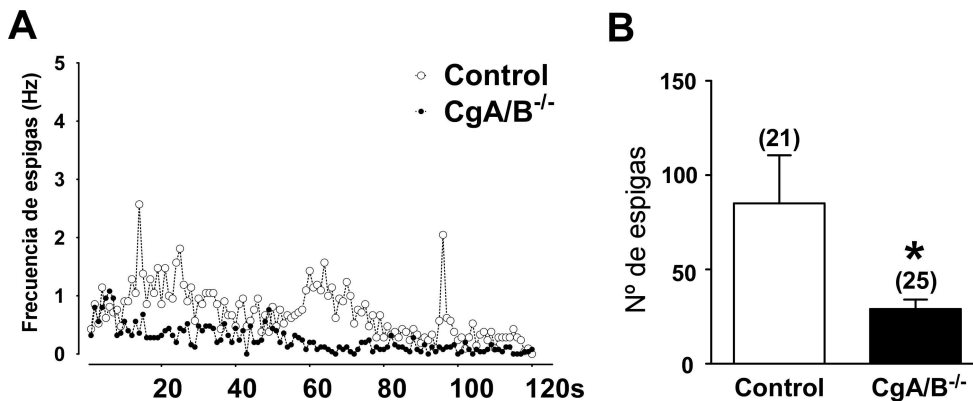


**Figura 30. La frecuencia de las exocitosis no se modifica cuando se encuentra ausente la CgA ó la CgB.** Distribución del numero medio de exocitosis por segundo durante 2 min de registro total tras la estimulación con 5 mM de BaCl<sub>2</sub> de las células CgA<sup>-/-</sup> (A) y CgB<sup>-/-</sup> (C) frente a sus respectivos controles. Número medio de espigas totales liberadas por células cromafines de la cepa CgA-KO (B) y CgB-KO (D) frente a su respectivo control (media ± error estándar). Entre paréntesis se muestra el número de células por grupo. El test estadístico utilizado fue la prueba *U* de Mann-Whitney.

No ocurre lo mismo cuando son eliminadas ambas cromograninas de la matriz intravesicular al mismo tiempo. El análisis de los registros amperométricos de las células procedentes de la cepa CgA/B-KO mostró que, al menos en parte, puede explicarse la reducción en la secreción total por la disminución del 66% en la frecuencia con la que aparecen las exocitosis tras el estímulo secretagogo (fig. 31).

Sin embargo, el análisis de la capacidad en célula entera de estas células desveló que las células incorporan la misma cantidad de membrana ( $16 \pm 1,13$  fF de incremento en la capacidad de las células control frente a los  $14,08 \pm 1,5$  fF de las células CgA/B-KO) que en las

células control tras un estímulo eléctrico despolarizante que produce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y por lo tanto la exocitosis.



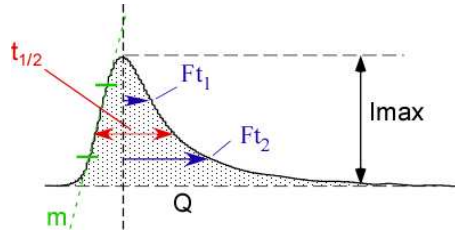
**Figura 31. La frecuencia de las exocitosis se reduce cuando faltan de manera simultánea la CgA y CgB.** A, distribución de los eventos durante 2 min tras la estimulación con 5 mM de  $\text{BaCl}_2$  (expresados en Hz) en células cromafines procedentes de ratones CgA/B-KO y su control respectivo. B, número medio de espigas en las células cromafines de la cepa CgA/B-KO frente a su control (media  $\pm$  error estándar). Entre paréntesis se muestra el número de células por grupo. El test estadístico utilizado fue la prueba *U* Mann-Whitney \* $p < 0,05$ .

#### 24. La cantidad de catecolaminas liberada por cada vesícula secretora se reduce en las tres cepas de ratones transgénicos.

La amperometría no sólo permite el estudio de la cantidad total de CA liberadas y la frecuencia con la que las vesículas liberan su contenido, sino que también proporciona la resolución temporal necesaria para analizar la “forma” en la que ese contenido es liberado por exocitosis (Wightman et al., 1991). El estudio de este aspecto es lo que se denomina cinética de la exocitosis y se estudia extrayendo los parámetros que se muestran en la tabla 2 de cada una de las deflexiones de la corriente o “espigas”. Cada una de estas “espigas” corresponde normalmente con la oxidación del contenido liberado de forma cuántica por cada una de las vesículas o gránulos secretores.

## Resultados

Tabla 2. Comparación del contenido liberado y las características cinéticas de las espigas secretoras de las cepas de ratones *knock-out*.



A	$I_{max}$ (pA)	Q (pC)	$t_{1/2}$ (ms)	m (nA/s)	Ft <sub>1</sub> (ms)	Ft <sub>2</sub> (ms)	n
<b>Control</b>	43.0±3.6	0.67±0.08	14.7±2.3	15.8±2.4	17.7±1.6	38.4±2.6	10
<b>CgA<sup>-/-</sup></b>	42.3±6.0	0.44±0.04**	9.8±0.7*	14.7±2.4	12.9±1.9*	31.0±2.6*	9
<b>Cambio</b>	-2%	-34%	-33%	-7%	-27%	-20%	
<b>B</b>							
<b>Control</b>	61.4±7.8	0.39±0.05	6.1±0.5	27.5±3.5	2.9±0.2	5.9±0.6	20
<b>CgB<sup>-/-</sup></b>	33.5±5.8**	0.27±0.04*	6.42±0.4	14.2±2.7**	3.7±0.2	6.1±0.4	20
<b>Cambio</b>	-45%	-31%	+5%	-48%	+28%	+22%	
<b>C</b>							
<b>Control</b>	25.4±2.7	0.26±0.03	9.2±0.4	10.7±1.4	4.6±0.3	8.9±0.5	12
<b>CgA/B<sup>-/-</sup></b>	14.3±1.4**	0.15±0.02**	9.62±0.8	6.1±0.7**	4.8±0.4	9.7±0.9	17
<b>Cambio</b>	-56%	-42%	+5%	-43%	+4%	+9%	

Datos expresados en las unidades indicadas. El test estadístico utilizado fue la prueba *U* Mann-Whitney \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

El análisis amperométrico se realizó mediante el estudio comparativo y de forma individual de las exocitosis de cada vesícula en las células de las tres cepas de ratones *knock-out*. La ausencia de CgA y la sobre-expresión de la CgB en las células CgA-KO, se tradujo en la reducción del 34% de la cantidad de CA detectada en cada liberación, esta observación se acompaña de la modificación de la segunda parte de las espigas. Las espigas secretoras no muestran cambios en la pendiente de ascenso ( $m$ ), por el contrario sí se observa la reducción de la duración de la espiga ( $t_{1/2}$ ) acompañada de una fase de caída más rápida (Ft<sub>1</sub> y Ft<sub>2</sub>). Esto sugiere que la disociación de las CA desde la matriz vesicular ocurre

de forma más rápida en las células CgA-KO cuya matriz es rica en CgB. Estas modificaciones no se acompañaron de una reducción en la altura máxima de las espigas ( $I_{max}$ ) (tabla 2A).

El contenido de CA liberado por las vesículas secretoras de los ratones CgB-KO, al igual que en el caso anterior, es menor (tabla 2B). Sin embargo, en este caso se observa una reducción de los parámetros que miden la salida inicial de catecolaminas ( $I_{max}$  y  $m$ ), más que en aquellos que cuantifican la parte más tardía de la liberación ( $t_{1/2}$ ,  $Ft_1$  y  $Ft_2$ ) (tabla 2B). Por lo tanto, la falta de CgB y la sobre-expresión de CgA, parece modificar el mecanismo de retención de CA en el interior de las vesículas, haciendo que las CA sean retenidas durante más tiempo antes de ser liberadas.

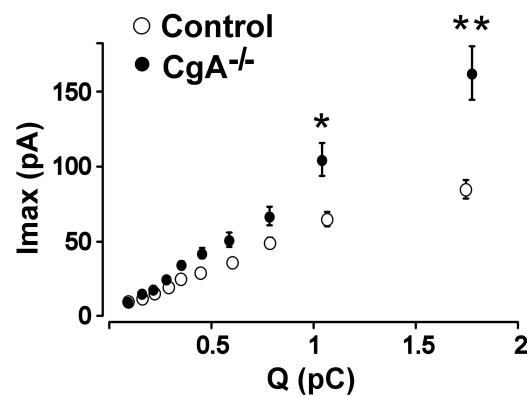
Por último, los resultados de las células CgA/B-KO, fueron similares a los obtenidos en las células cromafines procedentes de los ratones CgB-KO. El contenido en CA de cada vesícula se reduce hasta quedar en un 58% del contenido de las vesículas control y la pendiente de subida de la corriente se reduce en un 42% lo que indica el retraso debido a algún componente intragranular en la liberación de las CA (tabla 2C).

**25. La relación entre la concentración de CA que alcanza el electrodo ( $I_{max}$ ) y el contenido en CA de las vesículas secretoras (Q) se encuentra alterada.**

En condiciones normales en cuanto a la composición de la matriz, el incremento en la carga de CA de una vesícula secretora se acompaña de un incremento proporcional en la altura máxima que alcanza la corriente de oxidación (Grabner et al., 2005). No ocurre así, cuando se enfrentan los datos de  $I_{max}$  y Q referidos a las espigas procedentes de las células cromafines de la cepa CgA-KO. Las espigas de ambos grupos, CgA-KO y control, mantienen una relación lineal pero con pendientes marcadamente diferentes; las espigas de las células CgA-KO con contenido en catecolaminas similar muestran  $I_{max}$  mayores que las células control (fig.

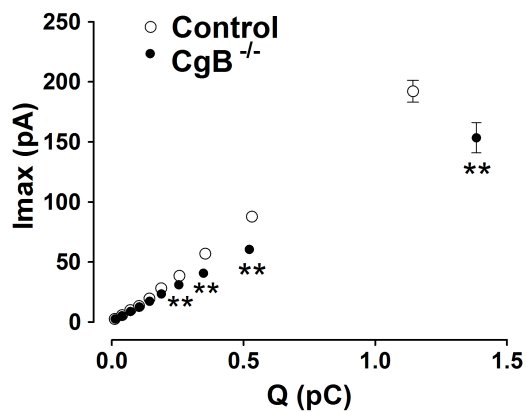
## Resultados

32). Este efecto es evidente sobre todo en las vesículas de mayor carga y pone de manifiesto una diferencia de afinidad en cuanto a las catecolaminas.



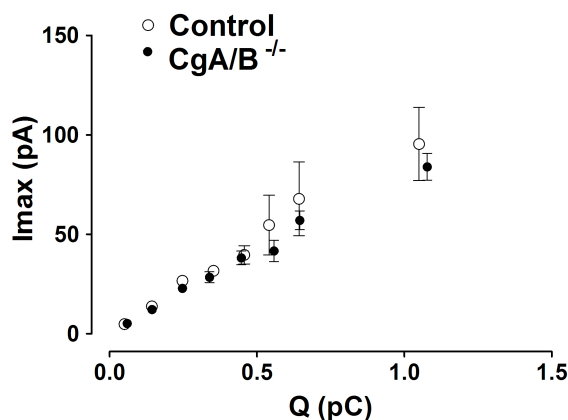
**Figura 32.** Las vesículas de ratones CgA-KO con carga (Q) equivalente a la del control presentan una corriente máxima (Imax) más alta. Todas las espigas del grupo CgA-KO (n=9 células) y control (n=10 células) fueron ordenadas en orden creciente en base a su carga, entonces se distribuyen en 10 grupos con igual número de espigas y se representaron como se muestra (media  $\pm$  error estándar). Los datos están expresados en las unidades señaladas y el análisis estadístico fue realizado usando la prueba U-Mann de Whitney con la corrección de Bonferroni. \*p<0,005; \*\*p<0,001.

Si se realiza la misma representación tomando los datos de las espigas de las células CgB-KO, se observa el efecto contrario a lo ocurrido con las espigas de las células CgA-KO. Existe diferencia en las pendientes, pero las espigas con contenido cuántico similar presentan concentraciones al alcanzar el electrodo (Imax) menores, (fig. 33). Este efecto es más evidente al analizar las vesículas de mayor carga.



**Figura 33. Las vesículas de ratones CgB-KO con carga (Q) equivalente que en el control presentan una corriente máxima (Imax) más baja.** Todas las espigas del grupo CgB-KO (n=20 células) y control (n=20 células) son ordenadas en orden creciente en base a su carga, entonces se distribuyen en 10 grupos con igual número de espigas y se representaron como se muestra (media  $\pm$  error estándar). Los datos están expresados en las unidades señaladas y el análisis estadístico fue realizado usando la prueba U-Mann de Whitney con corrección de Bonferroni. \*\*p<0,001.

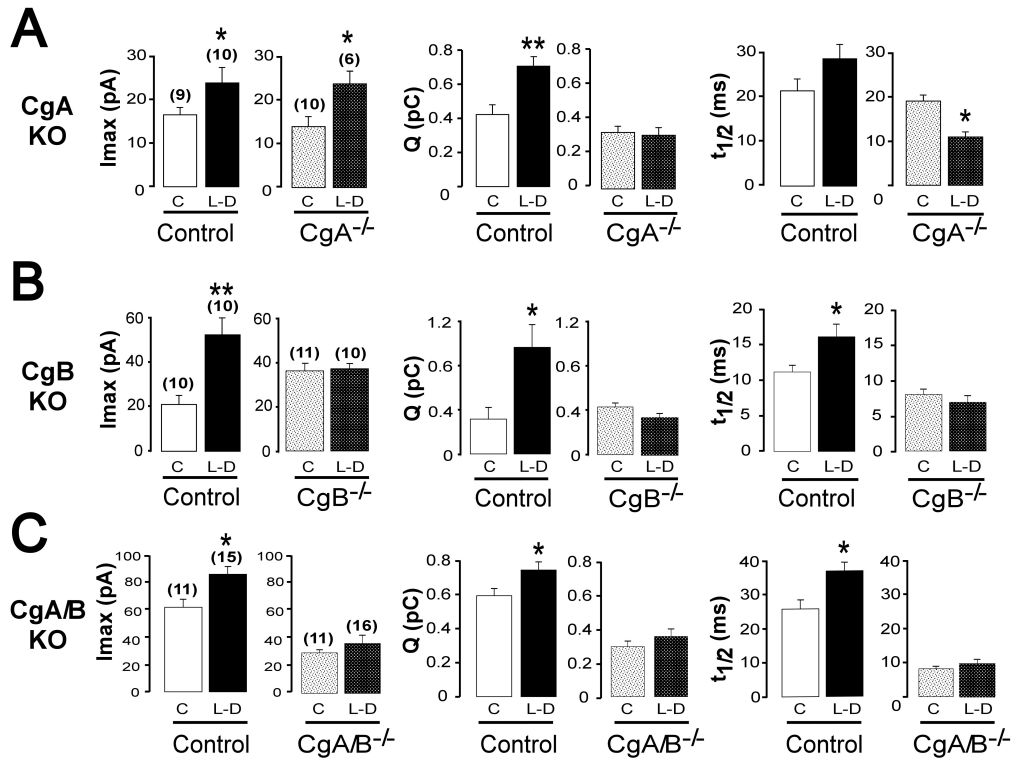
Por último, el enfrentamiento de los datos de Q e Imax de las espigas obtenidas a partir de las células cromafines de la cepa CgA/B-KO, no dio diferencias significativas. Es decir, el incremento de carga está apareado al incremento en la altura máxima de las espigas y esa relación mantiene una pendiente similar (fig. 34).



**Figura 34.** Las vesículas de ratones CgA/B-KO con carga (Q) equivalente a la del control no presentan variación en cuanto a su corriente máxima. Todas las espigas del grupo CgA/B-KO (n=12 células) y control (n=17 células) son ordenadas en orden creciente en base a su carga, entonces se distribuyen en 8 grupos con igual número de espigas y se representan como se muestra (media  $\pm$  error estándar). Los datos están expresados en las unidades señaladas y el análisis estadístico fue realizado usando la prueba U-Mann de Whitney con corrección de Bonferroni.

## 26. Los gránulos de las células cromafines *knock-out* han perdido la capacidad de acumular más catecolaminas.

Los experimentos anteriores demuestran que la liberación cuántica de CA, aunque con características cinéticas diferentes, ocurre a pesar de la eliminación de las cromograninas. Con objeto de caracterizar las propiedades de estas tres matrices diferentes, se decidió estudiar la capacidad de la matriz de albergar una cantidad extra de CA, como puede ocurrir en una situación de estrés. Para ello se simuló esta situación por medio de la incubación de los cultivos de células cromafines con 100  $\mu$ M L-DOPA durante 90 min. Con estas células se realizó experimentos de amperometría en célula única en los que se midieron los parámetros cinéticos de las espigas.



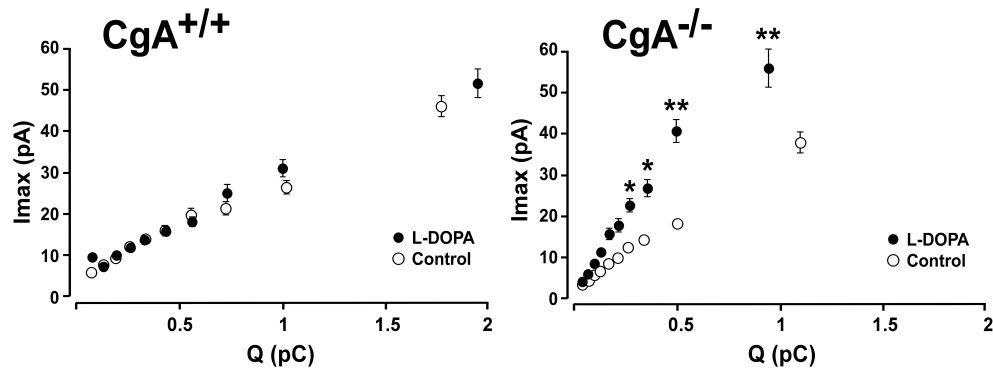
**Figura 35. Las vesículas de las cepas *knock-out* no son capaces de acumular más catecolaminas.** A, representación en histogramas de los parámetros cinéticos  $I_{max}$ ,  $Q$  y  $t_{1/2}$  (media  $\pm$  error estándar) resultados de los experimentos en los que se trató las células cromafines en cultivo de la cepa CgA-KO y su control, con 100  $\mu$ M de L-DOPA durante 90 min (L-D) o sin L-DOPA (C). B, ídem para la cepa CgB-KO. C, ídem para la cepa CgA/B-KO. Los experimentos de amperometría de las células KO y control no fueron realizados el mismo día, por lo que sólo puede compararse las situaciones C y L-D en de cada cepa. Los datos están expresados en las unidades señaladas y el análisis estadístico fue realizado usando la prueba *U*-Mann Whitney. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

Los gránulos procedentes de las cepas control incrementaron su contenido en catecolaminas ( $Q$ ), la concentración máxima de catecolaminas alcanzada en la superficie del electrodo ( $I_{max}$ ) y la duración de la espiga ( $t_{1/2}$ ); sin embargo el contenido vesicular de las espigas de los ratones *knock-out* no varió con respecto a los controles tras la incubación (fig. 35). Por lo tanto, la modificación en el contenido de cromograninas produce la pérdida de la capacidad de las vesículas de acumular CA en su interior ante una sobrecarga de éstas en el citoplasma.



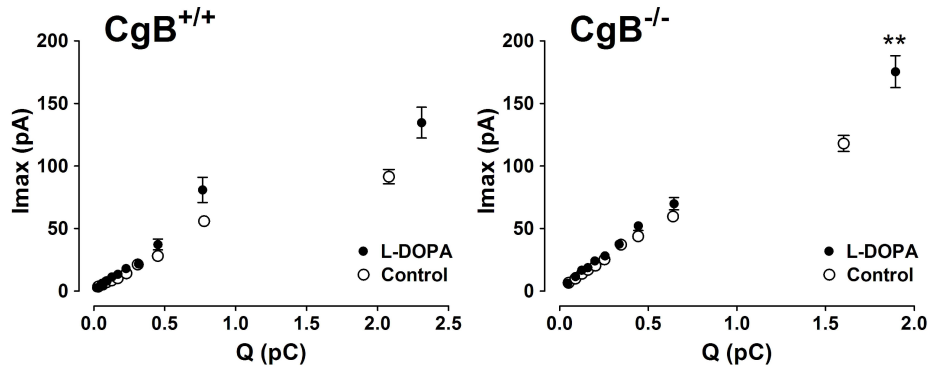
**27. La relación entre los parámetros  $I_{max}$  y  $Q$  se pierde por efecto de la incubación con L-DOPA en los ratones *knock-out*.**

La  $I_{max}$  y la  $Q$  son dos parámetros altamente dependientes. Se ha descrito que la relación que existe entre estos parámetros es lineal y que no cambia tras el tratamiento con L-DOPA (Colliver et al., 2000). En las células CgA-KO esta relación se pierde; los gránulos con contenido en catecolaminas equivalentes ( $Q$ ) alcanzan concentraciones en la superficie del electrodo máximas ( $I_{max}$ ) mayores que en las células control, esto indica el incremento en la velocidad de liberación de las CA (fig. 36).

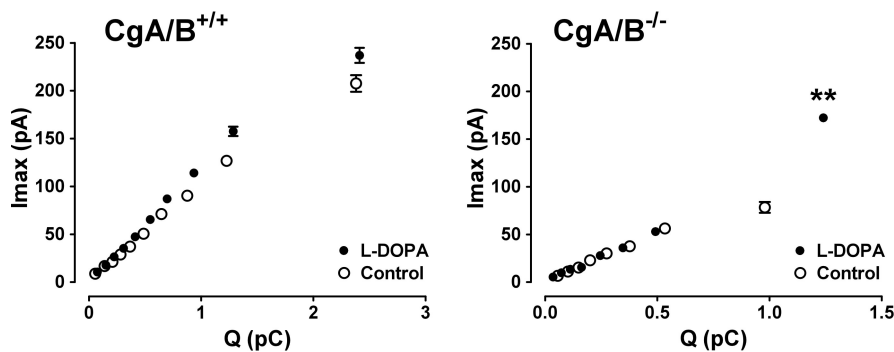


**Figura 36.** La relación entre los parámetros cinéticos  $Q$  e  $I_{max}$  cambia en las espigas procedentes de las células cromafines CgA-KO tras la incubación con L-DOPA. Las células fueron incubadas (círculos negros ●) o no con L-DOPA (círculos blancos ○) dentro del grupo de células CgA-KO (CgA<sup>-/-</sup>) y el grupo de células control (CgA<sup>+/+</sup>), las espigas obtenidas de cada tratamiento fueron ordenadas en orden creciente en base a su carga, entonces se distribuyeron en 10 grupos con igual número de espigas y se representaron como se muestra (media  $\pm$  error estándar). Los datos están expresados en las unidades señaladas y el análisis estadístico fue realizado usando la prueba U-Mann de Whitney con corrección de Bonferroni. \* $p < 0,005$ ; \*\* $p < 0,001$ .

Este efecto no es tan claro en las cepas CgB-KO y CgA/B-KO. La relación entre los parámetros se pierde cuando se analizan las vesículas de mayor contenido en CA, ya que se observa un incremento en la  $I_{max}$  cuyo incremento en  $Q$  no es proporcional. Este fenómeno no se observa en el resto de subgrupos (fig. 37 y 38).



**Figura 37.** La relación entre los parámetros cinéticos  $Q$  e  $I_{max}$  se pierde sólo en las espigas mayores de las células  $CgB$ -KO tras la incubación con L-DOPA. Todas las espigas de las células  $CgB$ -KO ( $CgB^{-/-}$ ) y control ( $CgB^{+/+}$ ), incubadas (círculos negros  $\bullet$ ) o no con L-DOPA (círculos blancos  $\circ$ ), fueron ordenadas en orden creciente en base a su carga, entonces se distribuyeron en 10 grupos con igual número de espigas (media  $\pm$  error estándar). Los datos están expresados en las unidades señaladas y el análisis estadístico fue realizado usándola prueba  $U$ -Mann Whitney con corrección de Bonferroni. \*\* $p < 0,001$ .



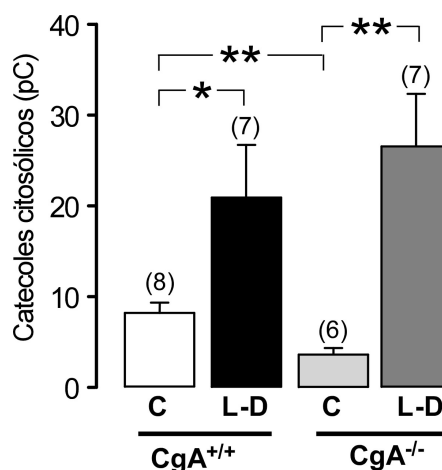
**Figura 38.** La relación entre los parámetros cinéticos  $Q$  e  $I_{max}$  se pierde sólo en las espigas mayores de las células  $CgA/B$ -KO tras la incubación con L-DOPA. La representación se hizo de igual forma que en la figuras 36 y 37 pero el agrupamiento se hizo en 8 ó 10 grupos con igual número de espigas (media  $\pm$  error estándar). Los datos están expresados en las unidades señaladas y el análisis estadístico fue realizado usándola prueba  $U$ -Mann Whitney con corrección de Bonferroni. \*\* $p < 0,0012$ .

## 28. La inducción de la síntesis de catecolaminas produce su acumulación en el citosol ante la imposibilidad de ser incorporadas por los gránulos.

La detección electroquímica intracelular es una técnica nueva que permite determinar los niveles de catecoles libres en el citosol en célula

## Resultados

única (Mosharov et al., 2003). Las células fueron incubadas con 100  $\mu\text{M}$  de L-DOPA durante 90 min, para inducir la síntesis de CA en las células cromafines CgA-KO y comparar estos niveles con los de las células control. La pargilina, un inhibidor de la monoaminoxidasa, fue mantenido en el medio en todo momento para prevenir el catabolismo de las CA, ya que de otra forma las CA son rápidamente degradadas y el efecto de la L-DOPA puede quedar así enmascarado (Mosharov et al., 2003).

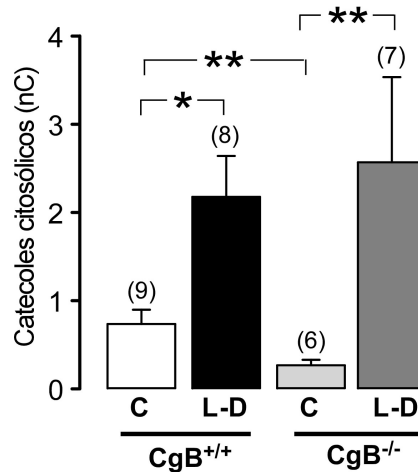


**Figura 39. Los catecoles citosólicos se incrementan en mayor proporción en las células CgA-KO tras la incubación con L-DOPA.** Detección electroquímica intracelular de catecoles citosólicos (media  $\pm$  error estándar). (C) indica la situación control en la que ambos grupos de células (células CgA<sup>-/-</sup> y células CgA<sup>+/+</sup>) fueron incubadas únicamente con pargilina (10  $\mu\text{M}$ , 90 min); (L-D) indica la incubación simultánea de pargilina (10  $\mu\text{M}$ ) y L-DOPA (100  $\mu\text{M}$ ) durante 90 min. Estos experimentos fueron realizados con la colaboración de la Dra. Mónica S. Montesinos. Los datos están expresados en pC, el número de células se indica entre paréntesis y el análisis estadístico fue realizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación global y la prueba U-Mann Whitney con corrección de Bonferroni. \*p<0,016; \*\*p<0,003.

La cantidad basal de catecoles citosólicos en las condiciones descritas es menor 1,3 veces en las células CgA-KO que en las células control (fig.39). Cuando se incuban ambos grupos de células con L-DOPA (L-D) la cantidad de catecoles incrementa en ambos casos debido a la aparición en el citosol de nuevas catecolaminas sintetizadas al compararla con la situación basal (C), sin embargo este incremento es más

pronunciado en el caso de las células CgA-KO (5,3 veces) que en las células control (2,2 veces) (fig. 39).

La medida de los catecoles en el citosol de las células CgB-KO en comparación a la cantidad en las células control dio el mismo resultado que en las células CgA-KO. La cantidad basal de catecoles es 2 veces menor en situación basal en las células CgB-KO (fig. 40) y el incremento más acentuado (~8 veces) en éstas cuando se somete las células a incubación con L-DOPA y se comparan con el incremento de catecoles libres en las células control (~3 veces) (fig. 40).

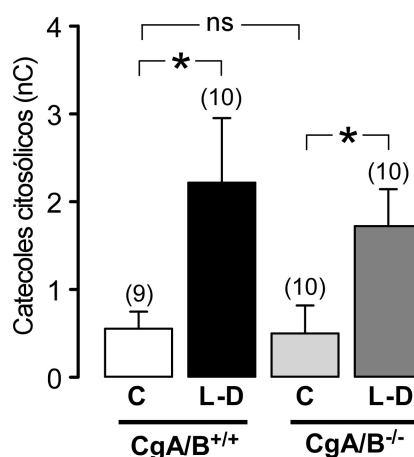


**Figura 40. Los catecoles citosólicos incrementan en mayor proporción en las células CgB-KO tras la incubación con L-DOPA.** Detección electroquímica intracelular de catecoles citosólicos (media  $\pm$  error estándar). (C) indica la situación control en la que ambos grupos de células (CgB-KO y control) fueron incubadas únicamente con pargilina (10  $\mu$ M, 90 min); (L-D), indica la incubación simultánea de pargilina (10  $\mu$ M) y L-DOPA (100  $\mu$ M) durante 90 min. Datos están expresados en nC, el número entre paréntesis indica el número de células y el análisis estadístico fue realizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación global y la prueba U-Mann de Whitney con corrección de Bonferroni. \* $p < 0,016$ ; \*\* $p < 0,003$ .

El resultado de estos experimentos, en ambos casos (CgA-KO y CgB-KO), confirma la incapacidad de las vesículas de las células cromafines de los *knock-out* para asimilar más catecolaminas, anteriormente observada por amperometría (fig. 35).

## Resultados

En el caso de las células pertenecientes a la cepa CgA/B-KO, el resultado fue distinto. En primer lugar, no se pudo demostrar que la cantidad basal de cateoles fuera diferente entre las células control y las células CgA/B-KO. Y, en segundo, el incremento ante el tratamiento con L-DOPA se da pero es, incluso, menos pronunciado que en el caso de las células control (fig. 41). Este resultado podría indicar defectos en la ruta de biosíntesis de las CA en estos animales.

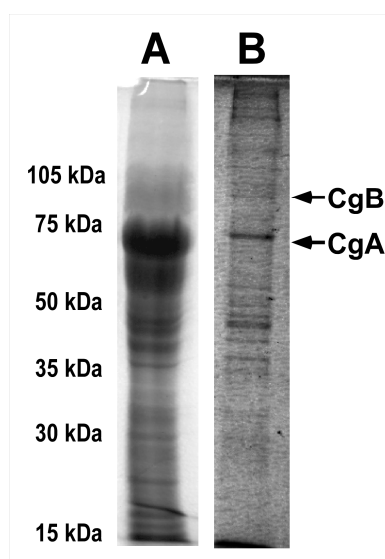


**Figura 41. Los cateoles citosólicos también incrementan en las células cromafines de los ratones CgA/B-KO tras su incubación con L-DOPA, pero no lo hacen en mayor proporción que en el control.** Detección electroquímica intracelular de cateoles citosólicos (media  $\pm$  error estándar). (C) indica la situación control en la que ambos grupos de células (CgA/B-KO y control) fueron incubadas únicamente con pargilina (10  $\mu$ M, 90 min); (L-D), indica la incubación simultánea de pargilina (10  $\mu$ M) y L-DOPA (100  $\mu$ M) durante 90 min. Datos expresados en nC, el número entre paréntesis indica el número de células y el análisis estadístico fue realizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación global y la prueba *U*-Mann de Whitney con corrección de Bonferroni. \* $p < 0,016$ .

## 29. El aislamiento y la purificación de gránulos cromafines de ratón es factible.

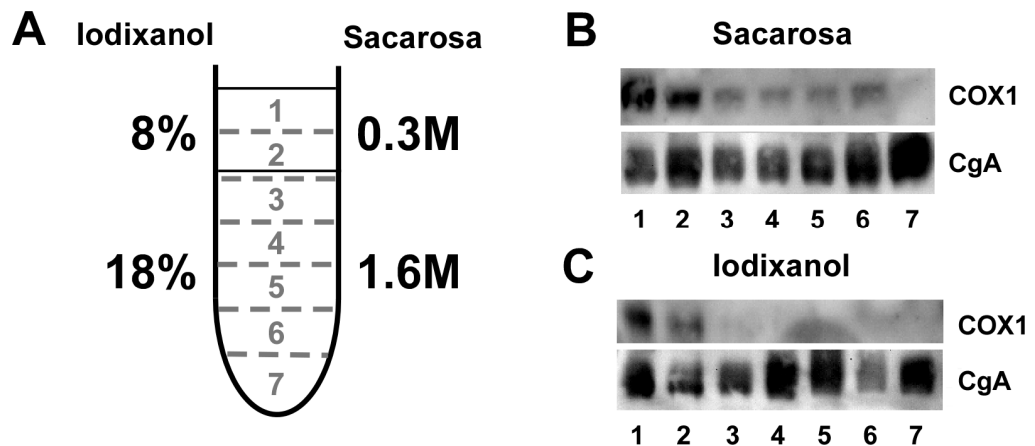
Debido a la cantidad tan pequeña de tejido medular que se obtiene a partir de un solo ratón (~0,5 mg por médula sin desecar), hasta el momento no se ha realizado ningún estudio con gránulos cromafines aislados procedentes de ratón. Por este motivo, fue necesario diseñar y poner a punto su aislamiento en cantidad y calidad suficientes para estudiar su proteoma. Para ello, se determinó el número mínimo de individuos para la obtención aproximadamente 100 µg totales de proteína. Consideramos que esta cantidad permite la visualización de las proteínas en un gel de bidimensional de acrilamida una vez marcado con azul de coomassie. En la figura 42 se pueden observar las bandas típicas que se obtienen tras la separación electroforética de las proteínas granulares. La CgA y CgB se encuentran en un gel *SDS-PAGE* a la altura aproximada de 68 kDa y 78 kDa respectivamente. La apariencia de los geles es similar entre sí y equivalente a la de los geles descritos de gránulos cromafines bovinos (Wegrzyn et al., 2007). A pesar de que se puede visualizar las proteínas mediante este método, estos geles tienen muy baja resolución de las proteínas debido al solapamiento que se observa entre ellas. Por este motivo fue necesaria la separación por electroforesis bidimensional y el posterior marcaje con azul de coomassie.

**Figura 42. Imagen de las electroforesis *SDS-PAGE* de extractos proteicos de gránulos cromafines A, proteínas de gránulos cromafines bovinos; B, proteínas de gránulos cromafines de ratón.** En ambos casos los gránulos fueron obtenidos a partir de homogeneizados de tejido mediante centrifugación diferencial y su posterior enriquecimiento y purificación en un gradiente discontinuo de iodixanol. El marcaje de las proteínas se realizó con azul de coomassie.



## Resultados

Otra dificultad, fue la separación de los gránulos cromafines de la fracción mitocondrial durante la formación de los gradientes. Para evitar en todo lo posible la presencia de mitocondrias en la fracción granular, se ensayaron distintos medios y tipos de gradientes. Finalmente, se optó por un gradiente discontinuo en un medio osmóticamente inactivo; Iodixanol (Optiprep®). El gradiente discontinuo de Iodixanol con densidad 8% sobre un volumen al 18%, fue el que permitió la mayor separación entre el punto de equilibrio isopícnico de ambos orgánulos (fig. 43).



**Figura 43.** El gradiente discontinuo de iodixanol (8% / 18%) es el más adecuado para la purificación de gránulos cromafines de ratón. A, Esquema de las condiciones que resultaron más eficientes para la obtención de la fracción granular. B, imagen del western-blot de la distribución de la COX 1, marcador mitocondrial, y la CgA, como marcador granular tras el gradiente discontinuo de sacarosa (0,3 M / 1,6 M). C, ídem para el gradiente discontinuo 8% /18 % de iodixanol. Los números expresan las fracciones que se tomaron, la número 1 corresponde con la fracción más superficial de tubo y la 7 con la más profunda.

Para comprobar la bonanza del método, se consideró el tipo de gradiente que permite mayor enriquecimiento en gránulos secretores y la posición a lo largo del gradiente en la cual están acompañados de la menor cantidad de mitocondrias (fig. 43B y 43C). La fracción correspondiente a la fracción 7 del gradiente de iodixanol fue la que mostró mayor contenido en CgA y por lo tanto en gránulos cromafines (fig. 43C). Para esto último se utilizó la citocromo C oxidasa (COX1) como

marcador de contaminación mitocondrial. Adicionalmente, se comprobó la ausencia de actividad de la enzima succinato deshidrogenasa, otro marcador mitocondrial, en la fracción identificada como fracción granular (datos no mostrados).

La optimización del método de purificación y la posibilidad de obtener una cantidad suficiente de proteína procedente de los gránulos secretores de ratón, abrió el camino para el estudio comparativo del proteoma de dichos gránulos.

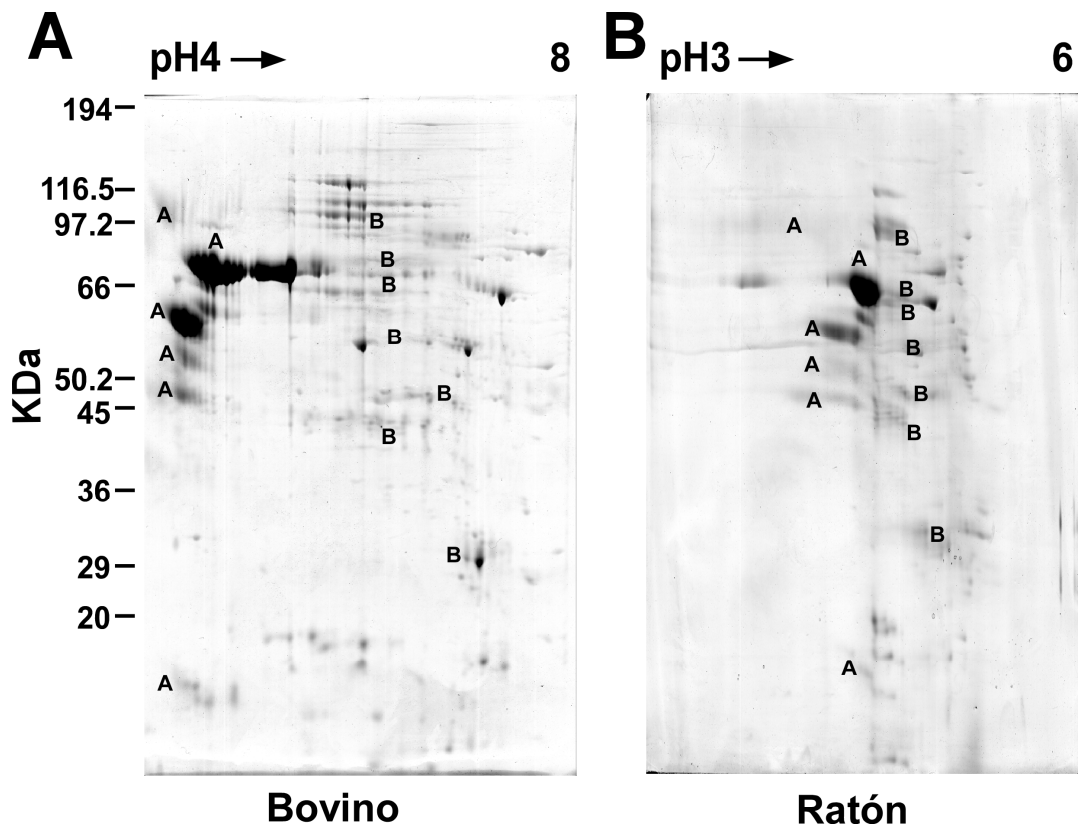
El rendimiento que se obtiene de la glándula adrenal de vaca es muy grande, este es el motivo de que todos los estudios previos estén realizados en gránulos cromafines bovinos (Wegrzyn et al., 2007). Por este motivo aplicamos nuestro método sobre fracciones granulares bovinas y comparamos la separación de sus proteínas mediante electroforesis bidimensional con la de los gránulos de ratón (fig. 44). Los geles fueron aparentemente similares entre sí y similares a los encontrados en la bibliografía referidos a proteínas de origen bovino (Lee and Hook, 2009). El rango de pH de las proteínas granulares de ratón que elegimos fue de pH 3-6 porque así descartamos que hubiera proteínas en la zona más ácida que pudiera escapar de nuestro análisis (fig. 44B). El gel bidimensional de la fracción enriquecida en gránulos procedentes de ratones CD1 mostró bandas diferenciadas, bien resueltas y equivalentes en punto isoeléctrico y masa a las bandas procedentes de bovino, aunque con una señal muy débil debido a la baja concentración de proteína (fig. 44B). Por este motivo se hizo necesario incrementar la señal con el uso del marcador de proteínas azul de coomassie coloidal de alta sensibilidad ProtoBlue Safe.

Tanto en los geles que se obtuvieron a partir de fracciones bovinas, como en los procedentes de ratón, fue posible la identificación de los fragmentos producto del procesamiento que sufren las cromograninas y que da lugar a sus péptidos derivados (fig. 44). El cóctel de inhibidores de



## Resultados

proteasas Complete® fue añadido inicialmente al homogeneizado del tejido para evitar la degradación de las proteínas, por lo tanto la degradación de las cromograninas no es debido al proceso de extracción de las proteínas sino su procesamiento intragranular (Lee and Hook, 2009).

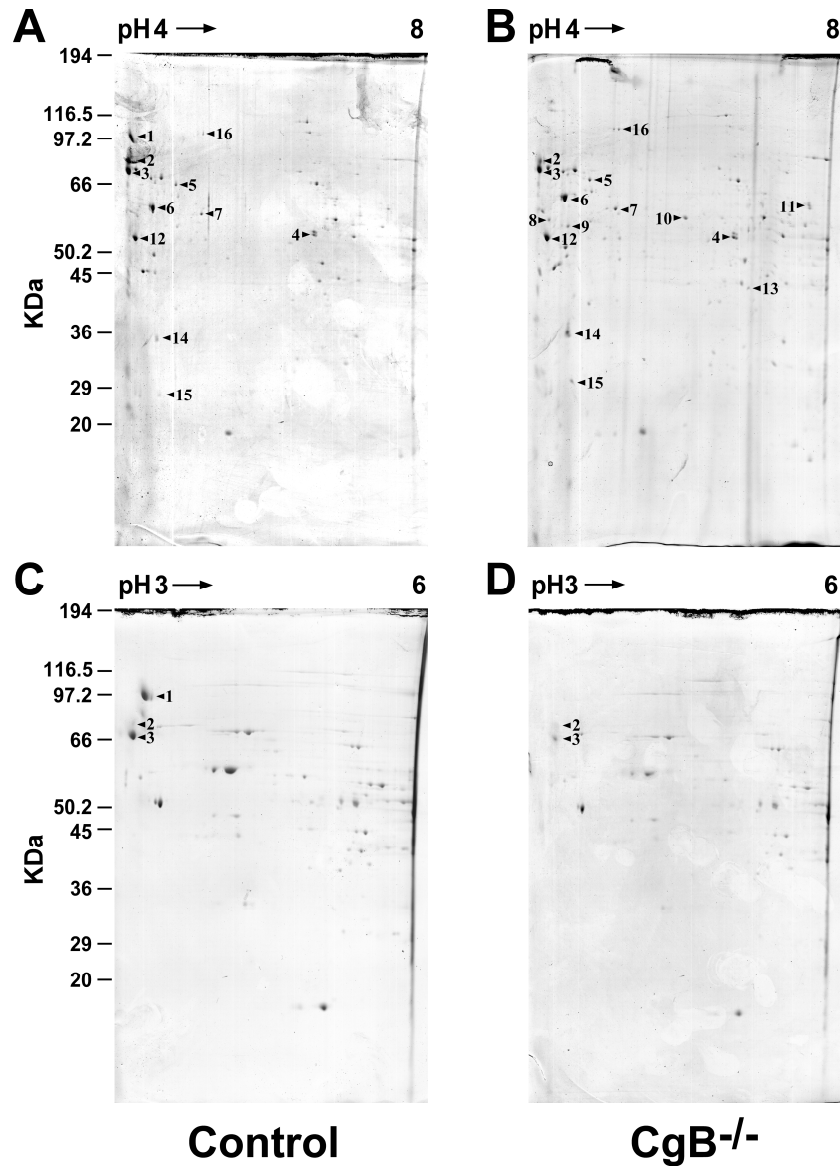


**Figura 44. Electroforesis bidimensionales de gránulos cromafines aislados mediante el gradiente discontinuo de iodixanol (8% /18%).** A, imagen del gel bidimensional de la separación de las proteínas de gránulos cromafines bovinos (rango de pH de 4 a 8). B, ídem para gránulos cromafines procedentes de ratón (rango de pH entre 3 y 6). Tinción realizada con azul de coomassie de alta sensibilidad ProtoBlue Safe. Las letras indican la posición de los fragmentos de la CgA en el caso la "A" y de la CgB en el de la "B" según se encuentra en publicado por Lee y Hook (2009).

### **30. El análisis del proteoma granular de las cepas de ratones CgB-KO y CgA/B-KO excluye la sobre-expresión de otra granina como mecanismo compensatorio.**

Los datos obtenidos mediante *western-blot* mostraron cambios en la expresión de las proteínas intravesiculares cuando se eliminan una o las dos cromograninas (fig. 24, 25 y 26). El análisis del resto de proteínas cuya expresión pudiera modificarse era muy complicado mediante su marcaje con anticuerpos y, dado que desconocíamos qué proteínas podían modificar su expresión, decidimos abordar la búsqueda mediante técnicas de espectrometría de masas. En primer lugar se sometieron los extractos de proteínas granulares, de las cepas CgB-KO, CgA/B-KO y sus respectivos controles, a isoelectroenfoque en capilares en dos rangos de pH distintos. El primero, entre 4 y 8, se eligió por proporcionar una visión general de las proteínas de los gránulos en un rango de pH amplio (fig. 45A y B ó fig. 46A y B); el segundo, entre 3 y 6 fue seleccionado con objeto de resolver mejor las proteínas situadas en el rango más ácido de pH en el que se encuentran las proteínas del interior granular (fig. 45C y D ó fig. 46C y D). La segunda dimensión separó las proteínas por su masa. El resultado de la separación electroforética del proteoma granular de la cepa CgB-KO y su respectivo control se muestra en la figura 45. Se siguió el mismo procedimiento para el aislamiento de las proteínas de la cepa CgA/B-KO y su control (fig. 46). A pesar de lo débil que se mostró la señal, las imágenes pudieron ser analizadas. Se realizó un análisis de expresión diferencial de los geles para localizar aquellas proteínas cuya expresión superó 1,5 veces al control. Después se procedió a su identificación mediante la obtención de su huella peptídica por espectrometría de masas (MALDI-TOF) y posterior búsqueda en la base de datos haciendo uso del algoritmo de búsqueda MASCOT. De un total de 65 bandas recortadas en los geles, 16 no pudieron ser identificadas.

## Resultados



**Figura 45. Electroforesis bidimensionales (SDS-PAGE) del extracto proteico de gránulos cromafines procedentes de la cepa CgB-KO.** Las proteínas granulares procedentes de las médulas de ~40 médulas fueron separadas por medio de SDS-PAGE. La tinción se llevó a cabo con azul coomassie de alta sensibilidad ProtoBlue® Safe. **A**, imagen del gel 2D de las proteínas granulares control en el rango de pH de 4 a 8. **B**, imagen del gel 2D de la cepa CgB-KO en el rango de pH de 4 a 8. **C**, Imagen del gel 2D las proteínas de la cepa control en rango de pH 3 a 6. **D**, imagen del gel 2D de la cepa CgB-KO en rango de pH 3 a 6. Los números indican las proteínas que fueron escindidas del gel y analizadas mediante MALDI-TOF-MS. Estos números se corresponden con el identificador de la banda (ID-banda) indicado en la tabla 3.

El análisis de los geles bidimensionales del proteoma granular de la cepa CgB-KO, desveló cambios en la expresión de un total de 16 proteínas (tabla 3). Entre las proteínas identificadas con expresión diferencial se hallaron proteínas típicas de la matriz intragranular, como son la CgA, CgB y Sg II. Por otro lado, se confirmó una vez más, la desaparición de la expresión de la CgB (nº 1, fig. 45B y D) en los gránulos cromafines procedentes de la cepa CgB-KO. Dado que el criterio de selección de las proteínas para su identificación fue el de su expresión diferencial entre la cepa CgB-KO y su control, no se identificó otras proteínas descritas como típicas en gránulos cromafines en otras especies como la vaca. Sin embargo, entre las proteínas identificadas se encontró la subunidad beta del transportador de H<sup>+</sup>, ATP sintasa del complejo mitocondrial F1, que además de situarse en la mitocondria, ha sido descrita en los gránulos cromafines bovinos (Wegrzyn et al., 2007). Por ese motivo se incluyó en las proteínas de esta tabla a pesar de no cumplir la condición de estar sobre-expresada 1,5 veces más que el control.

**Tabla 3.** Tabla de proteínas con expresión diferencial detectadas en los gránulos de la cepa de ratones CgB-KO.

Id-Banda	Proteína	NCBI No (gi)	PM (Da)	pI	Péptidos coincidentes	Cobertura de la secuencia (%)	Mascot Score	Dianas omitidas	Proporción de cambio en el KO
1	Cromogranina-B	50409	77895	5.01	14	22	122	3	Sólo en control
2	Secretogranina II, precursor	417771	70600	4.69	18	31	194	2	*
3	Cromogranina-A	20071660	51929	4.65	15	27	114	4	*
4	Aldehído deshidrogenasa 2, mitocondrial	26330458	57015	7.53	11	25	146	1	+2.4
5	Albumina	26341396	67013	5.49	11	21	94	1	-2.3
6	Proteína de choque térmico 1 (Chaperonina)	26353954	61089	5.67	9	20	87	1	+1.8
7	Proteína disulfuro isomerasa asociada 3	26353794	57103	5.78	9	23	106	2	+1.5
8	Vimentina	2078001	51590	4.96	8	31	79	1	Sólo en KO
9	Fibrinógeno cadena gamma	18043449	50044	5.54	18	37	137	2	Sólo en KO
10	Fibrinógeno cadena beta	21619364	55402	6.68	10	23	100	1	Sólo en KO
11	Fibrinógeno cadena alfa	13529485	61801	7.16	23	33	175	2	Sólo en KO
12	ATP sintasa, transportador de H <sup>+</sup> , complejo mitocondrial F1, subunidad beta	28302366	56265	5.19	19	55	230	1	+1.3
13	Acil-Coenzima A deshidrogenasa, cadena corta	192659	45203	8.96	9	28	74	2	Sólo en KO
14	Apolipoproteína E	54035417	35901	5.56	12	28	91	2	+2.6
15	Prohibitina	12832901	29859	5.57	9	55	132	1	+1.5
16	Chapsina 110 (Drosófila)	26338173	54421	6.93	6	18	68	1	-2.1

\* indica que no fue posible la cuantificación debido al alto grado de fragmentación de la proteína.

## Resultados

---

A pesar del incremento de expresión de algunas proteínas e incluso la aparición de otras en el extracto procedente de los gránulos cromafines de la cepa CgB-KO (tabla 3), no se halló ninguna proteína de la familia de las graninas, por lo que la sobre-expresión de otra granina, además de la CgA, puede descartarse como mecanismo compensatorio capaz de adsorber con capacidad suficiente las CA en los gránulos cromafines de la cepa CgB-KO.

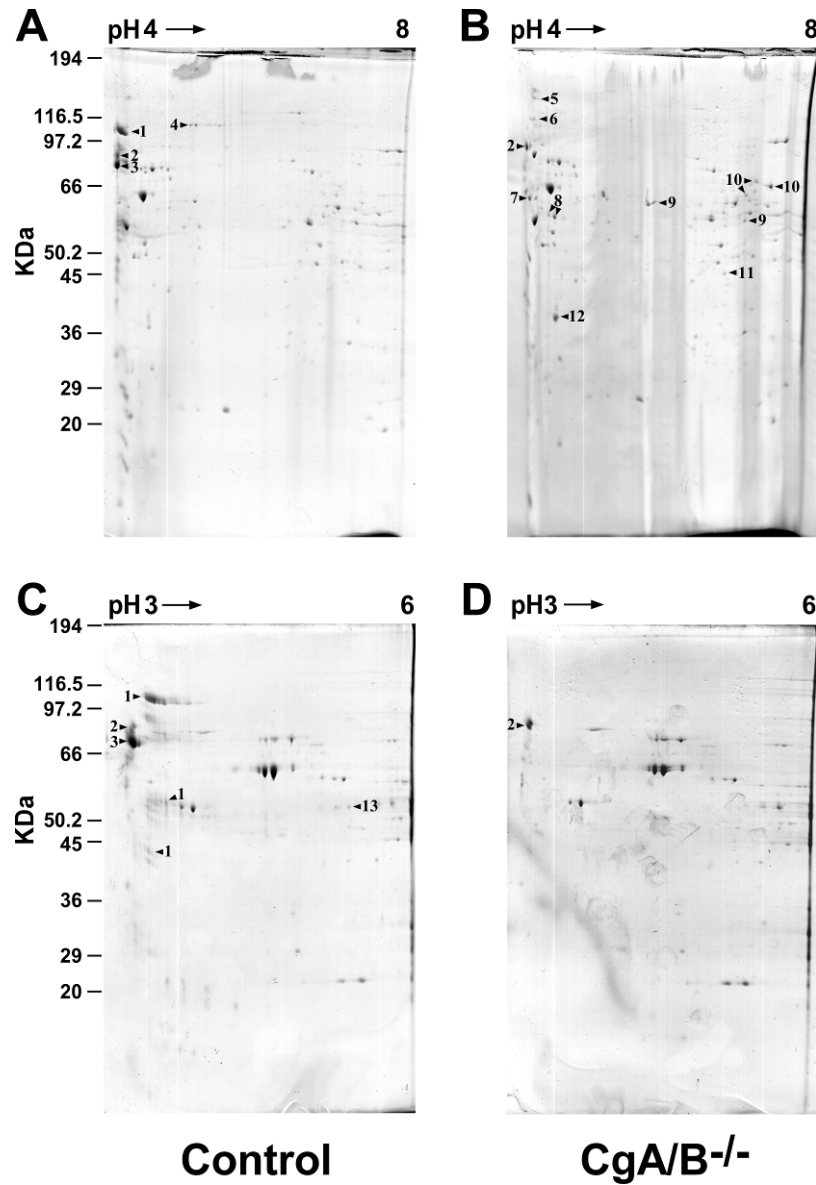
El análisis de los geles bidimensionales del proteoma granular de la cepa CgA/B-KO, mostró cambios en la expresión de un total de 13 proteínas, la identidad de éstas se detalla en la tabla 4. Como en el caso anterior, entre las proteínas identificadas con expresión diferencial con respecto al control, se encontró proteínas típicas de la matriz intragranular como son la CgA, CgB y SgII. Tanto en el gel con un rango de pH más amplio (pH 4 a 8) como en el “zoom” (pH 3 a 6), se comprobó una vez más la desaparición de la expresión de las CgA (nº 3, fig. 46) y CgB (nº 1, fig 46) en los gránulos cromafines procedentes de la cepa CgA/B-KO.

Tampoco se observó en este caso aumento de la expresión en otra proteína de la familia de las graninas aparte de la sobre-expresión de la secretogranina II en 1,65 veces (tabla 4). Este dato apoya el incremento leve de su expresión al que parecía apuntar los datos de *western-blot* (fig. 26). Por este motivo exploramos esta posibilidad por medio de radioinmunoensayo (RIA) con un anticuerpo contra uno de los péptidos derivados de la SgII, la secretoneurina. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con el Dr. Reiner Fischer-Colbrie de la Universidad de Innsbruck. Por medio de ésta técnica no se observó un aumento de la expresión de SgII (datos no mostrados).

Se debe destacar la aparición o la modificación de la expresión de determinadas proteínas comunes en ambas cepas de ratones (CgB-KO y CgA/B-KO). Es el caso de la proteína disulfuro isomerasa o su precursor, que se sobre-expresa 1,5 veces en la cepa CgB-KO que en el control y,

sin embargo, se encuentra en los ratones de la cepa CgA/B-KO y no en su respectivo control. Ocurre lo mismo con la apolipoproteína E; mientras se encuentra sobre-expresada 2,6 veces en los ratones CgB-KO, se presenta exclusivamente en los ratones pertenecientes a la cepa CgA/B-KO. Asimismo, existe otro grupo de proteínas identificadas, comunes a ambas cepas y cuya aparición se da únicamente en los geles procedentes de las cepas *knock-out* y no en sus respectivos controles; es el caso de la acil-coenzima A deshidrogenasa de cadena corta y las tres subunidades del fibrinógeno, cadena alfa, beta, y gamma. El caso contrario, se dio solamente en la proteína chapsina 110 que presentó una expresión 2,1 veces menor que el control en la cepa de ratones CgB-KO y su ausencia es total en la cepa CgA/B-KO.

## Resultados



**Figura 46. Electroforesis bidimensionales (SDS-PAGE) del extracto proteico de gránulos cromafines procedentes de la cepa CgA/B-KO.** Las proteínas granulares procedentes de las médulas de ~40 médulas fueron separadas por medio de SDS-PAGE. La tinción se llevó a cabo con azul coomassie de alta sensibilidad ProtoBlue® Safe. A, Imagen resultado de la separación de proteínas granulares de la cepa control en el rango de pH de 4 a 8. B, Imagen del gel 2D de la cepa CgA/B-KO en el rango de pH de 4 a 8. C, imagen del gel 2D de la cepa control en rango de pH 3 a 6. D, Imagen del gel 2D de las proteínas de la cepa CgA/B-KO en rango de pH 3 a 6. Los números indican las proteínas que fueron escindidas del gel y analizadas mediante MALDI-TOF-MS. Estos números corresponden con en ID de la banda indicado en la tabla 4.

Las proteínas cuya expresión se vio modificada con respecto al control en la cepa CgB-KO y que se identificaron exclusivamente en esta cepa o su respectivo control fueron: la albúmina (2,3 veces menos en CgB-KO), la proteína de choque térmico 1 (chaperonina) (1,8 veces más en CgB-KO), la subunidad beta de la ATP-sintasa (1,3 veces más en CgB-KO), la prohibitina (1,5 veces más en CgB-KO) y la vimentina (sólo en CgB-KO) (tabla 4).

Por otra parte, hubo proteínas cuya expresión se vio modificada con respecto al control en la cepa CgA/B-KO y que se identificaron exclusivamente en ésta como la cadena pesada 4 del inhibidor inter-alfa tripsina y la proteína de choque térmico 90. Por último, la dihidrolipoil-lisina-residuo succiniltransferasa componente del complejo 2-oxoglutarato de deshidrogenasa se mostró únicamente en la cepa control y no en la CgA/B-KO (tabla 4).

**Tabla 4.** Tabla de proteínas con expresión diferencial detectadas en los gránulos de la cepa de ratones CgA/B-KO.

Id-Banda	Proteína	NCBI No (gi)	PM (Da)	pI	Péptidos coincidentes	Cobertura de la secuencia (%)	Mascot Score	Dianas omitidas	Proporción de cambio en el KO
1	Cromogranina B	50403	78036	5.01	11	20	113	1	Sólo en WT
2	Secretogranina 2, precursor	417771	70600	4.69	18	31	194	2	+1.65
3	Cromogranina A	26338173	51929	4.65	8	15	66	3	Sólo en WT
4	Chapsina 110	26338173	54421	6.93	6	18	68	1	Sólo en WT
5	Inter alfa-tripsina inhibidor, cadena pesada 4	12836422	100375	6.13	10	13	79	1	Sólo en KO
6	Proteína de choque térmico 90, beta (Grp94), miembro 1	309220	92703	4.74	15	20	65	1	Sólo en KO
7	Proteína disulfuro isomerasa-precursor	14250251	57442	4.77	15	34	137	2	Sólo en KO
8	Fibrinogeno cadena gamma	18043449	50044	5.54	18	37	137	2	Sólo en KO
9	Fibrinogeno cadena beta	21619364	55402	6.68	10	23	100	1	Sólo en KO
10	Fibrinogeno cadena alfa	13529485	61801	7.16	23	33	175	2	Sólo en KO
11	Acil Coenzima A deshidrogenasa, cadena corta	16740777	45146	8.68	7	25	63	1	Sólo en KO
12	Apolipoproteína E	192005	35901	5.56	12	51	94	2	Sólo en KO
13	Dihidrolipoil-lisina residuo succiniltransferasa componente del complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa	62510833	49306	9.11	8	16	56	2	Sólo en WT

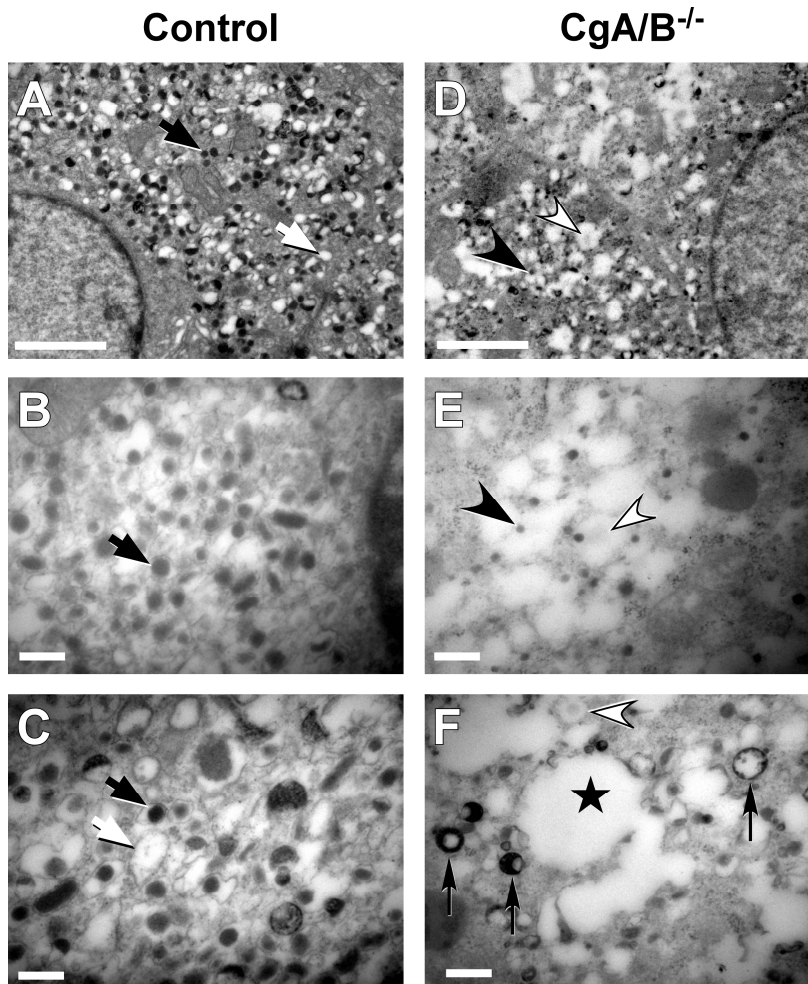
\* indica que no fue posible la cuantificación debido al alto grado de fragmentación de la proteína.



**31. La morfología de los gránulos cromafines en las células adrenomedulares está alterada como consecuencia de la ausencia de CgA y CgB.**

Dado que el fenómeno de la exostosis sigue dándose a pesar de silenciar la expresión de dos proteínas, descritas por distintos autores como esenciales para la granulogénesis, se analizó la ultraestructura de las células cromafines CgA/B-KO y su control. El resultado fue la aparición en el citoplasma de nuevas estructuras con electrodensidad reducida y tamaño mayor al de los gránulos cromafines de las células control (fig. 47A y 47D). En ocasiones, esas nuevas estructuras, mostraron una matriz de tamaño menor o con apariencia muy poco densa al paso de los electrones (fig. 47E y 47F). En otras ocasiones, se observa que la matriz, se concentra en la periferia de los gránulos (fig. 47F), este comportamiento no se observa en las células control (fig. 47B y 47C). Por último, hay que destacar la apariencia vacuolada que presentan las estructuras claras que aparecen en el citoplasma de las células cromafines de los ratones CgA/B-KO (fig. 47F). La integridad de otros orgánulos, como las mitocondrias, parece mantenerse por lo que descartamos que este fenómeno sea fruto de un fallo en la preparación de la muestra.

Como se observa, existe un incremento en el tamaño de la región clara ó halo de los gránulos, fenómeno que ha sido descrito como consecuencia de la entrada de agua en condiciones de saturación de la matriz de CA, como mecanismo para mantener la osmolaridad constante (Colliver et al., 2000). Sin embargo, la reducción del diámetro de la matriz, que se puede observar, como consecuencia de la eliminación de la CgA y la CgB, es un fenómeno que no había sido descrito antes.



**Figura 47. Características ultraestructurales de las células cromafines procedentes de la cepa de ratón CgA/B- KO.** **A**, las flechas negras señalan gránulos cromafines de aspecto típico en las células adrenomedulares de ratón; las flechas blancas señalan gránulos aparentemente vacíos. **B** y **C** distintas morfologías observadas entre los gránulos cromafines en los ratones control. **D**, la alteración de la ultraestructura de las vesículas en los ratones CgA/B-KO se evidencia en esta microfotografía con la aparición de estructuras grandes y claras de aspecto vacuolado (estrellas). **E** y **F**, presencia de estructuras claras distribuidas por todo el citoplasma parecidas a gránulos cromafines (cabeza de flecha negra); en otras ocasiones, la matriz aparece con densidad muy baja (cabeza de flecha blanca). Otra morfología observada corresponde a la concentración de la matriz en la periferia del gránulo (flechas delgadas verticales). Las barras indican: 1  $\mu$ m en **A** y **D**; y 200 nm en **B**, **C**, **E** y **F**.

## ***Discusión***

### **32. La ausencia de las cromograninas A y B se relaciona con desórdenes metabólicos.**

En el presente trabajo hemos utilizado tres cepas de ratones *knock-out* carentes de cromograninas: la primera sin CgA (CgA-KO) (cedida por los Dres. S. Mahata y D. O'Connor), la segunda sin CgB (CgB-KO) (cedida por los Dres. F. Calegari y B. Huttner) y la tercera, la hemos desarrollado nosotros y carece de ambas proteínas (CgA/B-KO).

La ausencia de las cromograninas en las distintas cepas de ratón, ha permitido a distintos grupos estudiar la función de sus péptidos derivados. La CgA y algunos estos péptidos, como la catestatina y la pancrestatina, están implicados en la patogénesis de la hipertensión, la resistencia a la insulina, y el síndrome metabólico (Friese et al., 2009; Gayen et al., 2009a; O'Connor et al., 2005). Además, se ha estudiado el efecto de la carencia de la CgA sobre la granulogénesis (Kim et al., 2001; Kim et al., 2005; Mahapatra et al., 2005; O'Connor et al., 2005; Obermüller et al., 2010).

El grupo del Dr. Mahata (Universidad de San Diego) ha estudiado la cepa CgA-KO centrándose, sobre todo, en aspectos relacionados con la hipertensión. La falta de catestatina, un péptido derivado de la CgA, eleva la tensión arterial en estos ratones. También han observado que la desaparición de la CgA en el animal provoca una reducción en el número y el tamaño de los gránulos cromafines (Mahapatra et al., 2005). Sin embargo, ésta es una observación que ha causado gran controversia (Hendy et al., 2006).

En la cepa CgB-KO, se ha comprobado la elevación de la tensión arterial (Zhang et al., 2009) en relación con la ausencia de la CgB. Además los animales de esta cepa muestran diabetes tipo II debido a su intolerancia a la glucosa, asociada a la reducción de la secreción de insulina, glucagón y somatostatina en los islotes, cuando éstos son estimulados y a una liberación basal de insulina elevada. Sin embargo, no

## *Discusión*

---

se observa diferencias en cuanto a la biogénesis, la morfología, la maduración, ni la liberación de los gránulos de insulina en las células beta pancreáticas (Obermüller et al., 2010).

Nuestros datos revelan que la cepa CgA/B-KO muestra diferencias en el peso de los individuos machos. Hay un incremento significativo del peso a partir de la semana 14, aunque ya es evidente desde el primer mes de vida (fig. 27). Por el contrario, ha sido descrito que la cepa CgA-KO muestra un retraso en su peso en el primer mes de vida con respecto al control, aunque después se normaliza (Mahapatra et al., 2005). Este tipo de alteración no ha sido descrita en la cepa CgB-KO (Obermüller et al., 2010) y podría indicar cambios metabólicos en los ratones CgA/B-KO en los que sería interesante profundizar. Adicionalmente los individuos machos de la cepa CgA/B-KO muestran un comportamiento agresivo que se manifiesta en la producción de heridas por mordeduras frecuentemente en los genitales. Este comportamiento coincide con el descrito con anterioridad en otro modelo de ratones que sufrieron el silenciamiento de la expresión de la MAO (Cases et al., 1995) y puede deberse a alteraciones de los neurotransmisores en el SNC como en tal caso. Además, la carencia de las cromograninas ha sido también relacionada con otras enfermedades de tipo neurológico como la esquizofrenia (Zhang et al., 2002), la enfermedad de Alzheimer (Marksteiner et al., 2000) y la epilepsia (Mahata et al., 1992).

Por lo tanto, a pesar de que las tres cepas son viables y fértiles presentan características fisiopatológicas que las convierten en modelos interesantes para estudiar las funciones de la CgA, CgB y sus correspondientes péptidos derivados.

El motivo de nuestro interés por estas cepas de ratones es el efecto que podrían tener las alteraciones de la matriz intragranular de cromograninas, sobre la acumulación y exocitosis de CA. Estos procesos se dan en multitud de tipos celulares y su modificación podría estar

implicada en las enfermedades descritas. La información que se tiene hasta el momento, acerca de la matriz en la acumulación y la exocitosis de moléculas se refiere a aspectos físicos y químicos. Así, se ha propuesto su acción adsorbiendo los componentes solubles intravesiculares para disminuir la osmolaridad en el interior de los gránulos (Helle et al., 1985) de modo que participa de forma activa en el equilibrio entre las catecolaminas unidas y libres (Schroeder et al., 1996). También es conocida su habilidad para unir  $\text{Ca}^{2+}$  y CA con baja afinidad pero alta capacidad dependiendo del pH del medio (Yoo and Albanesi, 1991). Se sabe que la liberación de moléculas desde la matriz, en el momento de la exocitosis, depende de varios factores como son el pH. Nuestro grupo ha estudiado el efecto de la alcalinización o la acidificación del interior de la vesícula en la cinética de la liberación, de forma que la alcalinización retrasa la liberación de CA mientras que la acidificación la acelera (Camacho et al., 2006) y esto podría deberse a una acción sobre los lugares de unión que quedan libres para las CA en la matriz de cromograninas. Otros factores externos que influyen en la liberación de moléculas desde la matriz son el pH extracelular (Jankowski et al., 1993; Monck et al., 1991), la temperatura (Pihel et al., 1996), la presencia de diferentes cationes divalentes en el medio extracelular (Jankowski et al., 1994; Pihel et al., 1996) y el gradiente osmótico (Borges et al., 1997). Sin embargo, esta información ha sido obtenida a partir de sistemas en los que la matriz permanecía como una constante. En el presente estudio pretendemos, por primera vez, aportar información acerca de la matriz discriminando entre la función de sus componentes mayoritarios; la CgA y la CgB.

### **33. La granulogénesis sin cromograninas.**

Las cromograninas se han relacionado en numerosos trabajos con la formación de gránulos secretores (para una revisión más amplia ver Dikeakos y Reudelhuber (2007) y Koshimizu et al. (2009)). Por este motivo

## Discusión

---

su ausencia en las células cromafines debería provocar alteraciones en la cantidad de gránulos cromafines detectados y, así ha sido descrito por otros autores (Huh et al., 2003; Kim et al., 2005; Taupenot et al., 2002).

El mecanismo más aceptado de granulogénesis en las células cromafines requiere la participación de una molécula señalizadora que induce el proceso de formación. Se ha propuesto que esta proteína podría ser la CgA y/o la CgB. Esta idea se apoya en distintos trabajos. Se ha observado que la inhibición de la expresión de la CgA en células PC12 por técnicas de ARN antisentido o ARNs pequeños interferentes, conduce a disminución en el número de vesículas secretoras y a la reducción de otras proteínas secretoras como la CgB, carboxipeptidasa E y la sinaptotagmina (Kim et al., 2001). Este aspecto también ha sido abordado *in vivo* mediante dos estrategias diferentes; el uso de ratones con la ablación genética de la expresión del gen de la CgA (Hendy et al., 2006; Mahapatra et al., 2005) y el silenciamiento de la expresión de la CgA induciendo la expresión de su secuencia antisentido (Kim et al., 2005). En ambos casos la formación de gránulos se encuentra reducida, así como la cantidad de otros constituyentes de las vesículas como las CA y el neuropéptido Y (Kim et al., 2005; Mahapatra et al., 2005). Por otro lado, se ha logrado inducir la formación de estructuras similares a gránulos secretores, expresando esta proteína en una línea celular derivada de fibroblastos que carecía inicialmente de la ruta de secreción regulada (Kim et al., 2001). Se ha propuesto una zona del extremo N-terminal de la CgA como determinante proteico que induce la granulogénesis (Taupenot et al., 2002). Igualmente, la eliminación de la CgB conlleva el fallo en la formación de gránulos y también ha sido descrita una región en el extremo N-terminal relacionada con la formación de los gránulos (Kromer et al., 1998).

Nuestros datos muestran que los ratones CgA-KO sobre-expresan 2,2 veces la CgB en el tejido de la médula adrenal (fig. 24), y que en la cepa CgB-KO, la CgA se encuentra también sobre-expresada 2,6 veces

con respecto al control (fig. 25). Estos resultados no se encuentran en consonancia con lo descrito, por Hendy (Hendy et al., 2006), en otra cepa sin CgA y, por Mahapatra (Mahapatra et al., 2005), en esta misma cepa de ratones. Una explicación posible es la evolución de la cepa a lo largo de los sucesivos cruces endogámicos, desarrollando mecanismos compensatorios que aseguren su viabilidad, como muestran nuestros datos. Si tenemos en cuenta la importancia de la secreción de hormonas y neurotransmisores que se almacenan en vesículas secretoras con matriz de cromograninas, es posible que exista uno o más mecanismos que compensen la carencia de las cromograninas para que los ratones sean viables.

La SgII es el tercer componente mayoritario de la matriz (Kagotani et al., 1991) y comparte con la CgA y la CgB sus características de afinidad y capacidad de unión al  $Ca^{2+}$  (Park et al., 2002). Se ha descrito que también se agrega en presencia de  $Ca^{2+}$  (Park et al., 2002) y es capaz de inducir la granulogénesis (Courel et al., 2008). A pesar de esto, no hemos detectado variaciones significativas en su expresión en las tres cepas de ratones *knock-out* mediante *western-blot* (fig. 24, 25 y 26), salvo el aumento que muestran los geles bidimensionales (tabla 4) y que tampoco pudo ser confirmado mediante radioinmunoensayo. Este resultado no coincide con lo observado en los ratones sin CgA por los demás autores, ya que en ambos casos describen el incremento del ARNm de la SgII al silenciar, mediante distintas estrategias, la expresión de la CgA (Hendy et al., 2006; Mahapatra et al., 2005). El motivo de esta discrepancia puede ser que nosotros hemos medido la expresión final de la proteína por *western-blot* y ambos autores miden el incremento del ARNm de la SgII, o bien, que la proporción de cambio sea tan pequeña que no hayamos podido detectarla. Otra posible explicación podría ser la actuación de mecanismos de regulación al nivel de la síntesis de la SgII (Soszynski et al., 1993).



## *Discusión*

---

En el caso de la cepa CgA-KO se ha descrito una reducción en el número y tamaño de los gránulos (Mahapatra et al., 2005). No hay información por el momento de la cepa CgB-KO con respecto a los gránulos cromafines, pero todo apunta a que nos encontramos ante una situación parecida, ya que la granulogénesis en las células beta pancreáticas no se encuentra afectada por la desaparición de la CgB (Obermüller et al., 2010). En el caso de la cepa CgA/B-KO, según muestran las imágenes de microscopía electrónica, existe granulogénesis aunque seriamente afectada (fig. 47). En los tres casos hemos detectado por medio de amperometría la liberación por exocitosis de las CA. En las células CgA-KO y CgB-KO el número de vesículas liberadas tras el estímulo es el mismo, y en las células CgA/B-KO, sigue ocurriendo la exocitosis a pesar de reducirse su frecuencia en un 66% con respecto al control. Esto pone de manifiesto la participación de las CgA y CgB en la granulogénesis puesto que se forman vesículas secretoras funcionales, pero también el hecho de que no son imprescindibles para que ésta ocurra. Este hecho explica la gran controversia que existe actualmente acerca de la proteína señalizadora, o incluso, del mecanismo que da lugar a la formación de los gránulos (Dikeakos and Reudelhuber, 2007).

Otra proteína podría ser la responsable de la formación de los gránulos en las células cromafines de los ratones CgA/B-KO, o bien, podría ocurrir que la capacidad de agregación de las cromograninas fuera suficiente para generar la señal que lleva a su formación (Beuret et al., 2004). Sin embargo, no encontramos sobre-expresión de la SgII en las cepas de ratones CgA-KO ni CgB-KO por lo que descartamos que éste sea un mecanismo compensatorio adicional por el cual la célula suple la función de la CgA y la CgB en estos animales. En la cepa de ratones CgA/B-KO, el incremento de SgII no se da de manera tan evidente como ocurre con la CgA y la CgB en las cepas CgB-KO y CgA-KO respectivamente, por lo que puede ser que esta cantidad de SgII sea suficiente para la formación de los gránulos cuya liberación hemos

detectado (Beuret et al., 2004; Courel et al., 2008) o que haya otro mecanismo compensatorio diferente para inducir la granulogénesis.

La observación de vesículas parecidas a las secretoras en el citoplasma de las células cromafines CgA/B-KO (fig. 47), unido a la comprobación de la funcionalidad de éstos por la amperometría y a las medidas de capacidad de membrana, arroja nueva luz al estudio de la granulogénesis. Nuestros resultados, no nos permiten discernir entre la posibilidad de un mecanismo de granulogénesis mediado únicamente por la capacidad agregadora de las cromograninas o la existencia de otra proteína con acción granulogénica, pero estas cepas de ratones son sin duda una valiosa herramienta para profundizar en este aspecto.

#### **34. El manejo de las catecolaminas en las células cromafines de los ratones *knock-out*.**

En el presente trabajo barajamos la hipótesis de que la matriz intravesicular de cromograninas podría ser el principal mecanismo que permite acumular CA y ATP en altas concentraciones. Esta capacidad ya ha sido descrita previamente por distintos autores, incluso en otros tipos celulares (Helle et al., 1985; Reigada et al., 2003; Tabares et al., 2003). Por lo tanto, la alteración de la composición de la matriz intravesicular debería traducirse en diferencias en el manejo de las CA por parte de las vesículas secretoras. Efectivamente, la cantidad de CA medida por HPLC con detección electroquímica en la glándula adrenal de estos animales muestra alteraciones. Hay una reducción de ambas CA, noradrenalina y adrenalina, en la cepa CgA-KO y esto coincide con lo observado por Mahapatra (Mahapatra et al., 2005). También se encuentran reducidas ambas CA en la cepa CgA/B-KO, pero únicamente la adrenalina disminuye en el ratón CgB-KO (fig. 28). Esto supone el primer indicio de la existencia de problemas en la internalización de las CA en los gránulos, proceso que las protege de los mecanismos degradativos hasta su liberación por exocitosis. Esta variación en los niveles de catecolaminas sugiere que la

## Discusión

---

causa da la agresividad observada en los animales machos de la cepa CgA/B-KO podría estar relacionada con la alteración en las cantidades de adrenalina y noradrenalina, ya que ambas se encuentran reducidas a la mitad en este tejido (fig. 28). Sería interesante estudiar estos niveles en el SNC y en el plasma de estos animales.

Por otra parte, la expresión de la enzima TH también fue objeto de estudio en las tres las cepas de ratones *knock-out*. Según nuestros datos la expresión de la TH no se encuentra alterada en las células CgA-KO, al contrario de lo descrito por Mahapatra (Mahapatra et al., 2005). En las células CgB-KO, tampoco se observa variación de la TH a pesar de presentar variación en el contenido de catecolaminas. La explicación podría estar en una diferencia en la actividad de esta enzima. Por otra parte, la expresión de la TH está incrementada 1,6 veces en la cepa CgA/B-KO, lo cual podría ser otro de los mecanismos con los que el sistema compensa la deficiencia en el almacenaje y posterior liberación de las CA en ausencia de la CgA y la CgB. Si observamos la cantidad basal de catecoles libres en el citosol medidos en las células CgA-KO y las CgB-KO, hay una reducción cuando esta cantidad es comparada con la de las células control (fig. 39 y 40) y éste hecho no se encuentra asociado a cambios en la expresión de la TH (fig. 24 y 25). La medida de la cantidad de catecoles libres en el citosol de las células CgA/B-KO muestra que no hay diferencia entre el CgA/B-KO y su control (fig. 41) esto indica que el incremento de la enzima TH podría responder a la necesidad de un mecanismos para aumentar las cantidades de CA liberadas en la cepa CgA/B-KO y nos informa de cambios más profundos en las síntesis de CA en estos animales que sería interesante explorar.

### **35. La exocitosis sin cromograninas. ¿Son funcionales los gránulos secretores?**

La eficacia de la transmisión sináptica está determinada por el fenómeno de la exocitosis y en ella influyen tanto la cantidad de contenido

acumulado dentro de cada vesícula (tamaño cuántico), como la frecuencia y la cinética con la que la liberación se da. En este trabajo, también estudiamos cómo influye la carencia de CgA y CgB en la respuesta exocitótica de las células cromafines.

La primera observación que hicimos mediante amperometría, fue la importante reducción de la secreción total de CA por las células cromafines procedentes de las tres cepas de ratones *knock-out*. Por lo tanto, sí es posible la exocitosis frente a un estímulo en los ratones de las tres cepas *knock-out*, pero la cantidad total liberada de CA se encuentra reducida en comparación al control en cada caso.

En el caso de la respuesta secretora de las células procedentes de las cepas CgA-KO y CgB-KO, el motivo de esta reducción no fue una disminución en la frecuencia de los eventos, sino la disminución de CA liberadas por cada vesícula. La carga individual (Q) media liberada por las vesículas se reduce en un 33 % y un 31 %, en las cepas CgA-KO y CgB-KO respectivamente (tabla 2). Por lo tanto descartamos que la maquinaria de la exocitosis se esté viendo afectada en estos dos casos.

A pesar del aspecto que presentan los gránulos CgA/B-KO mediante microscopía electrónica, éstos o una porción de ellos son funcionales según la amperometría y la medida de la capacidad de membrana en célula entera. Sin embargo, la reducción en las CA liberadas tras el estímulo por estas células, sí se encuentra debida, al menos en parte, a la reducción en el número de exocitosis (un 66% menos) (fig. 31). La otra causa es la reducción de la cantidad de CA liberada por cada uno de ellos (un 42% menos) (tabla 2). Puede ser que la desaparición de las CgA y CgB, esté afectando de alguna manera a los mecanismos que desencadenan la exocitosis. Los experimentos de capacidad en célula entera indican que la cantidad de membrana que se añade tras el estímulo secretagogo, es igual a los controles a pesar de que la amperometría muestra que se libera un 66% menos de vesículas secretoras con CA.

## Discusión

---

Esto podría indicar que las vesículas secretoras que se observan mediante microscopía electrónica en las células cromafines CgA/B-KO, son funcionales y que al fusionarse con la membrana igualan la cantidad de membrana añadida a pesar de ser inferiores en número que en el control. Las imágenes de microscopía electrónica muestran que el tamaño de estas vesículas es mayor, posiblemente como resultado de su hinchamiento para mantener la osmolaridad (Colliver et al., 2000) y es posible que también tengan impedimentos mayores para llegar a la región del subplasmalema para ser liberadas (Degtyar et al., 2007).

Las estructuras más grandes que se observan en las microfotografías (indicadas con una estrella en la fig. 47F) podrían corresponderse con estructuras resultantes de fallos en la formación de gránulos en la red *trans*-Golgi, como ha sido descrito anteriormente en una línea de células neuroendocrinas en las cuales se ha eliminado el colesterol de sus membranas, necesario para la correcta granulogénesis en la red *trans*-Golgi (Wang et al., 2000).

### **36. ¿Es funcional la matriz sin CgA ni CgB?**

Como ya hemos comentado anteriormente, la matriz es responsable del mantenimiento de la osmolaridad del gránulo (Helle et al., 1985) posiblemente mediante la adsorción de moléculas como el  $\text{Ca}^{2+}$  (Yoo and Albanesi, 1991) y las CA (Westermann et al., 1988) reduciendo la fracción libre de éstas. La CgA y la CgB pueden formar heterotetrámeros o heterodímeros en función de las condiciones de pH y la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (Yoo and Lewis, 1996) del medio en el que se encuentren. Esta propiedad podría estar relacionada con la correcta funcionalidad de la matriz y no es posible en la matriz de las vesículas secretoras de los ratones CgA/B-KO. Además, tengamos en cuenta que la concentración de CA intragranulares puede variar entre 0,6 y 1 M (Albillos et al., 1997; Jankowski et al., 1993; Montesinos et al., 2008), el ATP puede encontrarse en el orden de 150 mM (Kopell and Westhead, 1982); y el  $\text{Ca}^{2+}$  total entre

20-40 mM (Mahapatra et al., 2004), lo cual indica la importancia de compensar la función de la matriz.

La participación de cada graninas en la concentración de sustancias y en la liberación de las CA durante la exocitosis, permanecían desconocidas hasta la elaboración del presente trabajo.

### **36.1. El proceso de concentración de catecolaminas en el interior de los gránulos cromafines de los ratones *knock-out*.**

La reducción en el contenido en CA liberado por exocitosis (pC) indica que la capacidad acumuladora de las vesículas se encuentra deteriorada en las tres cepas de ratones *knock-out* (tabla 2). El dato que sugiere la pérdida de esta función es la determinación del contenido en CA de las vesículas tras la incubación de los cultivos con L-DOPA. En este diseño experimental tratamos de simular una situación de estrés en el que la ruta biosintética de CA se encontrara activada, con el consiguiente aumento de las CA citosólicas (Pothos et al., 2002). Los gránulos de las células cromafines de las tres cepas *knock-out* han perdido la capacidad de acumular más CA cuando éstas se encuentran en exceso en el citosol (fig. 35). Esta observación se ve reforzada por la medida de la cantidad de catecoles citosólicos por medio de electroquímica. La adición de la pargilina, un inhibidor de la MAO, durante estos experimentos, puso de manifiesto el incremento de catecoles citosólicos cuando las células son incubadas con L-DOPA, de otro modo el incremento podía haber sido enmascarado por la rápida acción de la ruta de degradación de CA (Mosharov et al., 2003). Puesto que las CA no pueden ser degradadas ni introducidas en los gránulos debido al cambio en las propiedades de la matriz, las CA incrementan en mayor medida en el citosol de las células de los ratones *knock-out*. Lo cual pone de manifiesto *in vivo*, la capacidad concentradora y reguladora de la matriz de cromograninas en éstas células y la importancia de su composición para que se conserven sus propiedades fisiológicas. Esta idea se ve apoyada por el hecho de que los

gránulos que muestra la microscopía electrónica de las células CgA/B-KO muestran mayor tamaño frente al control. Diferentes autores han descrito el incremento en el diámetro de los gránulos, debido a la entrada de agua para compensar el aumento de la concentración intragranular, cuando la concentración de CA es incrementada por la incubación con L-DOPA (Colliver et al., 2000; Sudhof, 1982).

### **36.2. Liberación de CA durante la exocitosis de las vesículas secretoras de los ratones *knock-out*.**

La presencia de factores intravesiculares que retrasan la liberación de CA se pone de manifiesto tras observar las discrepancias que existen, entre la difusión predicha, dado el coeficiente de difusión de las CA, y la observada detectada por amperometría (Alvarez de Toledo et al., 1993; Venton et al., 2002; Wightman et al., 1995). La difusión es más lenta de lo esperado, lo cual indica que ésta debe estar regulada tras la fusión de las vesículas (Rahamimoff and Fernandez, 1997). Las dos posibilidades de regulación que se han propuesto son: la apertura del poro de fusión (Lindau and Alvarez de Toledo, 2003) y, el aspecto que se examina en el presente trabajo, el papel de la matriz intragranular (Alvarez de Toledo et al., 1993; Díaz-Vera et al., 2010; Montesinos et al., 2008; Venton et al., 2002; Wightman et al., 1995). La participación de la matriz en la exocitosis ha sido puesta de manifiesto hasta el momento de forma indirecta por medio de distintas técnicas, tales como la manipulación del pH extracelular y la composición iónica (Jankowski et al., 1994), la manipulación del pH intravesicular (Camacho et al., 2006) ó de la presión osmótica del medio extracelular (Borges et al., 1997) y, mediante el uso de fármacos que desplazan las catecolaminas de la matriz (Machado et al., 2002). Así se ha visto que, pequeñas variaciones en la conformación de las cromograninas dan como resultado el cambio en su afinidad por las CA (Borges et al., 1997; Leszczyszyn et al., 1990; Pihel et al., 1996; Rahamimoff and Fernandez, 1997; Schroeder et al., 1996).

Los parámetros cinéticos de la exocitosis nos proporcionan información acerca la liberación de catecolaminas (Schroeder et al., 1996). Proporcionándonos así, una estimación del efecto del cambio la composición de la matriz e indicando posibles cambios en su conformación. Asimismo, podemos estudiar las diferencias provocadas por la carencia de una cromogranina determinada y la sobre-expresión de otra. Este análisis muestra interesantes modificaciones en las espigas amperométricas de las tres cepas, además de la disminución en la cantidad de CA liberadas (tabla 2). El análisis de cada evento exocitótico por separado de las células CgA-KO, indica que la disminución en la carga (Q) no se encuentra asociada a una reducción en la  $I_{max}$ , sino a una reducción de la duración de la espiga. Las constantes de caída ( $F_{t_1}$  y  $F_{t_2}$ ) y el ancho a media altura ( $t_{1/2}$ ), son menores en las espigas de las células CgA-KO que en los controles, sugiriendo que la difusión de las CA a partir de la matriz es más rápida desde etapas tempranas de la fusión debido a su pérdida de afinidad por éstas (Montesinos et al., 2008). Recordemos que en la matriz de estos gránulos está sobre-expresada la CgB y estos resultados indican que sus propiedades son distintas a las de la CgA. Actualmente no existe información publicada acerca de la afinidad de la CgB por las CA, pero nuestros datos sugieren que su constante de afinidad por las CA es menor que la de la CgA puesto que las CA parecen liberarse de la matriz de forma más rápida (fig. 48). Efectos similares de retraso y aceleración de la liberación de CA han sido descritos por nuestro grupo tras el tratamiento de las células con agentes quelantes de NO (Machado et al., 2000) y en colaboración con el grupo del Dr. Wightman, mediante el incremento de la temperatura (Pihel et al., 1996) y la reducción de la osmolaridad del medio extracelular (Borges et al., 1997).

Cuando las células CgA-KO son tratadas con L-DOPA pierden la habilidad de concentrar más catecolaminas (fig. 35 A) puesto que no son capaces de incrementar su contenido, al contrario de lo esperado (Gong et al., 2003; Mosharov et al., 2003; Pothos et al., 2002). Sin embargo, se



## *Discusión*

---

observa que la  $I_{max}$  sí incrementa, al contrario de lo descrito ante este tratamiento en otros estudios (Colliver et al., 2000). La razón puede ser que el incremento de la fracción libre de catecolaminas intragranulares, sea debido a la menor afinidad de esta matriz formada principalmente por CgB. Esto se traduciría en la entrada de agua para mantener la osmolaridad y en una llegada de concentraciones más altas a la superficie del electrodo en las fases iniciales de la fusión ( $I_{max}$ ). Este fenómeno ha sido descrito con anterioridad en trabajos en los que la cantidad de CA ha sido manipulada (Colliver et al., 2000; Sudhof, 1982). La entrada de agua debería producir el incremento de diámetro de los gránulos en las células CgA-KO, lo cual ha sido comunicado sólo en uno de los trabajos con ratones sin CgA (Hendy et al., 2006). Los autores de este trabajo señalan que es necesario hacer una distinción para las medidas morfométricas entre los gránulos adrenérgicos y los noradrenérgicos, ya que de otra forma las diferencias quedan enmascaradas y a esto atribuyen que el grupo del Dr. Mahata no vea estas diferencias.

Otra observación que aporta información acerca de las propiedades de la matriz rica en CgB (CgA-KO), se deriva de enfrentar la amplitud máxima de la espiga  $I_{max}$  con la carga. Se ha descrito que el incremento en la amplitud de la espiga ( $I_{max}$ ) se acompaña del incremento del contenido de CA liberadas (Q) (Colliver et al., 2000; Grabner et al., 2005). Esta relación cambia en las vesículas que liberan más CA, las más grandes, alcanzándose concentraciones en la superficie del electrodo mayores en las vesículas CgA-KO con contenido similar en CA (fig. 32). Esta representación de las espigas de la cepa CgA-KO frente a las del control, mostró cómo la relación variaba sobre todo en las vesículas de mayor carga, cuya  $I_{max}$  era mayor de lo esperado al compararlas con la situación control. De nuevo se pone de manifiesto la pérdida de afinidad de las CA por la matriz rica en CgB, ya que la misma cantidad de CA es liberada de forma más rápida durante la exocitosis (fig. 48).

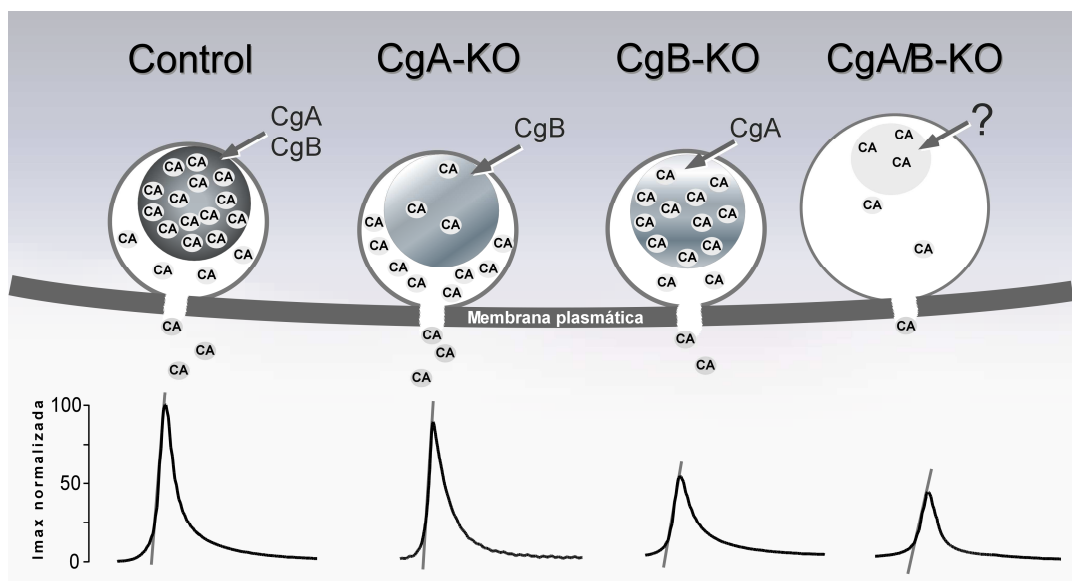
Veamos lo que se desprende del análisis amperométrico de la cepa CgB-KO. La disminución del contenido en CA media se da en proporción similar a lo que ocurre al eliminar la CgA (31%), pero las CA son liberadas de forma más lenta en este caso. Esto se encuentra indicado por la disminución de la amplitud máxima ( $I_{max}$ ) y la pendiente de subida ( $m$ ) (tabla 2). Los  $Ft_1$  y  $Ft_2$  muestran también una tendencia a incrementarse. Adicionalmente, la representación de la  $I_{max}$  frente a la  $Q$ , muestra cómo las vesículas de mayor contenido ( $Q$ ) alcanzan concentraciones máximas al llegar a la superficie del electrodo ( $I_{max}$ ) menores (fig. 33). Todos estos resultados tomados en conjunto indican que la matriz enriquecida en CgA posee mayor afinidad y poder de retención por las CA que en el caso anterior. La CgA se une a las CA con baja afinidad con una  $K_d=2,1 \times 10^{-3}$  M, pero alta capacidad, 32 mol CA/mol (Videen et al., 1992). Desafortunadamente, estos parámetros no han sido comunicados para la CgB, pero nuestros datos indican que la CgB es menos afín que la CgA por las CA y probablemente tenga menos capacidad que ésta de albergar CA. La matriz de CgA parece ser más eficaz a la hora de retener las CA ya que ocurre este retraso en su liberación (fig.48).

Los eventos exocitóticos de las células CgA/B-KO se visualizaron como espigas amperométricas de aspecto aparentemente normal. A pesar de ello, su análisis indica la reducción drástica de la carga acompañada de la reducción de la amplitud máxima  $I_{max}$  y la pendiente de subida  $m$ . Se libera un 42 % menos de CA y éstas son liberadas de forma más lenta que en el caso del control (tabla 2). La reducción del contenido de que observamos no corresponde con el esperado si las únicas proteínas formadoras de la matriz fueran la CgA y la CgB, por lo tanto los gránulos secretores de las células CgA/B-KO deben tener algún tipo de material que está reteniendo la liberación de las CA, a pesar de haber eliminado la CgA y la CgB de su composición. El retraso en la liberación del contenido, indica una mayor afinidad de este material por las CA que la matriz del control, como ocurre en el ratón CgB-KO, o bien, defectos en el

## Discusión

hinchamiento de la matriz (Fernandez et al., 1991; Monck et al., 1991; Travis and Wightman, 1998).

El modelo que hemos elaborado tras el presente trabajo se representa en la figura 48.



**Figura 48. Modelo explicativo de los cambios en la cinética y la capacidad de retención de las cromograninas en los gránulos secretorios de los ratones CgA-KO, CgB-KO y CgA/B-KO en comparación con un control.** Para la representación del proceso no se han respetado las escalas reales. Las espigas medias se han hallado mediante la normalización de su  $I_{max}$ . Se muestra la pendiente ( $m$ ) con una línea de color gris.

### 37. ¿Qué otra proteína podría sustituir la CgA y la CgB?

El análisis del proteoma de los gránulos CgB-KO y CgA/B-KO pretendió aclarar la presencia de otras proteínas en el interior de los gránulos. La matriz de los gránulos CgA/B-KO podría estar formada por SgII ya que comparte propiedades con la CgA y CgB como la dependencia del pH para su agregación, su afinidad por el  $Ca^{2+}$  (Park et al., 2002), y su acción granulogénica (Courel et al., 2008). La comparación de los gels bidimensionales de los extractos granulares de la cepa CgA/B-KO, no mostró la sobre-expresión evidente de ninguna de las proteínas de la

familia de las graninas, salvo el incremento de 1,65 veces de la SgII no confirmado por otras técnicas. A pesar de que existe limitaciones para detectar y cuantificar la expresión de las graninas mediante cualquiera de estas técnicas por su alto grado de escisión en péptidos (Hoflehner et al., 1995; Lee and Hook, 2009), podemos concluir que no parece ser la sobre-expresión de la SgII el mecanismo compensatorio en la matriz intravesicular en su función como quelante de moléculas en estos animales, aunque sí puede estar llevando a cabo labores en la granulogénesis como ha sido propuesto (Courel et al., 2008).

La comparación de los geles de las cepas CgB-KO y CgA/B-KO frente a sus respectivos controles, tampoco mostró la expresión diferencial de otra proteína de la familia de las graninas. Por lo que descartamos la sobre-expresión de otra granina como mecanismo compensatorio. Sin embargo, encontramos otras proteínas cuya función en los gránulos podría estar relacionada con la matriz.

Una parte de las proteínas identificadas pueden ser agrupadas funcionalmente como chaperonas. En el caso de los gránulos CgB-KO, encontramos sobre-expresada la proteína de choque térmico 1 (chaperonina) y la prohibitina (tabla 3), con acción chaperona ambas y, por lo tanto, relacionadas con el andamiaje y correcto plegamiento de otras proteínas. En el caso de los gránulos CgA/B-KO, aparece otra proteína con función chaperona, la proteína de choque térmico 90 (tabla 4). La sobre-expresión de estas enzimas podría indicar un intento de mantener la funcionalidad de la matriz mediante la conservación de la estructura de la proteína ó proteínas que la forman.

Podemos agrupar otra parte de las proteínas con expresión diferencial, en proteínas clásicamente atribuidas a la mitocondria, como la aldehído deshidrogenasa mitocondrial, la subunidad beta de la ATP sintasa, la acil-coenzima A deshidrogenasa o la prohibitina. A pesar de no haber detectado la presencia del marcador mitocondrial COX1 en la

## *Discusión*

---

fracción granular del gradiente (fig. 43), estas proteínas podrían responder a una contaminación mitocondrial detectable mediante la electroforesis bidimensional. Sin embargo, la expresión de otras proteínas mitocondriales que fueron detectadas, permaneció invariable. De hecho, algunas de estas proteínas ya han sido identificadas en gránulos cromafines bovinos, como la proteína de choque térmico 1 (Chaperonina) (Wegrzyn et al., 2007). El motivo de la presencia de las otras proteínas, no descritas con anterioridad en este tipo de gránulos requiere un estudio más profundo.

En la lista de proteínas identificadas con expresión diferencial, destaca la aparición tanto en los gránulos CgB-KO, como en los CgA/B-KO, de las tres subunidades del fibrinógeno; cadena  $\alpha$ , cadena  $\beta$ , y cadena  $\gamma$  (tabla 3 y tabla 4). El fibrinógeno es una proteína implicada en la cadena de coagulación y no había sido descrita, hasta el momento, en el interior de los gránulos cromafines. Su expresión en éstos resulta especialmente relevante debido a que comparte algunas características con las cromograninas en cuanto a su habilidad de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  y las CA (Everse et al., 1998; Martini et al., 2007). Además sufre procesamiento, dando lugar a péptidos derivados y, conformacionalmente, consiste en un dímero cuya mitad de la molécula está compuesta por una cadena  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  unidas por enlaces disulfuro. En el extremo amino terminal de la molécula posee un puente disulfuro estructura que en las graninas ha sido relacionado con la biogénesis de gránulos secretores (Zhang and Redman, 1996). Las imágenes de microscopía electrónica muestran una matriz laxa y de aspecto poco denso en el caso de los gránulos de la cepa CgA/B-KO (fig. 47) que podría corresponder con el fibrinógeno, aunque esta asunción debe ser confirmada.

## ***Conclusiones***

1. La cromogranina A y la cromogranina B son componentes de la matriz directamente implicados en la acumulación y en la cinética de la exocitosis de CA en los gránulos cromafines y probablemente en todas las vesículas secretoras de núcleo denso.
2. La acumulación de CA en los gránulos cromafines de los ratones CgA-KO, CgB-KO y CgA/B-KO se encuentra saturada ante una sobrecarga de catecolaminas, por el contrario existe una amplia capacidad de acumulación en sus respectivos gránulos control.
3. La cromogranina A y cromogranina B pueden estar implicadas en la correcta granulogénesis de las vesículas cromafines pero no son imprescindibles para este proceso.
4. No parece haber otra granina ocupando la función de la cromogranina A y cromogranina B en la matriz de los gránulos CgA/B-KO como quelante de catecolaminas.
5. El fibrinógeno podría estar supliendo la función de las cromograninas en la granulogénesis y en su función de concentración y liberación de las CA durante la exocitosis.

## ***Bibliografía***



- Albillos, A., Dernick, G., Horstmann, H., Almers, W., Alvarez de Toledo, G. and Lindau, M. (1997) The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature*, **389**, 509-512.
- Ales, E., Tabares, L., Poyato, J.M., Valero, V., Lindau, M. and Alvarez de Toledo, G. (1999) High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nat Cell Biol*, **1**, 40-44.
- Alonso, M.T., Barrero, M.J., Michelena, P., Carnicero, E., Cuchillo, I., Garcia, A.G., Garcia-Sancho, J., Montero, M. and Alvarez, J. (1999) Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> Release in Chromaffin Cells Seen from inside the ER with Targeted Aequorin. Vol. 144, pp. 241-254.
- Alvarez de Toledo, G., Fernandez-Chacon, R. and Fernandez, J.M. (1993) Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature*, **363**, 554-558.
- Andreis, P.G., Malendowicz, L.K., Belloni, A.S. and Nussdorfer, G.G. (1995) Effects of pituitary adenylate-cyclase activating peptide (PACAP) on the rat adrenal secretory activity: preliminary in-vitro studies. *Life Sci*, **56**, 135-142.
- Anton, A.H. and Sayre, D.F. (1962) A study of the factors affecting the aluminum oxide-trihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines. *J Pharmacol Exp Ther*, **138**, 360-375.
- Apps, D.K. (1997) Membrane and soluble proteins of adrenal chromaffin granules. Vol. 8, pp. 121-131.
- Arvan, P. and Castle, D. (1998) Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *Biochem J*, **332 ( Pt 3)**, 593-610.
- Augustin, I., Rosenmund, C., Sudhof, T.C. and Brose, N. (1999) Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature*, **400**, 457-461.
- Bader, M.F., Thierse, D., Aunis, D., Ahnert-Hilger, G. and Gratzl, M. (1986) Characterization of hormone and protein release from alpha-toxin-permeabilized chromaffin cells in primary culture. *J Biol Chem*, **261**, 5777-5783.
- Baker, P.F. and Knight, D.E. (1978) A high-voltage technique for gaining rapid access to the interior of secretory cells [proceedings]. *J Physiol*, **284**, 30P-31P.
- Baker, P.F. and Knight, D.E. (1979) Calcium-dependent exocytosis in 'leaky' bovine adrenal medullary cells has a specific requirement for magnesium adenosine triphosphate [proceedings]. *J Physiol*, **295**, 89P.
- Banks, P. and Helle, K. (1965) The release of protein from the stimulated adrenal medulla. *Biochem J*, **97**, 40C-41C.

## Bibliografía

---

- Benedum, U.M., Lamouroux, A., Konecki, D.S., Rosa, P., Hille, A., Baeuerle, P.A., Frank, R., Lottspeich, F., Mallet, J. and Huttner, W.B. (1987) The primary structure of human secretogranin I (chromogranin B): comparison with chromogranin A reveals homologous terminal domains and a large intervening variable region. Vol. 6, pp. 1203-1211.
- Bennett, M.K., Calakos, N. and Scheller, R.H. (1992) Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science*, **257**, 255-259.
- Bennett, M.K. and Scheller, R.H. (1993) The Molecular Machinery for Secretion is Conserved from Yeast to Neurons. Vol. 90, pp. 2559-2563.
- Berberian, K., Torres, A.J., Fang, Q., Kisler, K. and Lindau, M. (2009) F-Actin and Myosin II Accelerate Catecholamine Release from Chromaffin Granules. Vol. 29, pp. 863-870.
- Beuret, N., Stettler, H., Renold, A., Rutishauser, J. and Spiess, M. (2004) Expression of Regulated Secretory Proteins Is Sufficient to Generate Granule-like Structures in Constitutively Secreting Cells. Vol. 279, pp. 20242-20249.
- Bittner, M.A. and Holz, R.W. (1992) Kinetic analysis of secretion from permeabilized adrenal chromaffin cells reveals distinct components. *J Biol Chem*, **267**, 16219-16225.
- Blaschko, H. (1939) The specific action of 1-dopa decarboxylase. *J Physiol (Lond)*, **96**, 5OP.
- Blaschko, H., Comline, R.S., Schneider, F.H., Silver, M. and Smith, A.D. (1967a) Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation. Vol. 215, pp. 58-59.
- Blaschko, H., Firemark, H., Smith, A.D. and Winkler, H. (1967b) Lipids of the adrenal medulla. Lysolecithin, a characteristic constituent of chromaffin granules. Vol. 104, pp. 545-549.
- Blaschko, H. and Welch, A.D. (1953) Localization of adrenaline in cytoplasmic particles of the bovine adrenal medulla. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol*, **219**, 17-22.
- Boksa, P., St-Pierre, S. and Livett, B.G. (1982) Characterization of substance P and somatostatin receptors on adrenal chromaffin cells using structural analogues. *Brain Res*, **245**, 275-283.
- Borges, R., Delgado, G. and Díaz, J. (2004) New Insights About the Functional Role of Chromogranins in the Latest Steps of Exocytosis. *Current Medicinal Chemistry*, **4**.

- Borges, R., Machado, J.D., Betancor, G. and Camacho, M. (2002) Pharmacological regulation of the late steps of exocytosis. *Ann N Y Acad Sci*, **971**, 184-192.
- Borges, R., Sala, F. and Garcia, A.G. (1986) Continuous monitoring of catecholamine release from perfused cat adrenals. *J Neurosci Methods*, **16**, 289-300.
- Borges, R., Travis, E.R., Hochstetler, S.E. and Wightman, R.M. (1997) Effects of External Osmotic Pressure on Vesicular Secretion from Bovine Adrenal Medullary Cells. Vol. 272, pp. 8325-8331.
- Borregaard, N., Lollike, K., Kjeldsen, L., Sengelov, H., Bastholm, L., Nielsen, M.H. and Bainton, D.F. (1993) Human neutrophil granules and secretory vesicles. Vol. 51, pp. 187-198.
- Boutahricht, M., Guillemot, J., Montero-Hadjadje, M., Bellafqih, S., El Ouezzani, S., Alaoui, A., Yon, L., Vaudry, H., Anouar, Y. and Magoul, R. (2005) Biochemical characterisation and immunohistochemical localisation of the secretogranin II-derived peptide EM66 in the hypothalamus of the jerboa (*Jaculus orientalis*): modulation by food deprivation. Vol. 17, pp. 372-378.
- Brooks, J.C. and Carmichael, S.W. (1987) Ultrastructural demonstration of exocytosis in intact and saponin-permeabilized cultured bovine chromaffin cells. *Am J Anat*, **178**, 85-89.
- Brose, N., Petrenko, A.G., Sudhof, T.C. and Jahn, R. (1992) Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science*, **256**, 1021-1025.
- Bruns, D., Riedel, D., Klingauf, J. and Jahn, R. (2000) Quantal release of serotonin. *Neuron*, **28**, 205-220.
- Buchanan, C.M., Phillips, A.R. and Cooper, G.J. (2001) Preptin derived from proinsulin-like growth factor II (proIGF-II) is secreted from pancreatic islet beta-cells and enhances insulin secretion. Vol. 360, pp. 431-439.
- Bulenda, D. and Gratzl, M. (1985) Matrix free Ca<sup>2+</sup> in isolated chromaffin vesicles. Vol. 24, pp. 7760-7765.
- Burgoyne, R.D. (1995) Fast exocytosis and endocytosis triggered by depolarisation in single adrenal chromaffin cells before rapid Ca<sup>2+</sup> current run-down. *Pflugers Arch*, **430**, 213-219.
- Burgoyne, R.D. and Cheek, T.R. (1987) Reorganisation of peripheral actin filaments as a prelude to exocytosis. *Biosci Rep*, **7**, 281-288.
- Burgoyne, R.D. and Handel, S.E. (1994) Activation of exocytosis by GTP analogues in adrenal chromaffin cells revealed by patch-clamp capacitance measurement. *FEBS Lett*, **344**, 139-142.

## Bibliografía

---

- Burgoyne, R.D. and Morgan, A. (1998a) Analysis of regulated exocytosis in adrenal chromaffin cells: insights into NSF/SNAP/SNARE function. *Bioessays*, **20**, 328-335.
- Burgoyne, R.D. and Morgan, A. (1998b) Calcium sensors in regulated exocytosis. *Cell Calcium*, **24**, 367-376.
- Burgoyne, R.D. and Morgan, A. (2003) Secretory granule exocytosis. *Physiological Reviews*, Vol. 83, pp. 581-632.
- Burns, M.E. and Augustine, G.J. (1995) Synaptic structure and function: dynamic organization yields architectural precision. *Cell*, **83**, 187-194.
- Calakos, N. and Scheller, R.H. (1996) Synaptic vesicle biogenesis, docking, and fusion: a molecular description. *Physiol. Rev.*, **76**, 1-29.
- Camacho, M., Machado, J.D., Alvarez, J. and Borges, R. (2008) Intravesicular calcium release mediates the motion and exocytosis of secretory organelles: a study with adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem*, **283**, 22383-22389.
- Camacho, M., Machado, J.D., Montesinos, M.S., Criado, M. and Borges, R. (2006) Intragranular pH rapidly modulates exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J Neurochem*, **96**, 324-334.
- Cases, O., Seif, I., Grimsby, J., Gaspar, P., Chen, K., Pournin, S., Muller, U., Aguet, M., Babinet, C., Shih, J.C. and et, a. (1995) Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. Vol. 268, pp. 1763-1766.
- Cochilla, A.J., Angleson, J.K. and Betz, W.J. (2000) Differential regulation of granule-to-granule and granule-to-plasma membrane fusion during secretion from rat pituitary lactotrophs. *J Cell Biol*, **150**, 839-848.
- Colliver, T.L., Pyott, S.J., Achalabun, M. and Ewing, A.G. (2000) VMAT-Mediated changes in quantal size and vesicular volume. *J Neurosci*, **20**, 5276-5282.
- Coupland, R., Kobayashi, S, Serizawa, Y and Fujita, T. (1979) SGC cell: the third type of adrenal chromaffin cell. In Uadin, A. and Barchau, J. (eds.), *Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers*. Pergamon Press, New York, pp. 313-315.
- Coupland, R.E. (1965) (Electron Microscopic Observations on the Structure of the Rat Adrenal Medulla. I. The Ultrastructure and Organization of Chromaffin Cells in the Normal Adrenal Medulla.). *J Anat*, **99**, 231-254.

- Coupland, R.E., Pyper, A.S. and Hopwood, D. (1964) A Method for Differentiating between Noradrenaline- and Adrenaline-Storing Cells in the Light and Electron Microscope. *Nature*, **201**, 1240-1242.
- Courel, M., O'Connor, D.T. and Taupenot, L. (2008) Granulogenesis in Sympathoadrenal Chromaffin Cells: Contribution of the Neuroendocrine Secretory Protein Secretogranin II. *American Journal of Kidney Diseases*, Vol. 51, pp. B40-B40.
- Courel, M., Rodemer, C., Nguyen, S.T., Pance, A., Jackson, A.P., O'Connor D, T. and Taupenot, L. (2006) Secretory granule biogenesis in sympathoadrenal cells: identification of a granulogenic determinant in the secretory prohormone chromogranin A. *J Biol Chem*, **281**, 38038-38051.
- Crivellato, E., Nico, B. and Ribatti, D. (2008) The chromaffin vesicle: advances in understanding the composition of a versatile, multifunctional secretory organelle. Vol. 291, pp. 1587-1602.
- Chanat, E. and Huttner, W.B. (1991) Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network. Vol. 115, pp. 1505-1519.
- Chanat, E., Weiss, U., Huttner, W.B. and Tooze, S.A. (1993) Reduction of the disulfide bond of chromogranin B (secretogranin I) in the trans-Golgi network causes its missorting to the constitutive secretory pathways. Vol. 12, pp. 2159-2168.
- Cheek, T.R. and Burgoyne, R.D. (1986) Nicotine-evoked disassembly of cortical actin filaments in adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett*, **207**, 110-114.
- Chen, D., Lemons, P.P., Schraw, T. and Whiteheart, S.W. (2000) Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 and 4 in lysosome release. Vol. 96, pp. 1782-1788.
- Chien, J.B., Wallingford, R.A. and Ewing, A.G. (1990) Estimation of free dopamine in the cytoplasm of the giant dopamine cell of *Planorbis corneus* by voltammetry and capillary electrophoresis. Vol. 54, pp. 633-638.
- Chow, R. and von Ruden, L. (1995) Electrochemical detection of secretion from single cells. In Sackman, B. and Neher, E. (eds.), *Single-Channel Recording*. Plenum Press, New York, pp. 245-275.
- Chow, R.H., von Ruden, L. and Neher, E. (1992) Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature*, **356**, 60-63.
- Chung, S.H., Joberty, G., Gelino, E.A., Macara, I.G. and Holz, R.W. (1999) Comparison of the effects on secretion in chromaffin and PC12 cells of Rab3 family members and mutants. Evidence that inhibitory

## Bibliografía

---

- effects are independent of direct interaction with Rabphilin3. *J Biol Chem*, **274**, 18113-18120.
- Dale, H.H., Feldberg, W. and Vogt, M. (1936) Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *J Physiol*, **86**, 353-380.
- Darios, F., Wasser, C., Shakirzyanova, A., Giniatullin, A., Goodman, K., Munoz-Bravo, J.L., Raingo, J., Jorgacevski, J., Kreft, M., Zorec, R., Rosa, J.M., Gandia, L., Gutierrez, L.M., Binz, T., Giniatullin, R., Kavalali, E.T. and Davletov, B. (2009a) Sphingosine facilitates SNARE complex assembly and activates synaptic vesicle exocytosis. Vol. 62, pp. 683-694.
- Darios, F., Wasser, C., Shakirzyanova, A., Giniatullin, A., Goodman, K., Munoz-Bravo, J.L., Raingo, J., Jorgacevski, J., Kreft, M., Zorec, R., Rosa, J.M., Gandia, L., Gutierrez, L.M., Binz, T., Giniatullin, R., Kavalali, E.T. and Davletov, B. (2009b) Sphingosine facilitates SNARE complex assembly and activates synaptic vesicle exocytosis. *Neuron*, **62**, 683-694.
- Degtyar, V.E., Allersma, M.W., Axelrod, D. and Holz, R.W. (2007) Increased motion and travel, rather than stable docking, characterize the last moments before secretory granule fusion. Vol. 104, pp. 15929-15934.
- Del Castillo, J. and Katz, B. (1954) Quantal components of the end-plate potential. *Journal of Physiology*, **124**, 560-573.
- Dernick, G., Gong, L.W., Tabares, L., Alvarez de Toledo, G. and Lindau, M. (2005) Patch amperometry: high-resolution measurements of single-vesicle fusion and release. *Nat Methods*, **2**, 699-708.
- Diaz-Flores, L., Gutierrez, R., Varela, H., Valladares, F., Alvarez-Arguelles, H. and Borges, R. (2008) Histogenesis and morphofunctional characteristics of chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)*, **192**, 145-163.
- Díaz-Vera, J., G. Morales, Y., Hernández-Fernaud, J.R., Camacho, M., Montesinos, M.S., Calegari, F., Huttner, W.B., Borges, R.a. and Machado, J.D. (2010) Chromogranin B gene ablation reduces the catecholamine cargo and decelerates exocytosis in chromaffin secretory vesicles. *Journal of Neuroscience*.
- Dikeakos, J.D. and Reudelhuber, T.L. (2007) Sending proteins to dense core secretory granules: still a lot to sort out. Vol. 177, pp. 191-196.
- Douglas, W.W. and Rubin, R.P. (1961a) Mechanism of nicotinic action at the adrenal medulla: calcium as a link in stimulus-secretion coupling. *Nauchni Tr Vissh Med Inst Sofiia*, **192**, 1087-1089.
- Douglas, W.W. and Rubin, R.P. (1961b) The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J Physiol (London)*, **159**, 40-57.

- Douglas, W.W. and Rubin, R.P. (1964) Stimulant Action of Barium on the Adrenal Medulla. *Nature*, **203**, 305-307.
- Dulubova, I., Lou, X., Lu, J., Huryeva, I., Alam, A., Schneggenburger, R., Sudhof, T.C. and Rizo, J. (2005) A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity? *EMBO J*, **24**, 2839-2850.
- Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Sudhof, T.C. and Rizo, J. (1999) A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *Embo J*, **18**, 4372-4382.
- Dunn, L.A. and Holz, R.W. (1983) Catecholamine secretion from digitonin-treated adrenal medullary chromaffin cells. *J Biol Chem*, **258**, 4989-4993.
- Eberhard, D.A., Cooper, C.L., Low, M.G. and Holz, R.W. (1990) Evidence that the inositol phospholipids are necessary for exocytosis. Loss of inositol phospholipids and inhibition of secretion in permeabilized cells caused by a bacterial phospholipase C and removal of ATP. *Biochem J*, **268**, 15-25.
- Eisenhofer, G., Keiser, H., Friberg, P., Mezey, E., Huynh, T.-T., Hiremagalur, B., Ellingson, T., Duddempudi, S., Eijsbouts, A. and Lenders, J.W.M. (1998) Plasma Metanephrines Are Markers of Pheochromocytoma Produced by Catechol-O-Methyltransferase Within Tumors. Vol. 83, pp. 2175-2185.
- Engisch, K.L. and Nowycky, M.C. (1998) Compensatory and excess retrieval: two types of endocytosis following single step depolarizations in bovine adrenal chromaffin cells. *J Physiol*, **506 (Pt 3)**, 591-608.
- Euler, U.S.v. (1972) Synthesis, uptake and storage of catecholamines in adrenergic nerves, the effects of drugs. In Blaschko, H. and Muscholl, E. (eds.), *Catecholamines*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 186-230.
- Everse, S.J., Spraggon, G., Veerapandian, L., Riley, M. and Doolittle, R.F. (1998) Crystal Structure of Fragment Double-D from Human Fibrin with Two Different Bound Ligands. *Biochemistry*, **37**, 8637-8642.
- Falkensammer, G., Fischer-Colbrie, R., Richter, K. and Winkler, H. (1985) Cell-free and cellular synthesis of chromogranin A and B of bovine adrenal medulla. Vol. 14, pp. 735-746.
- Fatt, P. and Katz, B. (1952) Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol*, **117**, 109-128.
- Fernandez, J.M., Villalon, M. and Verdugo, P. (1991) Reversible condensation of mast cell secretory products in vitro. *Biophys J*, **59**, 1022-1027.

## Bibliografía

---

- Fesce, R., Grohovaz, F., Valtorta, F. and Meldolesi, J. (1994) Neurotransmitter release: fusion or [kiss-and-run]? *Trends in Cell Biology*, **4**, 1-4.
- Finnegan, J.M., Pihel, K., Cahill, P.S., Huang, L., Zerby, S.E., Ewing, A.G., Kennedy, R.T. and Wightman, R.M. (1996) Vesicular quantal size measured by amperometry at chromaffin, mast, pheochromocytoma, and pancreatic beta-cells. *Journal of Neurochemistry*, **66**, 1914-1923.
- Fischer-Colbrie, R., Hagn, C., Kilpatrick, L. and Winkler, H. (1986) Chromogranin C: a third component of the acidic proteins in chromaffin granules. Vol. 47, pp. 318-321.
- Friese, R.S., Gayen, J.R., Mahapatra, N.R., Schmid-Schonbein, G.W., O'Connor, D.T. and Mahata, S.K. (2009) Global metabolic consequences of the chromogranin A-null model of hypertension: Transcriptomic detection, pathway identification, and experimental verification. p. 00164.02009.
- Garcia, A.G., Garcia-De-Diego, A.M., Gandia, L., Borges, R. and Garcia-Sancho, J. (2006) Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev*, **86**, 1093-1131.
- Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Bader, M.F. and Vitale, N. (2003) Regulation of exocytosis in adrenal chromaffin cells: focus on ARF and Rho GTPases. *Cell Signal*, **15**, 893-899.
- Gasnier, C., Karine, L., Olivier, R., Jean-Marc, S., Dominique, A. and Marie-Hélène, M.-B. (2004) Characterization and location of post-translational modifications on chromogranin B from bovine adrenal medullary chromaffin granules. Vol. 4, pp. 1789-1801.
- Gayen, J.R., Gu, Y., O'Connor, D.T. and Mahata, S.K. (2009a) Global Disturbances in Autonomic Function Yield Cardiovascular Instability and Hypertension in the Chromogranin A Null Mouse. Vol. 150, pp. 5027-5035.
- Gayen, J.R., Saberi, M., Schenk, S., Biswas, N., Vaingankar, S.M., Cheung, W.W., Najjar, S.M., O'Connor, D.T., Bandyopadhyay, G. and Mahata, S.K. (2009b) A Novel Pathway of Insulin Sensitivity in Chromogranin A Null Mice. Vol. 284, pp. 28498-28509.
- Gerdes, H.H., Rosa, P., Phillips, E., Baeuerle, P.A., Frank, R., Argos, P. and Huttner, W.B. (1989) The primary structure of human secretogranin II, a widespread tyrosine-sulfated secretory granule protein that exhibits low pH- and calcium-induced aggregation. Vol. 264, pp. 12009-12015.
- Gil, A., Rueda, J., Viniegra, S. and Gutierrez, L.M. (2000) The F-actin cytoskeleton modulates slow secretory components rather than



- readily releasable vesicle pools in bovine chromaffin cells. *Neuroscience*, **98**, 605-614.
- Giner, D., Lopez, I., Villanueva, J., Torres, V., Viniestra, S. and Gutierrez, L.M. (2007) Vesicle movements are governed by the size and dynamics of F-actin cytoskeletal structures in bovine chromaffin cells. *Neuroscience*, **146**, 659-669.
- Gong, L.W., Hafez, I., Alvarez de Toledo, G. and Lindau, M. (2003) Secretory vesicles membrane area is regulated in tandem with quantal size in chromaffin cells. *J Neurosci*, **23**, 7917-7921.
- Grabner, C.P., Price, S.D., Lysakowski, A. and Fox, A.P. (2005) Mouse chromaffin cells have two populations of dense core vesicles. *J Neurophysiol*, **94**, 2093-2104.
- Green, D.J. and Perlman, R.L. (1981) On-line measurement of catecholamine secretion. *Anal Biochem*, **110**, 270-276.
- Greene, L.A. and Tischler, A.S. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Vol. 73, pp. 2424-2428.
- Gundelfinger, E.D., Kessels, M.M. and Qualmann, B. (2003) Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **4**, 127.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, **391**, 85-100.
- Helle, K.B. (2000) The chromogranins. Historical perspectives. *Adv Exp Med Biol*, **482**, 3-20.
- Helle, K.B. (2004) The granin family of uniquely acidic proteins of the diffuse neuroendocrine system: comparative and functional aspects. Vol. 79, pp. 769-794.
- Helle, K.B., Reed, R.K., Pihl, K.E. and Serck-Hanssen, G. (1985) Osmotic properties of the chromogranins and relation to osmotic pressure in catecholamine storage granules. *Acta Physiol Scand*, **123**, 21-33.
- Helle, K.B., Serck-Hanssen, G. and Aardal, S. (1993) Functional aspects of the adrenal medullary chromogranins. *Neurochem Int*, **22**, 353-360.
- Hendy, G.N., Li, T., Girard, M., Feldstein, R.C., Mulay, S., Desjardins, R., Day, R., Karaplis, A.C., Tremblay, M.L. and Canaff, L. (2006) Targeted Ablation of the Chromogranin A (Chga) Gene: Normal Neuroendocrine Dense-Core Secretory Granules and Increased Expression of Other Granins. Vol. 20, pp. 1935-1947.
- Henry, J.P., Botton, D., Sagne, C., Isambert, M.F., Desnos, C., Blanchard, V., Raisman-Vozari, R., Krejci, E., Massoulie, J. and Gasnier, B.

## Bibliografía

---

- (1994) Biochemistry and molecular biology of the vesicular monoamine transporter from chromaffin granules. *J Exp Biol*, **196**, 251-262.
- Herrera, M., Kao, L.S., Curran, D.J. and Westhead, E.W. (1985) Flow-injection analysis of catecholamine secretion from bovine adrenal medulla cells on microbeads. *Anal Biochem*, **144**, 218-227.
- Herring, B.E., Xie, Z., Marks, J. and Fox, A.P. (2009) Isoflurane Inhibits the Neurotransmitter Release Machinery. Vol. 102, pp. 1265-1273.
- Hillarp, N.-Å., Lagerstedt, S. and Nilson, B. (1953) The isolation of a granular fraction from the suprarenal medulla, containing the sympathomimetic catecholamines. *Acta Physiol Scand*, **29**, 251-263.
- Hoflehner, J., Eder, U., Laslop, A., Seidah, N.G., Fischer-Colbrie, R. and Winkler, H. (1995) Processing of secretogranin II by prohormone convertases: Importance of PC1 in generation of secretoneurin. *FEBS Letters*, **360**, 294-298.
- Holz, R.W., Bittner, M.A., Peppers, S.C., Senter, R.A. and Eberhard, D.A. (1989) MgATP-independent and MgATP-dependent exocytosis. Evidence that MgATP primes adrenal chromaffin cells to undergo exocytosis. *J Biol Chem*, **264**, 5412-5419.
- Hook, V., Funkelstein, L., Lu, D., Bark, S., Wegrzyn, J. and Hwang, S.R. (2008) Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. Vol. 48, pp. 393-423.
- Hosaka, M., Watanabe, T., Sakai, Y., Kato, T. and Takeuchi, T. (2005) Interaction between secretogranin III and carboxypeptidase E facilitates prohormone sorting within secretory granules. Vol. 118, pp. 4785-4795.
- Hosaka, M., Watanabe, T., Sakai, Y., Uchiyama, Y. and Takeuchi, T. (2002) Identification of a Chromogranin A Domain That Mediates Binding to Secretogranin III and Targeting to Secretory Granules in Pituitary Cells and Pancreatic beta -Cells. Vol. 13, pp. 3388-3399.
- Huber, K. (2006) The sympathoadrenal cell lineage: Specification, diversification, and new perspectives. *Developmental Biology*, **298**, 335-343.
- Huh, Y.H., Jeon, S.H. and Yoo, S.H. (2003) Chromogranin B-induced secretory granule biogenesis: comparison with the similar role of chromogranin A. *J Biol Chem*, **278**, 40581-40589.
- Jacobs, D.T., Weigert, R., Grode, K.D., Donaldson, J.G. and Cheney, R.E. (2009) Myosin Vc Is a Molecular Motor That Functions in Secretory Granule Trafficking. Vol. 20, pp. 4471-4488.

- Jahn, R. (2000) Sec1/Munc18 proteins: mediators of membrane fusion moving to center stage. *Neuron*, **27**, 201-204.
- Jahn, R., Lang, T. and Sudhof, T.C. (2003) Membrane fusion. *Cell*, **112**, 519-533.
- Jahn, R. and Sudhof, T.C. (1999) Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem*, **68**, 863-911.
- Jankowski, J.A., Finnegan, J.M. and 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**, 1739-1747.
- Jankowski, J.A., Schroeder, T.J., Ciolkowski, E.L. and Wightman, R.M. (1993) Temporal Characteristics of Quantal Secretion of Catecholamines from Adrenal-Medullary Cells. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 14694-14700.
- Kagotani, Y., Picart, R., Barret, A., Wiedenmann, B., Huttner, W.B. and Tixier-Vidal, A. (1991) Subcellular localization of secretogranin II and synaptophysin by immunoelectron microscopy in differentiated hypothalamic neurons in culture. Vol. 39, pp. 1507-1518.
- Kawagoe, K.T., Zimmerman, J.B. and Wightman, R.M. (1993) Principles of voltammetry and microelectrode surface states. *J Neurosci Methods*, **48**, 225-240.
- Kim, T., Tao-Cheng, J.H., Eiden, L.E. and Loh, Y.P. (2001) Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell*, **106**, 499-509.
- Kim, T., Zhang, C.-f., Sun, Z., Wu, H. and Loh, Y.P. (2005) Chromogranin A Deficiency in Transgenic Mice Leads to Aberrant Chromaffin Granule Biogenesis. Vol. 25, pp. 6958-6961.
- Kirshner, N., Sage, H.J. and Smith, W.J. (1967) Mechanism of Secretion from the Adrenal Medulla: II. Release of Catecholamines and Storage Vesicle Protein in Response to Chemical Stimulation. *Mol Pharmacol*, **3**, 254-265.
- Klenchin, V.A. and Martin, T.F. (2000) Priming in exocytosis: attaining fusion-competence after vesicle docking. *Biochimie*, **82**, 399-407.
- Knight, D.E. and Baker, P.F. (1982) Calcium-dependence of catecholamine release from bovine adrenal medullary cells after exposure to intense electric fields. *J Membr Biol*, **68**, 107-140.
- Knight, D.E. and Baker, P.F. (1983) The phorbol ester TPA increases the affinity of exocytosis for calcium in 'leaky' adrenal medullary cells. *FEBS Lett*, **160**, 98-100.

## Bibliografía

---

- Knight, D.E., Sugden, D. and Baker, P.F. (1988) Evidence implicating protein kinase C in exocytosis from electropermeabilized bovine chromaffin cells. *J Membr Biol*, **104**, 21-34.
- Kobayashi, S., Serizawa, Y., Fujita, T. and Coupland, R.E. (1978) SGC (small granule chromaffin) cells in the mouse adrenal medulla: light and electron microscopic identification using semi-thin and ultra-thin sections. *Endocrinol Jpn*, **25**, 467-476.
- Kohn, A. (1902) Das chromaffine Gewebe. *Ergebn. Anat. entwickl.-Gesch*, 253-348.
- Kopell, W.N. and Westhead, E.W. (1982) Osmotic pressures of solutions of ATP and catecholamines relating to storage in chromaffin granules. *J Biol Chem*, **257**, 5707-5710.
- Kopin, I.J. (1985) Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance. *Pharmacol Rev*, **37**, 333-364.
- Koshimizu, H., Kim, T., Cawley, N.X. and Loh, Y.P. (2009) Chromogranin A: A new proposal for trafficking, processing and induction of granule biogenesis. *Regulatory Peptides*, **In Press**.
- Kromer, A., Glombik, M.M., Huttner, W.B. and Gerdes, H.H. (1998) Essential role of the disulfide-bonded loop of chromogranin B for sorting to secretory granules is revealed by expression of a deletion mutant in the absence of endogenous granin synthesis. *J Cell Biol*, **140**, 1331-1346.
- Kumai, T., Tanaka, M., Tateishi, T., Watanabe, M., Nakura, H., Asoh, M. and Kobayashi, S. (1998) Effects of anti-androgen treatment on the catecholamine synthetic pathway in the adrenal medulla of spontaneously hypertensive rats. Vol. 357, pp. 620-624.
- Lee, J.C. and Hook, V. (2009) Proteolytic Fragments of Chromogranins A and B Represent Major Soluble Components of Chromaffin Granules, Illustrated by Two-Dimensional Proteomics with NH<sub>2</sub>-Terminal Edman Peptide Sequencing and MALDI-TOF MS. *Biochemistry*, **48**, 5254-5262.
- Leszczyszyn, D.J., Jankowski, J.A., Viveros, O.H., Diliberto, E.J., Near, J.A. and Wightman, R.M. (1990) Nicotinic Receptor-Mediated Catecholamine Secretion from Individual Chromaffin Cells - Chemical Evidence for Exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 14736-14737.
- Lever, J.D. (1955) Electron microscopic observations on the adrenal cortex. *Am J Anat*, **97**, 409-429.
- Levitt, M., Spector, S., Sjoerdsma, A. and Udenfriend, S. (1965) ELUCIDATION OF THE RATE-LIMITING STEP IN

- NOREPINEPHRINE BIOSYNTHESIS IN THE PERFUSED GUINEA-PIG HEART. Vol. 148, pp. 1-8.
- Lindau, M. and Alvarez de Toledo, G. (2003) The fusion pore. *Biochim Biophys Acta*, **1641**, 167-173.
- Livett, B.G. (1984) Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol Rev*, **64**, 1103-1161.
- Livett, B.G., Day, R., Elde, R.P. and Howe, P.R. (1982) Co-storage of enkephalins and adrenaline in the bovine adrenal medulla. Vol. 7, pp. 1323-1332.
- Luján, R., Nusser, Z., Roberts, J.D.B., Shigemoto, R. and Somogyi, P. (1996) Perisynaptic Location of Metabotropic Glutamate Receptors mGluR1 and mGluR5 on Dendrites and Dendritic Spines in the Rat Hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, **8**, 1488-1500.
- Machado, J.D., Gomez, J.F., Betancor, G., Camacho, M., Brioso, M.A. and Borges, R. (2002) Hydralazine reduces the quantal size of secretory events by displacement of catecholamines from adrenomedullary chromaffin secretory vesicles. *Circulation Research*, **91**, 830-836.
- Machado, J.D., Montesinos, MS. and Borges, R. (2008) Good practices in single cell amperometry. In Ivanov, A.I. (ed.), *Exocytosis and Endocytosis. Methods in Molecular Biology* Human Press Vol. 440, pp. 297-313
- Machado, J.D., Morales, A., Gomez, J.F. and Borges, R. (2001) cAMP modulates exocytotic kinetics and increases quantal size in chromaffin cells. *Molecular Pharmacology*, **60**, 514-520.
- Machado, J.D., Segura, F., Brioso, M.A. and Borges, R. (2000) Nitric oxide modulates a late step of exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 20274-20279.
- Mahapatra, N.R., Mahata, M., Hazra, P.P., McDonough, P.M., O'Connor, D.T. and Mahata, S.K. (2004) A Dynamic Pool of Calcium in Catecholamine Storage Vesicles: EXPLORATION IN LIVING CELLS BY A NOVEL VESICLE-TARGETED CHROMOGRANIN A-AEQUORIN CHIMERIC PHOTOPROTEIN. Vol. 279, pp. 51107-51121.
- Mahapatra, N.R., O'Connor, D.T., Vaingankar, S.M., Hikim, A.P., Mahata, M., Ray, S., Staite, E., Wu, H., Gu, Y., Dalton, N., Kennedy, B.P., Ziegler, M.G., Ross, J. and Mahata, S.K. (2005) Hypertension from targeted ablation of chromogranin A can be rescued by the human ortholog. *J Clin Invest*, **115**, 1942-1952.
- Mahata, S.K., Marksteiner, J., Sperk, G., Mahata, M., Gruber, B., Fischer-Colbrie, R. and Winkler, H. (1992) Temporal lobe epilepsy of the rat: differential expression of mRNAs of chromogranin B, secretogranin

## Bibliografia

---

- II, synaptin/synaptophysin and p65 in subfield of the hippocampus. Vol. 16, pp. 1-12.
- Maletic-Savatic, M. and Malinow, R. (1998) Calcium-Evoked Dendritic Exocytosis in Cultured Hippocampal Neurons. Part I: Trans-Golgi Network-Derived Organelles Undergo Regulated Exocytosis. Vol. 18, pp. 6803-6813.
- Malosio, M.L., Giordano, T., Laslop, A. and Meldolesi, J. (2004) Dense-core granules: a specific hallmark of the neuronal/neurosecretory cell phenotype. Vol. 117, pp. 743-749.
- Marks, B. and McMahon, H.T. (1998) Calcium triggers calcineurin-dependent synaptic vesicle recycling in mammalian nerve terminals. *Curr Biol*, **8**, 740-749.
- Marksteiner, J., Lechner, T., Kaufmann, W.A., Gurka, P., Humpel, C., Nowakowski, C., Maier, H. and Jellinger, K.A. (2000) Distribution of chromogranin B-like immunoreactivity in the human hippocampus and its changes in Alzheimer's disease. Vol. 100, pp. 205-212.
- Marszalek, P., Farrell, B. and Fernandez, J.M. (1996) Ion-exchange gel regulates neurotransmitter release through the exocytotic fusion pore. *Soc Gen Physiol Ser*, **51**, 211-222.
- Martini, S., Consumi, M., Bonechi, C., Rossi, C. and Magnani, A. (2007) Fibrinogen-catecholamine interaction as observed by NMR and Fourier transform infrared spectroscopy. Vol. 8, pp. 2689-2696.
- Matveeva, E. and Whiteheart, S.W. (1998) The effects of SNAP/SNARE complexes on the ATPase of NSF. *FEBS Lett*, **435**, 211-214.
- Mezer, A., Nachliel, E., Gutman, M. and Ashery, U. (2004) A New Platform to Study the Molecular Mechanisms of Exocytosis. Vol. 24, pp. 8838-8846.
- Mitchell, K.J., Pinton, P., Varadi, A., Tacchetti, C., Ainscow, E.K., Pozzan, T., Rizzuto, R. and Rutter, G.A. (2001) Dense core secretory vesicles revealed as a dynamic Ca<sup>2+</sup> store in neuroendocrine cells with a vesicle-associated membrane protein aequorin chimera. Vol. 155, pp. 41-52.
- Monck, J.R., Oberhauser, A.F., Alvarez de Toledo, G. and Fernandez, J.M. (1991) Is swelling of the secretory granule matrix the force that dilates the exocytotic fusion pore? *Biophys J*, **59**, 39-47.
- Monck, J.R., Oberhauser, A.F. and Fernandez, J.M. (1995) The exocytotic fusion pore interface: a model of the site of neurotransmitter release. *Mol Membr Biol*, **12**, 151-156.
- Montero-Hadjadje, M., Vaingankar, S., Elias, S., Tostivint, H., Mahata, S.K. and Anouar, Y. (2008) Chromogranins A and B and secretogranin II: evolutionary and functional aspects. Vol. 192, pp. 309-324.

- Montero, M., Alonso, M.T., Carnicero, E., Cuchillo-Ibanez, I., Albillos, A., Garcia, A.G., Garcia-Sancho, J. and Alvarez, J. (2000) Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol*, **2**, 57-61.
- Montesinos, M.S., Machado, J.D., Camacho, M., Diaz, J., Morales, Y.G., Alvarez de la Rosa, D., Carmona, E., Castaneyra, A., Viveros, O.H., O'Connor, D.T., Mahata, S.K. and Borges, R. (2008) The crucial role of chromogranins in storage and exocytosis revealed using chromaffin cells from chromogranin A null mouse. *J Neurosci*, **28**, 3350-3358.
- Morris, S.J., Schultens, H.A. and Schober, R. (1977) An osmometer model for changes in the buoyant density of chromaffin granules. Vol. 20, pp. 33-48.
- Mosharov, E.V., Gong, L.W., Khanna, B., Sulzer, D. and Lindau, M. (2003) Intracellular patch electrochemistry: regulation of cytosolic catecholamines in chromaffin cells. *J Neurosci*, **23**, 5835-5845.
- Mosley, C.A., Taupenot, L., Biswas, N., Taulane, J.P., Olson, N.H., Vaingankar, S.M., Wen, G., Schork, N.J., Ziegler, M.G., Mahata, S.K. and O'Connor, D.T. (2007) Biogenesis of the Secretory Granule: Chromogranin A Coiled-Coil Structure Results in Unusual Physical Properties and Suggests a Mechanism for Granule Core Condensation. *Biochemistry*, **46**, 10999-11012.
- Munujos, P., Collcanti, J., Gonzalezsastre, F. and Gella, F.J. (1993) Assay of Succinate Dehydrogenase Activity by a Colorimetric-Continuous Method Using Iodonitrotetrazolium Chloride as Electron Acceptor. *Analytical Biochemistry*, **212**, 506-509.
- Nanavati, C. and Fernandez, J.M. (1993) The secretory granule matrix: a fast-acting smart polymer. *Science*, **259**, 963-965.
- Neher, E. (1988) The use of the patch clamp technique to study second messenger-mediated cellular events. *Neuroscience*, **26**, 727-734.
- Neher, E. (1998) Vesicle pools and Ca<sup>2+</sup> microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron*, **20**, 389-399.
- Neher, E. and Marty, A. (1982) Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 6712-6716.
- Neher, E. and Zucker, R.S. (1993) Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron*, **10**, 21-30.

## Bibliografía

---

- Ñeco, P., Fernandez-Peruchena, C., Navas, S., Gutierrez, L.M., de Toledo, G.A. and Ales, E. (2008) Myosin II contributes to fusion pore expansion during exocytosis. *J Biol Chem*, **283**, 10949-10957.
- O'Connor, D.T., Cadman, P.E., Smiley, C., Salem, R.M., Rao, F., Smith, J., Funk, S.D., Mahata, S.K., Mahata, M., Wen, G., Taupenot, L., Gonzalez-Yanes, C., Harper, K.L., Henry, R.R. and Sanchez-Margalet, V. (2005) Pancreastatin: Multiple Actions on Human Intermediary Metabolism in Vivo, Variation in Disease, and Naturally Occurring Functional Genetic Polymorphism. Vol. 90, pp. 5414-5425.
- O'Connor, D.T. and 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. Vol. 259, pp. 3237-3247.
- Obermüller, S., Calegari, F., King, A., Lindqvist, A., Karanauskaite, J., Lundquist, I., Salehi, A., Francolini, M., Rosa, P., Rorsman, P. and Barg, S. (2010) Chromogranin-B deficient mice are diabetic despite normal insulin granule biogenesis.
- Oyler, G.A., Higgins, G.A., Hart, R.A., Battenberg, E., Billingsley, M., Bloom, F.E. and Wilson, M.C. (1989) The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J Cell Biol*, **109**, 3039-3052.
- Palfrey, H.C. and Artalejo, C.R. (1998) Vesicle recycling revisited: rapid endocytosis may be the first step. *Neuroscience*, **83**, 969-989.
- Park, H.Y., So, S.H., Lee, W.B., You, S.H. and Yoo, S.H. (2002) Purification, pH-dependent conformational change, aggregation, and secretory granule membrane binding property of secretogranin II (chromogranin C). *Biochemistry*, **41**, 1259-1266.
- Pihel, K., Travis, E.R., Borges, R. and Wightman, R.M. (1996) Exocytotic release from individual granules exhibits similar properties at mast and chromaffin cells. *Biophysical Journal*, **71**, 1633-1640.
- Plattner, H., Artalejo, A.R. and Neher, E. (1997) Ultrastructural organization of bovine chromaffin cell cortex-analysis by cryofixation and morphometry of aspects pertinent to exocytosis. *J Cell Biol*, **139**, 1709-1717.
- Pohorecky, L.A. and Wurtman, R.J. (1971) ADRENOCORTICAL CONTROL OF EPINEPHRINE SYNTHESIS. Vol. 23, pp. 1-35.
- Pothos, E.N., Mosharov, E., Liu, K.P., Setlik, W., Haburcak, M., Baldini, G., Gershon, M.D., Tamir, H. and Sulzer, D. (2002) Stimulation-



- dependent regulation of the pH, volume and quantal size of bovine and rodent secretory vesicles. *J Physiol*, **542**, 453-476.
- Prasad, P., Yanagihara, A.A., Small-Howard, A.L., Turner, H. and Stokes, A.J. (2008) Secretogranin III Directs Secretory Vesicle Biogenesis in Mast Cells in a Manner Dependent upon Interaction with Chromogranin A. Vol. 181, pp. 5024-5034.
- Rahamimoff, R. and Fernandez, J.M. (1997) Pre- and postfusion regulation of transmitter release. *Neuron*, **18**, 17-27.
- Reigada, D., Díez-Pérez, I., Gorostiza, P., Verdaguer, A., GÃ³mez de Aranda, I., Pineda, O., Vilarrasa, J., Marsal, J., Blasi, J., Aleu, J. and Solsona, C. (2003) Control of neurotransmitter release by an internal gel matrix in synaptic vesicles. Vol. 100, pp. 3485-3490.
- Rosa, P. and Zanini, A. (1983) Purification of a sulfated secretory protein from the adenohypophysis. Immunochemical evidence that similar macromolecules are present in other glands. Vol. 31, pp. 94-98.
- Rybin, V., Ullrich, O., Rubino, M., Alexandrov, K., Simon, I., Seabra, M.C., Goody, R. and Zerial, M. (1996) GTPase activity of Rab5 acts as a timer for endocytic membrane fusion. *Nature*, **383**, 266-269.
- Salaün, C., J. James, D. and H. Chamberlain, L. (2004) Lipid Rafts and the Regulation of Exocytosis. Vol. 5, pp. 255-264.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, NY.
- Santodomingo, J., Vay, L., Camacho, M., Hernandez-Sanmiguel, E., Fonteriz, R.I., Lobaton, C.D., Montero, M., Moreno, A. and Alvarez, J. (2008) Calcium dynamics in bovine adrenal medulla chromaffin cell secretory granules. Vol. 28, pp. 1265-1274.
- Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., Yamamoto, A. and Moriyama, Y. (2008) Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 5683-5686.
- Schroeder, T.J., Borges, R., Finnegan, J.M., Pihel, K., Amatore, C. and Wightman, R.M. (1996) Temporally resolved, independent stages of individual exocytotic secretion events. *Biophysical Journal*, **70**, 1061-1068.
- Schroeder, T.J., Jankowski, J.A., Senyshyn, J., Holz, R.W. and Wightman, R.M. (1994) Zones of exocytotic release on bovine adrenal medullary cells in culture. *J Biol Chem*, **269**, 17215-17220.
- Schrott-Fischer, A., Bitsche, M., Humpel, C., Walcher, C., Maier, H., Jellinger, K., Rabl, W., Glueckert, R. and Marksteiner, J. (2009) Chromogranin peptides in amyotrophic lateral sclerosis. Vol. 152, pp. 13-21.

## Bibliografía

---

- Segura, F., Brioso, M.A., Gomez, J.F., Machado, J.D. and Borges, R. (2000) Automatic analysis for amperometrical recordings of exocytosis. *Journal of Neuroscience Methods*, **103**, 151-156.
- Smith, A.D. and Winkler, H. (1967) A simple method for the isolation of adrenal chromaffin granules on a large scale. *Biochem J*, **103**, 480-482.
- Smith, C., Moser, T., Xu, T. and Neher, E. (1998) Cytosolic Ca<sup>2+</sup> acts by two separate pathways to modulate the supply of release-competent vesicles in chromaffin cells. *Neuron*, **20**, 1243-1253.
- Smith, C. and Neher, E. (1997) Multiple forms of endocytosis in bovine adrenal chromaffin cells. *J Cell Biol*, **139**, 885-894.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, **150**, 76-85.
- Sollner, T., Bennett, M.K., Whiteheart, S.W., Scheller, R.H. and 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**, 409-418.
- Soszynski, D., Metz-Boutigue, M.H., Aunis, D. and Bader, M.F. (1993) Secretogranin II: regulation of synthesis and post-translational proteolysis in bovine adrenal chromaffin cells. *J Neuroendocrinol*, **5**, 655-662.
- Staal, R.G., Mosharov, E.V. and Sulzer, D. (2004) Dopamine neurons release transmitter via a flickering fusion pore. *Nat Neurosci*, **7**, 341-346.
- Stettler, H., Beuret, N., Prescianotto-Basc, C., Fayard, B., Taupenot, L. and Spiess, M. (2009) Determinants for chromogranin A sorting into the regulated secretory pathway are also sufficient to generate granule-like structures in non-endocrine cells. Vol. 418, pp. 81-91.
- Stjärne, L. (1966) Studies of Noradrenaline Biosynthesis in Nerve Tissue. Vol. 67, pp. 441-454.
- Sudhof, T.C. (1982) Core structure, internal osmotic pressure and irreversible structural changes of chromaffin granules during osmometer behaviour. Vol. 684, pp. 27-39.
- Sudhof, T.C. (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*, **375**, 645-653.
- Sudhof, T.C. (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*, **27**, 509-547.
- Sudhof, T.C. and Rothman, J.E. (2009) Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science*, **323**, 474-477.

- Tabares, L., Lindau, M. and Alvarez de Toledo, G. (2003) Relationship between fusion pore opening and release during mast cell exocytosis studied with patch amperometry. *Biochem Soc Trans*, **31**, 837-841.
- Tajparast, M. and Glavinovic, M.I. (2009) Forces and stresses acting on fusion pore membrane during secretion. *Biochim Biophys Acta*, **1788**, 1009-1023.
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E.A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S.A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J.S., De Groot, B.L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F. and Jahn, R. (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*, **127**, 831-846.
- Takiyuddin, M.A., Cervenka, J.H., Hsiao, R.J., Barbosa, J.A., Parmer, R.J. and O'Connor, D.T. (1990) Chromogranin A. Storage and release in hypertension. Vol. 15, pp. 237-246.
- Taupenot, L., Harper, K.L., Mahapatra, N.R., Parmer, R.J., Mahata, S.K. and O'Connor, D.T. (2002) Identification of a novel sorting determinant for the regulated pathway in the secretory protein chromogranin A. Vol. 115, pp. 4827-4841.
- Taupenot, L., Harper, K.L. and O'Connor, D.T. (2003) The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med*, **348**, 1134-1149.
- Thiele, C. and Huttner, W.B. (1998) Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to secretory granules--recent developments. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **9**, 511-516.
- Thomas, P., Surprenant, A. and Almers, W. (1990) Cytosolic Ca<sup>2+</sup>, exocytosis, and endocytosis in single melanotrophs of the rat pituitary. *Neuron*, **5**, 723-733.
- Thrower, E.C., Choe, C.U., So, S.H., Jeon, S.H., Ehrlich, B.E. and Yoo, S.H. (2003) A functional interaction between chromogranin B and the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca<sup>2+</sup> channel. *J Biol Chem*, **278**, 49699-49706.
- Tozer, T.N., Neff, N.H. and Brodie, B.B. (1966) APPLICATION OF STEADY STATE KINETICS TO THE SYNTHESIS RATE AND TURNOVER TIME OF SEROTONIN IN THE BRAIN OF NORMAL AND RESERPINE-TREATED RATS. Vol. 153, pp. 177-182.
- Travis, E.R. and Wightman, R.M. (1998) Spatio-temporal resolution of exocytosis from individual cells. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **27**, 77-103.

## Bibliografía

---

- Trifaro, J.M., Gasman, S. and Gutierrez, L.M. (2008) Cytoskeletal control of vesicle transport and exocytosis in chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)*, **192**, 165-172.
- Trifaro, J.M., Glavinovic, M. and Rose, S.D. (1997) Secretory vesicle pools and rate and kinetics of single vesicle exocytosis in neurosecretory cells. *Neurochem Res*, **22**, 831-841.
- Trimble, W.S., Cowan, D.M. and Scheller, R.H. (1988) VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 4538-4542.
- Tsien, R.Y., Pozzan, T. and Rink, T.J. (1982) Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol*, **94**, 325-334.
- Unsicker, K., Huber, K., Schutz, G. and Kalcheim, C. (2005) The chromaffin cell and its development. Vol. 30, pp. 921-925.
- Venton, B.J., Troyer, K.P. and Wightman, R.M. (2002) Response times of carbon fiber microelectrodes to dynamic changes in catecholamine concentration. *Anal Chem*, **74**, 539-546.
- Videen, J.S., Mezger, M.S., Chang, Y.M. and O'Connor, D.T. (1992) Calcium and catecholamine interactions with adrenal chromogranins. Comparison of driving forces in binding and aggregation. *J Biol Chem*, **267**, 3066-3073.
- Vitale, M.L., Seward, E.P. and 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**, 353-363.
- Voets, T., Neher, E. and Moser, T. (1999) Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron*, **23**, 607-615.
- Wang, C.T., Lu, J.C., Bai, J., Chang, P.Y., Martin, T.F., Chapman, E.R. and Jackson, M.B. (2003) Different domains of synaptotagmin control the choice between kiss-and-run and full fusion. *Nature*, **424**, 943-947.
- Wang, L., Bittner, M.A., Axelrod, D. and Holz, R.W. (2008) The Structural and Functional Implications of Linked SNARE Motifs in SNAP25. Vol. 19, pp. 3944-3955.
- Wang, Y., Thiele, C. and Huttner, W.B. (2000) Cholesterol is required for the formation of regulated and constitutive secretory vesicles from the trans-Golgi network. *Traffic*, **1**, 952-962.
- Wegrzyn, J., Lee, J., Neveu, J.M., Lane, W.S. and Hook, V. (2007) Proteomics of neuroendocrine secretory vesicles reveal distinct functional systems for biosynthesis and exocytosis of peptide hormones and neurotransmitters. Vol. 6, pp. 1652-1665.

- Weimer, R.M. and Jorgensen, E.M. (2003) Controversies in synaptic vesicle exocytosis. *J Cell Sci*, **116**, 3661-3666.
- Westermann, R., Stogbauer, F., Unsicker, K. and Lietzke, R. (1988) Calcium-dependence of chromogranin A-catecholamine interaction. Vol. 239, pp. 203-206.
- Wightman, R.M., Jankowski, J.A., Kennedy, R.T., Kawagoe, K.T., Schroeder, T.J., Leszczyszyn, D.J., Near, J.A., Diliberto, E.J. and Viveros, O.H. (1991) Temporally Resolved Catecholamine Spikes Correspond to Single Vesicle Release from Individual Chromaffin Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 10754-10758.
- Wightman, R.M., Schroeder, T.J., Finnegan, J.M., Ciolkowski, E.L. and Pihel, K. (1995) Time-Course of Release of Catecholamines from Individual Vesicles During Exocytosis at Adrenal-Medullary Cells. *Biophysical Journal*, **68**, 383-390.
- Wilson, S.P. and Kirshner, N. (1983) Calcium-evoked secretion from digitonin-permeabilized adrenal medullary chromaffin cells. *J. Biol. Chem.*, **258**, 4994-5000.
- Willis, M., Prokesch, M., Hutter-Paier, B., Windisch, M., Stridsberg, M., Mahata, S.K., Kirchmair, R., Wietzorrek, G., Knaus, H.G., Jellinger, K., Humpel, C. and Marksteiner, J. (2008) Chromogranin B and Secretogranin II in transgenic mice overexpressing human APP751 with the London (V717I) and Swedish (K670M/N671L) mutations and in Alzheimer patients. Vol. 13, pp. 123-135.
- Winkler, H. (1993) The adrenal chromaffin granule: a model for large dense core vesicles of endocrine and nervous tissue. *J Anat*, **183 ( Pt 2)**, 237-252.
- Winkler, H. and Westhead, E. (1980) The molecular organization of adrenal chromaffin granules. *Neuroscience*, **5**, 1803-1823.
- Yoo, S.H. (1995) pH- and Ca(2+)-induced conformational change and aggregation of chromogranin B. Comparison with chromogranin A and implication in secretory vesicle biogenesis. *J Biol Chem*, **270**, 12578-12583.
- Yoo, S.H. (1996) pH- and Ca(2+)-dependent aggregation property of secretory vesicle matrix proteins and the potential role of chromogranins A and B in secretory vesicle biogenesis. *J Biol Chem*, **271**, 1558-1565.
- Yoo, S.H. (2000) Coupling of the IP3 receptor/Ca2+ channel with Ca2+ storage proteins chromogranins A and B in secretory granules. *Trends Neurosci*, **23**, 424-428.

## Bibliografía

---

- Yoo, S.H. and Albanesi, J.P. (1990a) Ca<sup>2+</sup>(+)-induced conformational change and aggregation of chromogranin A. *J Biol Chem*, **265**, 14414-14421.
- Yoo, S.H. and Albanesi, J.P. (1990b) Inositol 1,4,5-trisphosphate-triggered Ca<sup>2+</sup> release from bovine adrenal medullary secretory vesicles. *J Biol Chem*, **265**, 13446-13448.
- Yoo, S.H. and Albanesi, J.P. (1991) High capacity, low affinity Ca<sup>2+</sup> binding of chromogranin A. Relationship between the pH-induced conformational change and Ca<sup>2+</sup> binding property. *J Biol Chem*, **266**, 7740-7745.
- Yoo, S.H. and Lewis, M.S. (1992) Effects of pH and Ca<sup>2+</sup> on monomer-dimer and monomer-tetramer equilibria of chromogranin A. *J Biol Chem*, **267**, 11236-11241.
- Yoo, S.H. and Lewis, M.S. (1996) Effects of pH and Ca<sup>2+</sup> on heterodimer and heterotetramer formation by chromogranin A and chromogranin B. *J Biol Chem*, **271**, 17041-17046.
- Yoo, S.H., You, S.H. and Huh, Y.H. (2005) Presence of syntaxin 1A in secretory granules of chromaffin cells and interaction with chromogranins A and B. *FEBS Lett*, **579**, 222-228.
- Yoo, S.H., You, S.H., Kang, M.K., Huh, Y.H., Lee, C.S. and Shim, C.S. (2002) Localization of the secretory granule marker protein chromogranin B in the nucleus. Potential role in transcription control. *J Biol Chem*, **277**, 16011-16021.
- Yoshizaki, T. (1974) Effects of cholinergic drugs and their blockers on adrenaline release from rat adrenal. *Biochem Pharmacol*, **24**, 1401-1405.
- Zhang, B., Tan, Z., Zhang, C., Shi, Y., Lin, Z., Gu, N., Feng, G. and He, L. (2002) Polymorphisms of chromogranin B gene associated with schizophrenia in Chinese Han population. *Neuroscience Letters*, **323**, 229-233.
- Zhang, J.-Z. and Redman, C.M. (1996) Assembly and Secretion of Fibrinogen. Vol. 271, pp. 12674-12680.
- Zhang, K., Rao, F., Rana, B.K., Gayen, J.R., Calegari, F., King, A., Rosa, P., Huttner, W.B., Stridsberg, M., Mahata, M., Vaingankar, S., Mahboubi, V., Salem, R.M., Rodriguez-Flores, J.L., Fung, M.M., Smith, D.W., Schork, N.J., Ziegler, M.G., Taupenot, L., Mahata, S.K. and O'Connor, D.T. (2009) Autonomic Function in Hypertension: Role of Genetic Variation at the Catecholamine Storage Vesicle Protein Chromogranin B. Vol. 2, pp. 46-56.

- Zhao, E., Zhang, D., Basak, A. and Trudeau, V.L. (2009) New insights into granin-derived peptides: evolution and endocrine roles. *General and Comparative Endocrinology*, **164**, 161-174.
- Zhou, X.F., Marley, P.D. and Livett, B.G. (1991) Substance P modulates the time course of nicotinic but not muscarinic catecholamine secretion from perfused adrenal glands of rat. *Br J Pharmacol*, **104**, 159-165.