



Instituto  
de  
Neurociencias



CONSEJO SUPERIOR  
DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS

Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular

Universidad Miguel Hernández

## **Tesis Doctoral / PhD Thesis**

### **Arquitectura y dinámica funcional**

**del citoesqueleto de F-actina**

**en secreción en modelo neuroendocrino**

---

**F-actin cytoskeleton**

**functional architecture and dynamics**

**in secretion in neuroendocrine model**

Memoria de tesis doctoral presentada por:

**Yolanda Giménez Molina**

Director y Tutor de la Tesis Doctoral: Dr. Jose Heliodoro Villanueva

Co-Director de la Tesis Doctoral: Dr. Luis Miguel Gutierrez Pérez





**Dr. Jose Heliodoro Villanueva**, Profesor Ayudante Doctor del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández y **Dr. Luis Miguel Gutiérrez Pérez**, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández, como Director/Tutor y Co-Director respectivamente, de la presente Tesis Doctoral:

**DAN SU CONFORMIDAD para la defensa por compendio de publicaciones y bajo la modalidad Internacional a la Tesis Doctoral:**

“Arquitectura y dinámica funcional del citoesqueleto de F-actina en secreción en modelo neuroendocrino / F-actin cytoskeleton functional architecture and dynamics in secretion in neuroendocrine model”, desarrollada y presentada por la doctoranda Yolanda Giménez Molina, estudiante predoctoral del Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche, para optar al Grado de Doctor con mención Internacional.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, firman el presente documento  
San Juan, Septiembre, 2018.

**Fdo: Dr. Jose Heliodoro Villanueva**  
**Director/Tutor de la Tesis Doctoral**

**Fdo: Dr. Luis Miguel Gutiérrez**  
**Co-Director de la Tesis Doctoral**







**Dr. Ricardo Mallavia**, Catedrático del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad Miguel Hernández y coordinador del Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular.

**CERTIFICA:** Que la doctoranda Yolanda Giménez Molina, ha completado el programa de formación Doctoral en Biología Molecular y Celular, impartido por el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández, alcanzando los objetivos establecidos en el mismo.

**Y DA SU CONFORMIDAD para la defensa por compendio de publicaciones y bajo la modalidad Internacional a la Tesis Doctoral:**

“Arquitectura y dinámica funcional del citoesqueleto de F-actina en secreción en modelo neuroendocrino / F-actin cytoskeleton functional architecture and dynamics in secretion in neuroendocrine model”, desarrollada y presentada por la doctoranda Yolanda Giménez Molina, estudiante predoctoral del Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche, para optar al Grado de Doctor con mención Internacional.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, firma el presente documento Elche, Septiembre, 2018.

**Fdo: Dr. Ricardo Mallavia**

**Coordinador del Programa de Doctorado de Biología Molecular y Celular**



# Agradecimientos

Son muchas, las personas a las que merecidamente me gustaría dedicar unas palabras y mostrar mi agradecimiento:

A mis dos directores Dr. Luis Miguel Gutiérrez y Dr. Jose Heliodoro Villanueva, porque a pesar de las nomenclaturas oficiales de director y co-director, ambos han ejercido como directores principales desde mis inicios en el laboratorio, siendo mi guía. Caminando de su mano durante el tiempo de mi tesis, me han formado no solo para afrontar las tareas de investigación propuestas, sino para que a día de hoy, yo sea capaz de proponer las mías propias. Quiero agradecerles de corazón, su confianza en mí y en mi capacidad para abordar todos nuestros objetivos científicos, así como su tiempo, dedicado en enseñarme a hacer ciencia de calidad, haciendo de mí una científica de bases consolidadas que, como en cualquier ámbito, son lo más importante para seguir creciendo. Nunca olvidaré cada charla, cada reunión y cada viaje con ellos, momentos de los que surgió una gran amistad y que convirtieron nuestra relación en algo mucho más que algo meramente profesional.

A Mar Francés, aquella compañera fiel que me acompañó en cada uno de mis experimentos aportándome: experiencia, apoyo y grandes lecciones de organización y destreza. Su labor es esencial en el grupo y así lo ha sido también en el trabajo que alberga esta tesis. Quiero agradecerle, haber estado presente siempre que la he necesitado, así como su predisposición a ayudarme en todo momento, aun sin necesidad de pedírselo. Tenerla a mi lado este tiempo, ha hecho posible alcanzar mis objetivos.

A la Dra. Inmaculada Belén López, quien me ha orientado en muchos experimentos y protocolos que alberga esta tesis, ofreciéndome no solo su gran experiencia y apoyo, sino su propio material de trabajo, a fin de poder completar el mío.

Al Dr. Salvador Viniegra, por ofrecerme su apoyo para mi incorporación al grupo de investigación en el que me he formado como científica. Él, fue decisivo a mi llegada y lo ha seguido siendo hasta mis últimos días como estudiante pre-doctoral.

Al Dr. Manuel Criado, por su ayuda y todo el material compartido para mis experimentos, haciendo posible una parte importante de esta tesis.

A la Dra. Elizabeth Seward, que me acogió en su laboratorio como uno más de su familia durante mi estancia pre-doctoral en su laboratorio de Reino Unido. Me gustaría agradecerle, la confianza depositada en mí como científica, su ayuda en hacer de mi estancia una etapa tan productiva y la oportunidad de vivir en la hermosa ciudad de Sheffield, de la que guardo en mi corazón recuerdos inolvidables.

Al Dr. Antonio García García, por haber sido el impulso de la escuela creada entorno al modelo de la célula cromafín usado en esta tesis y por una trayectoria de excelencia, reflejo de su pasión por la ciencia, convertida en todo un ejemplo a seguir.

Al Dr. Ricardo Mallavia, por su ayuda en la parte académica de mi doctorado. Su trabajo, fruto de su gran dedicación al programa de Doctorado que coordina, ha resultado ser todo un apoyo en mi formación.

Al Dr. Jose Martín Nieto, al que yo conozco como “mi querido Pepe”. En su laboratorio, empieza la bonita historia que culmina con esta tesis. Sus palabras de apoyo, siempre fueron mi impulso. Nunca olvidaré, toda su ayuda para encaminarme hacia ser una gran científica.

A mis padres, por su comprensión y ayuda desde el inicio de mi formación para alcanzar mi felicidad, hacer ciencia. Por un apoyo, que me ha hecho sentir fuerte y me ha recordado, que por muy lejos que estuviera de ellos, ellos siempre estarían conmigo. Por tantos consejos que hoy son mis pilares, por tantas palabras de ánimo que han sido mi aliento, por tantas sonrisas reflejo de su orgullo ante mis avances, por tanto... amor, comprensión y cariño, sin pedir nada a cambio.

A Mario, quién ha vivido muy cerca mi formación desde mis inicios, compartiendo conmigo, la misma ilusión por mis sueños como científica. Por su espera, en los largos días sin verme, cuando mi tiempo ha sido pleno para mis experimentos. Por su valentía, al afrontar nuevas experiencias en nuevas ciudades, allí donde la ciencia me ha llevado. Por un apoyo incondicional, en cada una de mis decisiones. Es más que merecido, agradecerle haber querido estar siempre cerca de mí y haberme querido tanto... como para anteponer mis objetivos a los suyos propios.

A Kyra, que llegó a mi vida en los inicios de mi tesis y me ha acompañado en tantas largas tardes de análisis en casa, trasmitiéndome con tan solo una mirada, todo su cariño. Nunca olvidaré su espera, durante el tiempo de mi estancia. A pesar, de no poder verme, ni entender porque no estaba a su lado, no me olvidó.

A todos mis compañeros, doctorandos y doctores del ámbito de la cromafín y ajenos a ella, por tantos buenos momentos compartidos y charlas científico-sociales tan únicas.

A mis amigos, con los he compartido tantas risas intentando explicar palabrejas científicas de mi tesis como el “citoesqueleto”. A todos y cada uno de ellos, con los que he compartido mi trayectoria, mostrándome siempre un apoyo incondicional.





*Por haber formado parte de mi camino científico*

*y ser piezas clave de esta tesis doctoral*

*A todos vosotros... **Gracias***





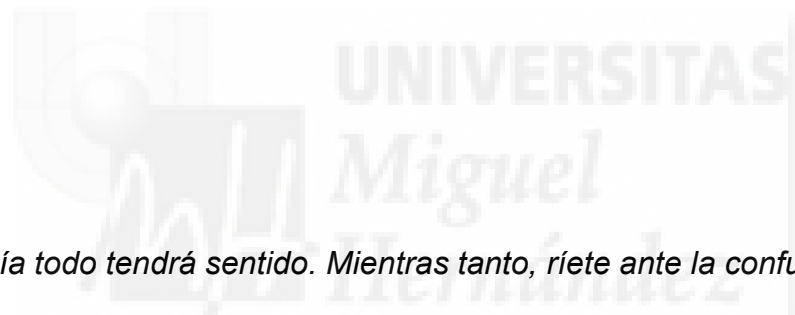
*Especialmente a mis padres...*

*por ayudarme a crear las bases para llegar a lo más alto*

*y*

*confiar en mí para alcanzar la cima*





*“Algún día todo tendrá sentido. Mientras tanto, ríete ante la confusión, sonríe a través de las lágrimas y sigue recordando que todo pasa por alguna razón”*

**Paulo Coelho**

*“Y una vez que la tormenta termine, no recordarás como lo lograste, como sobreviviste. Ni siquiera estarás seguro si la tormenta ha terminado realmente. Pero una cosa si es segura, cuando salgas de esa tormenta, no serás la misma persona que entró en ella”*

**Haruki Murak**



# Prefacio

La presente tesis doctoral, ha sido desarrollada por la doctoranda Yolanda Giménez Molina, bajo la dirección y supervisión de los Profesores Dr. Jose Heliodoro Villanueva y Dr. Luis Miguel Gutiérrez Pérez, en el marco del programa de Doctorado de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández y con el apoyo económico del proyecto financiado por el Ministerio Español de Economía y Competitividad (BFU2015-63684-P, MINECO, FEDER, UE).

La memoria correspondiente a la Tesis Doctoral titulada: “Arquitectura y dinámica funcional del citoesqueleto de F-actina en secreción en modelo neuroendocrino / F-actin cytoskeleton functional architecture and dynamics in secretion in neuroendocrine model”, ha sido redactada cumpliendo la normativa interna de la Universidad Miguel Hernández a fin de optar a la mención de Tesis Internacional, así como, estructurada bajo la modalidad de Tesis por compendio de publicaciones. El cuerpo central de la presente memoria de Tesis doctoral, lo constituyen las siguientes publicaciones científicas, citadas a continuación en orden cronológico de publicación:

- **Gimenez-Molina Y.** Cytoskeleton and neurotransmission. Molecular basis and protein interactions on vesicular transport and fusion in a neuroendocrine model. Revista Doctorado UMH. 2015; 2(1): p4. (Anexo I).
- Villanueva J, **Gimenez-Molina Y**, Viniegra S, Gutiérrez LM. F-actin cytoskeleton and the fate of organelles in chromaffin cells. J Neurochem. 2016 Jun; 137(6):860-6. doi: 10.1111/jnc.13560.PMID: 26843469. (Anexo II).

- **Gimenez-Molina Y**, Villanueva J, Nanclares C, Lopez-Font I, Viniegra S, Francés MDM, Gandia L, Gil A, Gutiérrez LM. The differential organization of F-Actin alters the distribution of organelles in cultured when compared to native chromaffin cells. *Front Cell Neurosci.* 2017 May 4; 11:135. doi: 10.3389/fncel.2017.00135. (Anexo III).
  
- **\*Gimenez-Molina Y**, Villanueva J, Francés MDM, Viniegra S, and Gutiérrez LM. Multiple mechanisms driving F-actin-dependent transport of organelles in bovine chromaffin cells during secretion. *Front Cell Neurosci.* 2018. *\*En revisión.* (Anexo IV).





Resumen

---





La tesis doctoral presentada por la doctoranda Yolanda Giménez Molina, está centrada en el estudio del citoesqueleto de F-actina, desde un punto de vista estructural y dinámico. El objetivo, es alcanzar un mayor conocimiento sobre la implicación de la distribución y la movilidad de F-actina en el proceso de la neurosecreción.

En primer lugar, centrados en avanzar en la descripción de la citoarquitectura de los microfilamentos de F-actina, esta tesis doctoral incluye los últimos hallazgos científicos sobre la organización citoplásmica de F-actina en las células cromafines nativas de la médula adrenal bovina, ofreciendo un estudio comparativo con la arquitectura de F-actina en la célula cromafín aislada y mostrando la influencia de la configuración de F-actina sobre la distribución de vesículas y mitocondrias en el espacio interno celular. En segundo lugar, esta tesis describe en detalle la dinámica local de las fibras de F-actina en respuesta a estimulación, no solo en términos de desplazamiento de fibras, sino también de remodelado de cavidades internas de la red citoesquelética, en las zonas activas. Unido a esto, el trabajo que alberga esta tesis explica las nuevas modalidades de transporte, halladas para las vesículas y las mitocondrias, altamente vinculadas a F-actina, especialmente a su capacidad dinámica y a su potencial de polimerización.

A fin de alcanzar todos estos objetivos, se ha seleccionado a la célula cromafín como modelo celular neuroendocrino aceptado para estudios de secreción y se ha hecho uso de un conjunto multidisciplinar de técnicas, que combina: herramientas de bioquímica y de biología molecular, un análisis biofísico de alta resolución temporal de la secreción y bioimagen por microscopia confocal dinámica.





Abstract

---



The PhD thesis submitted by the PhD student Yolanda Giménez Molina is focused on F-actin cytoskeleton study in terms of structure and dynamics. The objective is expanding the knowledge about the F-actin distribution and dynamics role in neurosecretion process.

Firstly, this thesis tries to improve the F-actin microfilaments cytoarchitecture description including last scientific findings about F-actin cytoplasmic organization in native chromaffin cells from bovine adrenal medulla, comparing the F-actin architecture from isolated chromaffin cells and showing the influence on vesicles and mitochondria distribution inside cell by F-actin configuration. Secondly, the thesis describes F-actin local dynamics by stimulation, not only in terms of fibers displacements but also for cytoskeletal network's cavities remodeling under active zones. Moreover, this work explains and reports new transport systems for vesicles and mitochondria linked to F-actin fibers, especially to F-actin dynamics and fibers polymerization potential.

In order to reach all these objectives, chromaffin cells have been selected as a neuroendocrine cellular model accepted for secretion studies and a multidisciplinary set of techniques have been used, combining: biochemistry and molecular biology tools, biophysical analysis with a high temporal resolution of secretion and bioimaging by dynamic confocal microscopy.



# Abreviaturas y Símbolos

A	Adrenalina
aa	Aminoácidos
Abs	Absorción
ACo	Acetilcolina
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Enzima desoxirribonucleasa
ADNc	ADN complementario
ADP	Di-fosfato de adenosina
AG	Aparato de Golgi
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina tri-fosfato
BH4	(6R)-5,6,7,8-tetra-L-hidrobiopterina
BSA	Albúmina sérica bovina (del inglés: "Bovine serum albumin")
CA	Catecolaminas
Ca <sup>2+</sup>	Ión Calcio
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración de Calcio intracelular
CaM	Calmodulina
CaMK II	Proteína quinasa de tipo II dependiente de Ca <sup>2+</sup> /Calmodulina
CCB	Células cromafines bovinas
CCDV	Canales de Calcio dependientes de voltaje
CICR	Salida de Calcio inducida por Calcio (del inglés: "Calcium release induced by Calcium")
Cl <sup>-</sup>	Ión Cloro
C-term	Carboxi-terminal
D	Coeficiente de difusión
Da	Daltons
DBH	Dopamina β-hidroxilasa

DMEM	Medio nutritivo de cultivo "Dulbecco's modified eagles medium"
DMSO	Dimetil sulfóxido
D.O.	Densidad óptica
DsRed	Proteína roja fluorescente
EGFP	Proteína fluorescente verde mejorada (del inglés: "Enhanced green fluorescent protein")
Ej	Ejemplo
ELC	Cadena ligera esencial de miosina (del inglés: "Essential light chain")
Em	Emisión
Ex	Excitación
Fig.	Figura
FNMT	Fenil-etanolamina-N-metil transferasa
GFP	Proteína verde fluorescente (del inglés: "Green fluorescence protein")
H <sup>+</sup>	Protones
H <sub>2</sub> CX	Intercambiadores de H <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> de membrana interna mitocondrial
IF	Intensidad de fluorescencia
Imag.	Imagen
IP3	Inositol 1,4,5 trifosfato
IP3R	Receptor de inositol 1,4,5 trifosfato
IRP	Grupo de secreción inmediata (del inglés: "Immediately releasable pool")
K <sup>+</sup>	Ión Potasio
KCl	Cloruro Potásico
K/H	Medio krebs hepes
KO	Modificado por ingeniería genética (del inglés: "Knockout")
Q-SNAREs	Grupo de proteínas SNAREs con residuos de Glutamina conservados
LDCV	Vesículas grandes de núcleo denso (del inglés: "Large dense core vesicles")
MBS	Subunidad de unión a miosina (del inglés: "Myosin binding subunit")



M.C.	Microscopía confocal
M.E.	Microscopía electrónica
M.E.T.	Microscopía electrónica de transmisión
MHC	Cadena pesada de miosina (del inglés: "Myosin heavy chain")
min.	Minuto/s
MLC	Cadena ligera de miosina (del inglés: "Myosin light chain")
MLCK	Proteína quinasa de la cadena ligera de miosina (del inglés: "Myosin light chain kinase")
ms.	Milisegundo/s
nA	Nanoamperios
NA	Noradrenalina
Na <sup>+</sup>	Ión Sodio
NaDS	Dodecil Sulfato de Sodio
NCX	Intercambiadores de Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> de membrana interna mitocondrial
nm	Nanómetros
NO	Óxido de Nitrógeno
Nt	Neurotransmisores
N-term	Amino-terminal
O <sub>2</sub>	Oxígeno
pA	Picoamperios
Pags	Páginas
PBS	Tampón fosfato (del inglés: "Phosphate buffered saline")
Pi	Fósforo inorgánico
PIP2	2-Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PKA	Proteína quinasa A.
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
RE	Retículo endoplásmico/endoplasmático
RFP	Proteína fluorescente roja (del inglés: "Red fluorescence protein")

RLC	Cadena ligera reguladora de miosina (del inglés: "Regulatory light chain")
RP	Grupo de reserva (del inglés: "Reserve pool")
RRP	Grupo vesicular preparado para secretarse (del inglés: "Ready release pool")
R-SNAREs	Grupo de proteínas SNAREs con residuos de Arginina conservados
s.	Segundos
SEM	Error estándar de la media (del inglés: "Standard error of the mean")
SLMVs	Microvesículas sinápticas (del inglés: "Synaptic-Like microvesicles")
SNAP-25	Proteína de 25 KDa asociada al sinaptosoma
SNAREs	Proteínas receptoras de SNAP
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SRP	Grupo de liberación lenta (del inglés: "Slowly releasable pool")
Synprint	Lugar de interacción de proteínas sinápticas (del inglés: "Synaptic protein interaction site")
t	Tiempo
TA	Temperatura ambiente
TH	Tirosina hidroxilasa
TIRFM	Microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (del inglés: "Total internal reflection fluorescence microscopy")
TRIC	Isocianato de tetrametilrodamina
UPP	Grupo de vesículas inmaduras (del inglés: "Unprimed pool")
VAMP	Proteína de membrana vesicular (del inglés: "Vesicle associated membrane protein")
VDAC	Canales aniónicos dependientes de voltaje (del inglés: "Voltage dependent anionic channels")
VDCC	Canal de Calcio dependiente de voltaje (del inglés: "Voltage dependent calcium channels")
[ ]	Concentración

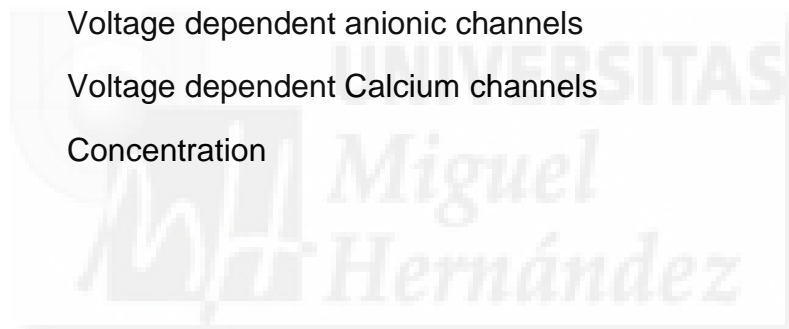
# Abbreviations and Symbols

A	Adrenalin
aa	Amino acids
Abs	Absorption
ACh	Acetylcholine
ACTH	Adrenocorticotropic hormone
ADP	Adenosine di-phosphate
ATP	Adenosine tri-phosphate
BCC	Bovine chromaffin cells
BH4	(6R) -5,6,7,8-tetra-L-hydrobiopterin
BSA	Bovine serum albumin
CA	Catecholamines
Ca <sup>2+</sup>	Calcium ion
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Intracellular Calcium concentration
CaM	Calmodulin
CaMK II	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin dependent kinase II
CCVD	Voltage dependent Calcium channels
CICR	Calcium release induced by Calcium
Cl <sup>-</sup>	Chlorine ion
C.M	Confocal microscopy
CNS	Central nervous system
C-term	Carboxy-terminal
D	Diffusion coefficient
Da	Daltons
DBH	Dopamine β-hydroxylase
DMEM	Dulbecco's modified eagles medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNAase	Deoxyribonuclease enzyme

DNAc	Complementary DNA
DsRed	Red fluorescence protein
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
ELC	Essential light chain
Em	Emission
E.M	Electron microscopy
ER	Endoplasmic reticulum
Ex	Excitation
FI	Fluorescence intensity
Fig.	Figure
FNMT	Phenyl-ethanolamine-N-methyl transferase
GA	Golgi apparatus
GFP	Green fluorescence protein
H <sup>+</sup>	Proton
HcX	Mitochondrial membrane H <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> exchangers
Imag.	Image
IRP	Immediately releasable pool
IP3	Inositol 1,4,5 triphosphate
IP3R	Inositol 1,4,5 triphosphate receptor
K <sup>+</sup>	Potassium ion
KCl	Potassium Chloride
K/H	Krebs hepes
KO	Knockout
LDCV	Large dense core vesicles
MBS	Myosin binding subunit
MHC	Myosin heavy chain
min.	Minute
MLC	Myosin light chain
MLCK	Myosin light chain kinase
ms.	Milisecond

nA	Nanoamperes (nanoamps)
NA	Noradrenaline
Na <sup>+</sup>	Sodium ion
NCX	Mitochondrial membrane Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> exchangers
nm	Nanometers
NO	Nitrogen Oxide
Nt	Neurotransmitter
N-term	Amino-terminal
O <sub>2</sub>	Oxygen
O.D	Optical density
pA	Picoamperes (picoamps)
PBS	Phosphate buffered saline
Pi	Inorganic phosphorus
PIP2	2-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PLC	Phospholipase C
PNS	Peripheral nervous system
P.p	Pages
Q-SNAREs	SNAREs proteins with conserved Glutamine residues
RFP	Red fluorescence protein
RLC	Regulatory light chain
RNA	Ribonucleic acid
RP	Reserve pool
RRP	Ready release pool
R-SNAREs	SNAREs proteins with conserved Arginine residues
RT	Room temperature
s.	Seconds
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEM	Standard error of the mean

SLMVs	Synaptic-like microvesicles
SNAP-25	25 KDa Protein associated with the synaptosome
SNAREs	SNAP receptor proteins
SRP	Slowly releasable pool
Synprint	Synaptic protein interaction site
t	Time
T.E.M	Transmission electron microscopy
TH	Tyrosine hydroxylase
TIRFM	Total internal reflection fluorescence microscopy
TRIC	Tetramethylrhodamine isocyanate
UPP	Unprimed pool
VAMP	Vesicle associated membrane protein
VDAC	Voltage dependent anionic channels
VDCC	Voltage dependent Calcium channels
[ ]	Concentration



# Índice

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.0. Introducción general, presentación de la línea de investigación y descripción de las publicaciones científicas y su vínculo .....	1
1.1. La glándula suprarrenal.....	3
1.1.1. La corteza de la glándula.....	3
1.1.2. La médula de la glándula.....	5
1.2. La célula cromafín.....	5
1.2.1. Definición .....	5
1.2.2. Funciones fisiológicas.....	7
1.2.3. Modelo neuroendocrino de secreción .....	9
1.3. El proceso secretor en célula cromafín .....	9
1.3.1. Definición .....	9
1.3.2. El ciclo secretor.....	10
1.3.3. Acoplamiento entre estímulo y secreción .....	12
1.3.4. El Calcio como elemento clave en secreción.....	18
1.3.5. El concepto de “zonas activas de secreción” .....	21

1.4. La vesícula cromafín .....	24
1.4.1. Definición y propiedades.....	24
1.4.2. Biosíntesis y almacenamiento de las catecolaminas .....	25
1.4.3. El ciclo vesicular .....	27
1.5. Las mitocondrias .....	31
1.5.1. Definición .....	31
1.5.2. Estructura .....	32
1.5.3. Función .....	35
1.5.4. Organización espacial en célula cromafín .....	36
1.6. El esqueleto celular o citoesqueleto.....	37
1.6.1. Definición.....	37
1.6.2. Elementos estructurales en procariontas y eucariontas.....	38
1.7. El citoesqueleto de F-actina en la célula cromafín .....	43
1.7.1. Concepto .....	43
1.7.2. Bioquímica .....	43
1.7.3. El proceso de polimerización .....	48
1.7.4. El proceso de despolimerización y fragmentación.....	51
1.7.5. Bases moleculares de la motilidad.....	53
1.7.6. Configuración.....	57



1.7.7. Fodrina: una proteína citoesquelética.....	60
1.7.8. Citoesqueleto de F-actina y tráfico vesicular .....	63
<b>2. Objetivos / Objectives .....</b>	<b>67</b>
Objetivos .....	67
Objectives.....	69
<b>3. Materiales y Métodos .....</b>	<b>71</b>
3.0. Resumen de los materiales y métodos utilizados .....	71
3.1. Aislamiento y cultivo de células cromafines bovinas.....	73
3.2. Obtención de rodajas tisulares adrenomedulares bovinas.....	77
3.3. Transfección de células cromafines bovinas aisladas .....	80
3.3.1. Protocolo.....	80
3.3.2. Material genético utilizado: ADN complementario (ADNc) .....	83
3.4. Inmunomarcaje .....	85
3.4.1. Concepto .....	85
3.4.2. Inmunocitoquímica.....	86
3.4.3. Inmunohistoquímica.....	87
3.4.4. Anticuerpos.....	88
3.5. Otros marcajes fluorescentes.....	89
3.5.1. Faloidina .....	89

3.5.2. Mito-Tracker.....	91
3.6. Farmacología .....	92
3.7. Protocolo de estimulación celular.....	96
3.8. Técnicas de imagen .....	97
3.8.1. Microscopía confocal .....	97
3.8.1.1. Descripción .....	97
3.8.1.2. Preparación de las muestras.....	99
3.8.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET) .....	100
3.8.2.1. Descripción .....	100
3.8.2.2. Preparación de las muestras.....	101
3.9. Análisis de imagen .....	105
3.10. Análisis de datos .....	105
<b>4. Resultados .....</b>	<b>107</b>
4.0. Resumen de los resultados obtenidos .....	107
4.1. Arquitectura del citoesqueleto de F- actina .....	109
4.1.1. El citoesqueleto de F-actina presenta una organización diferenciada en las células cromafines bovinas nativas y aisladas .....	109

4.1.2. La proteína citoesquelética fodrina presenta una distribución espacial equivalente a la de la F-actina en las células cromafínes bovinas .....	115
4.1.3. La densidad de fibras de F-actina y la proporción de parches de fodrina están conservados en la sección cortical de las células cromafínes bovinas nativas y aisladas.....	119
4.1.4. El incremento de los contactos entre las células cromafínes tras el aislamiento celular no ofrece cambios en la distribución de la F-actina .....	125
4.1.5. Los niveles de actina en su forma monomérica (G) y polimerizada (F) difieren entre las células cromafínes bovinas nativas y aisladas.....	129
4.1.6. Los gránulos cromafínes y las mitocondrias presentan una organización citoplásmica diferenciada entre las células cromafínes bovinas nativas y aisladas .....	133
4.1.7. Los datos amperométricos no revelan variaciones significativas en la cinética de secreción entre las células cromafínes bovinas nativas y aisladas .....	141

4.1.8. Los modelos matemáticos predicen la similitud de la respuesta secretora entre las células cromafines nativas y aisladas .....	143
4.2. Dinámica del citoesqueleto de F-actina .....	147
4.2.1. La red cortical de F-actina desarrolla una dinámica local en respuesta a estimulación en las células cromafines bovinas aisladas	147
4.2.2. Los eventos de dinámica local de las fibras corticales de F-actina son variaciones transitorias de distancia en el perfil celular .....	153
4.2.3. El complejo Actina-Miosina II es el motor molecular de las expansiones y las retracciones de la red cortical de F-actina en las células cromafines bovinas aisladas .....	159
4.2.4. Las cavidades de la red cortical de F-actina sufren modificaciones en las zonas de dinámica local de fibras.....	165
4.2.5. La dinámica local de fibras conlleva un transporte en “bloqueo” de los gránulos y las mitocondrias en las células cromafines bovinas aisladas.....	169
4.2.6. Los microfilamentos de F-actina pueden desarrollar cometas con efecto “impulso” sobre las vesículas cromafines .....	175
4.2.7. La red cortical de F-actina es capaz de desarrollar anillos de una naturaleza transitoria en las células cromafines bovinas aisladas	179

<b>5. Discusión .....</b>	<b>183</b>
5.0. Discusión general en base a los resultados .....	183
5.1. Arquitectura del citoesqueleto de F-actina .....	187
5.1.1. El citoesqueleto de F-actina interno de las células cromafínes bovinas sufre una desestabilización tras el aislamiento celular .....	187
5.1.2. Existen funciones no descritas para la proteína fodrina vinculada al citoesqueleto de F-actina en las células cromafínes bovinas .....	188
5.1.3. La célula cromafín bovina aislada como modelo celular neuroendocrino para los estudios de secreción.....	190
5.1.4. Los cultivos tridimensionales son una herramienta de aproximación de los estudios de secreción al nivel fisiológico usando la célula cromafín aislada .....	191
5.1.5. La distribución espacial de las vesículas y las mitocondrias está dirigida por el citoesqueleto de F-actina en las células cromafínes bovinas .....	192
5.1.6. El efecto compensatorio entre las organelas iguala la cinética de secreción entre las células cromafínes bovinas nativas y las aisladas	194
5.2. Dinámica del citoesqueleto de F-actina .....	197

5.2.1 La dinámica local de la red cortical de F-actina representa su vínculo funcional con la membrana plasmática en las células cromafines bovinas aisladas.....	197
5.2.2. Los cometas de F-actina son un sistema de reposición vesicular rápido en las células cromafines bovinas aisladas .....	198
5.2.3. Los anillos de F-actina son cavidades de nueva formación con una función en secreción para las células cromafines bovinas aisladas.....	200
5.2.4. El modelo integrado de sistemas de transporte para organelas mediados por el citoesqueleto de F-actina en las células cromafines bovinas aisladas .....	201
<b>6. Conclusiones / Conclusions .....</b>	<b>205</b>
Conclusiones.....	205
Conclusions.....	209
<b>7. Desarrollos futuros / Future developments .....</b>	<b>211</b>
Desarrollos futuros .....	211
Future developments .....	213
<b>8. Bibliografía / References .....</b>	<b>215</b>
<b>9. Anexos .....</b>	<b>231</b>







# 1. INTRODUCCIÓN

---

## **1.0. Introducción general, presentación de la línea de investigación y descripción de las publicaciones científicas y su vínculo.**

La comunicación neuronal, está basada en la neurosecreción, un proceso consistente en la liberación de neurotransmisores por exocitosis. El proceso excitotico, que tiene lugar mediante la fusión de la membrana plasmática y las vesículas cargadas de neurotransmisores, dota de una gran relevancia a la propia membrana plasmática, como superficie activa del proceso. Sin embargo, cabe considerar al mismo nivel la importancia del espacio submembranoso y la maquinaria excitotica incluida en este, destacando a este nivel la red citoesqueletal de F-actina. El estudio de la red citoesqueletal y su función en el proceso de liberación de neurotransmisores y hormonas en neurosecreción, es fundamental para entender como realizan su función los sistemas nervioso y endocrino. Son muchas las publicaciones que han venido contribuyendo a la elucidación de las bases moleculares y etapas del proceso en la célula cromafín, un excelente modelo neuroendocrino, utilizando una estrategia multidisciplinar que combina herramientas moleculares bioquímicas y de biología molecular, con un análisis biofísico de alta resolución temporal de la secreción y de imagen por microscopia confocal dinámica, FRET y TIRFM de los fenómenos de transporte vesicular e interacción proteica. No obstante, la descripción estructural y dinámica de esta red, era escasa años atrás.

La línea de investigación que recoge la presente memoria de Tesis Doctoral, pretende profundizar en el estudio de la configuración estructural citoesquelética de F-actina y su dinámica, así como de proteínas participantes e interacciones entre estas, que gobiernan las etapas de: transporte, atraque vesicular y de fusión de membranas, constituyentes del proceso exocitótico. Dicho conocimiento, resultará esencial para el desarrollo de terapias específicas para enfermedades tales como el Parkinson o el Alzheimer, cuya etiología tiene base en defectos de la neurotransmisión.

Esta tesis, se presenta como un compendio de cuatro publicaciones. En orden cronológico, inicialmente el artículo: **Gimenez-Molina Y 2015**, acoge la presentación del estado del arte de la investigación de la red citoesquelética de F-actina y su papel en neurosecreción, así como la introducción de los objetivos a cubrir por parte de la línea de investigación a desarrollar por la doctoranda. Con el desarrollo de esta línea de investigación en el tiempo, cada uno de estos objetivos han sido cubiertos y los resultados obtenidos han dado lugar al resto de publicaciones, cuerpo de esta memoria de tesis doctoral. El artículo: **Villanueva J et al., 2016**, ofrece la base de nuestra visión actual con respecto a la influencia que tiene la F-actina en la distribución de organelas que participan en la liberación de catecolaminas en células cromafines. Un artículo donde la doctoranda, como segunda firmante en autoría, participa con la investigación realizada en términos de distribución de organelas vinculada a la configuración del citoesqueleto de F-actina. Un año más tarde, la doctoranda publica como primera autora el artículo: **Gimenez-Molina Y et al., 2017**, donde se presentan los nuevos hallazgos en términos de configuración de F-actina, aportando una visión innovadora sobre la distribución de estas fibras entre el nivel celular y

tisular, así como el efecto directo de las diferencias encontradas en términos de organización de fibras sobre la propia organización de organelas con un papel clave en secreción. Por último, la parte de la investigación centrada en la comprensión dinámica de esta red citoesquelética, llega este mismo año (2018), con el artículo: **Gimenez-Molina Y et al., 2018**. En él, se detalla el componente dinámico de las fibras de F-actina, incluyendo no solo una descripción detallada de los tipos de eventos dinámicos, sino también la dependencia de temperatura para su magnitud y su funcionalidad vinculada a secreción y transporte de vesículas y mitocondrias en las zonas activas de exocitosis.

### **1.1. La glándula suprarrenal.**

Es una estructura retroperitoneal situada encima del riñón, perteneciente al sistema endocrino del organismo, presente a modo de un par estructural de morfología diferenciada siendo por lo general la glándula del lado derecho de forma piramidal y la izquierda semilunar.

Pese a las citadas diferencias morfológicas externas, ambas se encuentran irrigadas por ramas de la arteria frénica inferior, la arteria suprarrenal media (rama de la aorta abdominal), por la arteria polar superior (rama de la arteria renal) y por el arco exorrenal del riñón. Además, las dos unidades comparten la misma configuración estructural interna dividida en dos partes fundamentales: la corteza y la médula (inervadas por el sistema nervioso autónomo).

#### **1.1.1. La corteza de la glándula.**

Es una de las dos unidades funcionales de la glándula con la disposición espacial más periférica en la misma. Su función, consiste en la regulación de varios componentes del metabolismo, así como la producción de:

mineralocorticoides, glucocorticoides y hormonas sexuales (tanto femeninas, como masculinas). En función de los tipos celulares y de la función que realizan, se definen tres capas diferentes en la corteza:

a) Zona glomerular:

Se trata de la capa más externa de la corteza. Las células que la componen, están especializadas en la producción de mineralocorticoides como: la aldosterona (predominante) y la desoxicorticosterona, en respuesta a incrementos de los niveles de potasio o descenso del flujo sanguíneo a nivel de riñones.

b) Zona fascicular:

Se trata de la capa predominante de la corteza. Sus células, denominadas espongocitos, están dispuestas en hileras separadas por tabiques y capilares y están especializadas en la producción y secreción de glucocorticoides como: el cortisol (predominante), la cortisona y la hidrocortisona, en respuesta a la hormona adrenocorticotrópica (ACTH).

c) Zona reticular:

Se trata de la capa más interna de la corteza y con el contacto más directo a la parte medular de la glándula. Sus células, dispuestas a modo de cordones entrecruzados, están especializadas en la producción y secreción de: esteroides sexuales, estrógenos y andrógenos.

### **1.1.2. La médula de la glándula.**

Es la unidad o parte más interna de la glándula, considerada uno de los principales puntos activos de conversión de tirosina a catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) del organismo. El tipo celular predominante a este nivel son las células cromafines, unas células postganglionares del sistema nervioso simpático que reciben la inervación de células preganglionares. Dado que las sinapsis entre fibras pre y postganglionares ocurren en los ganglios nerviosos autónomos, la unidad de la médula es considerada un ganglio nervioso del sistema nervioso simpático.

Las células cromafines, componentes fundamentales de la médula adrenal, se encuentran intercaladas con células de sostén, pequeñas e irregulares, consideradas componentes neurogliales de la médula adrenal (Cocchia and Michetti, 1981). Además de las células cromafines, en la médula adrenal también se encuentran células endoteliales y fibroblastos formando un estroma de fibras reticulares que rodea los acinos de células secretoras (Coupland, 1965a; Coupland, 1965b).

## **1.2. La célula cromafín.**

### **1.2.1. Definición.**

Se trata de un tipo celular presente en: médula adrenal, ganglios del sistema nervioso autónomo, pared vesical, próstata e hígado. El nombre de cromafines, les es otorgado por Alfred Khon, a principios del siglo XX, en base a un método de tinción con sales de cromo que permite su visualización. Las citadas sales, oxidan y agregan las catecolaminas dando lugar a un color marrón pardo-amarillento notable de los gránulos que las contienen.

Centrándonos en las cromafines de la médula adrenal, base de los experimentos y estudios que alberga esta tesis, cabe decir que consisten en células organizadas en grupos, con una distribución en torno a los vasos sanguíneos y rodeados de tejido conectivo. Cada uno de estos grupos son considerados una unidad funcional independiente, secretando todas las células del mismo de una manera sincronizada tras la estimulación que llega a través de las fibras del nervio esplácnico (Iijima et al., 1992; Kajiwara et al., 1997).

La morfología común de este tipo celular, en el tejido intacto, es poligonal aunque se modifica hacia un formato más esférico cuando son aisladas y mantenidas en cultivo celular (Kajiwara et al., 1997). No obstante, pese a las posibles variaciones morfológicas externas de las mismas, un aspecto morfológico que las caracteriza a ambos niveles es la alta densidad de gránulos secretores presentes en su citosol.

Cabe diferenciar dos tipos fundamentales de células cromafines: adrenérgicas (producen y almacenan adrenalina) y noradrenérgicas (producen y almacenan noradrenalina) (Hillarp and Hokfelt, 1953). Las primeras, están en la zona más periférica del tejido parenquimatoso de la médula adrenal y se caracterizan por unos gránulos homogéneos y poco densos. Las segundas, tienen una localización más central en médula y muestran unos gránulos de centro electrodensos excéntricos dentro de la membrana que los limita. Paralelamente a estas diferencias de base puramente morfológica, existen diferencias moleculares significativas entre ambos tipos celulares. Algunas de estas diferencias son: la expresión de diferentes moléculas de adhesión: NCAM y L1 (Langley and Aunis, 1984), de

diversos receptores moleculares en su superficie celular, por ejemplo los de: histamina, angiotensina II y muscarínicos, así como de algunas proteínas tales como GAP-43 (Grant et al., 1994) y ambas isoformas de SNAP-25 (Grant et al., 1999). La mayor o menor presencia de cada una de ellas varía según especie, como resultado de una adaptación a las necesidades de cada una de las tipologías. En bovino, especie utilizada como modelo de estudio en la presente memoria de tesis doctoral, las adrenérgicas constituyen el 75%, dejando tan solo un 25 % para las noradrenérgicas (Aunis and Langley, 1999). Existe un tercer tipo de célula cromafín de vesículas pequeñas denominadas SIF (del inglés: "Small Intensely Fluorescent") (Huber, 2006; Kanno, 1998), con un fenotipo intermedio entre las células noradrenérgicas y las neuronas (Aunis and Langley, 1999). No obstante, estas no están presentes en todas las especies (ausentes en rata).

### **1.2.2. Funciones fisiológicas.**

La principal función de las células cromafines bovinas (CCB), es la liberación de catecolaminas y hormonas al torrente sanguíneo en respuesta a estímulo. Este tipo celular, puede recibir dos tipos de estímulos secretagogos para liberar catecolaminas al torrente circulatorio. Por un lado, mediante un incremento de la actividad de los nervios espláncnicos liberadores del neurotransmisor fisiológico acetil colina (ACh). Por otro, mediante estímulos químicos que llegan a la médula adrenal por vía hemática. Entre los primeros, figuran las situaciones de estrés físico (hipoxia, hipoglucemia o hipotermia) o emocional (miedo, ansiedad, alerta). En cambio por vía hemática, pueden llegar sustancias como: la histamina, la bradisinina o la angiotensina II, liberadas en situaciones de alergia o hipotensión. Una vez liberadas, el papel

principal de las catecolaminas es asegurar el flujo sanguíneo adecuado en los órganos vitales para que el organismo pueda adoptar una actitud de lucha o huida frente al estímulo estresante (Faurbye et al., 1951; Funkenstein and Meade, 1954; Gordon, 1950). Por lo tanto, aunque la médula adrenal no es esencial para la vida, en la cadena de reacciones mediante las cuales el cerebro coordina la respuesta al estrés, el sistema nervioso simpático y la médula adrenal tienen un papel predominante.

Las catecolaminas también desempeñan funciones reguladoras en sinapsis: dopaminérgicas, noradrenérgicas y adrenérgicas. La alteración en su: síntesis, almacenamiento, liberación y degradación, se ha asociado a diversos estados patológicos tales como: la hipertensión arterial esencial, la isquemia coronaria, la esquizofrenia o la enfermedad de Parkinson (Cymerman et al., 1972; Pinessi et al., 1984). A ello se añade que junto con las catecolaminas, se co-liberan otras sustancias igualmente almacenadas en las vesículas secretoras como: el ATP, los péptidos opiáceos, el factor natriurético atrial, el péptido intestinal vasoactivo, el neuropéptido Y, la sustancia P, el ascorbato o las cromograninas y sus derivados. Se ha demostrado, que muchas de ellas pueden modular la secreción adrenal de forma autocrina y paracrina (Albillos et al., 1996a; Albillos et al., 1996b; Winkler and Fischer-Colbrie, 1998). De otras, se ha postulado que ejercen un papel hormonal. Por ejemplo: el ATP y sus derivados, pueden actuar localmente sobre las células endoteliales provocando la liberación de óxido nítrico (NO), un agente vasodilatador que producirá un incremento del flujo sanguíneo, facilitando así la rápida liberación de catecolaminas al torrente sanguíneo (Moro et al., 1993).



### **1.2.3. Modelo neuroendocrino de secreción.**

Conocidas como neuronas modificadas o paraneuronas y con un origen embriológico común con neuronas, ambas procedentes de la cresta neural, el interés del uso de las mismas como modelo neuroendocrino para el estudio de los mecanismos celulares y moleculares del proceso de la neurosecreción, reside en su gran parentesco con neuronas simpáticas postganglionares (Fujita, 1977). Este parentesco, les hace compartir propiedades moleculares relevantes en el proceso de estimulación como los receptores nicotínicos (Criado, 2018) o canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (CCDV) (Ballesta et al., 1989; Fenwick et al., 1982; Garcia et al., 1998; Nishimura et al., 1981) entre otros y así compartir características funcionales como la secreción.

Las células cromafines, han sido utilizadas extensamente en la investigación del proceso neurosecretor. Tanto para definir las diferentes fases del mismo, como para identificar las biomoléculas más importantes que participan en cada una de ellas y su posible regulación. Esto, unido a su facilidad de obtención y manejo, ha llevado a este tipo celular a convertirse en uno de los sistemas más útiles en la investigación del proceso neurosecretor. De ahí, que estas hayan sido acuñadas recientemente como las *E.Choli* en neurobiología (Borges et al., 2018).

## **1.3. El proceso secretor en célula cromafín.**

### **1.3.1. Definición.**

La exocitosis, es el proceso mediante el cual se secretan diferentes tipos de moléculas, contenidas en las vesículas citoplasmáticas de una célula, al

espacio extracelular. Para ello, es necesario: una producción vesicular previa, un transporte efectivo de las mismas hasta la membrana plasmática celular y una fusión eficiente entre ambos elementos a nivel de sus membranas (membrana vesicular y plasmática) con fin de verter el contenido vesicular al espacio extracelular. Se trata de un proceso celular universal y el procedimiento mediante el cual las células neuroendocrinas y neuronales liberan los neurotransmisores de forma cuántica en respuesta a la estimulación celular (Almers, 1990).

### **1.3.2. El ciclo secretor.**

El ciclo de la secreción celular, ha sido descrito con el tiempo gracias a las aportaciones científicas de una larga lista de grupos de investigación siguiendo en estudio detallado la maquinaria molecular y celular implicada. Históricamente, son relevantes en el conocimiento de este proceso celular algunas citas como las siguientes: Bernard Katz y sus colaboradores en los años 50 (Fatt and Katz, 1952) aportaron los primeros datos sobre el proceso excitotónico. Ellos estudiaron la liberación del neurotransmisor ACh en los terminales nerviosos de la placa motora, descubriendo que tal proceso se producía de manera discreta, en forma de paquetes o cuantos. Tiempo después, fue Klein quién observó la vesícula en fusión con un microscopio electrónico, adjudicándole el nombre de estructura en omega ( $\Omega$ ) (Klein and Thureson-Klein, 1971). Finalmente, es durante la década de los años 60 y 70, cuando se demostró que el calcio y el ATP son elementos imprescindibles para que tenga lugar la secreción (Douglas, 1968; Douglas, 1974).

Más allá de la descripción del proceso, se ha descubierto la existencia de dos variantes del mismo: la exocitosis constitutiva y la regulada (Burgess and Kelly, 1987; Kelly, 1985). La exocitosis constitutiva, es un proceso universal presente en todas las células. Este, está focalizado en la liberación de moléculas que van a formar parte de la matriz extracelular o bien sirven para regenerar la propia membrana celular. Es un proceso espontáneo y constante de: producción, desplazamiento y fusión de vesículas, con diferente intensidad de tráfico según el estado fisiológico de la célula (Fig 1). Por otro lado, la exocitosis regulada es un fenómeno de secreción que se produce sólo en aquellas células especializadas en la secreción de sustancias activas, como son las células cromafines y las neuronas (Fig 1). En este tipo de exocitosis se liberan moléculas que realizan funciones para el organismo o que afectan a la fisiología de otras células, a las cuales llegan a través del sistema circulatorio como es el caso de las hormonas. Este no es un proceso constante de: producción, desplazamiento y fusión vesicular, sino que se trata de un fenómeno restringido en el tiempo y en el espacio. En términos temporales, las vesículas solo sufren fusión ante la llegada del estímulo que es molecularmente traducido en la célula como un incremento de la concentración de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). En términos de espacio, existen áreas específicas de membrana para la exocitosis denominadas: “zonas activas de secreción” (Introducción: 1.3.5).

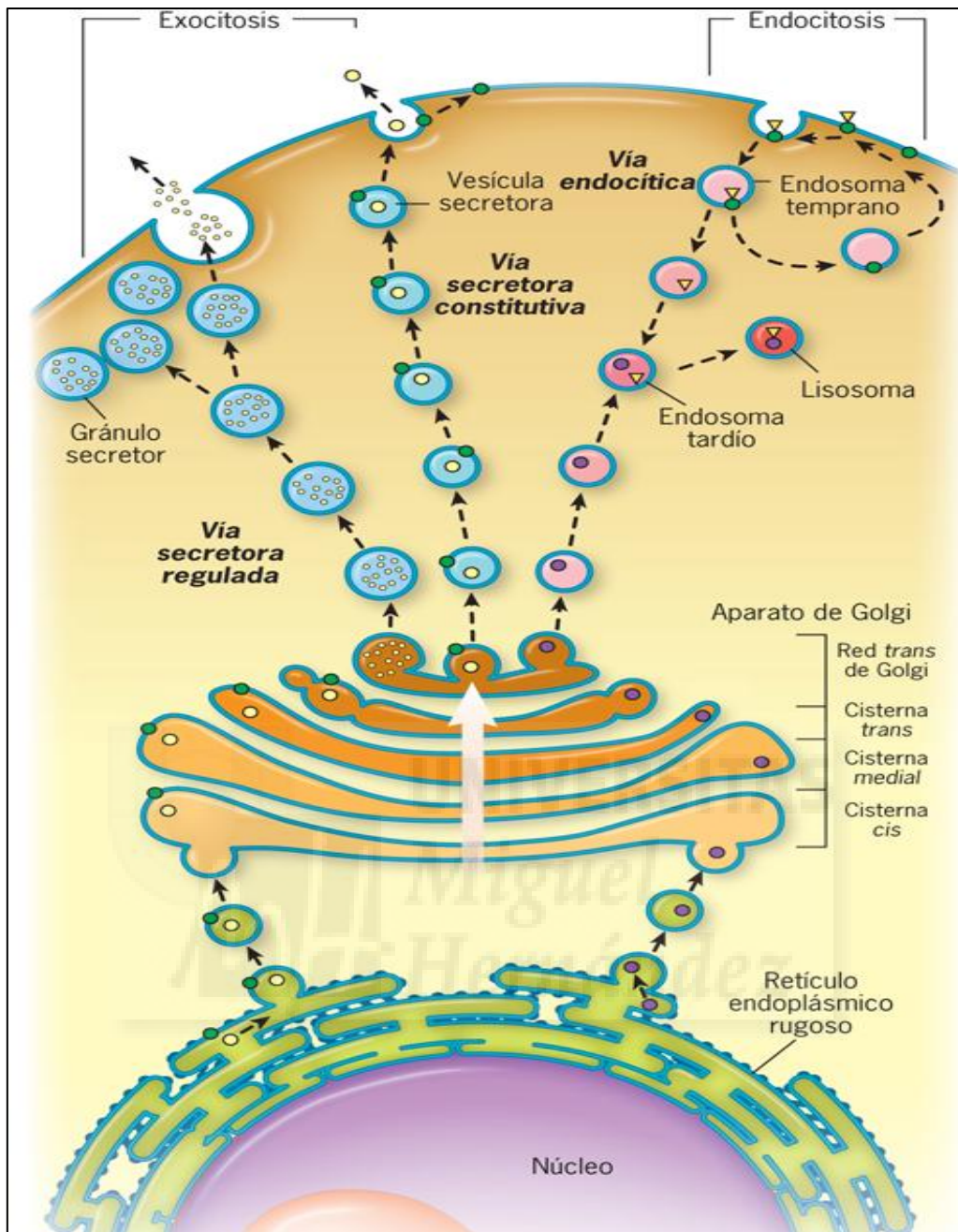


Fig 1. Tipos de vías exocitóticas y vía endocítica.

### 1.3.3. Acoplamiento entre estímulo y secreción.

El proceso que mejor define el acoplamiento entre la estimulación y el proceso de secreción, es aquel fenómeno bioquímico implicado en la elevación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Esto es debido, a que dicho ión es el mensajero intracelular desencadenante de los procesos de secreción (Ales et

al., 1999; Becherer et al., 2003; Garcia et al., 2006). En base a ello, han sido definidos múltiples métodos de estimulación con fines de investigación sobre el proceso excitotóxico en este modelo neuroendocrino. Cabe citar algunos como la histamina, capaz de estimular los receptores en membrana de retículo promoviendo este incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  por liberación al citoplasma desde los reservorios internos celulares (Ashby and Tepikin, 2001; Bunn and Boyd, 1992), u otros como la ACh o la aplicación de un medio con alta concentración en potasio ( $[\text{K}^+]$ ), cuyo mecanismo final de elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es mediante la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) por despolarización de membrana celular, aunque las vías implicadas en la citada despolarización difieren entre ambos.

W. Feldberg, fue el primero en identificar la ACh como el principal neurotransmisor capaz de activar la liberación de adrenalina y noradrenalina (Feldberg et al., 1934). El proceso de estimulación basado en ACh, tiene su punto de acción a nivel de los receptores nicotínicos (ionotrópicos) y/o muscarínicos (metabotrópicos) localizados en la membrana plasmática en células cromafínes. De ahí, que sea conocida como: estimulación nicotínica (Helle and Serck-Hanssen, 1975). Esta estimulación, consiste en la aplicación de la ACh con el fin de producir la apertura del canal iónico del receptor permitiendo la entrada de  $\text{Na}^+$ . Junto al  $\text{Na}^+$ , también entran iones  $\text{Ca}^{2+}$  aunque en una menor proporción, produciendo una ligera despolarización de la membrana. Tal despolarización, es suficiente para activar los canales rápidos de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje y sensibles a tetrodotoxina (Cena et al., 1983). La entrada de  $\text{Na}^+$  por estos canales selectivos, aumenta la despolarización celular activando la apertura de los CCDV sensibles a las

dihidropiridinas (Garcia et al., 1984; Montiel et al., 1984). Consecuentemente, los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  fluyen hacia el interior celular y aumenta la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). La liberación de catecolaminas mediada por la activación de los receptores nicotínicos por ACh, fue acuñada bajo el término: “acoplamiento estímulo – secreción” por parte de W. W. Douglas en el año 1961 (Douglas and Rubin, 1961).

La estimulación basada en  $\text{K}^+$ , elegida para los experimentos que alberga la presente tesis doctoral, consiste en la aplicación de una solución de Krebs-Hepes (K/H) de alta concentración para dicho ión, con el objetivo de incrementar la presencia extracelular del mismo y generar cambios en las concentraciones iónicas que caracterizan el estado de reposo celular. Con la aplicación de altas concentraciones de  $\text{K}^+$ , la célula responde inicialmente abriendo los canales de  $\text{Na}^+$  presentes en la membrana. De este modo, los iones  $\text{Na}^+$  entran en la célula a favor del gradiente de concentración y aportan carga positiva a la cara citosólica de membrana. Esta, es negativa hasta entonces y con el cambio de carga se produce la despolarización. La despolarización, es un proceso basado en cambios de potencial de membrana. En condición de reposo, la célula presenta un potencial de membrana que se debe a la distribución diferencial de iones, entre el interior y el exterior celular, propios para dicho estado celular. Este potencial de membrana, es mantenido a lo largo del tiempo mediante el transporte activo de iones por parte de las bombas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (que extraen de forma activa tres iones  $\text{Na}^+$  desde el interior hacia el exterior celular e introducen dos iones  $\text{K}^+$  consumiendo una molécula de ATP), los canales de  $\text{K}^+$  (que permiten el intercambio libre de los iones  $\text{K}^+$ ) y las bombas para  $\text{Cl}^-$  (que extraen cloruro

de forma activa). El balance neto de cargas para la cara citosólica en reposo celular es negativo  $\approx -50 \text{ mV} - -70 \text{ mV}$  (Biales et al., 1976; Matthews, 1967). Esto, es debido a que salen tres iones  $\text{Na}^+$  por cada dos iones  $\text{K}^+$  y también por la presencia de moléculas con carga negativa en el interior celular como: ATP y proteínas. Sin embargo, la cara extracelular es positiva. Es importante aclarar que tanto el interior como el exterior celular se mantienen electroneutros, es decir, no hay una diferencia de carga neta entre ambos. Esto, es debido a que el potencial de membrana viene dado por la distribución diferencial de los tipos de iones (mayoritariamente,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  en el exterior celular y  $\text{K}^+$  y aniones orgánicos en el interior), no por la cantidad de cada uno de estos a ambos lados de la membrana. Cambios en la distribución iónica propia del estadio de reposo celular, producen la despolarización de la membrana (Douglas et al., 1967). Esta, se caracteriza por una situación de carga positiva en la cara citosólica de la membrana y negativa en su parte extracelular (situación inversa a la condición de reposo). Cuando el potencial de membrana de una célula excitable se despolariza más allá de un cierto umbral ( $\approx -65 \text{ mV} - -55 \text{ mV}$ ), la célula genera (o dispara) un potencial de acción (Fig 2). Este proceso, consiste en un cambio en la polaridad de la membrana de negativo a positivo y vuelta a negativo, en un ciclo que dura milisegundos.

El voltaje desencadenado por los procesos ligados a la despolarización de membrana ante la alta  $[\text{K}^+]$ , activa los CCDV y los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  fluyen hacia el interior celular aumentando la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Esta elevación transitoria de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , es la señal que activa definitivamente el fenómeno de la secreción.



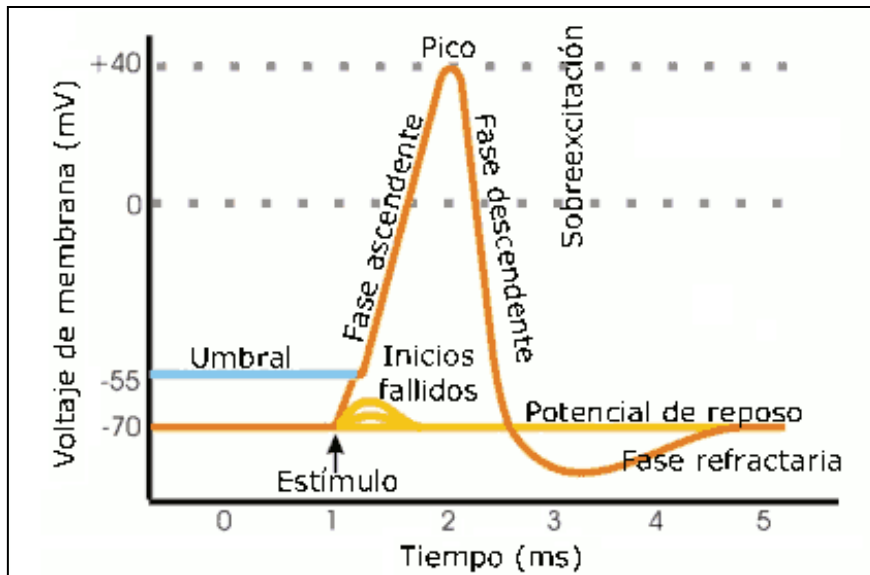


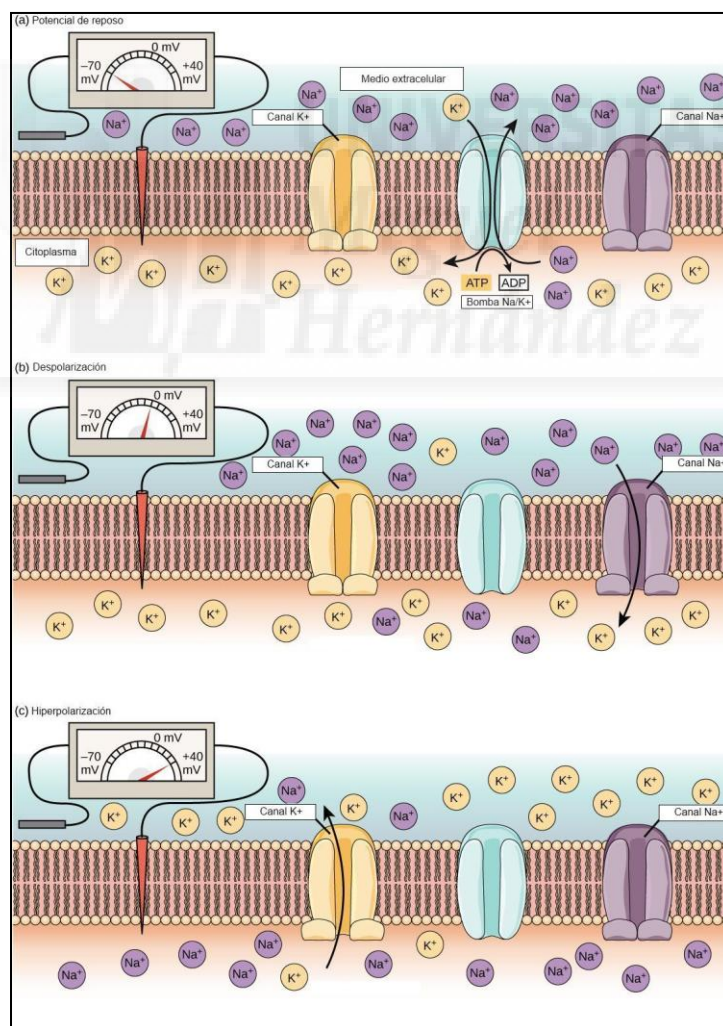
Fig 2. Potencial de acción.

El potencial de acción no se mantiene en un punto de la membrana plasmática, sino que viaja a lo largo de esta. Esta transmisión de la señal, es unidireccional en el caso de células polarizadas por dos razones. En primer lugar, cuando una sección de la membrana experimenta un potencial de acción, muchos iones de  $\text{Na}^+$  entran en la célula a través de esa sección. Estos iones, difunden lateralmente dentro de la célula y pueden despolarizar una sección vecina de membrana, lo cual abre los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje y provoca que la sección cercana experimente su propio potencial de acción. En segundo lugar, el potencial solo puede viajar en una dirección porque la sección de la membrana que acaba de experimentar un potencial de acción está en un periodo refractario y no puede experimentar otro (Lowitzsch and Hopf, 1972). El periodo refractario, se produce en gran medida por la inactivación de los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje que se da en el valor máximo del potencial de acción y persiste durante la mayor parte del periodo de hiperpolarización. Estos canales de  $\text{Na}^+$  inactivados, no se pueden abrir incluso si el potencial de



membrana supera el umbral. El cierre lento de los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje, que se traduce en la hiperpolarización, también contribuye al periodo refractario al dificultar la despolarización de la membrana (incluso una vez que los canales de  $Na^+$  dependientes de voltaje han regresado a su estado activo).

El citado fenómeno de la despolarización, conlleva posteriormente en el tiempo la apertura gradual de los canales de  $K^+$  y el cierre de los canales de  $Na^+$  previamente abiertos (Fig 3), produciéndose la repolarización de la membrana y vuelta al estado propio del reposo celular.



**Fig 3.** Funcionamiento de los canales iónicos regulados por voltaje durante un potencial de acción.

#### 1.3.4. El Calcio como elemento clave en secreción.

Dada la relevancia funcional del ión  $\text{Ca}^{2+}$  en la exocitosis, los niveles de este ión están estrictamente regulados y mantenidos en unos valores mínimos para las condiciones basales (reposo). De no ser así, la célula estaría permanentemente en un estado estimulado y no sería viable desde el punto de vista biológico, ni fisiológico. Es por ello, que existe una gran diferencia entre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro y fuera de la célula siendo mucho mayor fuera que dentro de esta. En condiciones basales, la concentración de calcio extracelular es aproximadamente 2 mM, mientras que la intracelular es del orden de 100 nM. El aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular procede de dos fuentes principales: el espacio extracelular y los reservorios celulares.

La aportación de  $\text{Ca}^{2+}$  procedente del espacio extracelular, es mediada por los CCDV. Tres, son los tipos presentes en la célula cromafín bovina: los de tipo L, tipo N y tipo P/Q (Bossu et al., 1991; Fenwick et al., 1982; Garcia et al., 1998; Lukyanetz and Neher, 1999). Los canales de tipo L (del inglés: “Long Lasting”), producen una corriente de entrada de larga duración y son sensibles a dihidropiridinas (Chang et al., 1991; Garcia et al., 1984; Gutierrez et al., 1991; Rosario et al., 1989). Estos, han sido relacionados con el proceso de exocitosis y endocitosis en células cromafínes (Nanclares et al., 2018). No obstante, se vinculan mayoritariamente a endocitosis en modelo bovino (Rosa et al., 2007; Rosa et al., 2011). Los de tipo N son abundantes, aunque parece que no están implicados en secreción en el modelo bovino (Lopez et al., 1994). Por último, los de tipo P/Q sí están implicados en exocitosis (Mochida et al., 2003) y presentan una localización más cercana a los sitios activos de

secreción que los de tipo L (Lara et al., 1998). Además, cabe citar sobre ellos su sensibilidad a  $\omega$ -agatoxina, así como a algunas  $\omega$ -conotoxinas (Fernandez et al., 1995). La apertura de los VDCC, que ocurre tras la despolarización celular, produce un aumento en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que en células nerviosas puede llegar a alcanzar los 100  $\mu\text{M}$  en cuestión de milisegundos. En las células cromafines, unos valores de entre 0,5 y 10  $\mu\text{M}$  son suficientes para provocar exocitosis (Kao and Schneider, 1986), además se trata de un proceso que ocurre con una cinética más lenta que en neuronas. Una diferencia, que responde a las funciones fisiológicas que desempeñan las neuronas y las células cromafines. En las neuronas, la liberación tiene que ser muy rápida para que la transmisión nerviosa siga su ritmo. Mientras que en las células cromafines, la liberación rápida no es necesaria. Las catecolaminas y demás sustancias, se liberan a la sangre y el paso limitante no es la velocidad de secreción, sino el tiempo que tardan hasta llegar al órgano diana.

La aportación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde la zona intracelular, procede de los reservorios celulares tales como el retículo endoplásmico y las mitocondrias. Para la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el lumen del retículo endoplásmico (RE) o matriz mitocondrial hacia el espacio citoplásmico, ambas organelas poseen unos sistemas especializados en tal efecto. En el caso del retículo endoplasmático, están implicados fundamentalmente dos receptores: el receptor de rianodina (RyR) (Xu et al., 1993) y el receptor del inositol trifosfato (IP3R) (Mikoshiba et al., 1994) (Miyazaki, 1993), implicado en la vía de estímulo mediada por histamina. La función de los RyR, está íntimamente ligada al fenómeno de la liberación de calcio inducida por calcio, conocido como CICR (del inglés:

“Calcium-Induced Calcium Release”). Este proceso, está basado en la activación de la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo como repuesta al incremento de calcio citoplásmico que ha accedido desde el espacio extracelular por los canales CCDV (de tipo L), consiguiendo amplificar y propagar la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  por el citosol. La citada liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el lumen por CICR responde a una curva en campana, ya que inicialmente la liberación se incrementa por un mecanismo de retroalimentación positiva, pero cuando la concentración de calcio alcanza su meseta, la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  se inhibe (Meissner, 1986). En función de su concentración, la rianodina, que es un compuesto que da nombre a los RyR, modifica la actividad de estos receptores de diferentes maneras. En el rango nanomolar los activa, mientras que en el rango de decenas de micromolar los deja en un estado de semiconductancia caracterizado por: un tiempo medio de apertura hasta 20 veces mayor e insensibilidad a la activación por  $\text{Ca}^{2+}$ . En lo que respecta a los IP3R, se trata de receptores presentes en todos los tipos celulares y activados por la unión del ligando inositol trifosfato (IP3), un producto de la cascada de activación de receptores muscarínicos. La capacidad del IP3R para liberar  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, también es dependiente de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intraluminal y citosólico que modulan el estado de afinidad del receptor por su agonista IP3. Esta situación, permite que estos receptores estén dinámicamente acoplados a las condiciones del medio citosólico y al estado de relleno del RE para activarse o inhibirse. Una vez que se activan los receptores de IP3, el  $\text{Ca}^{2+}$  que sale del RE es capaz de activar otros RyR colindantes, integrándose también en el fenómeno del CICR.

En el caso de la mitocondria, cabe citar dos estructuras presentes en la membrana interna de dicha organela responsables de la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde la matriz mitocondrial hacia el citoplasma: los intercambiadores de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (del inglés: “ $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Exchanger”) y de  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  (del inglés: “ $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  Exchanger”), abreviados respectivamente como NCX y HCX. El NCX, introduce en el lumen mitocondrial tres iones de  $\text{Na}^+$  por cada ion  $\text{Ca}^{2+}$  que saca al citosol (Thomas et al., 2003). Este posee baja afinidad y una alta capacidad para movilizar  $\text{Ca}^{2+}$ . Se trata de un mecanismo reversible, que funciona a favor de gradiente iónico y según la magnitud y la polaridad de los potenciales electroquímicos. Por otro lado, el HCX, introduce dos  $\text{H}^+$  por cada  $\text{Ca}^{2+}$  que saca al citosol y se ha caracterizado principalmente en hígado y riñón (Villa et al., 1998).

#### **1.3.5. El concepto de “zonas activas de secreción”.**

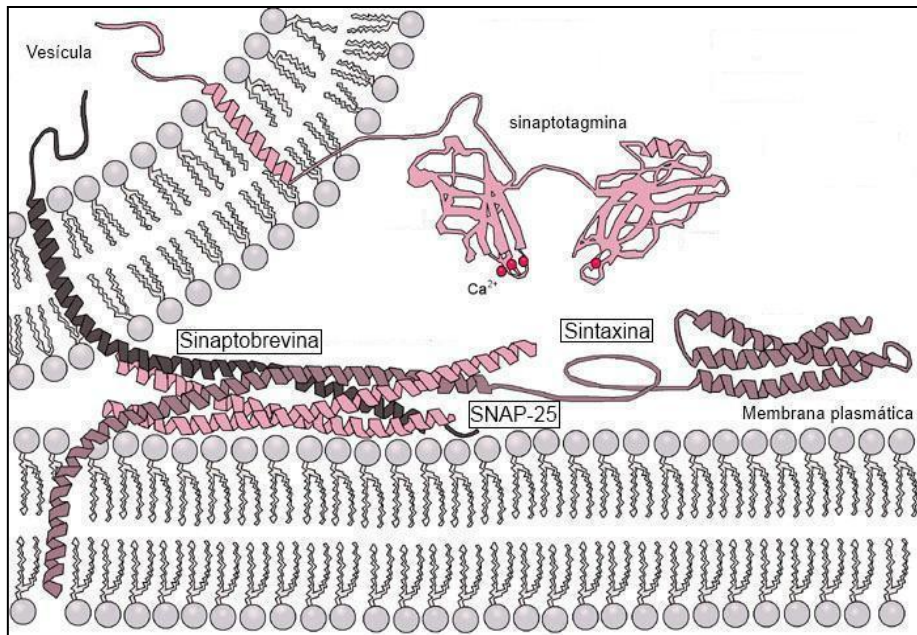
Las zonas activas de secreción, son regiones altamente preparadas, capaces y eficientes para llevar a término la fusión de membranas y con ello procesos como la exocitosis. Aunque no existen como tales, zonas definidas en la membrana plasmática de células neuroendocrinas con una morfología dedicada al proceso excitotico, las primeras imágenes de eventos de exocitosis en células vivas, usando marcadores fluorescente para gránulos secretores, revelaron puntos calientes para la exocitosis, sugiriendo la presencia de zonas de membrana enriquecidas con los componentes clave para tal evento (Schroeder et al., 1994).

Las proteínas SNAREs, han sido reconocidas como componentes clave de los complejos proteicos que median la fusión entre membranas desde su descubrimiento científico. De ahí, el término asociado a estas como

maquinaria de fusión en múltiples trabajos (Borisovska et al., 2005; Burgoyne et al., 1996; Gurunathan et al., 2000; Hu et al., 2004; Lang et al., 2002; Parpura and Mohideen, 2008; Rickman and Davletov, 2003). Estas proteínas, son una superfamilia de proteínas con 36 miembros en el genoma humano. Todas ellas, comparten el característico motivo SNARE que está formado por una estructura en hélice  $\alpha$  con una secuencia de 60-70 aminoácidos muy conservada consistente en la repetición de ocho heptadas. Estas fueron clasificadas inicialmente, por Sollner y colaboradores (Sollner et al., 1993), según el compartimento del que se habían aislado: vesícula y membrana celular. Por lo que se dividieron en un principio en: v-SNAREs (del inglés: "Vesicle Membrane SNAREs") y tSNAREs (del inglés: "Target Membrane SNAREs"). Más tarde se implantó una nueva clasificación, de acuerdo con la existencia de residuos altamente conservados de glutamina (Q-SNAREs) y de arginina (R-SNAREs) en el motivo SNARE. Sin embargo, hoy en día aún se sigue haciendo referencia a la antigua clasificación establecida por Sollner y colaboradores.

El primer complejo SNARE neuronal identificado por Sollner, se sustenta en un modelo basado en tres proteínas (Fig 4). Dos residentes en la membrana plasmática llamadas sintaxina (McNally et al., 2004) y SNAP-25 (Chapman et al., 1994), clasificadas ambas como t-SNAREs y una proteína de membrana vesicular denominada sinaptobrevina o VAMP (Trimble et al., 1988), clasificada como v-SNARE. De este modo, quedaba definido el complejo SNARE en base a una triada de proteínas localizadas en las membranas opuestas (Fig 4) que van a fusionar (Fix et al., 2004; Lang et al., 2008; Markin et al., 1984; Weber et al., 1998).





**Fig 4.** Complejo SNARE.

Las SNAREs de la membrana plasmática (t-SNAREs, según la clasificación antigua), no se distribuyen uniformemente en la membrana sino que forman clústeres en balsas lipídicas (del inglés: "Lipid Rafts"). Se encuentran a modo de parches (clústeres), sumergidos en nanodominios lipídicos de membrana, sobre los que atracan y fusionan vesículas secretoras (Lang et al., 2001). Estos clústeres de t-SNAREs, poseen una dinámica que les otorga la capacidad de moverse en la membrana plasmática (Lopez-Font et al., 2010). No obstante, en términos de organización espacial, han sido vinculados a los bordes de las cavidades citoesqueléticas de F-actina corticales de igual modo que los canales de  $Ca^{2+}$  L y P/Q (Torregrosa-Hetland et al., 2011; Torregrosa-Hetland et al., 2010). Dicha organización, en asociación con los bordes de las cavidades de la red cortical de F-actina, parece ser una forma efectiva de promover el acoplamiento rápido entre la entrada de calcio y la liberación de catecolaminas. Los nanodominios lipídicos colocalizados con estos clústeres, están particularmente enriquecidos en lípidos específicos como: colesterol,

fosfatidilinositol- 4, 5 –bifosfato y esfingolípidos (Salaun et al., 2004) y tienen una participación activa en la reacción de fusión de membranas asociada a los cambios de curvatura de estas (Ammar et al., 2013; Yang et al., 2016). Localizados en el cuello del poro de fusión, estos lípidos son también considerados parte de la maquinaria de secreción.

#### **1.4. La vesícula cromafín.**

##### **1.4.1. Definición y propiedades.**

La vesícula cromafín, también conocida como gránulo cromafín, es una organela modelo de almacenaje de productos de secreción (Zinder and Pollard, 1980) que, con su presencia intracelular y su capacidad de fusión, convierte a las cromafines en un modelo funcional para estudios de neurosecreción (Winkler, 1993).

En el interior de la célula cromafín, el tamaño de las vesículas puede oscilar con diámetros desde 65 hasta 590 nm de diámetro. Estas diferencias, se deben a que en la misma célula coexisten al menos tres tipos de vesículas: las vesículas grandes de núcleo denso, las pequeñas y claras encargadas de la exo/endocitosis constitutiva y las microvesículas parecidas a las propias vesículas sinápticas o SLMVs (del inglés: “synaptic-like microvesicles”) cuya función en las células cromafines se desconoce, pero que en las neuronas han sido asociadas al almacenan los neurotransmisores para la exocitosis rápida.

La membrana de las vesículas cromafines está compuesta fundamentalmente por lípidos, siendo el más abundante la fosfatidiletanolamina aunque también contiene mucho colesterol (Westhead,



1987). Además, posee una gran carga proteica de gran variabilidad lo que la convierte en una organela de función altamente regulada. Entre estas proteínas, cabe destacar la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa (DBH) por ser la más abundante.

El contenido interno de la vesícula cromafín, también conocido como el contenido de la matriz granular, contiene fundamentalmente catecolaminas en una concentración muy elevada (0.5-1 M) (Jankowski et al., 1993). Sin embargo, también forman parte de esta matriz: nucleótidos (entre los cuales el más abundante es el ATP; 1.5 M), el ácido ascórbico, el ión  $\text{Ca}^{2+}$  (16 mM), algunas proteínas como las cromograninas y la secretogranina II y los péptidos opiáceos (Crivellato et al., 2008).

#### **1.4.2. Biosíntesis y almacenamiento de las catecolaminas.**

El proceso de síntesis enzimática de las catecolaminas (CA) (adrenalina, noradrenalina y dopamina), tiene lugar a través de una vía multiseccional (Fig 5) que parte del aminoácido aromático esencial L-Tirosina (Coupland and MacDougall, 1966; Fernstrom and Fernstrom, 2007).

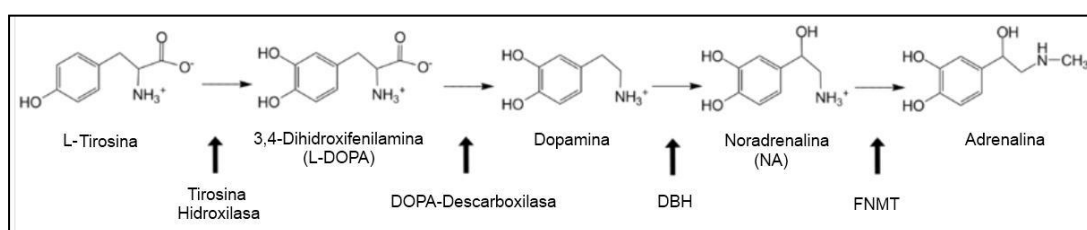
La primera etapa de esta síntesis, consiste en la hidroxilación de la Tirosina (L-Tirosina) para dar lugar a la 3,4-dihidroxifenilamina (L-DOPA). Esta reacción, está catalizada por la enzima Tirosina-Hidroxilasa (TH) y constituye el paso limitante de la síntesis de CA (Fig 5). Esta enzima, presente en el citoplasma, posee una actividad de 100 a 1.000 veces menor que las otras enzimas de la vía y por tanto está sujeta a regulación por activación e inhibición. Por otra parte, esta enzima posee un mecanismo de retroalimentación negativo, ya que las propias CA compiten con el cofactor de

la reacción: la (6R) - 5, 6, 7, 8-tetra-L-hidrobiopterina (BH4), regulando así la vía.

La segunda etapa, es una reacción de descarboxilación de la L-DOPA para dar dopamina y está catalizada por la enzima citosólica DOPA- Descarboxilasa (Fig 5).

La siguiente reacción, es catalizada por la Dopamina-β-hidroxilasa (DBH) y da como resultado la Noradrenalina (NA) (Fig 5). Esta enzima, está unida a la membrana vesicular y para que la hidroxilación tenga lugar es necesario que la dopamina sea captada por la vesícula. Esta reacción catalítica, necesita de la presencia de: O<sub>2</sub> y ácido ascórbico como cofactores y tiene lugar dentro del gránulo. Por el contrario, el resto son reacciones citoplásmicas.

En las células cromafines noradrenérgicas, el proceso de síntesis de CA termina con la formación de NA. Sin embargo, en las células adrenérgicas, la última fase consiste en la formación de adrenalina. Para llevar a cabo esta última reacción, la NA es exportada al citoplasma desde el interior del gránulo (donde tuvo lugar la reacción de su formación previamente) y una vez allí, la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa (FNMT) cataliza la reacción de metilación para dar adrenalina (Fig 5). La adrenalina producida, entra en el gránulo posteriormente para su almacenamiento en la matriz granular.



**Fig 5.** Ruta biosintética de las catecolaminas en las células cromafines.

### 1.4.3. El ciclo vesicular.

El ciclo vesicular, es el conjunto de pasos que constituyen el tráfico vesicular intracelular que comprenden: la adquisición de competencia excitotónica plena por parte de una vesícula, su fusión con la membrana plasmática y la posterior recuperación de membrana, así como el proceso de reacidificación del lumen vesicular que precede a la reincorporación de nuevas moléculas de neurotransmisor en su interior (Fillenz and Howe, 1971). Se trata de un proceso compuesto de varias etapas sucesivas, con una fina coordinación de complejas estructuras moleculares. Las principales etapas del proceso están incluidas en la figura 6, así como la propiedad cíclica que lo caracteriza. La descripción de cada una de ellas, se detalla a continuación.

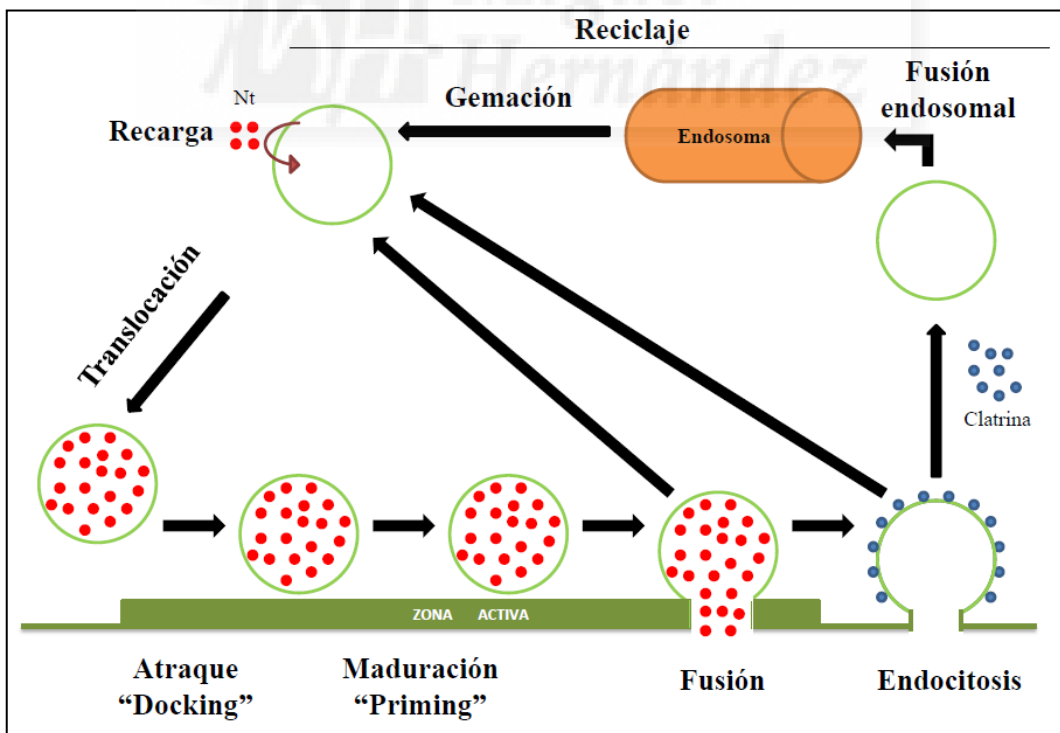


Fig 6. Etapas del ciclo vesicular. Imagen adaptada de Südhof (Sudhof, 2004).

a) Translocación de las vesículas desde los puntos de formación hacia las zonas activas de secreción:

Las vesículas secretoras, se generan en el aparato de Golgi donde sufren un proceso de ordenación (del inglés: "Sorting"). Una serie de proteínas, hacen que la célula las reconozca como vesículas de secreción y se envíen como tales hacia la membrana plasmática. En este camino, las vesículas se acidifican y comienzan a captar: catecolaminas, ATP, calcio y ácido ascórbico. En el movimiento de las vesículas hacia la membrana plasmática, participan activamente: microtúbulos, actina y las miosinas II y V (Neco et al., 2002; Neco et al., 2003a; Neco et al., 2004; Trifaro and Vitale, 1993). Una vez en la membrana plasmática, antes de que se produzca el atraque vesicular, una serie de proteínas controlan el trasiego de las vesículas y la actividad de proteínas diana claves para que se produzca el atraque.

b) Atraque y maduración vesicular:

El atraque (del inglés: "Docking"), es una etapa dependiente de ATP que consiste en el: reclutamiento vesicular, reconocimiento del sitio de liberación por la vesícula y anclaje de dicha vesícula en la membrana plasmática. Únicamente una fracción de las vesículas atracadas, experimentan una maduración o preparación (del inglés: "Priming") (Misonou et al., 1997). Este proceso, dependiente de ATP y  $Ca^{2+}$ , las faculta para liberar su contenido mediante el proceso de fusión. Durante esta etapa, podría ocurrir un proceso parcial de fusión donde las vesículas se detendrían esperando una señal de calcio.

c) Fusión de membranas y liberación del contenido vesicular:

Se trata de un paso dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$  y del pH, pero no de ATP (Heinemann et al., 1994). Este, se centra en la formación de un poro entre el interior de la vesícula y el entorno extracelular a consecuencia de la fusión de la membrana vesicular y membrana plasmática (Jena et al., 2003; Lindau and Almers, 1995; Lindau and de Toledo, 2003). Este poro, es conocido como: el poro de fusión. Tanto la formación, como el tiempo de apertura y expansión de dicho poro, son clave en la liberación del contenido vesicular al espacio extracelular (Almers and Tse, 1990; Breckenridge and Almers, 1987; Spruce et al., 1990). Este proceso, requiere la acción de proteínas especializadas que actúan como la maquinaria de fusión exocitótica (Zimmerberg et al., 1991). Estas proteínas, son las encargadas de mediar el reconocimiento inicial entre las membranas que se van a fusionar, aproximándolas entre sí para superar las elevadas fuerzas electrostáticas de repulsión existentes entre ellas. Este, es un paso fundamental antes de que los lípidos de las capas puedan interactuar. Una vez desestabilizado el límite de las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas de la bicapa, se produce el estado de transición. Un estado, dirigido a minimizar la exposición de las superficies no polares al medio acuoso. Este estado culmina con la formación del poro de fusión previamente citado.

En algunos casos, el poro de fusión formado es estrecho y permite tan solo la liberación de pequeñas moléculas como hormonas, reteniéndose grandes moléculas como neuropéptidos en el interior del gránulo. Este tipo de fusión parcial y transitoria, donde la forma  $\Omega$  del

gránulo no se pierde, se define con el término inglés: “kiss and Run” (Ales et al., 1999; Burgoyne et al., 2001; Rizzoli and Jahn, 2007). En otros casos, la dilatación del poro es un tanto mayor, permitiendo la liberación de hormonas y parte de los neuropéptidos. Este tipo de fusión, viable también con la conservación de la forma  $\Omega$  vesicular, es conocida bajo el nombre de: captura de la cavidad granular o cavicaptura (del inglés: “Cavicapture”), ya que es considerada una fusión transitoria que permite el rellenado del gránulo y posteriores nuevas fusiones del mismo (Balseiro-Gomez et al., 2016). Por último, cabe citar la fusión completa (del inglés: “Full Fusion”) entre membrana plasmática y granular. En esta variante, el poro se expande de manera irreversible y los gránulos liberan todo su contenido perdiendo la estructura  $\Omega$  que los caracteriza (Lindau and Almers, 1995).

d) Recuperación de membrana:

Consiste en un proceso de invaginación de la membrana citoplasmática, que termina por desprenderse de la membrana para incorporarse al citoplasma. La función principal de dicho fenómeno en el ciclo vesicular, es el reciclaje local de los fragmentos membranosos que experimentan fusión con la membrana plasmática durante la exocitosis y con ello aparece el acoplamiento entre exo y endocitosis (Wu et al., 2014). No obstante, también puede ir dirigido a la incorporación directa de elementos del medio extracelular al citoplasma (Geisow, 1980).

Los primeros indicios del proceso de reciclaje de membrana, tienen lugar alrededor de 1970 mediante estudios hechos con trazadores y técnicas de microscopía electrónica (Heuser and Reese, 1973). Desde

entonces, se han descrito tres formas de endocitosis de vesículas sinápticas: la endocitosis mediada por clatrina (Jackson, 1992; Klinger et al., 1997; Robinson, 1994), la endocitosis masiva (del inglés: “Bulk Endocytosis”) (Meunier and Gutierrez, 2016) y la endocitosis que prosigue a los fenómenos de kiss and run (Alabi and Tsien, 2012). De los tres modos de endocitosis mencionados, el más relevante en lo que respecta al reciclaje de vesículas sinápticas es la endocitosis mediada por clatrina. Sin embargo, el modo exacto de endocitosis que se pone en marcha en un terminal presináptico, depende de numerosos factores como: la intensidad del estímulo que desencadena el evento excitotónico o el tipo celular en el que se estudie este mecanismo. Siguiendo con el proceso de reciclaje endocitótico mediado por clatrina, la vesícula ahora vacía de carga, puede seguir dos vías. Bien ser translocada y recargada con su correspondiente neurotransmisor (Nt), o ser fusionada con un endosoma temprano del que gemarán nuevas vesículas que serán cargadas posteriormente con sus correspondientes neurotransmisores.

## **1.5. Las mitocondrias.**

### **1.5.1. Definición.**

Las mitocondrias, son unas organelas celulares de las que se obtienen las primeras observaciones por el botánico suizo Kolliker. El, descubrió la presencia de unos gránulos en las células musculares de insectos, entre 1880-1888, a los que denominó: sarcosomas. En 1882, el alemán Walther Flemming observó una serie de inclusiones a las que denominó: fila. Dos años más tarde también fueron observadas por Richard Altmann, que en este caso las describió como una serie de corpúsculos detectados mediante una

tinción especial que incluía fucsina. Especulando pudiera tratarse de una serie de parásitos independientes de metabolismo propio, denominó a estas estructuras: bioplastos. Por aquel entonces, el hallazgo fue rechazado al ser considerado un artefacto de la preparación. Finalmente tales estructuras, a las que tan variados nombres y semblantes se les había adjudicado, son reconocidas como mitocondrias por N.H. Cowdry en 1916. Aunque el nombre de mitocondria, que es el que alcanzó mayor fortuna, se debe a Carl Benda, quien en 1889 denominó así a unos gránulos que aparecían con gran brillo en tinciones de cristal violeta y alizarina, los cuales anteriormente habían sido denominados citomicrosomas por Velette St. George.

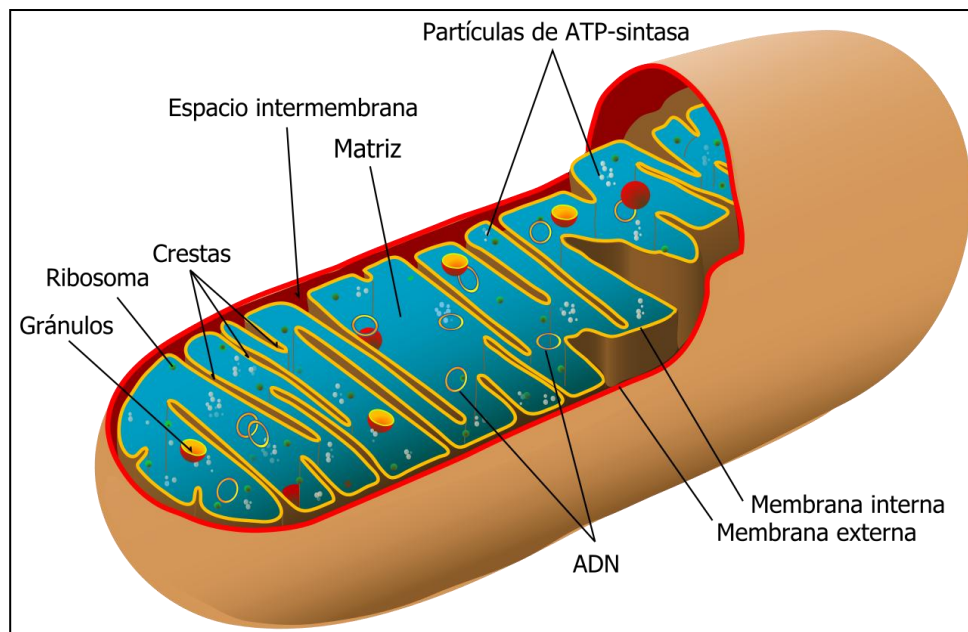
El aislamiento de las mismas, llega mucho más tarde en el tiempo. Es en el año 1934, cuando se aíslan por primera vez mitocondrias a partir de homogeneizados de hígado. Años más tarde, Hogeboom, Schneider y Palade aportan los primeros datos de funcionalidad para tales estructuras, definiendo definitivamente a la mitocondria como el lugar donde se produce la respiración celular (Hogeboom et al., 1947).

### **1.5.2. Estructura.**

La mitocondria, es una organela de morfología elongada con un tamaño oscilante entre 0,5 y 1  $\mu\text{m}$  de diámetro y hasta 7  $\mu\text{m}$  de longitud. Su configuración estructural, se sostiene en base a dos membranas: membrana externa y membrana interna, las cuales, definen su interior a modo de dos espacios diferenciados: espacio intermembranoso y matriz mitocondrial (Fig 7).



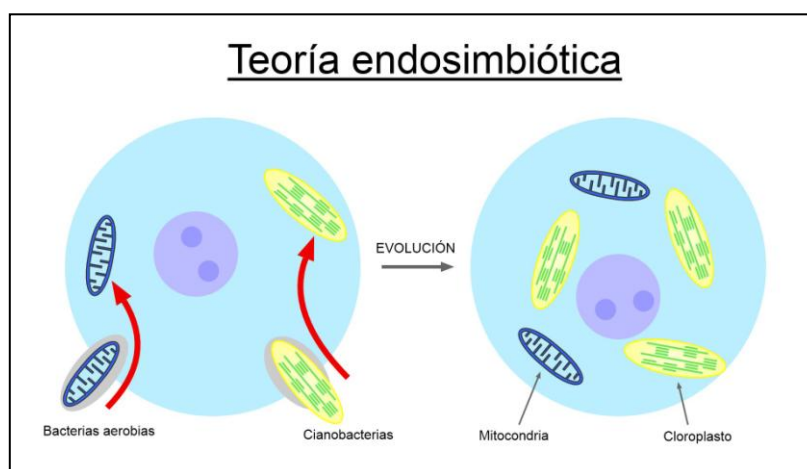
La membrana externa, responsable de delimitar la organela y actuar como superficie de contacto con el citosol celular, consiste en una bicapa lipídica altamente cargada de porinas y canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC) que permiten el paso de metabolitos intermedios. Por otro lado, la membrana interna es otra bicapa lipídica pero, esta a diferencia de la externa, carece de poros tan permisivos ya que se trata de una capa altamente selectiva. En ella, se albergan muchos complejos enzimáticos y sistemas de transporte transmembrana implicados en la translocación de moléculas específicas. Esta membrana, se presenta a modo de invaginaciones o pliegues llamados crestas mitocondriales (Fig 7), incrementando la superficie total de la misma en el interior de la organela y ofreciendo un amplio espacio membranoso para el asentamiento de múltiples enzimas y transportadores electrónicos. Su función, además de albergar complejos enzimáticos, es la de delimitar con su presencia los dos espacios mitocondriales internos: espacio intermembrana y matriz mitocondrial.



**Fig 7.** Esquema estructural de una mitocondrial.

El espacio intermembranoso, es la zona delimitada entre membranas mitocondriales externa e interna. Este, está altamente cargado de protones como resultado del bombeo de los mismos por parte de: los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria, enzimas que intervienen en la transferencia del enlace de alta energía del ATP como la adenilato quinasa y otros elementos como la carnitina implicada en el transporte de ácidos grasos desde el citosol hasta la matriz mitocondrial, donde son oxidados a través de la beta-oxidación.

La matriz mitocondrial, también conocida como matrisol, es el espacio interno delimitado por la membrana interna de dicha organela. En esta zona, podemos hallar una serie de elementos tales como: iones, metabolitos a oxidar, ribosomas tipo 55 S llamados mitorribosomas, así como ARN mitocondrial y ADN circular bicatenario de gran similitud al de las bacterias (Fig 7). Todos estos elementos citados, albergados en la matriz mitocondrial, recuerdan el contenido interno de una célula procariota de vida libre, de ahí que se planteara la teoría endosimbiótica (Fig 8).



**Fig 8.** Esquema representativo de la teoría endosimbiótica.

Además de la peculiaridad de su contenido, cabe citar su importancia funcional ya que este espacio alberga rutas metabólicas clave para la vida como el ciclo de Krebs y la beta-oxidación de los ácidos grasos (Hull et al., 1975). También tienen lugar aquí la oxidación de aminoácidos y algunas reacciones de la síntesis de la urea, así como de algunas de las porfirinas como el grupo hemo.

### **1.5.3. Función.**

Cuando se habla de la función mitocondrial, es preciso considerar un concepto amplio de funcionalidad y una alta vinculación con estados de salud y enfermedad (Duchen, 2004; Duchen and Szabadkai, 2010). Esto, se debe a: la relevancia de los procesos bioquímicos que acoge la organela en su interior, su función como maquinaria generadora de energía celular o su papel como reservorio de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Sulochana et al., 1977), así como su relevancia en la señalización de calcio que tan importante resulta para procesos como la excitación (Chikando et al., 2011; Garcia-Sancho, 2014; Hernandez-Guijo et al., 2001; Pozzan and Rizzuto, 2000).

Biológicamente hablando, la principal función de esta organela es la producción de ATP, siendo este un porcentaje muy alto del ATP total sintetizado por la célula. Consecuentemente, estas organelas son unas fuentes de energía química con relevancia notable para la célula. La producción del ATP, se lleva a cabo mediante la oxidación de metabolitos variados en procesos como: el ciclo de Krebs, la beta-oxidación de ácidos grasos y la fosforilación oxidativa. No obstante, citada dicha función, cabe resaltar además su papel asociado a la homeostasis de Calcio en la célula y su función en la secreción. Las mitocondrias, han sido descritas como unas

organelas capaces de optimizar las señales de calcio, tras estimulación, vinculadas funcionalmente con canales de calcio dependientes de voltaje y con el retículo endoplásmico (Garcia-Sancho et al., 2012; Garcia et al., 2012; Miranda-Ferreira et al., 2009; Montero et al., 2000). Esta función compartida, junto con el acoplamiento descrito entre estos tres elementos (Garcia-Sancho, 2014), a promovido el uso del término de complejo o “triada” funcional en señalización de calcio. A esto se suma, la capacidad de las mitocondrias para participar en evitar grandes elevaciones de calcio en el citoplasma celular y con ello prevenir la citotoxicidad asociada. Además, ha sido demostrada su participación en el reciclaje del  $\text{Ca}^{2+}$  en organelas como el retículo, asociándole así un papel activo en la homeostasis de calcio reticular. Una función, que sostiene la idea de una comunicación extensa entre la mitocondria y el retículo endoplásmico (Bustos et al., 2017). Por último, cabe mencionar su función como almacén de sustancias tales como: iones, agua, restos de virus y proteínas.

#### **1.5.4. Organización espacial en la célula cromafín.**

La función mitocondrial en señalización de calcio, sostiene una implicación notable de dicha organela en la secreción. En relación con esto, la configuración mitocondrial respecto a las zonas activas de secreción, resulta un estudio muy interesante. Son muchos, los trabajos destinados a dilucidar la distribución de estas organelas en modelo neuroendocrino para estudios de exocitosis. Algunos de los trabajos científicos tempranos, apuntaron al descubrimiento de dos poblaciones mitocondriales (Wong et al., 1970). Dos poblaciones, para las que poco después se demuestran diferencias morfológicas importantes (Elander et al., 1985; Shimada et al., 1984). Años

más tarde, se aportaron datos sobre su capacidad de interacción con el citoesqueleto de F-actina (Boldogh and Pon, 2006), así como de su capacidad dinámica en el citoplasma y su transporte axónico (Hollenbeck, 1996).

En las células cromafines, ha sido descrita recientemente su organización espacial a modo de tres poblaciones principales (cortical, intermedia e interna), situadas entre la línea de membrana plasmática celular y la envoltura nuclear (Villanueva et al., 2014). Todas ellas, presentan propiedades morfológicas distintas y un componente dinámico diferencial. Esto, se explica en base al vínculo entre estas organelas y el citoesqueleto de F-actina y su configuración de red densa cortical. La red citoesquelética de F-actina, infiere una población cortical de mitocondrias, inmersas en la propia red, con pequeñas dimensiones y baja movilidad, mientras que las poblaciones intermedia e interna adoptan morfologías mayores y dinámicas más notables al quedar externas a la red de fibras. Para la población mitocondrial más cortical, se ha descrito una posición correlacionada con la maquinaria secretora (SNAREs) (Villanueva et al., 2014; Vos et al., 2010). Su papel en regulación y señalización de  $Ca^{2+}$ , unido al vínculo espacial citado con las zonas de fusión, hacen de las mitocondrias un componente adicional en la maquinaria de fusión.

## **1.6. El esqueleto celular o citoesqueleto.**

### **1.6.1. Definición.**

El citoesqueleto, descubierto por el biólogo Keith Porter a principios de los años 80, fue descrito inicialmente como un “enrejado de microtrabéculas” bajo el concepto de sustancia fundamental del citoplasma celular o matriz

axoplásmica (Wolosewick and Porter, 1979). Se trataba de una estructura intracelular tridimensional de proteínas, a la que con los años se le asociaron múltiples funciones como: división (Baum et al., 1981), movilidad celular (Tang and Gerlach, 2017) y tráfico intracelular (Neco et al., 2003a), entre otras. Esta red, interacciona con otras muchas proteínas y lípidos (Albertini and Clark, 1975; Allison and Davies, 1974; Fujimoto et al., 1991; Fujimoto and Ogawa, 1987; Kirazov and Lagnado, 1977). Estas interacciones, no se limitan solo a componentes citoplásmicos, sino que además mantiene comunicación con los elementos de la matriz extracelular (Hendesi et al., 2015). De tales interacciones, surge en su conjunto una estructura compleja de respuesta potencialmente activa ante la estimulación.

#### **1.6.2. Elementos estructurales en procariotas y eucariotas.**

Cuando se hace referencia a los elementos estructurales que forman el citoesqueleto, es importante diferenciar inicialmente entre el citoesqueleto procariota y eucariota. En las células procariotas, el citoesqueleto está constituido principalmente por las proteínas estructurales: proto-tubulinas (FtsZ), crescentina (CreS) y protoactinas (MreB) (Celler et al., 2013), mientras que los elementos estructurales en células eucariotas son: microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos de actina (Svitkina, 2009; Tang and Gerlach, 2017). En base al modelo de evolución del citoesqueleto, conocido como modelo de evolución rápida o de complejidad temprana, los elementos estructurales descritos para la estructura citoesqueletal procariota, son la base ancestral de los asignados elementos citoesqueletales eucariotas, emergentes en respuesta a procesos de diversificación y especialización de las moléculas ancestrales del citoesqueleto procariota (Jones et al., 2001). De

este modo, las conocidas como proto-tubulinas (FtsZ), son la estructura ancestral que dio origen en eucariotas al elemento citoesquelético de los microtúbulos. Elementos como la Crescentina (CreS), es la más asociada con el origen de los filamentos intermedios y por último las protoactinas (MreB), son el origen de los microfilamentos de actina.

A pesar del vínculo en origen entre los elementos estructurales citoesqueléticos, entre el nivel procariota y el eucariota, el citoesqueleto eucariótico muestra un nivel de complejidad mayor. Esta mayor complejidad, está basada en un incremento en la cantidad de proteínas que conforman cada uno de los filamentos, así como en la aparición de un gran número de proteínas motoras y accesorias que se suman como elementos de esta estructura (Wickstead and Gull, 2011).

A continuación, se describen en detalle cada uno de los elementos estructurales del citoesqueleto eucariótico:

a) Microtúbulos:

Los microtúbulos, son unas estructuras tubulares de 25 nm de diámetro formados por dímeros de tubulina (alfa y beta) polimerizados (Nogales, 2015). Originados en los centros organizadores de microtúbulos, estos se extienden a lo largo del citoplasma pudiendo polimerizar y despolimerizar activamente según las necesidades propias de la célula (Bader et al., 1984).

Como propiedad a destacar, cabe decir que los microtúbulos son altamente resistentes, resultando mucho más resistentes que la actina, aunque se caracterizan por una menor flexibilidad en comparación con

esta. Pese a no compartir propiedades físicas con los microfilamentos de actina, sí comparten funcionalidad (Arnette et al., 2016; Neco et al., 2003a; Potokar et al., 2007).

Funcionalmente hablando, este elemento citoesquelético, está implicado en el transporte de vesículas (Caviston and Holzbaur, 2006; Howell and Tyhurst, 1982; Poisner and Bernstein, 1971), quedando adjudicado su papel en el tráfico vesicular principalmente en zonas internas del citoplasma. En la superficie de los gránulos cromafines, han sido descritas proteínas implicadas en la unión a microtúbulos (Aunis et al., 1987), que explican el mecanismo base en este transporte. Relacionado con su papel en el tráfico vesicular, se les asigna una funcionalidad en secreción (Allison and Davies, 1974; Poisner and Bernstein, 1971). Además, los microtúbulos forman el huso acromático, participando activamente en la división celular (Baum et al., 1981) y son los componentes de la estructura interna de los cilios (Chasey, 1969) y los flagelos (Shelanski and Taylor, 1968), aportando la capacidad contráctil a tales estructuras (Lehman and Rebhun, 1971) y haciendo posible la movilidad celular.

#### b) Filamentos intermedios:

Son filamentos de proteína fibrosa, de unos 12 nm de diámetro y de una composición proteica variable dependiente del tejido a considerar. Algunos de los tipos de filamentos intermedios identificados, en base a la proteína que los constituyen, son aquellos formados por: citoqueratina (característicos de: las células epiteliales, incluyendo mucosas y glándulas, así como las uñas, el pelo y las plumas de los animales),



vimentina (típicos de las células mesenquimales) y desmina (propios de las células musculares, tanto estriadas como lisas). Los dos tipos de filamentos intermedios relacionados con el sistema nervioso son: los filamentos gliales (presentes en: las células gliales como los astrocitos y las células de Schwann) y los neurofilamentos (típicos de las neuronas) (Moll and Franke, 1982).

Como propiedad a destacar, cabe citar que constituyen el componente del citoesqueleto más estable en términos de polimerización/despolimerización. Sin embargo, a su vez resultan ser el componente más heterogéneo, capaces de resistir las fuerzas de tracción y compresión en las células (Goldmann, 2018).

Su función, implica formar parte de la envoltura nuclear y de los sarcómeros, así como participar en algunas uniones intercelulares como los desmosomas (Moll and Franke, 1982).

#### c) Microfilamentos de actina:

Se trata de unos filamentos de pequeño diámetro, oscilante entre unos 3 y 7 nm, formados por dos cadenas de monómeros de actina dispuestas a modo de hélice en toda su longitud (Holmes et al., 1990).

Como propiedad a destacar, cabe citar su alta flexibilidad y una distribución en íntima relación con la membrana plasmática celular. En base a dicha distribución cortical, brotaron las primeras interpretaciones funcionales sobre este componente citoesquelético. Los primeros trabajos,

aportaron una interpretación funcional de “barrera”, lo que suponía un efecto de bloqueo para el tráfico vesicular (Aunis and Bader, 1988; Trifaro et al., 1985). Sin embargo, trabajos científicos posteriores ofrecieron datos sobre la dinámica (Riedl et al., 2010; Trifaro et al., 2000) y la capacidad de remodelamiento interno de esta red de fibras cortical (Giner et al., 2005). Con ello, el papel de barrera quedó ampliado con la función de regulación para el tráfico vesicular (Berberian et al., 2009; Giner et al., 2007; Gutierrez and Villanueva, 2018; Meunier and Gutierrez, 2016). Unido a la capacidad dinámica, propia de la estructura, se han descrito en los gránulos cromafines proteínas de unión a filamentos de actina, igual que se describió previamente para el caso de microtúbulos (Aunis et al., 1987; Fowler and Pollard, 1982). Esto, reforzó el papel de la red de actina en la dinámica de los gránulos. Siguiendo con la descripción de sus funciones, cabe citar también su influencia en la organización de los elementos de la maquinaria exocitótica en modelo neuroendocrino (Torregrosa-Hetland et al., 2011; Torregrosa-Hetland et al., 2010; Villanueva et al., 2010), así como la regulación que ejerce sobre el tiempo de apertura del poro de fusión (Aoki et al., 2010; Doreian et al., 2008; Neco et al., 2008). Sumado a todo lo anteriormente citado, los microfilamentos forman parte de las protuberancias citoplasmáticas como pseudópodos y microvilli (Bretscher and Weber, 1978), participando en la movilidad celular. También hay indicios claros sobre su implicación y relevancia en la polaridad celular (Lomakin et al., 2015).

## **1.7. El citoesqueleto de F-actina en célula cromafín.**

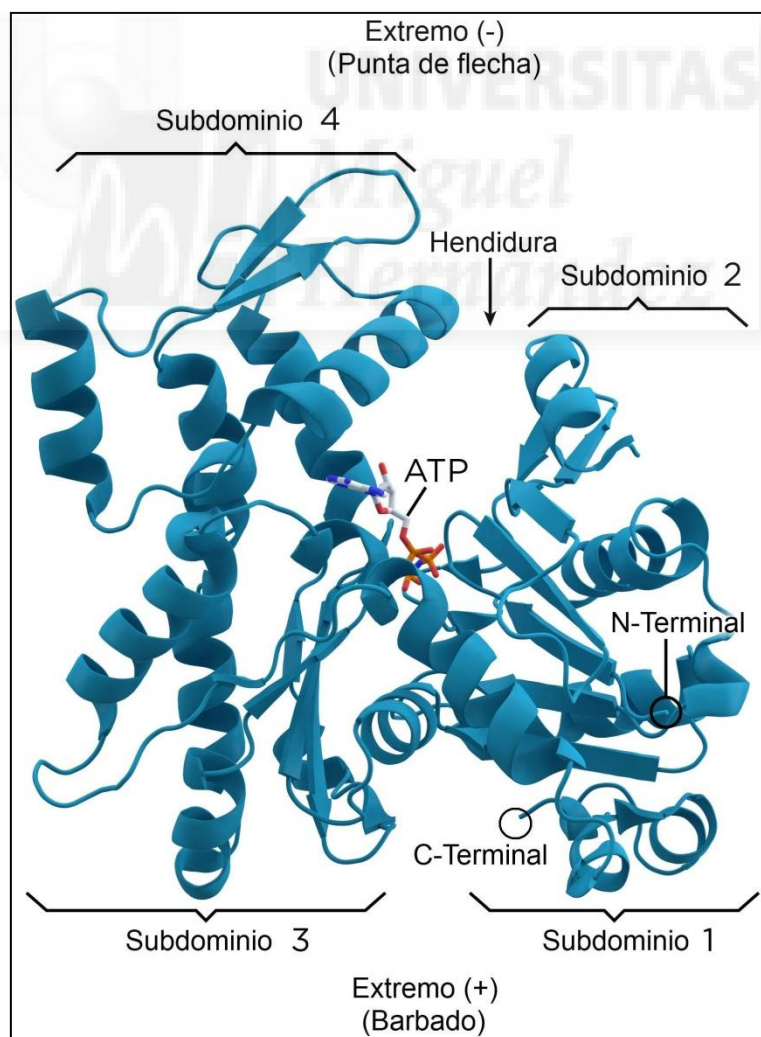
### **1.7.1. Concepto.**

Se hace referencia con el nombre de citoesqueleto de F-actina, a la parte de la red citoesquelética celular formada fundamentalmente por los microfilamentos de F-actina, también conocida como actina filamentosa, formada a partir de la polimerización de monómeros de G-actina (actina monomérica).

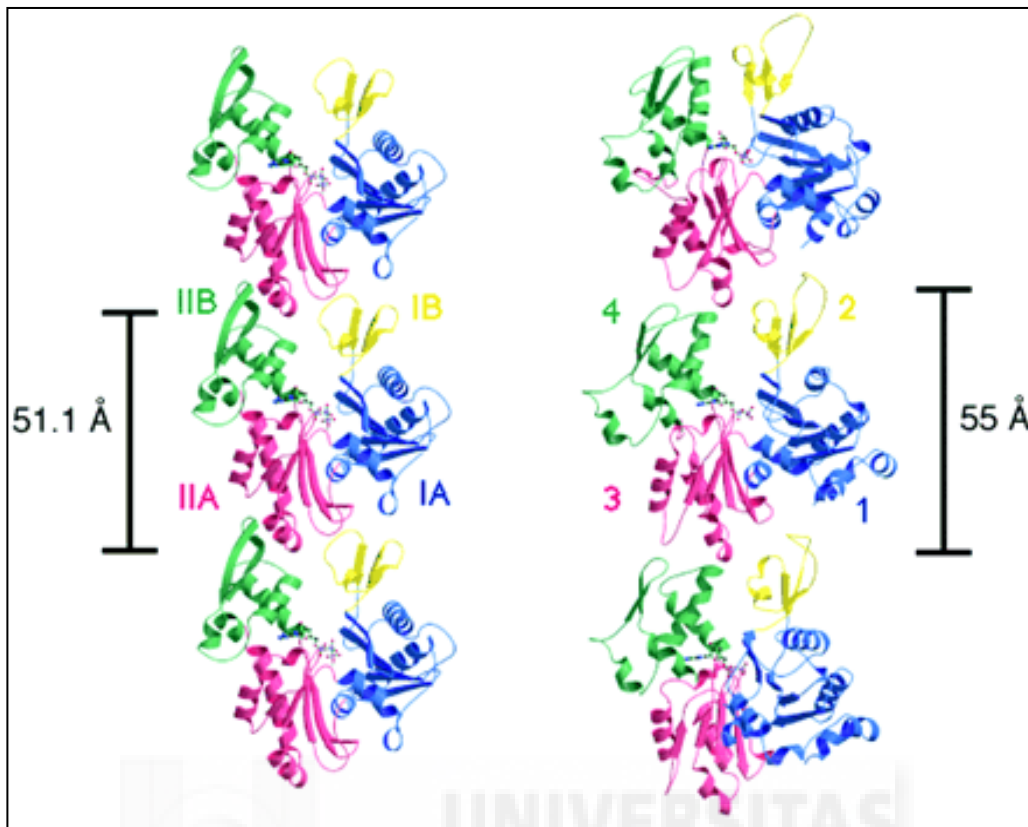
### **1.7.2. Bioquímica.**

La actina, fue observada experimentalmente por primera vez por Halliburton en 1887, aunque por entonces, este investigador desconocía su hallazgo. Él, extrajo una proteína muscular de la que demostró su capacidad para coagular preparaciones de miosina y la denominó: fermento de la miosina (Halliburton, 1887). Dado que Halliburton fue incapaz de efectuar la caracterización de sus observaciones, el descubrimiento se atribuye años más tarde a Brunó F. Straub, un joven bioquímico que trabajaba por entonces en el laboratorio de Albert Szent-Györgyi en el Instituto de Química Médica de la Universidad de Szeged ( Hungría). En 1942, Straub desarrolló una nueva técnica para la extracción de proteínas musculares que permitía aislar cantidades sustanciales de actina relativamente pura. Szent-Györgyi, había descrito previamente una forma altamente viscosa de miosina producida por extracciones lentas en músculo y puesto que la proteína de Straub producía un efecto activador de la misma, la denominó actina.

La G-actina, también conocida como actina monomérica o globular, es la unidad más básica de actina. Sus dimensiones son de alrededor de 67x40x37 Å y posee una masa molecular entorno a los 43.000 Da. Esta molécula, se compone de cuatro subdominios: I o IA, II o IB, III o IIA y IV o IIB (Fig 9). El 40% de su estructura está compuesta por  $\alpha$ -hélices, mientras que el 60% restante corresponde a conformaciones de hoja  $\beta$  (Graceffa and Dominguez, 2003). Cabe decir además, que presenta una secuencia muy conservada a partir de su precursor MreB y que las fibras polimerizadas (Fig 10), a partir de cada uno de estos monómeros, muestran orientaciones e interacciones moleculares idénticas (dos Remedios et al., 2003).



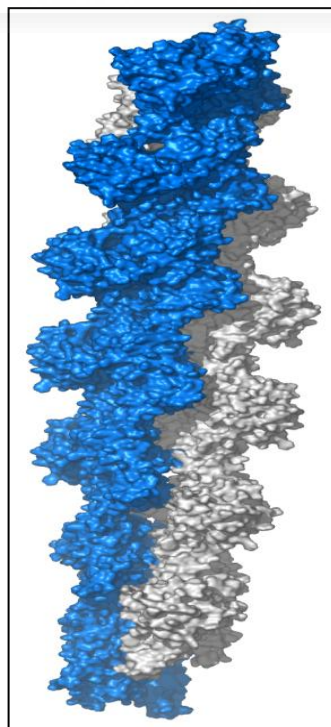
**Fig 9.** Estructura bioquímica de la proteína G-actina.



**Fig 10.** Protofilamentos de MreB (izquierda) y filamentos de F-actina formados por G-actina (derecha)  
(dos Remedios et al., 2003).

El producto helicoidal del fenómeno de polimerización de la actina monomérica, fue predicho por Fumio Oosawa y Sho Asakura (Kasai et al., 1962). De ello, hay constancia en un libro pionero de biofísica que lleva por título: “Termodinámica de la polimerización de proteínas”. Sobre esta conformación en hélice, derivan dos posibles interpretaciones: una hélice levógira monocatenaria con giro de  $166^\circ$  e incremento de  $27,5 \text{ \AA}$  o una hélice dextrógira bicatenaria con incremento de  $350\text{-}380 \text{ \AA}$  estando cada unidad de actina rodeada de otras cuatro. Pese a la riqueza aportada por la doble interpretación de la actina filamentosa, los valores de radio de giro o grosor del filamento resultan controvertidos. Dicha controversia, reside en el hecho de que la simetría del polímero de actina de unas 2,17 subunidades por vuelta

de hélice, es incompatible con la formación de cristales (posibles solo cuando éstas son exactamente: 2, 3, 4 ó 6 subunidades por vuelta). Esto, conlleva la necesidad de efectuar modelos. Estos modelos, son diseños estructurales basados en la interpretación de los datos procedentes de técnicas variadas como son: la microscopía electrónica, la criomicroscopía electrónica, o la difracción de rayos X. Dado que cada una de estas técnicas, ofrece unos valores diferentes para dichos parámetros de la hélice se han propuesto múltiples modelos. Uno de los modelos que mayor aceptación ha tenido en el campo, es el modelo propuesto por Holmes (Fig 11), presentado en su publicación en la revista Nature en 1990 (Holmes et al., 1990). En este modelo de fibras de actina polimerizadas, se puede deducir datos como: el ángulo de rotación de cada monómero ( $-166^\circ$ ) o la translación axial de los mismos ( $27,5 \text{ \AA}$ ) así como, quedan definidos los contactos entre monómeros a lo largo del diámetro del filamento, comprometiéndose de 12-14 monómeros por media vuelta o giro.



**Fig 11.** Filamento de F-actina. Modelo de Holmes (Holmes et al., 1990)

No obstante, expertos en la materia han diseñado otros modelos donde se pueden hallar diferencias respecto a lo propuesto por Holmes. Cabe destacar a Schutt y colaboradores, quienes basándose en los principios de la cristalografía y conociendo la estructura de otras estructuras biológicas similares, establecen una propuesta que implica una reorientación de los monómeros para la formación del filamento de F-actina. En esencia, la propuesta incorporaba una rotación de los monómeros de  $180^\circ$  sobre el plano del eje del filamento y de ese modo los subdominios 1 y 2 quedaban más cercanos al propio eje, mientras el 3 y 4 quedaban posicionados a radios mayores. Con este modelo, ellos proponen que los subdominios serían más capaces de sufrir movimientos significativos y esto favorecería el mecanismo de contracción del propio filamento.

Estos y otros modelos, pese a parecer dispares entre sí, por ofrecen visiones diferentes de una misma estructura, han sido validados en su conjunto por la microscopía electrónica de baja resolución. Esta tecnología, revela que los filamentos de F-actina pueden existir en múltiples conformaciones dependiendo: del tipo de catión y el nucleótido unido, la isoforma de actina y la presencia de otras proteínas de interacción con la actina (McGough et al., 1997). En base a esto, hablar de una única estructura no sería apropiado. En realidad se debería hablar de distintos estados estructurales, entre los cuales el dato más constante sería el incremento de  $27,5 \text{ \AA}$ . Sin embargo, la rotación de las subunidades mostraría una considerable variabilidad, siendo normal observar desplazamientos de hasta el 10% de su posición ideal.



Lejos de la variabilidad posible en: los ángulos de giro o la rotación de las subunidades en la fibra polimerizada, la actina filamentosa siempre muestra una polaridad definida. Los filamentos polarizados, pueden sufrir plegamientos y adquirir así estructuras secundarias y terciarias. En el desarrollo de un correcto plegamiento de los mismos, ha sido descrita la participación de una chaperona citosólica (CCT), así como la relevancia de la presencia de prefoldina (Kubota, 2002).

### 1.7.3. El proceso de polimerización.

El proceso de polimerización, es en esencia una reacción de condensación de carácter reversible en la que los monómeros se asocian y disocian a partir de los extremos positivos y negativos, respectivamente (Fig 12). La velocidad de asociación ( $K_1$ ), es proporcional a la concentración de monómeros libres, mientras que la de disociación ( $K_{-1}$ ), no es dependiente de esta. Las velocidades de crecimiento de los filamentos son desiguales, siendo mayores en el extremo positivo que en el negativo (Fig 12). Esto, genera una discrepancia de longitud entre ambos extremos de la fibra en un rango de entre 5-10 veces. Esto es, el extremo positivo es entre 5 y 10 veces más largo que el negativo.

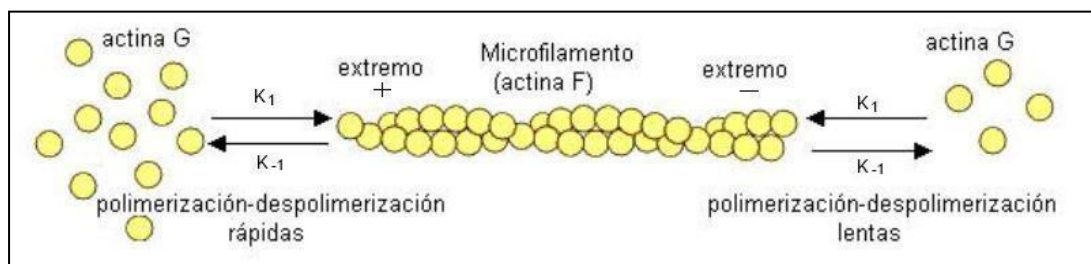


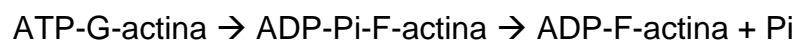
Fig 12. Esquema del proceso de polimerización de actina.



Este proceso de polimerización, se desarrolla en etapas. La primera etapa del proceso, es la activación de los monómeros de actina. En ella, juegan un papel importante tanto la molécula de ATP, de la que se ha descrito su unión en zonas específicas de cada uno de los monómeros de G-actina (Nachmias, 1976), como la unión y el intercambio de cationes divalentes. Todos estos factores en conjunto, producen un cambio conformacional de los monómeros y una activación de los mismos. Los monómeros de G-actina activados (ATP-G-Actina), se simbolizan como: Actina G o monómero de actina F debido a que son más parecidos a las unidades que se sitúan en el filamento.

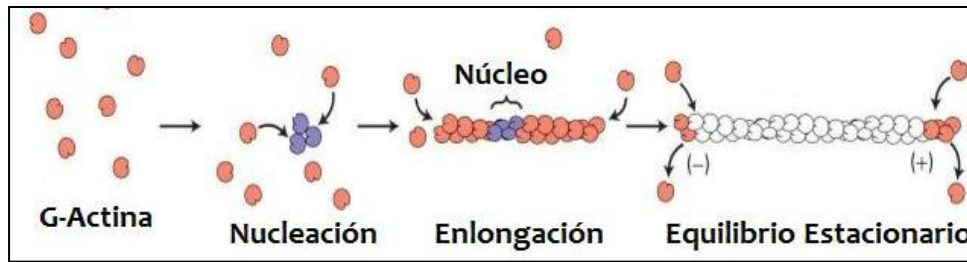
Tras la activación de los monómeros, se inicia la fase de la nucleación (Fig 14). En esta fase, los monómeros de Actina G forman inicialmente dímeros y trímeros inestables, los cuales mantienen por entonces aún las moléculas de ATP unidas. A continuación, estas moléculas de ATP sufren un proceso de hidrólisis, donde se libera Pi, quedando unidos ahora a los monómeros de la fibra de actina inestable: moléculas de ADP. Mientras que el ATP unido a los monómeros es fácilmente intercambiable por otros nucleótidos, el ADP no lo es (Hegyí et al., 1988), siendo un componente ligado al monómero de un modo mucho más estable. En células cromafines, este proceso de hidrólisis ( $ATP \rightarrow ADP + P_i$ ) ha sido adjudicado fundamentalmente a la familia de proteínas de las Rho GTPasas. Un ejemplo de una de las proteínas implicadas, incluida en esta familia, es la RhoA. Esta, está asociada a gránulos cromafines y presenta una activación mediada por GTPasa  $G_o$ , implicada en la regulación de los pasos de la maduración (priming) vesicular en exocitosis (Bader et al., 2004). No obstante, cabe añadir

que participan otras GTPasas además de las RhoA GTPasas (Gasman et al., 2004). La hidrólisis antes citada, se lleva a cabo a través de dos pasos secuenciales que dan lugar a dos formas o estados: ADP-Pi-F-actina y ADP-F-actina + Pi (Fig 13). Dado que la tasa de hidrólisis de ATP, resulta diez veces más alta que la velocidad de liberación de Pi, ADP-Pi-F-actina es la forma principal y más abundante (Carlier, 1990; Korn et al., 1987; Mockrin and Korn, 1983).



**Fig13.** Fases de la reacción de hidrólisis de ATP en los monómeros actina.

Cuando el número de monómeros unidos es lo suficientemente grande, empieza la siguiente fase: fase de elongación (Fig 14). En esta, el filamento crece rápidamente mediante la adición reversible de nuevos monómeros a ambos extremos (Pollard, 1983). Finalmente se alcanza un equilibrio estacionario, donde los monómeros de actina G se intercambian en los extremos (+ y -) del microfilamento, sin que varíe la longitud total del polímero (Fig 14). Es en ese momento, cuando se define la concentración crítica (Cc), basada en la relación entre las constantes de ensamblaje y desensamblaje (Pollard, 1983). Esta, representa la concentración de actina F en la cual, la dinámica de adición y eliminación de monómeros, no produce una modificación en la longitud del microfilamento.



**Fig 14.** Fases del proceso de polimerización del microfilamento de actina.

A diferencia de otros polímeros, como el ADN, que mantienen unidos sus elementos constitutivos mediante enlaces covalentes, en los filamentos de actina los monómeros se ensamblan por enlaces más débiles, de tipo no covalente. Esto, que en principio aporta debilidad a la estructura, ofrece la ventaja de que los extremos del filamento pueden liberar o incorporar fácilmente monómeros, de manera que se pueden remodelar rápidamente en respuesta a estímulos ambientales. El mecanismo bioquímico por el que se efectúa el remodelaje, es lo que se conoce como: “dinámica de ensamblaje” (Taylor et al., 1981), con una relevancia demostrada en procesos biológicos como: la endocitosis (Farrell et al., 2017), exocitosis (Takeshita et al., 2017) o los procesos de motilidad (Boujema-Paterski et al., 2014). En refuerzo estructural a estos enlaces débiles antes citados, el filamento de actina cuenta con los enlaces laterales con los monómeros vecinos. Tomados en conjunto, ambos enlaces confieren una cualidad combinada de flexibilidad y resistencia a la actina filamentosa (F-actina).

#### **1.7.4. El proceso de despolimerización y fragmentación.**

La despolimerización de F-actina, es un proceso que consiste en la disociación de las unidades de G-actina desde la fibra de F-actina. Estas unidades disociadas, están cargadas con su molécula de ADP.

Posteriormente a su liberación, este ADP es cambiado por una molécula de ATP en solución. Algunas de las moléculas implicadas en la despolimerización de F-actina son: cofilina, citocasilina D, gelsolina y fragmina (Grumet and Lin, 1980; Hotulainen et al., 2005; Larson et al., 2005; Waelkens et al., 1995).

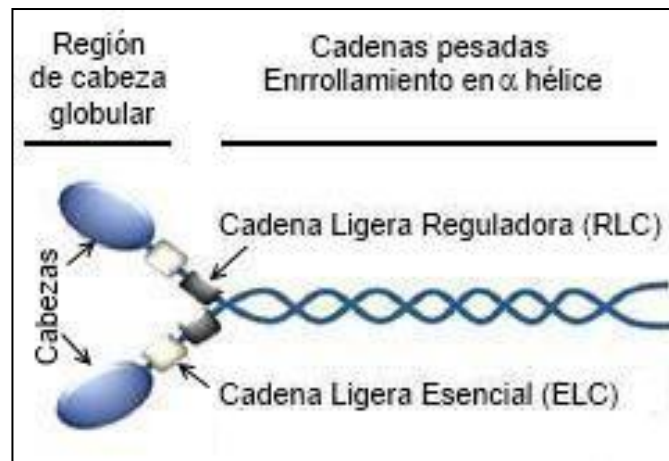
Por otro lado, la fragmentación de F-actina, es un proceso de rotura de la fibra polimerizada en otros polímeros más pequeños, no necesariamente basado en la disociación de monómeros individualmente. Inicialmente, fueron propuestas varias proteínas relacionadas con dicho proceso y entre ellas la proteína fodrina. Pero tras la consideración de fodrina como elemento citoesquelético (Langley et al., 1986; Nakano et al., 2001), ha quedado definida como un elemento de unión a F-actina de la que podría haber separación con la fragmentación de esta, pero sin un papel activo por su parte en la fragmentación en sí misma. Actualmente, se sabe que la escinderina es una de las proteínas clave ejecutando la fragmentación de F-actina y con ello alterando el grado de viscosidad de los geles de F-actina (Trifaro et al., 1992). La explicación a su funcionalidad en fragmentación de F-actina, viene dada en base a su configuración bioquímica y ha sido demostrada en células cromafines. La escinderina, está formada por dos dominios de unión a actina y otros dos dominios de unión a 2-fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), presentando una alta homología génica para cada uno de estos pares. En estado basal, PIP<sub>2</sub> y escinderina están unidos, quedando esta proteína secuestrada en las inmediaciones de la membrana plasmática (cara citosólica de la membrana) en un estado inactivo (Zhang et al., 1996). Con la llegada del estímulo y el consecuente incremento en la concentración de calcio

intracelular, se induce la unión a actina y la actividad de corte, provocando así la fragmentación de la red de F-actina cortical (Trifaro et al., 1992) y una reorganización de la proteína que sigue los patrones de fragmentación de la propia F-actina (Vitale et al., 1991). Además de en células cromafines, esta proteína ha sido descrita en otros tejidos secretores tales como: cerebro, glándula pituitaria y glándula salivar.

#### **1.7.5. Bases moleculares de la motilidad.**

La motilidad de las fibras de la red de F-actina, no es una propiedad intrínseca de las mismas, sino una característica otorgada por la influencia de los motores moleculares de esta red (Hasson and Mooseker, 1995). Los motores moleculares vinculados a la red de microfilamentos de F-actina, se encuentran incluidos en la superfamilia proteica de las miosinas. Esta superfamilia, está compuesta por 15 clases distintas de moléculas, clasificadas en: miosinas convencionales (ej.: miosina II) y miosinas no convencionales (ej.: miosina I, V, VI).

Las miosinas, son unas proteínas fibrosas formadas por: una cabeza biglobular, dos cadenas pesadas dispuestas formando un brazo helicoidal ( $\alpha$ -hélice) y cuatro cadenas ligeras (Fig 15). Las cuatro cadenas ligeras se dividen en: dos cadenas ligeras esenciales (ELC, del inglés: "Essential Light Chain") y dos cadenas ligeras reguladoras (RLC, del inglés: "Regulatory Light Chain"). Estas, se localizan de modo combinado en cada dominio globular de la cabeza de la proteína (Fig 15).



**Fig 15.** Esquema de la estructura bioquímica de las miosinas.

Dentro de esta superfamilia proteica, la miosina II ha sido relacionada directamente con la motilidad citoesqueletal. Especialmente, con la dinámica de la F-actina (Aoki et al., 2010; Giese and Spudich, 1997; Li et al., 1998; Neco et al., 2004), así como de las estructuras en las que están implicados estos microfilamentos (Gormal et al., 2015; Neco et al., 2008; Neco et al., 2004; Straight et al., 2003). Además, ha sido descrito en células secretoras, como las cromafines, su papel en el proceso de la secreción de catecolaminas (Aoki et al., 2010; Berberian et al., 2009; Reig et al., 1993).

La miosina II, está formada por dos cadenas pesadas de 200 kDa, las cuales dimerizan y se asocian covalentemente con cuatro cadenas ligeras: dos ELCs de 17 kDa y dos RLCs de 20 kDa. Estas cadenas ligeras, que están estructuralmente relacionadas con la proteína calmodulina, se unen al dominio motor de la cadena pesada (cabeza de la miosina). Este dominio motor, tiene actividad ATPásica y es el responsable de la hidrólisis de ATP. A través de esta reacción de hidrólisis, se incrementa la afinidad de la cabeza de la miosina por las fibras de F-actina, promoviendo el contacto entre ambas. Posteriormente, se genera una fuerza motriz sobre dichas fibras mediada por

el regreso de la miosina a su posición original (Buchthal et al., 1947; Li et al., 1998).

La estructura previamente descrita para la proteína Miosina II, puede presentarse en dos conformaciones diferentes que definen su estado funcional. Una, es la forma inactiva donde las cadenas ligeras RLC, de cada cadena pesada, interaccionan manteniendo a la proteína en una configuración plegada muy estable. En la forma activa, no hay presencia de dichas interacciones y la configuración es extendida. Estando en conformación activa, esta proteína tiende a combinarse con otras moléculas de miosina II. Como resultado, se forman los filamentos de miosina II, unas estructuras con una alta capacidad contráctil y generadoras de una notoria fuerza motriz (Fig 16). En estos filamentos de miosinas, los brazos helicoidales de las miosinas individuales, quedan formando la base de la estructura filamentosa y las regiones globulares de estas proteínas se encuentran dispuestas hacia el exterior (Hall et al., 1946), con un alto nivel de exposición a las moléculas y/o estructuras con las que establecen contacto, como es el caso de la actina (Fig 16).

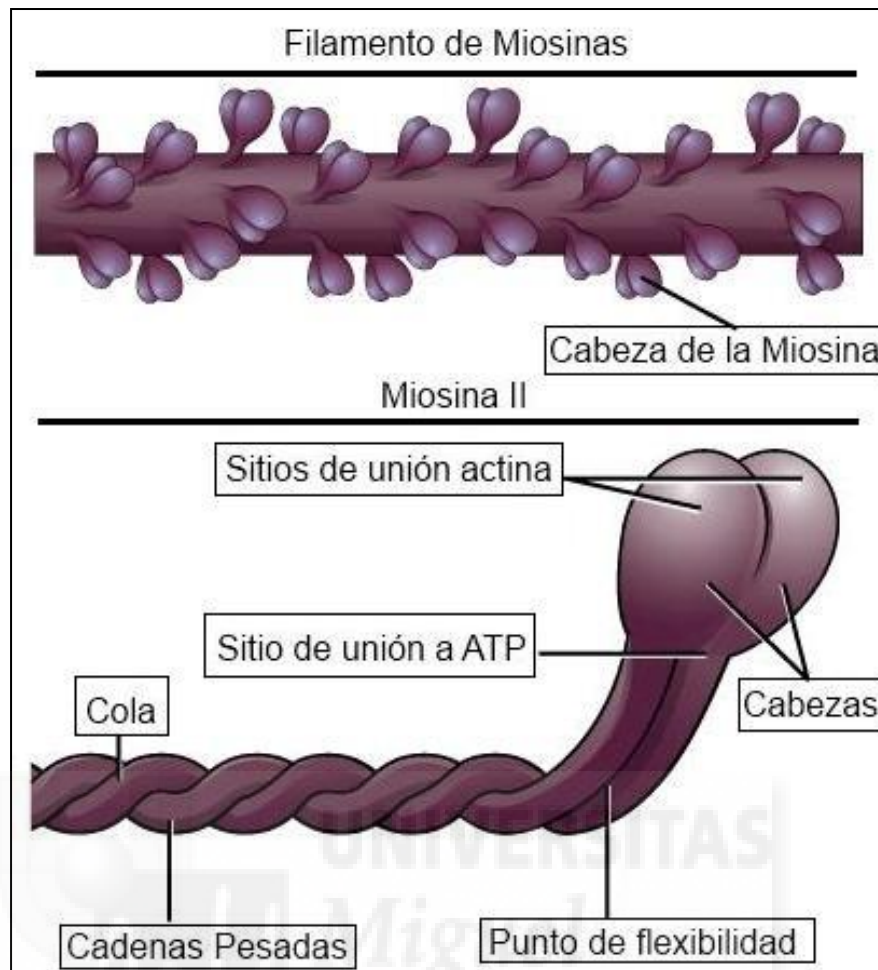


Fig 16. Esquema de los filamentos de miosinas II.

La actividad de la miosina II, puede venir mediada de un modo dependiente o independiente de Calcio. En el primero de los casos, el calcio se une a la proteína calmodulina y el complejo formado ( $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina) activa la proteína quinasa de la cadena ligera de miosina, abreviada como MLCK (del inglés: “Myosin Light Chain Kinase”). Esta quinasa, fosforila los residuos Treonina 18 y Serina 19 de la RLC, activando la actividad  $\text{Mg}^{2+}$  - ATPasa (Hong et al., 2015; Sellers et al., 1981; Trybus and Lowey, 1985) y con ello la actividad motora de la miosina II. En el segundo caso, la activación no mediada por el  $\text{Ca}^{2+}$  reside en la fosfatasa MLCP (del inglés: “Myosin Light Chain Phosphatase”) y en las proteínas Rho-quinasa. La MLCP es una



proteína heterotrimérica, presente tanto en las células de la musculatura lisa como en las células no musculares. Sus tres subunidades son: subunidad de unión a la miosina abreviada como MBS (del inglés: Myosin Binding Subunit), subunidad catalítica y subunidad reguladora. La subunidad MBS, es crítica para que la subunidad catalítica pueda funcionar y su actividad está regulada por fosforilación por varias proteínas quinasas, entre ellas: la proteína quinasa de tipo A (PKA) y la proteína ROCK (Totsukawa et al., 1999). La fosforilación de la subunidad MBS, se traduce en una disminución de la actividad fosfatasa de la MLCP y por tanto aumenta el nivel de fosforilación de la miosina II, quedando esta activada.

#### **1.7.6. Configuración.**

Son muchos, los estudios desarrollados a fin de definir la configuración estructural del citoesqueleto de F-actina, así como los cambios que esta red de microfilamentos, altamente implicada en exocitosis, puede experimentar en respuesta a estímulo.

A principios del 1980, mediante el uso combinado de técnicas de inmunofluorescencia y de microscopía, se definió la distribución espacial del citoesqueleto de F-actina en la célula cromafín a modo de una red densa y continua, predominantemente cortical (Lee and Trifaro, 1981). Estos datos, fueron coherentes con el hallazgo de una densa red de F-actina bajo la membrana plasmática en otros sistemas endocrinos, tales como las células  $\beta$  pancreáticas (Orci et al., 1972).

Acorde con esta organización espacial cortical de la red, fueron apareciendo las primeras interpretaciones funcionales vinculadas a la misma.

Inicialmente, esta red fue entendida como un sistema de retención vesicular en las proximidades de membrana plasmática. Con ello, se planteó que la red de F-actina actuaría como una auténtica barrera en secreción, capaz de impedir el libre acceso de gránulos cromafines a los sitios activos de exocitosis (Aunis and Bader, 1988; Trifaro et al., 1985). No obstante, el trabajo de los científicos Burgoyne y Cheek, presentó al citoesqueleto de F-actina como una estructura con capacidad de reorganizarse, aportando así un giro al concepto de “barrera” previamente citado (Burgoyne and Cheek, 1987b). Años más tarde, el trabajo de Becker y colaboradores, ofrece nuevos datos con una clara correlación entre reorganizaciones del citoesqueleto de F-Actina y miosina II, con el fenómeno exocitótico de gránulos corticales (Becker and Hart, 1999), rompiendo definitivamente la idea de una barrera estática.

La arquitectura ultraestructural en tres dimensiones de esta red cortical, fue elegantemente demostrada en el año 1992, usando la tecnología de congelación rápida y la microscopía electrónica (Nakata and Hirokawa, 1992). Sin embargo, este hallazgo se vió asociado a una alta controversia, ya que los productos químicos del protocolo de fijación y las bajas temperaturas usadas en la preparación de las muestras, podrían afectar a la integridad de la estructura cortical nativa. El uso de la luz transmitida, con tecnología de microscopía confocal, proporcionó un método alternativo para el estudio estructural de la red cortical, basado en el diferente índice de refracción presentado por la F-actina en sus dos estados: gel y sol. A diferencia de los experimentos de Nakata y Hirokawa, este procedimiento ofrecía no interferir sobre la propia estructura y la posibilidad añadida de su visualización en célula viva. Los primeros estudios realizados con esta tecnología, en células

cromafines vivas, aportaron la visión estructural más consolidada actualmente sobre la red citoesquelética de F-actina para este modelo neuroendocrino. El concepto estructural aportado, consistía en una red densa con una capacidad notoria de reorganización interna bajo estimulación (Giner et al., 2005). La base de la citada reorganización en la red, residía en la capacidad de cambio posicional y de orientación de sus fibras y esta a su vez, tenía su base en la propia dinámica de fibras promovida por su motor molecular, la miosina II. Como consecuencia, la red de F-actina podría adoptar una versión cerrada convertible a una configuración más abierta de la misma y viceversa (Giner et al., 2005). Se presentaba así el citoesqueleto de F-actina, como una estructura dinámica considerada un auténtico “gel activo”. Esta dinámica de fibras, podía ser promovida tanto por estimulación, capaz de incrementar los niveles de  $Ca^{2+}$  y activar la miosina II de un modo dependiente de este, o bien mediante activadores de la proteína quinasa C (PKC) como los ésteres de forbol (El-Yazbi et al., 2015; McIntosh et al., 1987). Sin embargo, al margen de la dinámica de fibras, la remodelación interna de la red podía ser explicada también con la disgregación/fragmentación de la propia actina. Un fenómeno, desencadenado por la alta concentración de calcio intracelular alcanzada en el citoplasma tras estimulación y gobernado por la acción de proteínas como: la cofilina, la gelsolina y la escinderina. Independientemente del factor base de la citada remodelación de la red cortical de F-actina (dinámica de fibras vs fragmentación de fibras), años más tarde se demostró que el proceso de remodelaje en sí, no solo ejercía una influencia en el patrón de configuración espacial de las fibras que la constituían, sino que también afectaba al esquema interno de las cavidades citoesqueléticas. Esto es, conllevaba una relevante remodelación de las cavidades internas de la red, que ligado a la

dinámica de fibras, estaban altamente implicados en regular la dinámica y el tráfico de gránulos (Giner et al., 2007).

### 1.7.7. Fodrina: una proteína citoesqueletal.

Fodrina, es una proteína perteneciente a la familia de las espectrininas. Se trata de una proteína tetramérica, formada por: dos subunidades alfa ( $\alpha$ ) y dos subunidades beta ( $\beta$ ) (Fig 17). Sus subunidades, se ensamblan inicialmente a modo de dímeros mixtos, es decir, formados cada uno de ellos por dos subunidades diferentes: una subunidad alfa (240,000 Mr) y una subunidad beta (235,000 Mr). Posteriormente, los dímeros proceden a conjugarse entre sí (Fig 17), para formar el tetrámero definitivo que da forma a la proteína completa (Perrin and Aunis, 1985).

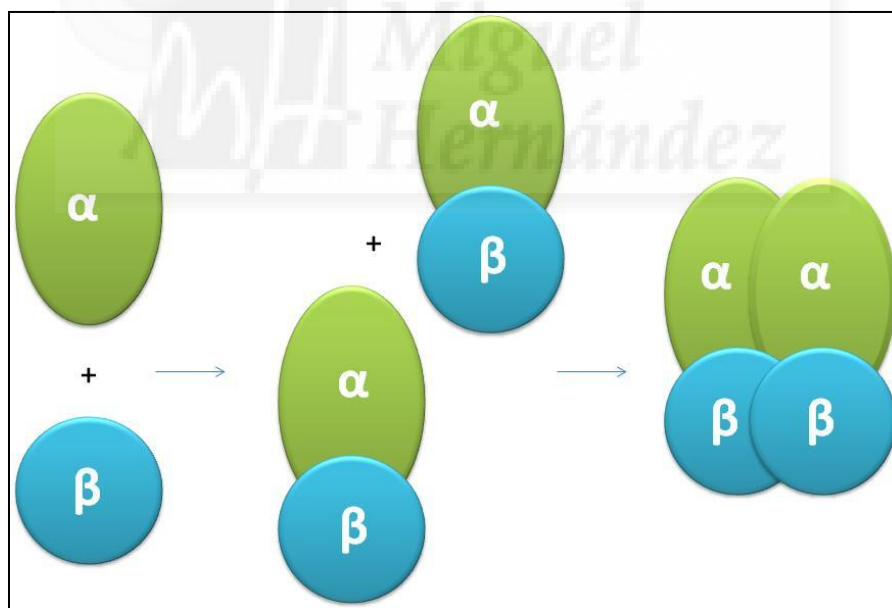


Fig 17. Esquema de ensamblaje de las subunidades de fodrina.

La funcionalidad de dicha proteína, reside en las interacciones establecidas por parte de sus subunidades. Son varios los trabajos científicos que definen a la subunidad alfa, como la parte de fodrina capaz de

interaccionar con F-actina (Perrin and Aunis, 1985) y con las syntaxinas: I, III y IV, siendo la interacción con la III de tipo dosis dependiente (Nakano et al., 2001). A través de la interacción con syntaxinas, elementos del complejo SNARE, fodrina actúa como un intermediario de conexión entre las propias fibras de F-actina y los elementos del complejo SNARE, así como la membrana plasmática donde estos se localizan. La interacción entre la subunidad alfa y syntaxina tiene además un papel regulador sobre esta última. Fodrina, a través de dicha interacción, actúa como mecanismo secuestrador de este elemento del complejo SNARE, regulando así la cantidad de syntaxina libre capaz de conjugarse con SNAP-25 y Munc-18. De este modo, modula la formación del complejo activo y con ello la secreción (Nakano et al., 2001). Un ejemplo de este mismo tipo de regulación funcional, es el hallado para SNAP-23 por parte de vimentina (Faigle et al., 2000).

La interacción entre la subunidad alfa de fodrina y F-actina, propone a fodrina como una proteína de unión directa al citoesqueleto de F-actina. Unido al descubrimiento de esta capacidad de interacción con los microfilamentos de actina, algunos descubrimientos científicos en relación a esta proteína, han permitido vincular definitivamente a fodrina con el citoesqueleto de F-actina y establecer para la misma el término de: “proteína del citoesqueleto de F-actina” (Nakano et al., 2001). Los ensayos de Levine, en 1981, ofrecieron una clara demostración de la habilidad de cosedimentación de esta proteína junto a F-actina, incluso en fracciones altamente purificadas donde muchas otras proteínas no conseguían coprecipitar (Levine and Willard, 1981). Posteriormente, varios grupos de investigación que trabajaron describiendo su localización en las células cromafines, así como sus cambios de configuración

espacial asociados a estimulación, hallaron una notoria correspondencia entre la localización espacial de esta y el citoesqueleto de F-actina. Fodrina, presentaba una distribución periférica (Langley et al., 1986), al igual que otras proteínas como las anquirinas (Fujimoto et al., 1991), íntimamente cercana a la membrana plasmática celular pero sin colocalizar con ella. Se trataba de una distribución cortical, paralela a membrana plasmática y coincidente con la posición ocupada por el citoesqueleto de F-actina (Aunis and Bader, 1988; Lee and Trifaro, 1981). Una coincidencia espacial, que se extendía incluso con la reorganización de fibras de la red por estimulación (Perrin and Aunis, 1985). En situación de estímulo, se observó que el marcaje periférico de fodrina perdía la continuidad que lo caracteriza en estado basal, quedando en una configuración a modo de parches (Perrin and Aunis, 1985). Bajo la consideración de fodrina como proteína del citoesqueleto de F-actina, esta fue incorporada como componente estructural de elementos con una alta relevancia en secreción en los que forma parte la F-actina, por ejemplo: el poro de fusión (Jena et al., 2003).

En lo que respecta a la subunidad beta de la proteína fodrina, esta ha sido asociada con interacción directa con membranas celulares. En el concepto de membranas celulares, el trabajo presentado en 1986 por Langley y colaboradores (Langley et al., 1986), incluía a: la membrana plasmática, la membrana mitocondrial y la membrana vesicular. Descrita la interacción de la subunidad alfa con la F-actina, este vínculo a las membranas de las organelas citadas por parte de su subunidad beta, ofrecía una conexión de F-actina con las mismas mediada por fodrina.

En cuanto a la interacción de las vesículas cromafines con los filamentos de actina, se ha descrito también la participación de una proteína de anclaje llamada actinina (Maruyama and Ebashi, 1965), presente en la membrana de los gránulos cromafines (Jockusch et al., 1977). De este modo, fodrina, unida por su subunidad alfa al citoesqueleto de actina, podría unirse por su subunidad beta a los gránulos y estos, mediante la actinina de su membrana, establecerían interacción con las fibras de F-actina. La interacción mediada por actinina entre gránulos cromafines y F-actina, ha sido descrita fundamentalmente a través de la subunidad alfa de esta proteína (Drabikowski and Nowak, 1968). Sin embargo, en neuronas la interacción vesícula-citoesqueleto o vesícula-vesícula se realiza a través de pequeñas hebras proteicas de unos 30 nm de longitud llamadas: sinapsinas. Las sinapsinas, son unas fosfoproteínas ancladas en la membrana de la vesícula sináptica (Huttner et al., 1983), que rompen sus anclajes de forma dependiente de calcio por procesos de fosforilación proteica.

#### **1.7.8. Citoesqueleto de F-actina y tráfico vesicular.**

La visión clásica de la movilidad vesicular en las células cromafines, relaciona este fenómeno con la estructura citoesqueletal. Las fases más tempranas del transporte de los gránulos cromafines, desde la zona citoplásmica interna, han sido asociadas tanto a los microtúbulos como a los microfilamentos de F-actina (Caviston and Holzbaur, 2006; DePina and Langford, 1999). No obstante, las últimas fases del movimiento vesicular, en la zona cortical cerca de la membrana plasmática, han sido vinculadas fundamentalmente a los microfilamentos de F-actina (Gutierrez and Villanueva, 2018; Neco et al., 2003a; Villanueva et al., 2012a; Villanueva et

al., 2012b). El uso de fármacos bloqueantes, específicos para cada uno de los dos elementos citoesqueletales citados, confirmaba esta hipótesis. El tratamiento con los bloqueantes de microtúbulos, se veía traducido tan solo en una afectación de la movilidad de los gránulos en la zona interna (Neco et al., 2003a). Sin embargo, el bloqueo combinado de microtúbulos y F-actina, mostraba una movilidad vesicular afectada en las zonas internas (Neco et al., 2003a) y también en la región periférica (Allersma et al., 2006; Giner et al., 2007; Lang et al., 2000; Oheim and Stuhmer, 2000).

Estudios llevados a cabo en la célula cromafín, con microscopía confocal mediante el uso de la luz transmitida, permitieron dilucidar el modo en que la red cortical de F-actina dirigía el tráfico vesicular cortical (Giner et al., 2005). El mecanismo, residía en la capacidad de los microfilamentos de F-actina para cambiar la configuración de su estructura. Este cambio configuracional implicaba: reorganización de fibras, desfragmentación de parte de la red, así como cambios morfológicos a nivel de las cavidades internas. En estado basal, la configuración de la red cortical de F-actina era cerrada y se caracterizaba por la presencia de múltiples cavidades pequeñas, sin conexión interna. Esta configuración, ofrecía espacios muy reducidos y con ello una dinámica muy limitada para los gránulos, impidiendo su avance hacia la membrana plasmática. Con la llegada del estímulo, las fibras se reorganizaban y las cavidades se ensanchaban, apareciendo además una intercomunicación entre ellas que definía auténticas vías de paso para las vesículas.(Giner et al., 2007; Giner et al., 2005). El conjunto de cavidades existentes en el citoesqueleto de F-actina, se podía dividir en dos grandes grupos: los compartimentos con vesículas listas para exocitar y los



compartimentos con vesículas de reserva. Con la llegada del estímulo y la aparición de la intercomunicación antes citada entre cavidades, ambos tipos de compartimentos quedaban conectados produciéndose el tráfico de vesículas entre ellos. Este proceso, estaba sujeto a una regulación muy fina donde los microfilamentos de F-actina jugaban un papel importante (Vitale et al., 1995).

A pesar de la demostrada implicación de los microtúbulos y los microfilamentos de F-actina en el tráfico vesicular, el consenso procedente de múltiples estudios hechos en: neuronas, células endocrinas y células neuroendocrinas, establecía para el tráfico granular no solo la intervención de ambos elementos citoesqueletales, sino de sus motores moleculares: quinesinas en microtúbulos y miosinas para microfilamentos. El conjunto formado por: los elementos citoesqueletales y sus motores moleculares, se llamó: transportoma (DePina and Langford, 1999) y fue dotado de una notable relevancia en el tráfico de vesículas. Centrando la atención en los motores moleculares vinculados a F-actina, considerados en el transportoma, cabe decir que se hace referencia tanto a la miosina II, como a la miosina V (Eichler et al., 2006; Rose et al., 2003; Rudolf et al., 2011). La miosina II, estaría implicada en la dinámica de fibras, mientras que la miosina V, sería la encargada de usar a estas últimas como carriles de paso vesicular hacia la membrana plasmática. Las miosinas V, son un tipo de miosinas presentes en las vesículas de las células cromafines y de las células PC12, así como en el citoplasma celular de ambas. Las pequeñas GTPasas Rab27 y las proteínas MyRIP, han sido descritas como las mediadoras de la interacción entre: miosina V, vesículas y filamentos de actina (Desnos et al., 2003). Además, ha

sido descubierto que la interacción de miosina V con vesículas, no se aplica solamente a una simple función de transporte, sino que participa en el proceso de biogénesis y maduración vesicular (Kogel et al., 2010), así como en el posicionamiento estratégico de las mismas cerca de las zonas activas de secreción en la membrana plasmática (Rudolf et al., 2011; Tomatis et al., 2013), resultando así altamente funcionales para la fusión.



## 2. OBJETIVOS

---

La presente tesis doctoral, pretende contribuir a ampliar el conocimiento sobre la arquitectura y dinámica del citoesqueleto de F-actina, así como desvelar su relevancia en el proceso de secreción. Para este propósito, nos hemos planteado los siguientes objetivos generales:

### **2.1. Estudiar la distribución del citoesqueleto de F-actina y la influencia ejercida por la organización de las fibras sobre la configuración citoplásmica de las vesículas y las mitocondrias en la célula cromafín bovina.**

Los objetivos particulares de este apartado son los siguientes:

- Describir y comparar la distribución de las fibras de F-actina, en las células cromafínes aisladas mantenidas en cultivo celular y en las células cromafínes nativas inmersas en el tejido adrenomedular.
- Analizar la distribución de proteínas citoesqueletales, como soporte a los resultados de arquitectura de la red citoesqueletal de F-actina en las células cromafínes aisladas y nativas.
- Estudiar la organización de vesículas y mitocondrias en el citoplasma celular, así como su relación con la configuración de las fibras de F-actina en las células cromafínes aisladas y nativas.

- Modelizar la respuesta secretora, en base a la distribución de las organelas, a fin de analizar el posible efecto de su organización citoplásmica sobre la cinética de secreción en las células cromafínes aisladas y nativas.
- Cuantificar la secreción mediante amperometría y comparar los resultados electrofisiológicos con la respuesta secretora predicha por el modelo matemático en las células cromafínes aisladas y nativas.

## **2.2. Describir la dinámica local de la red cortical de F-actina y el transporte vinculado de las vesículas y las mitocondrias en respuesta a estimulación en las células cromafínes bovinas aisladas en cultivo.**

Los objetivos particulares de este apartado son los siguientes:

- Analizar los tipos de eventos dinámicos locales desarrollados por el citoesqueleto cortical de F-actina bajo estímulo.
- Identificar el/los motores moleculares de la dinámica local de F-actina desarrollada por estimulación.
- Estudiar los cambios estructurales de las cavidades internas de la red cortical de F-actina asociados a los eventos dinámicos locales desarrollados en respuesta a estimulación.
- Describir el transporte de organelas dependiente de F-actina ligado a la dinámica local de la red cortical bajo estímulo.
- Analizar los fenómenos dinámicos no corticales de F-actina y su influencia en el tráfico intracelular de gránulos cromafínes en células estimuladas.

## 2. OBJECTIVES

---

This PhD thesis aims to contribute to broaden the knowledge about architecture and dynamics of the F-actin cytoskeleton trying to reveal their relevance on the secretion process. For this purpose, we have established the following general objectives:

### **2.1. Studying the F-actin cytoskeleton distribution and their influence on the vesicles and mitochondria cytoplasmic configuration in bovine chromaffin cells.**

Particular objectives for this section are the following them:

- Describing the F-actin distribution in isolated chromaffin cells from cell culture and native chromaffin cells from adrenal medulla tissue in order to compare them.
- Analyzing the cytoskeletal proteins distribution in order to consolidate F-actin network architecture data in both isolated and native chromaffin cells.
- Studying the vesicular and mitochondrial organization looking for the relationship between the organelles distribution and F-actin fibers configuration in isolated and native chromaffin cells.
- Modeling secretory response based on organelles distribution data in order to detect the possible effect of the organelles organization in the secretion kinetics in isolated and native chromaffin cells.

- Quantifying secretion by amperometry to compare electrophysiological results with the secretory response predicted by the math model in isolated and native chromaffin cells.

## **2.2. Describing F-actin cortical network local dynamics and the linked transport for vesicles and mitochondria by stimulation in cultured isolated bovine chromaffin cells.**

Particular objectives for this section are the following them:

- Analyzing different kinds of local dynamic events developed by F-actin cortical cytoskeleton under stimulus.
- Identifying molecular motors for F-actin local dynamics by stimulation
- Studying structural variations for internal cavities from F-actin cortical network linked to local dynamic events developed under stimulation.
- Describing F-actin dependent organelles transport linked to F-actin cortical network local dynamics by stimulation.
- Analyzing F-actin non-cortical dynamic events and their influence in chromaffin granules trafficking in stimulated cells.

# 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

## 3.0. Resumen de los materiales y métodos utilizados.

La línea de investigación, ha sido desarrollada haciendo uso de un modelo neuroendocrino altamente aceptado para estudios de secreción: las “cromafines”. El trabajo realizado e incluido en la presente memoria de tesis doctoral, con las células cromafines, abarca tanto células aisladas como nativas. Para la obtención de cada una de estas, se han hecho uso de los protocolos estandarizados de aislamiento, siendo para el primero de los casos un protocolo de aislamiento celular a partir de la médula de la glándula adrenal, para dar lugar a cultivos celulares de células aisladas. Mientras, que en el segundo caso (nativas), se ha aplicado un protocolo de obtención de rodajas tisulares de la médula adrenal, a fin de trabajar directamente con cada una de estas unidades de tejido contenedoras de las células cromafines nativas.

Los estudios desarrollados en las cromafines (aisladas y nativas), en búsqueda de un mayor conocimiento en términos de configuración y dinámica, han requerido en ambos casos de un marcaje fluorescente de las proteínas de interés. Para obtener los marcajes fluorescentes pertinentes, se han combinado herramientas de: transfección para un marcaje basado en la sobreexpresión de proteínas fluorescentes, inmunocito/histoquímica para un marcaje basado en la especificidad de anticuerpos sobre los elementos de interés y por último marcadores fluorescentes en solución altamente utilizados para citoesqueleto de F-actina (faloidina), o mitocondrias (Mitotracker).

Aparte de las técnicas de marcaje y con un especial interés para los estudios de la dinámica del citoesqueleto de F-actina, se ha requerido de un proceso de estimulación celular basado en la despolarización de la membrana plasmática con una solución de KCl (59 mM), aplicada mediante un sistema de perfusión con el que poder controlar tiempo de inicio y fin del estímulo sobre las muestras y con ello la duración del proceso de estimulación. Además, se ha hecho uso de unas herramientas farmacológicas, de aplicación previa a estimulación, con las que se ha logrado bloquear estructuras biológicas específicas a fin de valorar su papel en los procesos dinámicos en respuesta a estímulo y con ello definir motores moleculares a la base de la dinámica de las fibras de F-actina.

Las técnicas de bioimagen utilizadas, a fin de estudiar cada una de las muestras, han sido en esencia: la Microscopía Confocal (MC) y la Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). Dos técnicas, que han estado acompañadas de un análisis biofísico de la secreción por amperometría y una modelización matemática del sistema secretor. Las imágenes, secuencias temporales y datos amperométricos así como los matemáticos (modelos) obtenidos, han requerido de un análisis posterior para el que se ha hecho uso de programas como: Image J, GraphPad o Igor, entre otros.



### 3.1. Aislamiento y cultivo de células cromafines bovinas.

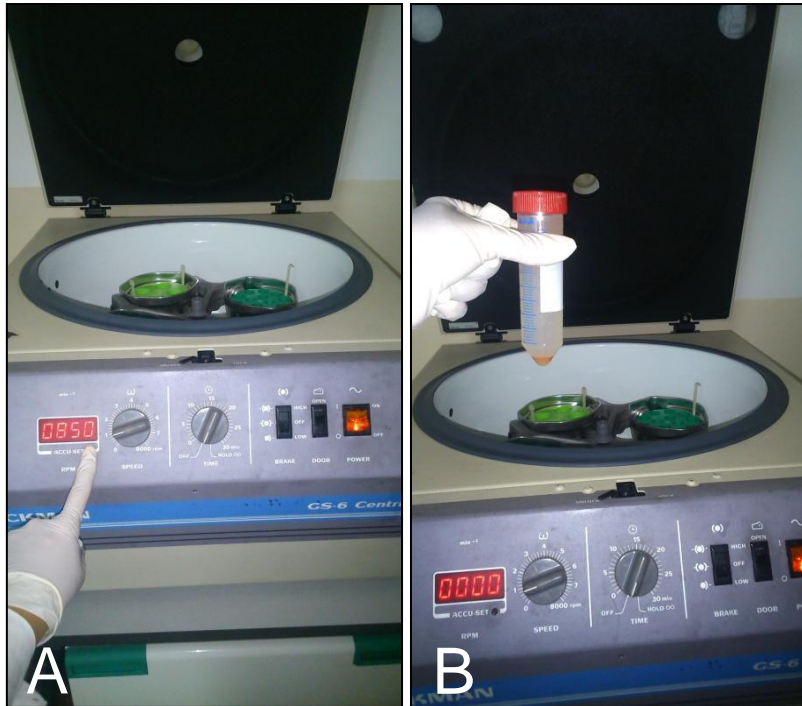
El cultivo celular, se prepara a partir de la médula de glándulas adrenales bovinas. Las glándulas, son obtenidas de terneras recién sacrificadas del matadero de Orihuela (Polígono industrial Puente Alto, Parcela 52B, 03300 Orihuela, Alicante). Para su transporte, se usa un recipiente previamente esterilizado con Locke 1X frío, sin  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , estéril y tamponado a pH 7,4 (154 mM de NaCl, 5.58 mM de KCl, 3.6 mM de  $\text{NaHCO}_3$ , 5.6 mM de glucosa, 5 mM de 4-(2-hidroxietil) 1-piperazinaetanosulfónico (HEPES) (Sigma, Madrid, cat#: H-3375)).

El procedimiento de aislamiento de las células cromafines bovinas, se realiza en una campana de flujo laminar (Telstar, BV-30/70, Barcelona, España). Inicialmente, se seleccionan entre dos y cuatro de las mejores glándulas, evitando aquellas con aspecto externo necrosado o con roturas superficiales visibles. A continuación, se extirpa el tejido adiposo de la superficie más externa de las glándulas seleccionadas, elemento relevante en la conservación de las mismas durante su transporte desde matadero hasta el laboratorio, haciendo uso de unas pinzas y tijeras curvas esterilizadas en etanol al 70% (v/v). Seguidamente, las glándulas son depositadas en un vaso estéril con medio Locke 1X a temperatura ambiente (TA).

Posteriormente, se digiere la médula con colagenasa tipo A (Roche Diagnostic GmbH, Alemania, ref: 11088793001) al 0,25% en tampón Locke 1X con 0,5 % de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma, Madrid, cat# A-4503). Esta solución, se inyecta en volúmenes de 5 ml por glándula durante 15 min y es repetida 3 veces para poder llevar a cabo una digestión idónea. Estos volúmenes, son filtrados usando filtros estériles de 0,22  $\mu\text{m}$  (VWR Internacional,

USA, cat#: 28145-477), de aplicación directa a la boca de la jeringa usada para la inyección de los mismos en la glándula. Las incubaciones con colagenasa, se llevan a cabo a 37 °C. Para mantener la temperatura, durante los tiempos de incubación indicados, las glándulas se colocan en el interior de vasos estériles (250 ml) sumergidos al baño María, mediante unos trípodes, en un pequeño incubador (Precistern, P-Selecta) localizado dentro de la cabina de flujo.

Finalizada la digestión, se realiza la disección de la glándula en 2 fragmentos, según el plano sagital, para tener acceso a la médula adrenal. A continuación, se separa la médula de la corteza adrenal con la ayuda de un bisturí y se retiran los posibles restos de corteza, mezclados con la médula extraída, con la ayuda de unas pinzas. Posteriormente, se disgrega la médula con ayuda de unas tijeras. Por último, se realiza una dispersión mecánica con la ayuda de una pipeta estéril de 10 ml, para obtener un batido celular relativamente homogéneo. El batido celular, es filtrado a través de un tamiz inicial de 217  $\mu\text{m}$  y seguidamente por otro de 82  $\mu\text{m}$ , con la ayuda de la disolución de Locke 1X (100 ml/glándula). El volumen total de filtrado obtenido, es repartido en tubos Corning de 50 ml (Corning Incorporated, NY, USA) para someterse a una centrifugación de 10 min a 850 rpm (100xg) (Beckman GS-6 Centrifuge, USA). El objetivo de esta centrifugación, es limpiar la disolución de colagenasa en las muestras (Fig 18).



**Fig 18.** A, Centrifuga Beckman GS-6. B, Muestra tras la centrifugación: 10min a 850 rpm.

A continuación, se aíslan las células cromafines del resto de tipos celulares con la ayuda de una centrifugación en un gradiente continuo de Percol (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suecia, cat#: 17-0891-01). Para hacer este gradiente, se preparan: 19 ml de Percol y 2 ml de Locke 10X (pH a 5,3) y esta solución se mezcla con el batido celular. Para esta centrifugación, se utilizan tubos Nalgen (Sigma Aldrich, Cat#: T1918-10EA) y una ultracentrífuga (Beckman Coulter, Avanti Centrifuge J-25-I), haciendo uso del rotor JA 25-50 (Beckman Coulter, Cat#: 363055), previamente calentada a 37°C. La centrifugación, es llevada a cabo a 13.200 rpm (20.000xg) durante 22 min a una temperatura mantenida de 37°C. Tras la centrifugación, aparecen tres bandas: una superior compuesta mayoritariamente de restos celulares y grasa (detritus) que es desechada con una pipeta, una intermedia donde se encuentran las células cromafines que dará lugar al cultivo final y una inferior compuesta mayoritariamente de eritrocitos, que al igual que la superior, no se utiliza en

pasos posteriores. Se procede a recuperar el volumen correspondiente a la banda intermedia y este se reparte en cuatro tubos cónicos de 50 ml, que posteriormente se completan con Locke 1X. Los cuatro tubos, son centrifugados a 850 r.p.m. (100xg) (Beckman GS-6 Centrifuge, USA) durante 10 min, a fin de lavar la muestra de los restos de Percol. Al terminar, se retira el sobrenadante y se añade de nuevo Locke 1X para repetir la centrifugación anterior como un segundo lavado. Terminado el segundo lavado, se eliminan los sobrenadantes de todos los tubos y se resuspenden los pellets en un único tubo, a fin de unificar muestra. Al tubo con la muestra de pellets unificados, se adiciona Locke 1X hasta completar los 50 ml de su capacidad y se centrifuga de nuevo a 850 r.p.m. (100xg) (Beckman GS-6 Centrifuge, USA) durante 10 min. Posteriormente, se elimina el sobrenadante y se resuspende el precipitado celular en 10 ml de medio de cultivo DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium-Hig, Sigma, Madrid, Cat#: D-5796) suplementado con: un 10 % de suero fetal bovino (FBS) (Sigma, Madrid, cat#:F-7524), 10  $\mu$ M de Citosina  $\beta$ -D-Arabinósido (Sigma, Madrid, Cat#: C-1768) y de 5-fluoro-2'-deoxiuridina (Sigma, Madrid, Cat#: F-0503) (inhibidores del crecimiento de fibroblastos), así como con penicilina 50 UI/ml y estreptomycinina 25  $\mu$ g/ml (Sigma, Madrid, cat#:P-4333). Esta solución DMEM, es conocida como: DMEM completo.

Por último, se realiza el recuento y el estudio de la viabilidad celular por el método de exclusión con azul de tripano, también conocido como: azul tripán (Merck 127, Alemania, Cat#: 2753535). Para este paso, se toma una pequeña muestra celular y se analiza usando una cámara de Neubauer y un microscopio de contraste de fases Zeiss ID03 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) dotado de un objetivo 10x (N.A = 0.22). En base al recuento, se procede a tomar el

volumen correspondiente para sembrar cada placa a la densidad óptima de trabajo. La densidad de siembra habitual, es de:  $0,75 \times 10^6$  células/placa. Aunque para algunos de los experimentos que incluye esta tesis, donde se pretende evaluar el efecto de la densidad en placa, esta es modificada a valores superiores:  $1 \times 10^6$ ;  $5 \times 10^6$ ;  $10 \times 10^6$ . Los cristales sobre los que son sembradas las células (Deckgläser Cover Glasses), son cristales circulares de 24 mm de diámetro, esterilizados previamente a su uso, por inmersión en alcohol al 70% y flameado, así como tratados con poli-L-lisina (Sigma, Madrid, cat#: P5899) mediante incubación de los mismos (15 min) para mejorar la adhesión celular. Los cultivos celulares, son mantenidos en placas costar de cultivo (Corning Incorporated) de 35 mm de diámetro y conservados en un incubador Heraeus (Hera Cell 150, HeraTec Madrid, España) a 37 °C de temperatura en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %.

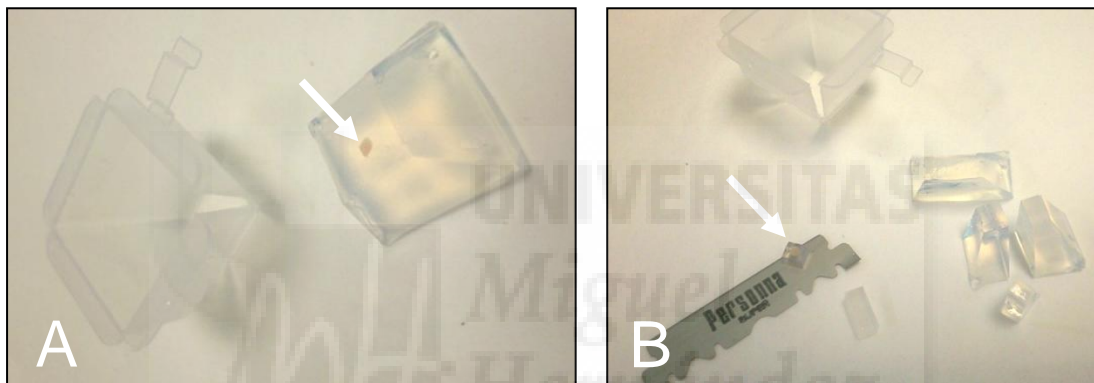
### **3.2. Obtención de rodajas tisulares adrenomedulares bovinas .**

El protocolo aplicado para la obtención de muestras tisulares, se basa en un método modificado del descrito para preparar rodajas de páncreas (Speier and Rupnik, 2003). Las rodajas de médula adrenal, se obtienen a partir de glándulas adrenales bovinas obtenidas del matadero de Orihuela (Polígono industrial Puente Alto, Parcela 52B, 03300 Orihuela, Alicante).

Inicialmente, se extrae el tejido adiposo más superficial de las glándulas seleccionadas, tal y como se describe en el apartado de cultivo celular de las células cromafínes (Materiales y Métodos 3.1). Posteriormente, se secciona la glándula con el bisturí para separar la médula de la corteza. Obtenida aisladamente la médula, se corta en pequeñas porciones que son posteriormente embebidas en agarosa de bajo punto de fusión al 4 % de

concentración (Tipo VII-A, Sigma, Madrid, cat#: A0701). La agarosa, se vierte previamente en unos recipientes desmoldables y en el seno de la misma se deposita la mini porción de médula adrenal (una por molde). Esta agarosa, actuará como soporte físico posterior para los cortes al vibratomo.

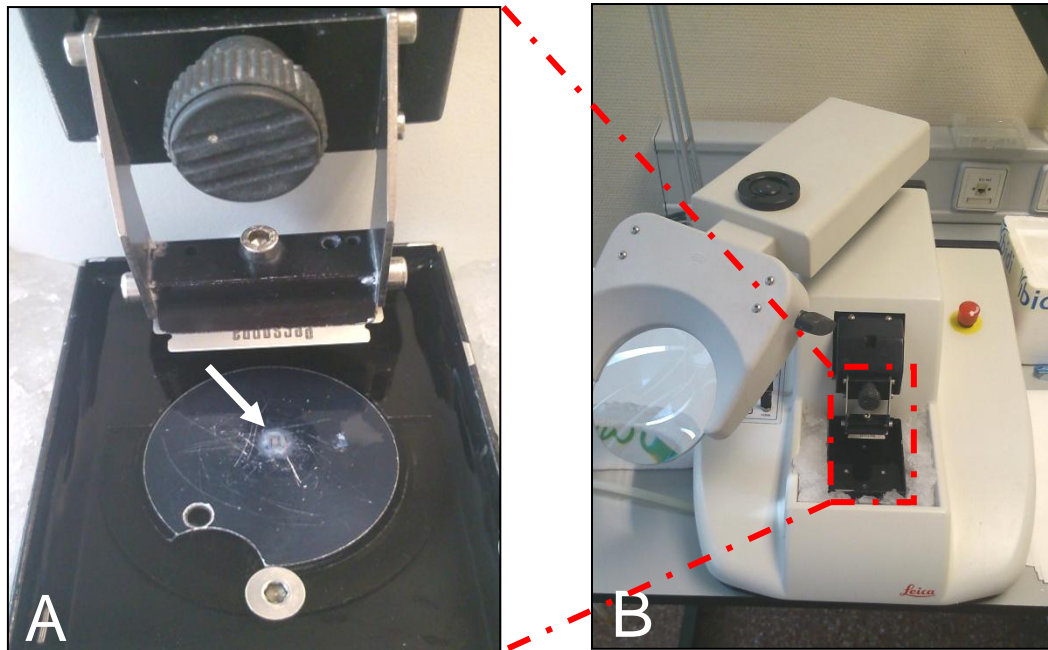
Una vez la agarosa a solidificado, es extraída del molde y con ella la muestra tisular embebida (Fig 19, A). A continuación, el bloque se disecciona hasta obtener uno de pequeñas dimensiones, que se someterá a corte ultra fino en vibratomo (Fig 19, B).



**Fig 19.** A, Bloque solidificado de agarosa con muestra medular.

B, Sección del bloque de agarosa y médula.

Los mini bloques de agarosa con el tejido, se colocan en la platina del vibratomo (Fig 20, A) y posteriormente se procede a su corte en rodajas finas de 180  $\mu\text{m}$  a una frecuencia de 6 Hz con el vibratomo (Leica VT 1000S) (Fig 20, B).



**Fig 20.** A, Sección de bloque de agarosa y médula sobre platina del vibratomo.

B, Vibratomo Leica VT 1000S.

Tras el corte del bloque, las rodajas obtenidas son recogidas inicialmente por el recipiente que alberga la platina con la muestra en el Vibratomo. Este recipiente, contiene una solución de Krebs/Hepes basal libre de  $\text{Ca}^{2+}$  (2.38 M de NaCl, 60 mM de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 940 mM de KCl, 60 Mm de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 11 mM de D-Glucosa y 15mM de Hepes). La base y los laterales de dicho recipiente, deben estar en todo momento envueltos en hielo picado, manteniendo así tanto al recipiente como a la solución y las rodajas recién cortadas, a baja temperatura. El objetivo del uso de esta baja temperatura es dual, mejorar la textura del tejido para el corte y minimizar el daño por anoxia. Tras la obtención de las rodajas, estas son extraídas del citado recipiente y transferidas a una placa costar (Corning Incorporated), a la que previamente se le ha añadido la misma solución que contiene el recipiente (Fig 21). Esta placa, es mantenida sobre hielo mientras se obtienen el conjunto de rodajas para el experimento (sin exceder los 30 min).



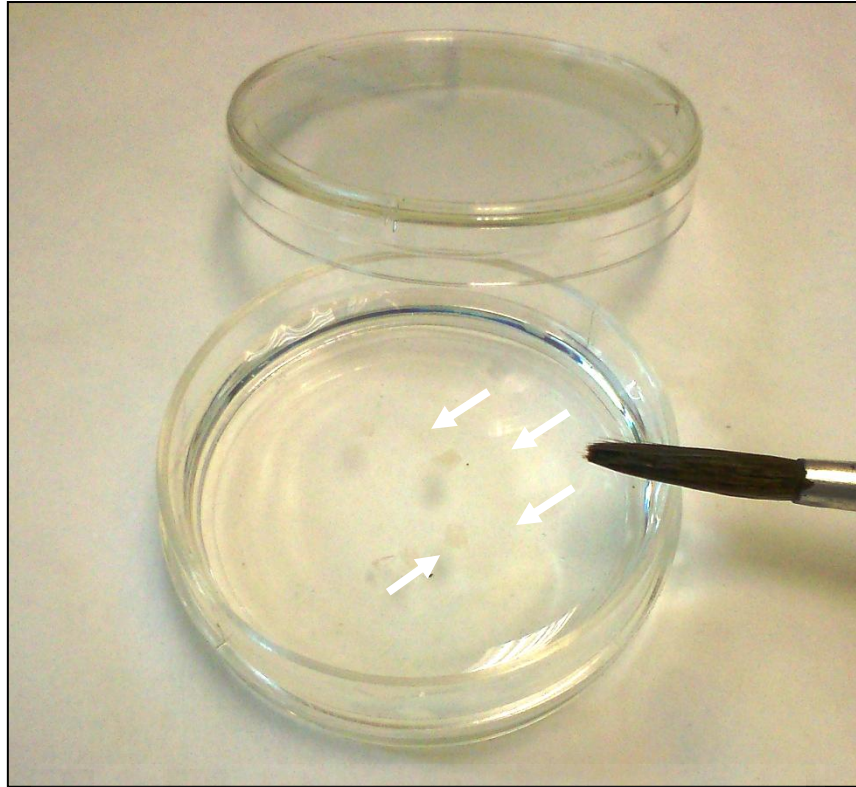


Fig 21. Placa costar con rodajas tisulares en solución K/H sin  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 3.3. Transfección de células cromafines bovinas aisladas.

#### 3.3.1. Protocolo.

El protocolo de transfección o electroporación, es un procedimiento que consiste en provocar un aumento significativo de la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana plasmática celular, mediante la aplicación de un campo eléctrico, con el fin de formar poros en la membrana plasmática de tipo transitorio. Aplicando el voltaje, en una magnitud y duración apropiada, estos poros permiten zonas de paso para los vectores de expresión y posteriormente se sellan evitando la salida de los mismos, sin comprometer así la viabilidad celular.

Para este tipo de procedimiento, se usa un kit (Amaya Basic Nucleofactor Kit Primary Neurons, Lonza, Alemania, cat#: VPI-1003) con las



soluciones necesarias para resuspender la muestra antes de ser sometida a voltaje y el voltaje, se aplica haciendo uso de un nucleofactor, un sistema de aplicación controlada del voltaje con efectividad en la transfección (Nucleofactor II Amaxa Biosystems, Amaxa GmbH. Koehl, Alemania).

El protocolo de electroporación, se inicia tras el recuento celular que forma parte de la última fase descrita en el protocolo de cultivo celular (Materiales y Métodos 3.1), previamente a la siembra en placa. Terminado el recuento celular, se preparan alícuotas de 4-5 millones de células en tubos Eppendorf de microcentrífuga de 1,5 ml (Daslab Cat#: 175508). El número de alícuotas a preparar, es equivalente al de ensayos diferentes a realizar. Todas ellas, son sometidas a centrifugación a 850 rpm durante 5 min (Eppendorf Centrifuge 5415 R). Seguidamente, se retira el sobrenadante en cada una de ellas y se reservan mientras se prepara la mezcla de reacción. La preparación de la mezcla de reacción, se debe hacer para cada muestra que vaya a someterse a electroporación y se lleva a cabo en una campana de flujo laminar BV-30/70 (Telstar, Barcelona, España). Inicialmente, se prepara la solución de nucleofacción activa, mezclando: 18,2 µl de suplemento y 81,8 µl de solución de nucleofacción inactiva (reactivos proporcionados por el Kit de nucleofacción: Basic Nucleofactor Kit for Mammalian Neurons 25 React, Cultex Lonza, Cat#: H3VPI-1003). El suplemento mezclado con la solución de nucleofacción inactiva, la convierte en solución activa. Cada uno de los volúmenes preparados de solución de nucleofacción activa (100 µl mezclados previamente), son añadidos a cada una de las alícuotas de células preparadas previamente. A esta mezcla, se le añade el ADN complementario (ADNc), según la concentración requerida y teniendo en cuenta que, por

ensayo, es preciso considerar una cantidad total de ADNc entre 1-3  $\mu\text{g}$ . El conjunto formado por: la solución de nucleofacción activa y el material genético (ADNc), da lugar a la mezcla de reacción. Desde el momento en que está preparada la mezcla de reacción, el protocolo debe completarse sin superar los 15 min, a fin de no comprometer la viabilidad celular.

El programa de electroporación utilizado para los experimentos que alberga la presente tesis doctoral es el O-005, especialmente diseñado para: neuronas o células cromafines en suspensión. Hecha la transfección, con la aplicación del protocolo O-005, se retiran los volúmenes de cada cubeta y son transferidos a tubos cónicos estériles (15 ml) (Saestedt, Cat#: 62.554.502) con 8 ml de medio DMEM completo, atemperado a 37 °C. A continuación, se mezclan ambos volúmenes suavemente y se reparten en las placas de cultivo para ser sembrados (2ml/placa). Estas placas, se dejan un mínimo de 2-4 h en el incubador Heraeus a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Transcurrido este tiempo, en el que las células mayoritariamente ya están adheridas a la placa, se retiran cuidadosamente los 2 ml de volumen de cada una de ellas. El objetivo, es extraer del medio los restos de la mezcla de reacción que pudieran resultar tóxicos para el cultivo. A continuación, se adicionan 2 ml de medio DMEM completo nuevo como suplemento nutricional para las células. Las placas, son devueltas al incubador Heraeus (Madrid, España) de nuevo y allí quedan 24-48 h hasta su uso en experimentación. Este tiempo, es un requisito fundamental para otorgar un espacio temporal suficiente para la expresión de las proteínas codificadas por los ADNc utilizados en la electroporación.

### 3.3.2. Material genético utilizado: ADN complementario (ADNc).

El ADN complementario o ADNc, es una hebra de ADN de doble cadena, donde una de las cadenas, constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado. Estas moléculas, se suelen utilizar para la clonación de genes propios de células eucariotas, en células procariontas, debido a que, dada la naturaleza de su síntesis, carecen de intrones.

Estas estructuras, se utilizan comúnmente en biología molecular a fin de incorporar a la célula material genético codificante de una proteína de interés. Unido al interés de poder expresar determinadas proteínas en un sistema celular modelo, los ADNc ofrecen la ventaja de incorporar un marcador fluorescente que permite visualizar la proteína codificante. De este modo, es posible detectar y estudiar estas proteínas en células vivas. Algunos de los marcadores fluorescentes más utilizados son: la proteína fluorescente verde GFP (del inglés "Green Fluorescent Protein") y la proteína fluorescente roja RFP (del inglés "Red Fluorescent Protein") o DsRed (del inglés "*Discosoma* sp. Red Fluorescent Protein"). Tales proteínas fluorescentes, son productos extraídos de diferentes organismos vivos y de cada una de ellas se han obtenido muchas variantes. Ejemplo claro de esto, son las decenas de proteínas mutadas derivadas de la GFP de *Aequorea victoria*, cuyas alteraciones producen propiedades físico-químicas distintas a la original con las que se ha mejorado su expresión y conseguido una mayor fluorescencia y fotoestabilidad. Todo ello, sin modificar el comportamiento general de la proteína. En la línea de investigación que aborda esta tesis, se ha hecho uso de una versión mejorada de la GFP, conocida como EGFP (del inglés

“Enhanced Green Fluorescent Protein”), caracterizada por una intensificación de los niveles de fluorescencia sobre la GFP común.

Los ADNc utilizados en los experimentos que alberga esta tesis son:

- EGFP-LifeAct (Plásmido Comercial; pCMV LifeAct-TagGFP2, ibidi, Alemania, cat#: 60101)
- RFP-NPY (Plásmido cedido por el Profesor Dr. Takashi Tsuboi; Departamento Ciencias de la vida; Universidad de Tokyo)
- pDsRed-SNAP-25 (Plásmido configurado por el Dr. José Heliodoro Villanueva haciendo uso del programa pDraw32 con el software de AcaClone)
- pRLC-wt-DsRed (Plásmido cedido por el Dr. Kendrick-Jones, MRC, Cambridge, Reino Unido)
- pRLC-T18A-S19A-DsRed (Plásmido generado por mutagenesis a partir del wt y configurado con Clontech)

### 3.4. Inmunomarcaje.

#### 3.4.1. Concepto.

La técnica del inmunomarcaje, consiste en la detección de estructuras biológicas (antígeno) por reacción de especificidad de anticuerpos contra las mismas. Los anticuerpos, son moléculas utilizadas en investigación dada su capacidad de unión específica, tanto a componentes celulares como de la matriz extracelular, en base a su afinidad por estas. Además de su especificidad, la ventaja añadida que ofrecen, es que pueden ser marcados con diversos tipos de elementos (moléculas fluorescentes, partículas de oro, enzimas...etc.). Esto último, permite revelarlos ofreciendo así una marca visible de las estructuras a las que están unidos. En los protocolos de inmunomarcaje, desarrollados en la presente tesis doctoral, se han utilizado anticuerpos contra las proteínas siguientes: dopamina  $\beta$ -Hidroxilasa (DBH), SNAP-25, G-actina y  $\alpha$ -Fodrina. Todos ellos, con una elevada capacidad de unión específica y un revelado, para su visualización, basado en una interacción secundaria. En esta reacción (Fig 22), están implicados: el anticuerpo primario afín por la estructura biológica de interés (sin marcaje) y el anticuerpo secundario, afín por el anticuerpo primario (anti-anticuerpo), marcado con una proteína fluorescente (verde o roja).

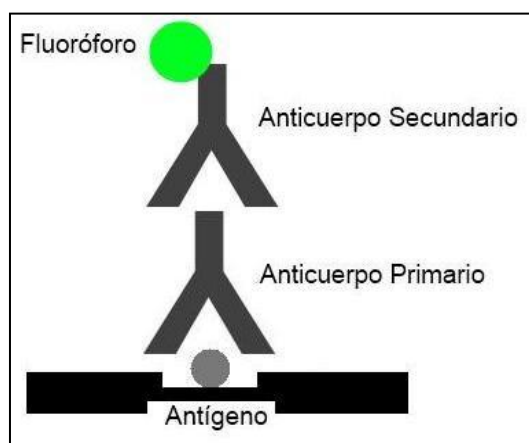


Fig 22. Esquema de la interacción secundaria.

### 3.4.2. Inmunocitoquímica.

La técnica de inmunocitoquímica, es el procedimiento de inmunomarcaje aplicado sobre las muestras celulares en cultivo. Esta técnica se inicia 24h tras la siembra en placa, a fin de favorecer la adhesión de las células antes de iniciar las incubaciones asociadas a este protocolo, ya que, muchos de los pasos requieren de agitación constante y a su vez, el protocolo en sí mismo, conlleva el cambio repetido de volúmenes en la placa.

El protocolo, se inicia con una fase de fijación de la muestra mediante incubación en paraformaldehído (Panreac Química SA, Cat#: 141451) al 4% en PBS. Esta fijación, se desarrolla en agitación constante durante 20 min a TA. A continuación, se permeabilizan las muestras con una incubación en Tritón X-100 (Sigma Aldrich, Cat#: 9002-93-1) al 0.2 % en formaldehído al 35-40 % (Panreac Química SA, Cat#: 211328 1211) en agitación constante durante 10 min a TA. Seguidamente, se lavan las muestras dos veces mediante dos incubaciones consecutivas en PBS y después se someten a dos incubaciones repetidas de BSA (Sigma Aldrich, Cat#: A4503) al 1% en PBS, con agitación constante durante 15 min a TA, para todas y cada una de ellas. Finalizadas estas últimas incubaciones, se trata la muestra con los anticuerpos primarios correspondientes en su dilución óptima: 1/500 para anti-DBH y 1:200 para anti- $\alpha$ -fodrina, G-actina y SNAP-25. La incubación de los primarios, se hace manteniendo las placas en cámara húmeda a 4 °C toda la noche bajo agitación constante atenuada, a fin de evitar despegar las células del cristal. Al día siguiente, las muestras se lavan mediante cuatro incubaciones de 10 min con PBS en agitación constante a TA y tras estos lavados, se aplican los anticuerpos secundarios, todos ellos a dilución 1:200

(dilución óptima). La incubación de los secundarios, se lleva a cabo durante 1h y 30 min en oscuridad a TA y bajo agitación. Terminada esta incubación, las muestras vuelven a ser lavadas con cuatro incubaciones en PBS durante 10 min con agitación constante y a TA. Por último, son conservadas en medio PBS en una cámara húmeda a 4 °C.

### **3.4.3. Inmunohistoquímica.**

La técnica de inmunohistoquímica, es el procedimiento de inmunomarcaje aplicado sobre las muestras tisulares. Esta técnica, se inicia inmediatamente tras la obtención del conjunto de rodajas. El objetivo, es favorecer un marcaje sobre una estructura tisular lo menos dañada posible, ya que, cabe tener en cuenta que las rodajas no son conservadas en cultivo tisular, ni incubadas con medios nutritivos.

El protocolo, consiste inicialmente en una fase de fijación mediante incubación en paraformaldehído al 4% en PBS, con agitación constante durante 30 min a TA. A continuación, se permeabilizan las muestras con una incubación en Tritón al 0.5 % X-100 en formaldehido al 3.6 %, en agitación constante durante 1 h a TA. Seguidamente, se lavan las muestras dos veces consecutivas en PBS y después son sometidas a dos incubaciones repetidas de BSA al 1% en PBS, en agitación constante durante 15 min a TA, en todas y cada una de ellas. Finalizadas estas incubaciones, se aplican los anticuerpos primarios correspondientes en su dilución óptima: 1/500 para anti-DBH y 1:200 para anti- $\alpha$ -fodrina, G-actina y SNAP-25, dejándolos en incubación dentro de cámara húmeda a 4 °C durante toda la noche, bajo una agitación constante suave. Al día siguiente, las muestras son lavadas mediante cuatro incubaciones de 10 min con PBS en agitación constante a TA

y tras estas se aplican los anticuerpos secundarios. Estos, son usados a dilución 1:200 en todos los casos (dilución óptima), con una incubación de 2 h en oscuridad a TA bajo agitación. Terminada esta incubación, las muestras se vuelven a lavar con PBS en agitación constante a TA durante 10 min (cuatro veces). Por último, las rodajas de tejido son conservadas inmersas en PBS en una cámara húmeda a 4 °C.

#### **3.4.4. Anticuerpos utilizados.**

Los anticuerpos primarios utilizados son los siguientes:

- Anti-SNAP-25 (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EEUU, Cat#: sc-7538). Anticuerpo policlonal isotipo IgG desarrollado en cabra.
- Anti-  $\alpha$ -fodrina (Abcam, Cambridge, CB40FL, Reino Unido; Cat#:ab131575). Anticuerpo monoclonal isotipo IgG1 desarrollado en ratón.
- Anti-G-actina (Abcam Research Products, Cambridge, UK, Cat#: AB3280, N° de clon: ACTN05 (C4)). Anticuerpo monoclonal de ratón IgG1 desarrollado en conejo.
- Anti-Dopamina- $\beta$ -Hidroxilasa (DBH) (Merck-Millipore, Darmstadt, Alemania; Cat#:AB1585). Anticuerpo policlonal isotipo IgG desarrollado en conejo.



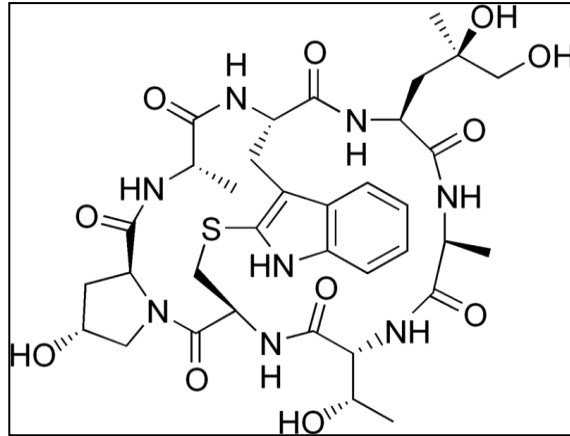
Los anticuerpos secundarios utilizados son los siguientes:

- Anti IgG de cabra producido en mono conjugado con FITC (isocianato de fluoresceína). (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EEUU, Cat#: sc-2024). Abs 494/Em 518. Usado para el revelado de SNAP-25 en fluorescencia verde.
- Anti- IgG de cabra desarrollado en conejo conjugado con rodamina (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EEUU, Cat#: sc-3945). Abs 525/Em 627. Usado para el revelado de SNAP-25 en fluorescencia roja.
- Anti-IgG de ratón desarrollado en cabra conjugado con el fluoróforo FITC (isocianato de fluoresceína) (Sigma-Aldrich, Madrid; Cat#:F2012). Abs 494/Em 518. Usado para el revelado de alfa-fodrina y G-actina en fluorescencia verde.
- Anti IgG de conejo desarrollado en burro conjugado con Alexa Fluor 488 (isocianato de fluoresceína modificado). (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA, Cat#: A 21206). Abs 495/Em 519. Usado para el revelado de DBH en fluorescencia verde.

### **3.5. Otros marcajes fluorescentes.**

#### **3.5.1. Faloidina.**

La Faloidina, es una micotoxina del grupo de las falotoxinas producida por el hongo *Amanita Phalloides*, con una estructura química de heptapéptido bicíclico (Fig 23).



**Fig 23.** Estructura química de la faloidina.

Se trata de un compuesto de unión a F-actina, que une específicamente a la interfaz presente entre monómeros consecutivos en los filamentos de F-actina, con un efecto estabilizador sobre los mismos y capacidad para generar una reducción de la tasa de disociación en su extremos (Cooper, 1987). Además, la faloidina inhibe la actividad de hidólisis de ATP, bloqueando la activación de los monómeros de actina en el proceso de polimerización de la fibra y con ello la propia polimerización, redundando en una mayor estabilización de los microfilamentos. Esta capacidad de unirse específicamente a los microfilamentos de F-actina, la facultan para ensayos de microscopía de fluorescencia y confocal. Normalmente, se usa una variante de la misma marcada fluorescentemente con un fluorocromo. La variante marcada, usada en la línea de investigación que alberga esta tesis, es faloidina unida a tetrametilrodamina (TRITC) (Phalloidin-TRITC, Sigma-Aldrich P1951).

El marcaje con faloidina-TRITC, se lleva a cabo haciendo uso de un protocolo que precisa de las primeras fases de los protocolos de inmunocitoquímica/histoquímica descritos en el apartado previo (Materiales y

Métodos 3.4). Las muestras, deben pasar por las etapas de: fijación, permeabilización, lavado en PBS e incubación en BSA al 1% en PBS. A continuación, se incuban con la faloidina-TRITC a una concentración 1  $\mu\text{M}$  durante 30 min para muestras celulares (Giner et al., 2005; Neco et al., 2003a), en condiciones de oscuridad y bajo agitación constante a TA. Para las muestras tisulares, se modifica el tiempo de exposición, prolongándose hasta 45 min a fin de facilitar la penetración del marcaje y perfeccionar la visibilidad al confocal de F-actina. Esta modificación, ligada al procedimiento de puesta a punto del marcaje fluorescente tisular que abarca el trabajo de esta tesis, fue validada con el cultivo. Para ello, se demostró que la diferencia en el tiempo de exposición no interfería en el marcaje final entre las células cromafines aisladas y las nativas. Se probó el tiempo de incubación de 45 min, en cultivos de células aisladas y no se hallaron cambios respecto a los obtenidos para los 30 min de incubación (óptimo para muestra en cultivo). Mientras que los 45 min de incubación, resultaban esenciales para alcanzar una buena penetración del marcaje fluorescente en las muestras tisulares.

Tras la incubación con faloidina, las muestras son tratadas con BSA al 1% en PBS y después lavadas dos veces con PBS. Cada una de estas incubaciones, se desarrolla durante 10 min, en agitación constante y a TA. Por último, las muestras son conservadas en PBS en cámara húmeda a 4 °C.

### **3.5.2. Mito-Tracker.**

Mito-Tracker, es un compuesto químico del que existen múltiples variantes, tanto en términos de estructura química, como en los fluorocromos

asociados o los niveles de permanencia de la fluorescencia emitida bajo iluminación constante.

Este, ha sido ampliamente utilizado en investigación para el marcaje mitocondrial dada su capacidad de entrar en la célula, de un modo pasivo, permeando a través de la membrana plasmática celular y acumularse en mitocondrias activas, sin comprometer la viabilidad celular. Tras su entrada en la mitocondria, este producto es retenido en la organela sin salir de la misma ante reducciones en el potencial de membrana mitocondrial, solventando así las deficiencias mostradas por otros marcadores mitocondriales convencionales tales como: tetrametilrosamina o rodamina 123.

En la línea de investigación que aborda esta tesis doctoral, ha sido relevante su uso para visualizar y estudiar mitocondrias en células vivas. La variante de Mitotracker usada, es: Mitotracker-Red CMXRos (Molecular Probes, Cat#: M7512). Su protocolo de uso, consiste en una incubación sobre las muestras celulares vivas mantenidas en cultivo, durante 15 min a una concentración de 1  $\mu$ M en oscuridad y a TA (Villanueva et al., 2014). A continuación, las muestras deben ser lavadas dos veces con K/H basal, a fin de eliminar los excesos de marcaje inespecífico que puedan quedar en suspensión.

### **3.6. Farmacología.**

La farmacología, es una herramienta imprescindible a fin de poder controlar y/o regular determinados componentes/complejos biológicos celulares con el fin de, bajo dicha regulación, estudiar los fenómenos biológicos de interés y analizar el grado de variación de estos, para así,

deducir la participación de cada uno de los componentes/complejos biológicos regulados en los procesos de estudio, foco de nuestro interés.

Los fármacos usados en esta tesis doctoral, han sido los siguientes:

a) Latrunculina A:

Latrunculina, es el nombre de una toxina producida por poríferos (esponjas de mar), como el género *Latrunculia*, del cual deriva su nombre. Su toxicidad, proviene de su capacidad de secuestrar monómeros de actina, reduciendo la polimerización de las fibras de F-actina (Coue et al., 1987) y actuando como disruptor de estos microfilamentos en células vivas (Braet et al., 1996). Su uso, en algunos de los experimentos de esta tesis, ha estado centrado en analizar el efecto disruptor de la F-actina sobre la distribución de organelas, como las vesículas y las mitocondrias, en células cromafines bovinas.

Este compuesto (Molecular Probes, Cat#: L12370), ha sido utilizado en esta línea de investigación a una concentración de 1  $\mu$ M, con aplicación por incubación durante 1 h a T.A (Neco et al., 2003b). Terminada la incubación descrita, las células son lavadas dos veces con Krebs/Hepes basal.

b) Jasplakinolide:

Jasplakinolide, también conocido como jaspamide, es un péptido macrocíclico aislado de la esponja marina *Jaspis Johnston* e incluido entre las drogas citoesqueletales que tienen como diana las fibras de F-actina. Bubb y colaboradores, demostraron sus efectos sobre el citoesqueleto de actina por primera vez en 1994 (Bubb et al., 1994). Entre estos, se incluyen: la inducción

de la nucleación espontánea de los monómeros de G-actina promotor de la aparición de agregados F-actina desorganizados y la estabilización de los microfilamentos mediante la inhibición del desensamblaje de estos. Para poder ejercer los citados efectos, precisa de su unión a F-actina y dado que su mecanismo de unión es muy similar al de la faloidina, una aplicación de ambos de un modo simultáneo, resulta en una unión competitiva a F-actina. Su uso, en esta tesis, ha estado dirigido a la estabilización de los microfilamentos de F-actina, a fin de poder valorar la implicación de la dinámica de fibras en la dinámica local de la red cortical del citoesqueleto de F-actina.

Este producto (Calbiochem, Cat#: 420107), ha sido utilizado a una concentración de 1  $\mu\text{M}$ , con aplicación mediante una incubación de 15 min, en oscuridad y a TA (Bubb et al., 1994; Zhang et al., 2017). Terminada la incubación, las células son lavadas dos veces con Krebs/Hepes basal.

#### c) Blebbistatina:

Blebbistatina es una molécula pequeña, con una estructura química sencilla, de la que a nivel celular ha sido demostrada su capacidad para inhibir la citocinesis (Straight et al., 2003) y a nivel molecular su papel inhibitorio sobre la miosina II (Duxbury et al., 2004). Su alta selectividad y afinidad por la miosina II, lo convierte en su inhibidor más específico. Su poder de acción sobre la miosina II, se centra en la capacidad para anular la actividad ATPasa de la misma. Entendiendo que esta función ATPasa, es la responsable final del incremento de afinidad de la cabeza de miosina II por las fibras de actina y de la posterior propulsión ejercida sobre estas, el fármaco consigue anular la función motora de miosina II. Su aplicación, en la línea de

trabajo que alberga esta tesis, ha estado dirigida a inhibir la capacidad motora de miosina II sobre las fibras de F-actina para poder estudiar la implicación del complejo actomiosina (actina-miosina) en los eventos de dinámica local del citoesqueleto de F-actina.

Este fármaco (Calbiochem, Cat#: 203391), ha sido utilizado a una concentración de 5  $\mu$ M, con aplicación mediante una incubación de 30 min en oscuridad y a TA (Villanueva et al., 2012b). Terminada la incubación, las células son lavadas dos veces con Krebs/Hepes basal.

#### d) Paclitaxel:

El Paclitaxel, también conocido como taxol, es un alcaloide que se deriva de la corteza del tejo (*Taxus brevifolia*), un árbol que crece en suelos húmedos y puede ser encontrado en sitios concretos como: Alaska, California, Montana y Washington, entre otros. El Dr. Monroe E. Wall y el Dr. Mansukh C. Wani, descubrieron este producto en el "Research Triangle Institute" en 1967, así como, su función como agente antitumoral en roedores. Años más tarde, otros científicos han descrito su efecto como estabilizador de los microtúbulos (Baum et al., 1981; De Brabander et al., 1982; Horwitz et al., 1982). Este compuesto, es considerado una droga citoesqueletal que tiene como diana la tubulina (subunidad de los microtúbulos). Su mecanismo de acción, consiste en estabilizar los microtúbulos polimerizados, evitando los procesos de despolimerización y la movilidad asociada a los mismos. Su aplicación, en algunos de los experimentos de esta tesis, ha estado dirigida a la citada estabilización de los microtúbulos para valorar la influencia de la dinámica de este componente citoesqueletal, sobre la dinámica local de la red de microfilamentos.

Este alcaloide (Sigma-Aldrich, Cat#: T7402), ha sido utilizado a una concentración de 0,1  $\mu$ M, con aplicación mediante una incubación de 30 min en oscuridad y a TA (Horwitz et al., 1982). Terminada la incubación, las células son lavadas dos veces con Krebs/Hepes basal.

### **3.7. Protocolo de estimulación celular.**

La estimulación celular, ha sido utilizada en múltiples experimentos que alberga esta tesis doctoral, con el fin de poder valorar las respuestas biológicas a estímulo y con un especial interés sobre su efecto en la dinámica de F-actina.

La estimulación, ha sido desarrollada mediante despolarización de membrana plasmática celular, haciendo uso de una solución de KCl 59 mM (K/H alto potasio) de aplicación mediada por un sistema de perfusión. Este, es un sistema paralelo a la platina del microscopio confocal (Fig 24, A), con capacidad de cambio posicional en altura a fin de poder ser ajustado próximo a la muestra, sin llegar a tocarla (Fig 24, B). El sistema, gracias a sus canales múltiples, ofrece la posibilidad de administrar hasta seis soluciones diferentes. Esto ha permitido, combinar en el tiempo, estados de estimulación (K/H alto potasio) y reposo (K/H basal), durante el transcurso de los experimentos.

El sistema presenta un control electrónico, con el que poder activar y desactivar la liberación de cada solución sobre la muestra. Así, es posible mantener un flujo constante durante el tiempo seleccionado y regular tanto el inicio como el fin de cada tratamiento, a la par que definimos el inicio y el fin del registro de imágenes de fluorescencia con el confocal en cada experimento. Esto, ha permitido desarrollar una estimulación sostenida entre



los segundos 10 y 50s de los registros, esto es, una estimulación de 40 segundos (Protocolo de estimulación “10-40-10”).

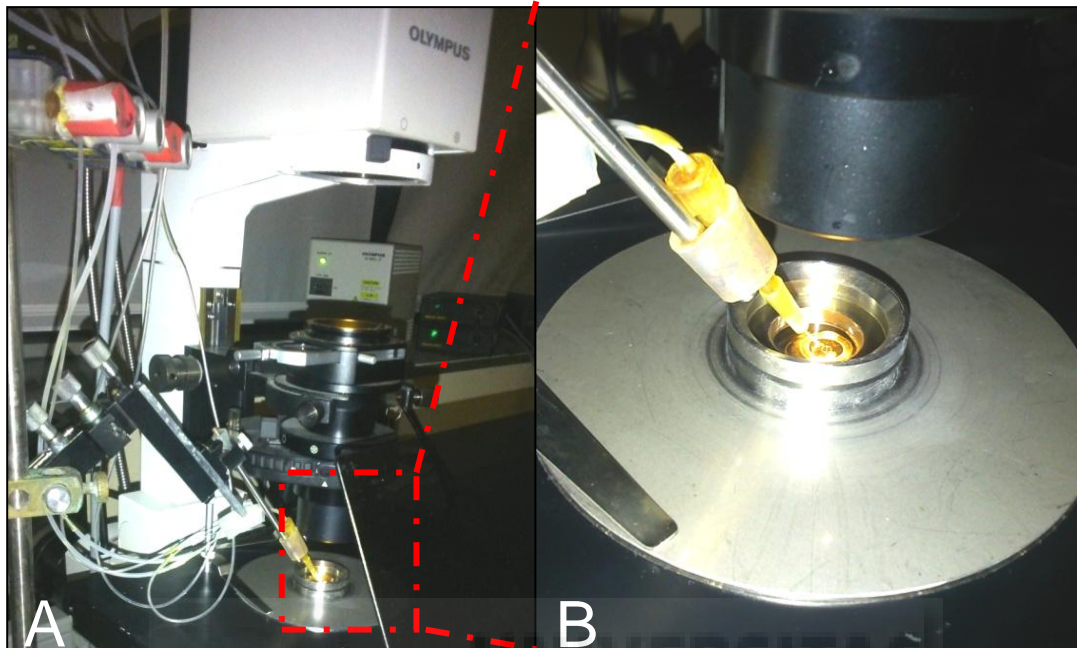


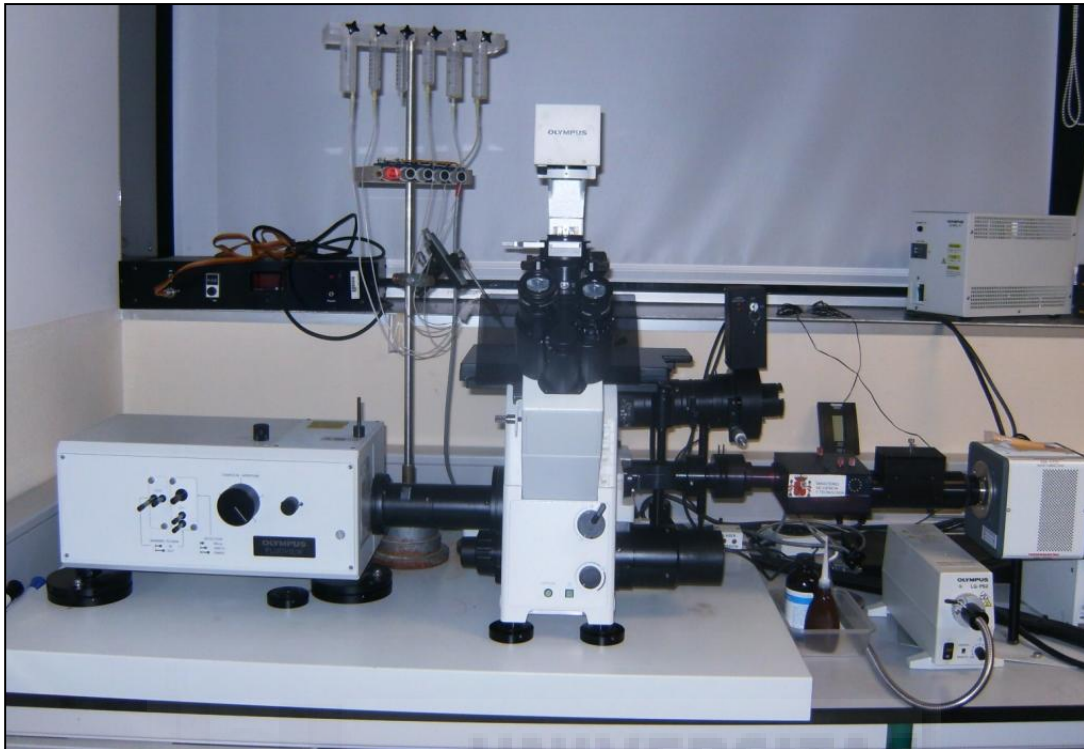
Fig 24. Sistema de perfusión. A y B, Detalle de la posición del sistema de perfusión.

### 3.8. Técnicas de imagen.

#### 3.8.1. Microscopía confocal.

##### 3.8.1.1. Descripción.

Todos los experimentos de microscopía confocal, incluidos en esta tesis, se han realizado con un sistema láser confocal Olympus Fluoview FV300 (Olympus Corp., Tokio, Japón), montado en un microscopio invertido IX71 y dotado de un objetivo Olympus 100X de inmersión en aceite (A.N = 1.45) (Fig 25). Este equipo, pertenece al laboratorio del Dr. Luis Miguel Gutiérrez donde se ha desarrollado la línea de investigación que alberga esta tesis doctoral.



**Fig 25.** Olympus Fluoview FV300.

Este sistema, está compuesto por dos unidades láser de luz visible: uno Multi-Argón ( $\lambda = 458 \text{ nm}; 488 \text{ nm}; 515 \text{ nm}/10 \text{ mW}$ ) y otro de Helio/Neón ( $\lambda = 543 \text{ nm}; 633 \text{ nm}/10 \text{ mW}$ ). Cada láser, está equipado con filtros de densidad neutra para controlar su intensidad y guiados por una única fibra óptica. La unidad de escaneo, basado en la tecnología de espejos galvanométricos en ambos ejes, desarrolla velocidades de escaneo de un segundo para regiones de  $256 \times 256$  píxeles y de  $10,835 \text{ s}$  para regiones de  $2048 \times 2048$  píxeles, en el modo normal. En el modo de escaneo rápido bidireccional, el escaneo puede llegar a ser de  $0.25 \text{ s}$  para regiones de  $256 \times 256$  píxeles y hasta dos canales diferentes. Cada canal permite recoger imágenes de 12 bits (4096 niveles de grises), con aumentos digitales de hasta 10X. El

control del eje Z, se realiza mediante un mecanismo monitorizado capaz de realizar pasos mínimos de 25 nm en la muestra. Además, posee un sistema de escaneo secuencial que permite la adquisición de imágenes sin cruzamiento óptico, incluso en fluoróforos que presentan un amplio espectro de emisión. La resolución espacial, basada en el objetivo descrito y en las características del escáner, ha sido estimada entre 60 y 80 nm que se corresponden con un valor de entre 2 o 3 píxeles de separación.

El equipo está equipado con el programa de adquisición FluoView 5.0, desde donde se han controlado los parámetros de adquisición durante todos los experimentos.

### **3.8.1.2. Preparación de las muestras.**

Tras llevar a cabo los marcajes fluorescentes pertinentes, en los cultivos de células aisladas (muestra celular) y en las rodajas de medula adrenal (muestra tisular), las muestras se montan en una cámara Attofluor® Cell Chamber (Invitrogen, Barcelona, Cat#: A-7816) para ser visualizadas con el microscopio confocal. En el caso de las muestras celulares, los cristales se montan en la cámara manteniendo la cara que contiene a las células hacia arriba y a continuación se adiciona 1 ml de Krebs Hepes basal (K/H bajo contenido en potasio) para evitar su deshidratación, manteniendo así la viabilidad celular sin presencia de estimulación. Para las muestras tisulares, se debe usar un montaje de tipo "sándwich" basado en dos cristales de 25 mm de diámetro como los utilizados para el cultivo de células cromafines. Entre ellos, se depositan las rodajas inmersas en un medio de montaje

(DPX, slide Mountant Medium, Sigma, Madrid, cat#: 06522). Este líquido, crea una interfase idónea para conseguir nitidez en la imagen por microscopía y facilita la visualización de cada elemento de la unidad tisular. El conjunto de los dos cristales enfrentados, con la/s rodaja/s y el medio, se monta en la cámara sin añadir ningún volumen adicional de K/H.

### **3.8.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET).**

#### **3.8.2.1. Descripción.**

El microscopio electrónico de transmisión, utilizado para los experimentos de esta tesis doctoral, fue un modelo: JEOL JEM-1011 (Fig 26). Este microscopio, forma parte de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia.

El microscopio electrónico de transmisión, es un instrumento que utiliza como fuente de iluminación un haz de electrones generados por un filamento de tungsteno cuando este, por efecto termoiónico, se pone incandescente. Estos electrones son acelerados y dirigidos hacia la muestra, mediante lentes electromagnéticas en condiciones de alto vacío. Las observaciones de las secciones ultra finas con tecnología MET, han sido llevadas a cabo operando a 80-90 Kv. La captura de imágenes, se ha realizado haciendo uso de una cámara digital Gatan BioScam modelo 792. Esta cámara, está asociada al equipo y se puede monitorizar con el programa DigitalMicrograph 3.11.0 (Gatan, Inc., Pleasanton., CA, USA).

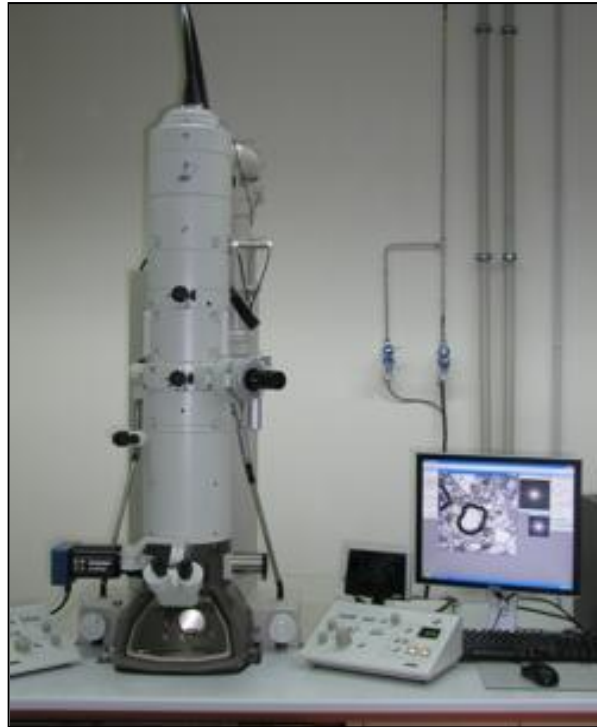


Fig 26. JEOL JEM-1011.

### 3.8.2.2. Preparación de las muestras.

Para la visualización de las células cromafines bovinas aisladas y nativas, con microscopía electrónica de transmisión (MET), se precisa de una preparación específica de las muestras. Pese a que inicialmente, esta preparación difiere ligeramente para las células aisladas y nativas, el protocolo conserva la mayoría de sus fases para el nivel celular y tisular, incorporando variaciones tan solo en los tiempos de incubación de cada etapa. Las variantes en los tiempos de incubación, son debidas a que en la unidad tisular el acceso a las células es más complicado y requiere de un mayor intervalo de tiempo para poder completarse con efectividad.

Inicialmente, se procede a preparar la muestra de partida para cada una de las preparaciones: celular y tisular. Para la preparación

celular, se sigue el protocolo de aislamiento y cultivo de células cromafines (Materiales y Métodos 3.1), hasta completar las dos centrifugaciones con Locke 1X tras el gradiente de Percol, justo antes de la resuspensión de los pelets de células en el DMEM. Para la preparación tisular, se procede a seccionar la glándula para obtener la médula adrenal (Materiales y Métodos 3.2) y a continuación, esta última se corta en mini-cubos de tejido (2-3 mm<sup>3</sup>). Los pelets celulares y los cubos de médula adrenal obtenidos, se depositan en tubos Eppendorf (uno por Eppendorf).

El protocolo de preparación de las muestras para MET, en sí mismo, se inicia con la fijación de las muestras con glutaraldehído (Electron Microscopy Sciences, Concentrado a 25%, Cat#: 111-30-8) al 2.5% en tampón cacodilato (Fluka Biochemika, Cat#: 52607318) a una concentración 0.2 M y pH 7. Esta solución, se añade a los Eppendorfs con las muestras y estos se mantienen a 4°C durante: dos horas para la muestra celular y cuatro para la tisular. Para estas incubaciones a 4°C, las muestras son introducidas en el refrigerador de un frigorífico convencional del laboratorio, sin agitación. Posteriormente, se retira la solución en cada Eppendorf y se aplica una disolución a 0,2 M de: tampón cacodilato, sacarosa (Panreac, Barcelona, España, Cat#: 131621) y agua destilada, en la que quedan incubando las muestras toda la noche en el refrigerador a 4°C, para ser lavadas. Tras el citado lavado, las muestras son sometidas a la post-fijación mediante incubación con tetraóxido de osmio al 1% (Sigma, Madrid, Cat#: 419494) en tampón cacodilato a 0.2 M, a 4°C durante: dos horas para

la muestra celular y cuatro para la tisular. Finalizada la post-fijación, se lleva a cabo un lavado extenso de las muestras con agua destilada. A continuación, las muestras son contrastadas con acetato de uranilo al 2%(Sigma, Madrid, Cat#: 73943), mediante incubación a 4°C durante: una hora para la muestra celular y dos horas para la muestra tisular. Después de dicho contraste, las muestras son deshidratadas a través de una serie de incubaciones en etanol (Sigma, Madrid, Cat#: 02860) de diferentes grados de pureza (30%, 50%, 70% 80%, 96% y 99%), durante quince minutos para cada una de ellas (tiempos aplicados a ambos tipos de muestra: celular y tisular). Terminadas las deshidrataciones, se inicia la fase de aclaramiento de las muestras mediante dos incubaciones consecutivas de quince minutos en óxido de propileno (Sigma, Madrid, Cat#: 471968) a TA.

Concluida la primera parte del protocolo, haciendo uso de los Eppendorfs comunes, los pelets celulares y los cubos de médula adrenal se transfieren a eppendorfs nuevos, de una morfología y material especial para este tipo de preparaciones (Electron Microscopy Sciences, Reino Unido, Cat#: 71189). Su morfología, puntiaguda a su base, ofrece un molde idóneo para que, obtenidos los bloques de resina, la muestra quede en un extremo de fácil acceso al corte. Además, su material de fácil rotura, permite desmoldarlos fácilmente y extraer las muestras de un modo sencillo. Depositadas las muestras en los nuevos eppendorfs, estas son impregnadas con resina Epoxi. La resina Epoxi, es una solución que se obtiene de la mezcla de tres productos químicos: Epoxy embedding médium (Sigma Aldrich, Madrid,



España, Cat#: 45345), Epoxy embedding medium hardener DDSA (Sigma Aldrich, Madrid, España, Cat#: 45346) y Epoxy embedding medium hardener MNA (Sigma Aldrich, Madrid, España, Cat#: 45347). Estos productos, se combinan dando lugar a dos mezclas (A y B). La mezcla A, se prepara con: Epoxi y DDSA (1:2) y la mezcla B con: Epoxy y MNA (1:1). Estas dos, se combinan más tarde en proporción 1:1 para dar lugar a una tercera (C). La mezcla C, es realmente la “resina Epoxi” y es la utilizada en la siguiente fase del protocolo. El paso de la impregnación en resina Epoxi, se desarrolla mediante cuatro pasos de incubación. Durante el transcurso de los mismos, las muestras son sometidas gradualmente a esta resina, siguiendo este esquema: Óxido de propileno-Resina epoxi (2:1), Óxido de propileno-Resina epoxi (1:1), Óxido de propileno-Resina epoxi (1:2) y Óxido de propileno-Resina epoxi (0:2). Cada uno de ellos, se prolonga durante una hora a TA, menos el último, donde quedan las muestras toda la noche. Al día siguiente, se toma la resina Epoxy del día anterior y se le adiciona un catalizador para favorecer su solidificación a altas temperaturas (Epoxy embedding médium accelerator, Sigma Aldrich, Madrid, España, Cat#: 45348). Esta, se usa en la última parte del protocolo. Se retiran los volúmenes de resina del paso de la impregnación y se sustituyen por la mezcla preparada de: resina y acelerador. Los eppendorfs, se dejan solidificando a 45°C durante un día (24h) y a 60°C durante dos días (48h). Una vez endurecida la resina, se procede a desmoldar los Eppendorfs para extraer las muestras y cortarlas. Para el corte, estas son trasladadas al servicio de microscopía de los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) de la



Universidad de Murcia, donde se preparan los cortes ultra finos (70nm) haciendo uso de un ultra microtomo Lieca UC6. Los cortes, se transfieren a unas gradillas de cobre (malla 200 $\mu$ m) y a continuación, son tratadas con acetato de uranilo (5min) y citrato de plomo (1min), para potenciar un buen contraste y mejorar así la calidad de la imagen a registrar con el microscopio.

### **3.9. Análisis de imagen.**

Los programas Image J y Confocal Uniovi 1-5 Image J, son las herramientas informáticas utilizadas para el análisis de las imágenes obtenidas por microscopía confocal y microscopía electrónica de transmisión.

Image J es un programa de dominio público, generado en lenguaje Java por Wayne Rasband del National Institute of Health (USA). Este programa, puede abrir y procesar tanto imágenes individuales, como grupos de imágenes en forma de pilas o secuencias. Algunas de las aplicaciones de análisis que ofrece el programa, de gran relevancia en la presente tesis doctoral, son: cuantificación de la intensidad integrada de fluorescencia y la densidad de fluorescencia, recuento de partículas, cálculo del área y perímetro, estudios de colocalización, etc. Como resultado del uso de todas ellas, se han obtenido una gran variedad de datos con los que poder interpretar las imágenes.

### **3.10. Análisis de datos.**

El análisis y graficado de los datos, así como el estudio de la significancia de los mismos, han sido desarrollados haciendo uso de los programas: GraphPad Prism 4 e Igor Pro 5.00.

GraphPad Prism 4 es un software comercial para graficado y análisis estadístico, creado por GraphPad Software, Inc., California. Algunas de las funciones que ofrece y han sido utilizadas en la presente línea de investigación son: la representación de datos (con o sin: SD, SEM o Intervalo de Confianza), las frecuencias de distribución, los ajustes lineales a los perfiles de distribución hallados, los estudios de correlación y las regresiones (lineales/no lineales). Además, permite normalizar y promediar los datos, así como compararlos entre sí o por grupos, sometiénolos a tests estadísticos como el T- test o ANOVA (One-way and Two-way ANOVA). Los niveles de significancia estadística incluídos en la tesis, siguen la siguiente correspondencia con los símbolos: n.s:  $P > 0,05$ ; \*:  $P \leq 0,05$ ; \*\*:  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*\*:  $P \leq 0,0001$ .

Igor Pro 5.00 es un software de análisis desarrollado por WaveMetrics Inc., USA. En sus primeras versiones, estaba centrado en cubrir solamente el análisis de series de tiempo, pero actualmente cubre otras muchas aplicaciones, siendo reconocido principalmente por sus capacidades gráficas. Además, ofrece la posibilidad de ampliar las funciones integradas con las operaciones externas (XOP), que permiten funciones de adquisición de datos, manipulación y análisis, la comunicación con dispositivos externos y en principio, cualquier otra tarea que pueda ser programada en C o C ++. La funcionalidad otorgada a este software, en el desarrollo de esta tesis doctoral, ha estado centrada fundamentalmente en el cálculo del coeficiente de difusión de partículas a partir de datos de posición espacial XY del centroide de partículas individuales, registrados a lo largo de una secuencia temporal. El objetivo, ha sido poder valorar cambios de posición espacial de cada partícula de interés en el tiempo y con ello estudiar su grado de movilidad.

# 4. RESULTADOS

---

## 4.0. Resumen de los resultados obtenidos.

La presente memoria de tesis doctoral, ofrece un conjunto de resultados con carácter innovador en términos de configuración y dinámica del citoesqueleto de F-actina.

Los hallazgos en la organización espacial de la red de F-actina, incluyen el descubrimiento de una amplia distribución de las fibras de F-actina en las células nativas del tejido adrenomedular, contrastando con la distribución limitada a la periferia, detectada para las células aisladas. Unas organizaciones, consolidadas por la compartida organización, a ambos niveles, de la proteína citoesquelética fodrina. Aparte de estas diferencias, se describe la clara divergencia en los patrones de organización intracelular de vesículas y mitocondrias, entre las células cromafines aisladas, donde estas se organizan de un modo bipoblacional y las nativas, donde aparecen ampliamente extendidas en una sola población (unipoblacional). También se detectan diferencias en la organización citoplásmica entre las formas G y F de actina. No obstante, pese a la diferente configuración hallada para las: fibras, vesículas y mitocondrias, entre las células cromafines bovinas nativas y las aisladas, los datos de amperometría en población celular no muestran diferencias significativas en la cinética de secreción entre ambas. Además, el modelo

matemático utilizado para los estudios de cinética de secreción, respalda los resultados amperométricos en base a una compensación por parte del efecto combinado de vesículas y mitocondrias, que iguala los perfiles de secreción.

En términos dinámicos, los resultados demuestran la capacidad del citoesqueleto de F-actina para desarrollar una dinámica local, a modo de expansiones y retracciones, mediadas por el complejo F-actina - miosina II (complejo actomiosina). Estos eventos de expansión y retracción de la red cortical de F-actina, conducen el transporte local de organelas, implicando el desplazamiento “en bloque” de toda una región citoplásmica, bajo estas zonas, en respuesta a estimulación. Unido a ello, las cavidades internas de la red de F-actina cambian en tamaño y número en respuesta a estímulo, apareciendo así un auténtico remodelamiento intra-red. Además del hallazgo de todos estos eventos dinámicos y su vínculo funcional con procesos de transporte y secreción, la tesis ofrece la primera descripción de dos nuevas formas de dinámica citoesquelética: los cometas y los anillos de F-actina. Unas estructuras de nueva formación, bajo la condición de estímulo, ambas con una clara relevancia en el tráfico vesicular.

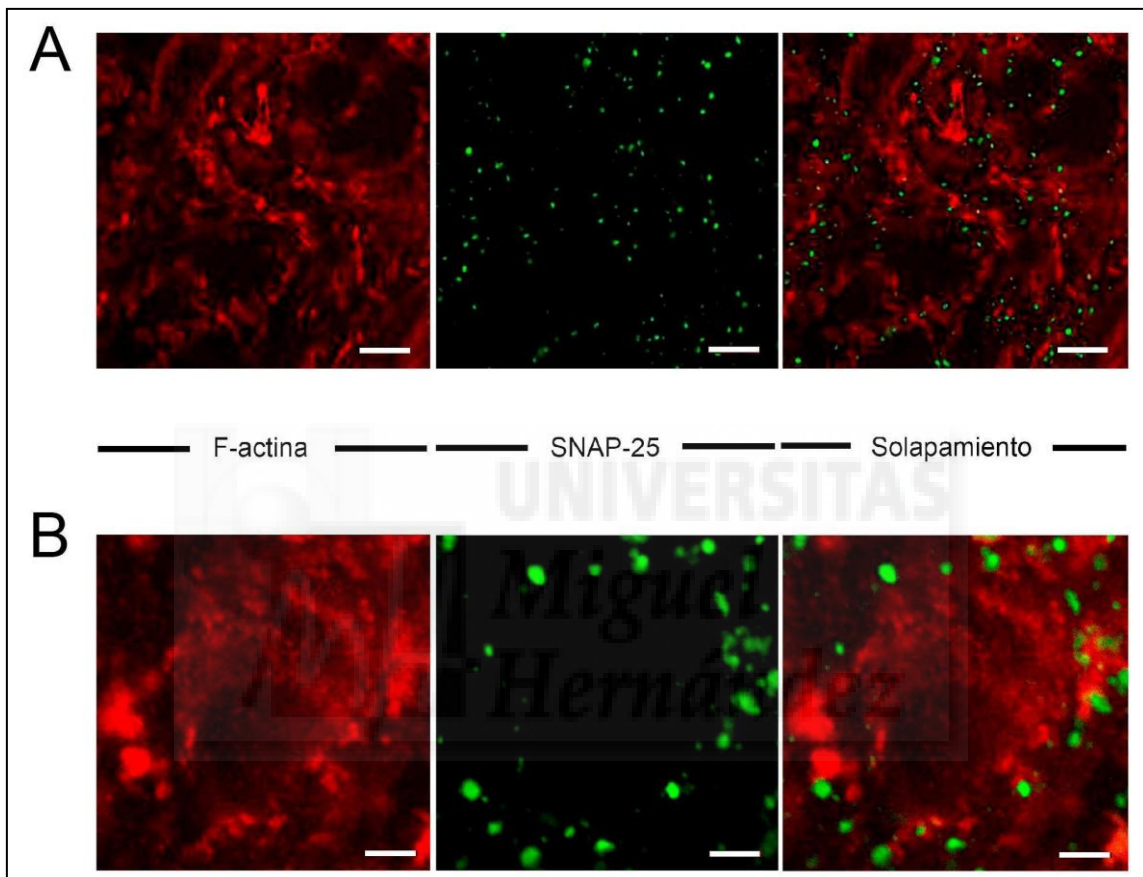
## **4.1. Arquitectura de citoesqueleto de F-actina:**

### 4.1.1. El citoesqueleto de F-actina presenta una organización diferenciada en las células cromafines bovinas nativas y aisladas.

Iniciamos estudios orientados a entender la organización celular y el comportamiento de la médula adrenal bovina como modelo fisiológico para estudios del proceso excitotico. Para este estudio se utilizaron rodajas tisulares obtenidas a partir de cortes ultra finos de la médula adrenal bovina (Materiales y Métodos 3.2). Estas muestras tisulares fueron sometidas a protocolos de inmunohistoquímica (Materiales y Métodos 3.4.3) de doble marcaje centrados principalmente en la visualización de dos elementos: las propias fibras de F-actina y las proteínas de membrana SNAP-25. Los anticuerpos utilizados para este estudio fueron un anticuerpo primario contra SNAP-25 (anticuerpo IgG policlonal desarrollado en cabra) que más tarde sería combinado con un anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo FITC (anti IgG de cabra desarrollado en mono) permitiendo el marcaje en verde de la proteína de interés mediante interacción secundaria. Las fibras de F-actina fueron reveladas en rojo mediante incubación con faloidina (1  $\mu\text{M}$ ) conjugada con el fluoróforo TRITC (Phalloidin-TRITC).

Por sí mismo, la obtención de dicho marcaje con calidad y nitidez en tejido adrenomedular, supuso un gran esfuerzo en tiempo y experimentación debido a la dificultad de penetración de los anticuerpos, así como la complejidad para su visualización nítida bajo microscopía confocal. Tras conseguir poner a punto el

marcaje tisular para los registros de microscopía confocal, se obtuvieron las imágenes de fluorescencia de las células cromafines nativas de la médula adrenal (Fig 27) con las que se abordaron los estudios.

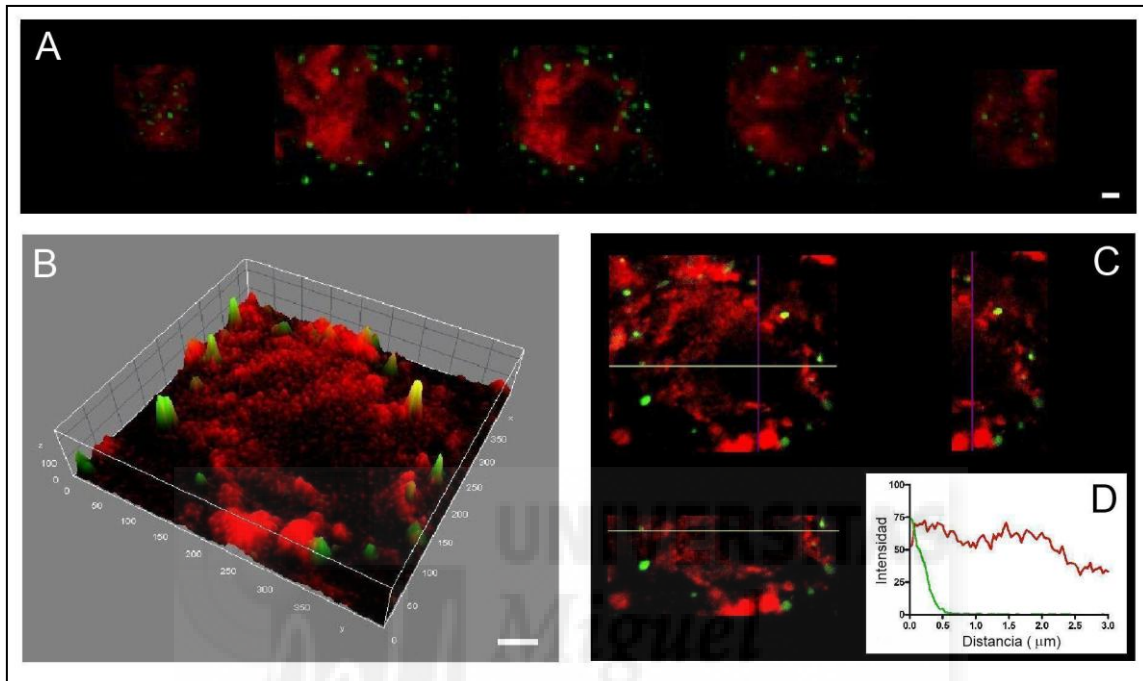


**Fig 27. Citoesqueleto de F-actina en células cromafines bovinas nativas.** A y B, Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de SNAP-25 (verde) y F-actina (rojo) de una sección de rodaja tisular adrenomedular a bajo aumento (1x) (A) y una célula nativa modelo inmersa en el tejido vista a gran aumento (5X) (B). Barras de 5  $\mu\text{m}$  (A) y 2  $\mu\text{m}$  (B).

Obtenidas las imágenes previamente descritas, estas fueron analizadas en los ejes Z y XY para una descripción detallada de la distribución del citoesqueleto de F-actina en las células nativas. Inicialmente, se procedió a estudiar la organización de las fibras de F-actina en volumen. Para ello, se

estudiaron los patrones de fluorescencia en los diferentes planos celulares en el eje Z (Figura 28, A). La visión en conjunto de los planos celulares analizados, desde la parte superior (top) hasta su base inferior (bottom), definía una amplia distribución citosólica para las fibras de F-actina en el volumen interno celular. Este concepto quedó reforzado con la proyección 3D (Fig 28, B), realizada en una de las células más representativas del estudio, donde se podía apreciar la notable continuidad citosólica de la red citoesquelética de F-actina.

Tras conocer la organización del citoesqueleto de F-actina en volumen, centramos nuestro interés en cuantificar la extensión de la red desde la línea de membrana plasmática (zona de interés para la ejecución de los procesos de secreción) hacia el interior celular (zona de interés para la organización de la maquinaria exocitótica). Este estudio estuvo centrado en analizar los perfiles de fluorescencia de F-actina en el eje XY (Fig 28, C) desde la línea de membrana plasmática, definida por proteínas SNAP-25, hacia el interior celular para una extensión total de 3  $\mu\text{m}$  de profundidad en el plano ecuatorial. El método de medición fue estandarizado para los perfiles de intensidad de F-actina (rojo) y de SNAP-25 (verde). Los valores de intensidad relativa obtenidos (N= 18 células nativas, procedentes de dos preparaciones diferentes), fueron promediados para cada marcaje (Fig 28, D). La extensión de la red abarcó toda la profundidad citosólica analizada confirmando el patrón de distribución antes descrito.

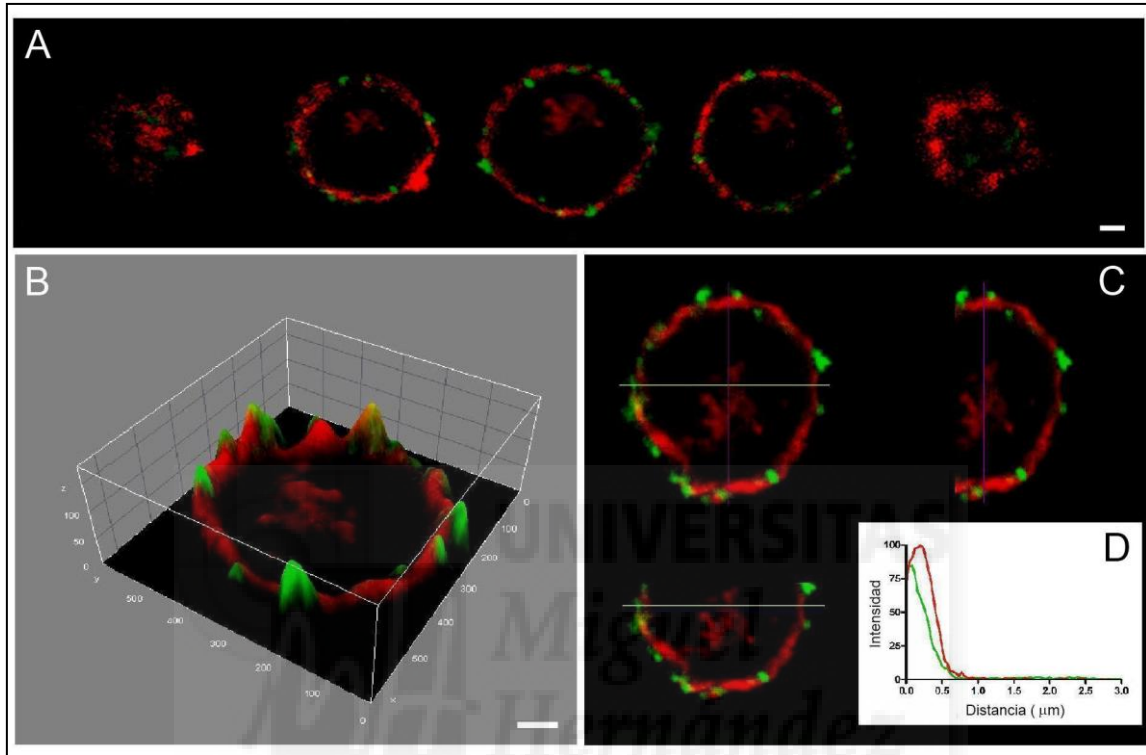


**Fig 28. Distribución del citoesqueleto de F-actina en célula cromafín bovina nativa.** A, Secuencia de imágenes de microscopía confocal de fluorescencia para la proteína SNAP-25 (verde) y F-actina (rojo) de los planos celulares en eje Z para un ejemplo modelo de célula cromafín nativa ordenados desde el “top” hasta el “bottom” (de derecha a izquierda de la imagen). B, Proyección tridimensional del plano ecuatorial representativa de la organización de fibras de F-actina en los tres ejes del espacio de una célula cromafín nativa. C, Célula nativa modelo para los registros de intensidad desarrollados en plano ecuatorial procesada para los ejes X e Y. D, Perfil de distribución para SNAP-25 (verde) y F-actina (rojo) en base a los datos de fluorescencia relativa individuales promediados. Barras de 1  $\mu\text{m}$ .



Obtenidos los resultados de la distribución de F-actina en la célula cromafín bovina nativa, se pretendía poder compararlos con la célula cromafín aislada. Para ello repetimos los inmunomarcajes, utilizados en las células nativas, para las células aisladas mantenidas en cultivo (Materiales y Métodos 3.4.2), así como los mismos tipos de análisis para los ejes: Z y X Y.

El análisis de la secuencia de planos en el eje Z para células aisladas (Fig 29, A), mostraba marcadas diferencias para la distribución en volumen del citoesqueleto de F-actina respecto a las células nativas. En las células aisladas, la distribución era principalmente periférica. Simulaba un anillo bajo la línea de la membrana plasmática en planos centrales y se mostraba a modo de red en zonas corticales: “top y bottom”. Además de la distribución periférica, también fueron halladas fibras de F-actina en la zona citoplásmica interna, cerca del núcleo. Esta red interna de F-actina, se mostraba polarizada y con cierta discontinuidad respecto al anillo periférico de fibras descrito, lejos de formar una red de distribución extensa entre las zonas cortical e interna como se detectó en las células nativas. La proyección 3D (Fig 29, B), mostraba claramente la F-actina periférica e interna, así como la discontinuidad citada entre ambas localizaciones. Haciendo uso de los registros fluorescentes (N= 16 células, procedentes de dos cultivos diferentes), se procedió a cuantificar la extensión de la red de F-actina en el eje XY (Fig 29, C) para el espacio definido entre la línea de membrana plasmática y el interior celular (3  $\mu\text{m}$ ), siguiendo el mismo método de medición anteriormente descrito y utilizado para las células cromafínes bovinas nativas. Los perfiles de intensidad relativa promedio (Fig 29, D), mostraron una estrecha extensión para la red de F-actina (1-1,5 micras), siendo esta muy cercana a la obtenida para las proteínas de membrana (SNAP-25).



**Fig 29. Distribución del citoesqueleto de F-actina en célula cromafín bovina aislada.** A, Secuencia de imágenes de microscopía confocal de fluorescencia para la proteína SNAP-25 (verde) y F-actina (rojo) de los planos celulares en eje Z para un ejemplo modelo de célula cromafín aislada ordenados desde el “top” hasta el “bottom” (de derecha a izquierda de la imagen). B, Proyección tridimensional del plano ecuatorial representativa de la organización de fibras de F-actina en los tres ejes del espacio de una célula cromafín aislada. C, Célula aislada modelo para los registros de intensidad desarrollados en plano ecuatorial procesada para los ejes X e Y. D, Perfil de distribución para SNAP-25 (verde) y F-actina (rojo) en base a los datos de fluorescencia relativa individuales promediados. Barras de 1  $\mu\text{m}$ .

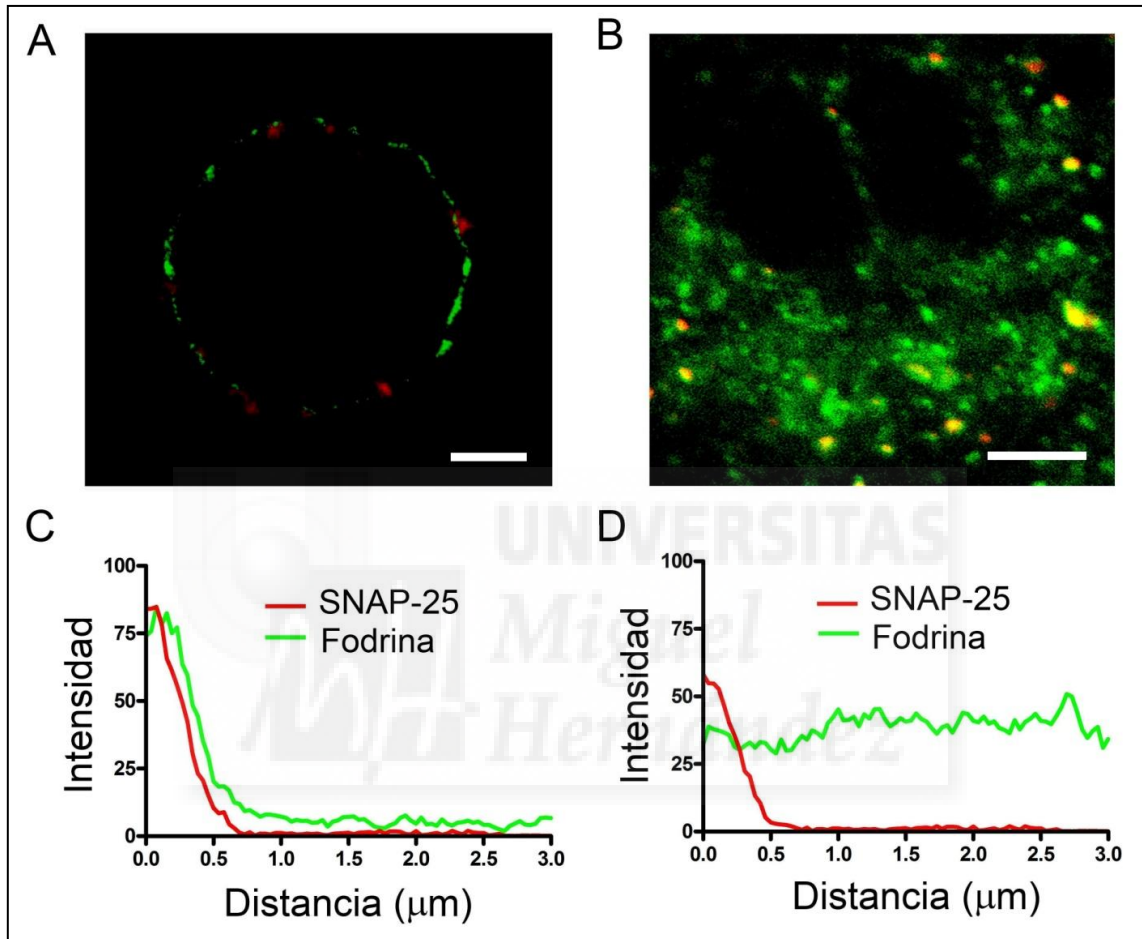
#### 4.1.2. La proteína citoesquelética fodrina presenta una distribución espacial equivalente a la de la F-actina en las células cromafines bovinas.

Conocida la distribución diferencial de fibras de F-actina en célula cromafín nativa y aislada, se plantea apoyar estos estudios con el análisis de proteínas asociadas a los microfilamentos de F-actina. Para ello se llevó a cabo el estudio de la organización espacial de la proteína fodrina, conocida como una proteína citoesquelética de la red de F-actina dada su vinculación a estas fibras (Burgoyne and Cheek, 1987a; Fujimoto et al., 1991; Fujimoto and Ogawa, 1987; Langley et al., 1986; Nakano et al., 2001).

Se diseñó un experimento de doble marcaje, con la proteína de interés fodrina (subunidad alfa) y SNAP-25 como delimitador de la línea de membrana. Este experimento se desarrollo paralelamente en célula cromafín bovina nativa y aislada mediante los protocolos inmunológicos de marcaje de histoquímica y citoquímica respectivamente (Materiales y Métodos 3.4.2 y 3.4.3). Se utilizaron dos anticuerpos primarios: uno anti alfa-fodrina (anticuerpo monoclonal isotipo IgG1 desarrollado en ratón) y otro contra SNAP-25 (anticuerpo policlonal isotipo IgG desarrollado en cabra). Posteriormente, se usaron dos anticuerpos secundarios contra cada uno de los primarios utilizados conjugados con fluorocromos diferentes (verde y rojo) para revelar el marcaje mediante interacción secundaria. Los anticuerpos secundarios usados fueron: un anticuerpo contra anti-alfa-fodrina (Anti-IgG de ratón desarrollado en cabra) conjugado con el fluorocromo FITC que se visualizaba en verde y un anticuerpo contra anti-SNAP-25 (Anti-IgG de cabra desarrollado en conejo) conjugado con rodamina que se observaba en color rojo.

Obtenidos los marcajes descritos en células cromafines bovinas nativas y aisladas, estas fueron analizadas en términos de intensidad (N= 11 células aisladas procedentes de dos cultivos diferentes; N= 16 células nativas procedentes de dos preparaciones de tejido adrenomedular diferentes) a fin de obtener los perfiles de distribución en eje XY desde la línea de membrana plasmática hacia el interior celular en plano ecuatorial, tal y como se procedió y está descrito en el resultado 4.1.1.

Los resultados de distribución obtenidos de este experimento (Fig 30), revelaron una organización corticalizada para la proteína fodrina en células aisladas (Fig 30, A y C), contrastada con una distribución ampliamente extendida en el espacio citosólico para las células nativas (Fig 30,B y D). Estos patrones de organización espacial presentaban una completa coincidencia con la distribución de fibras de F-actina descrita previamente (Resultado 4.1.1) para célula las nativas y aisladas.



**Fig 30. Distribución de la proteína citoesqueletal alfa-fodrina en célula cromafín bovina.** A y B, Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia para las proteínas SNAP-25 (rojo) y alfa-fodrina (verde), en célula cromafín aislada (A) y nativa (B). C y D, Perfiles promedio de intensidad relativa para las proteínas SNAP-25 (rojo) y alfa-fodrina (verde), en célula cromafín aislada (C) y nativa (D). Barras de 3 μm.



4.1.3. La densidad de fibras de F-actina y la proporción de parches de fodrina están conservados en la sección cortical de las células cromafines bovinas nativas y aisladas.

Conocidos los patrones de distribución para F-actina y alfa-fodrina en las células cromafines aisladas y nativas, se pretendía estudiar el grado de conservación de la densidad de las fibras y la proteína fodrina asociada a las mismas entre ambos tipos celulares. Para alcanzar este objetivo, se propuso hacer un estudio centrado en cuantificar la cantidad de fibras de F-actina presentes por unidad de espacio citoplásmica, es decir, la densidad de F-actina al margen de la distribución citoplásmica, de la que ya se habían aportado datos que respaldaban las diferencias notorias entre células cromafines nativas y aisladas.

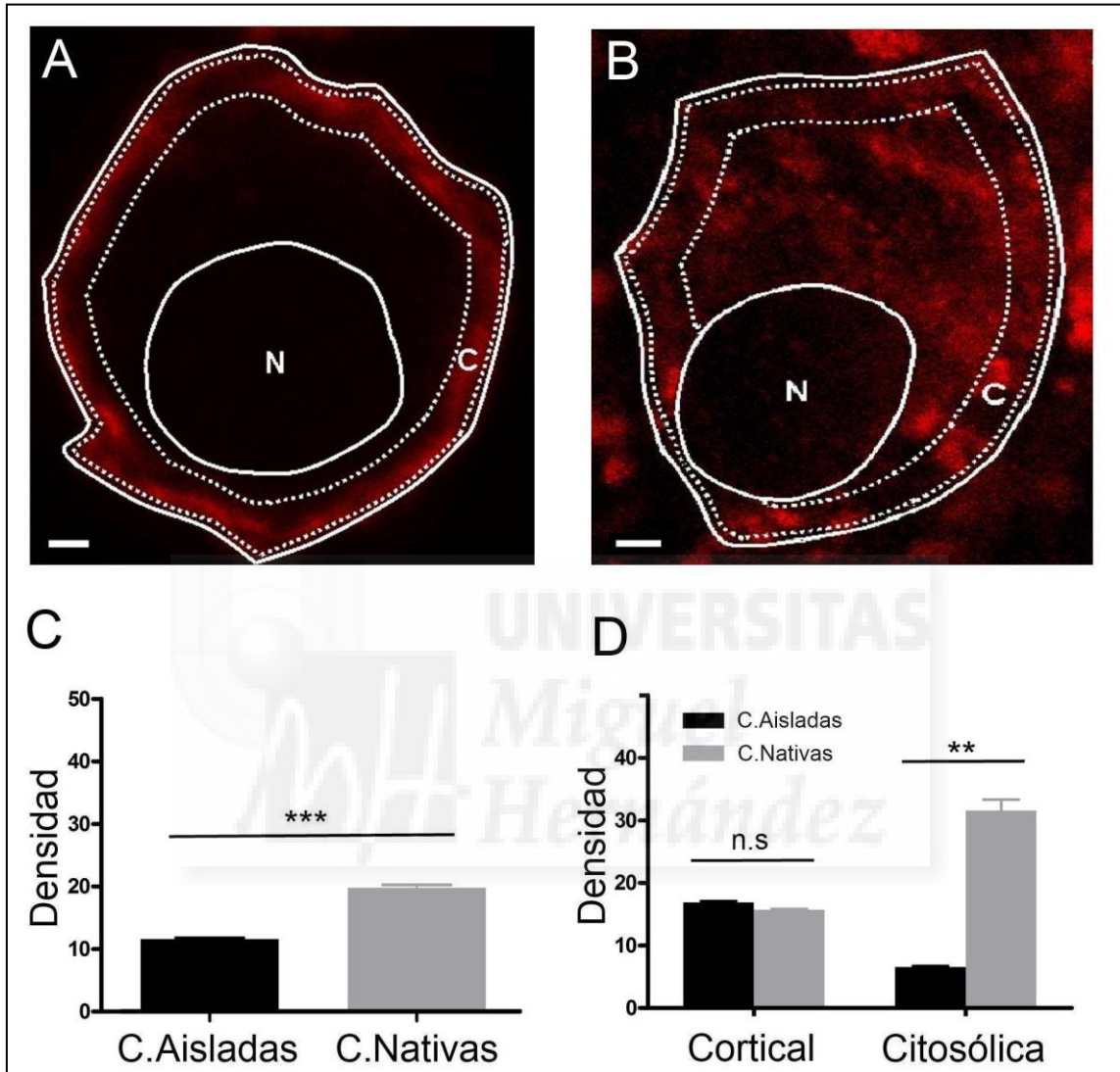
En los análisis de densidad, se estudiaron tres zonas: área celular, esto es, todo el espacio citoplásmico delimitado externamente por la membrana plasmática excluyendo el espacio del núcleo y otras dos zonas resultantes de la división de esta previa: zona cortical (definida a modo de anillo periférico de una micra de anchura localizado bajo la línea de membrana plasmática) y zona citosólica (comprendida por el resto de espacio interno de la célula excluyendo la zona cortical y el núcleo). La primera de las secciones antes citadas (área celular), nos daría información sobre la densidad total y fue establecida con el fin de comparar en términos de densidad lo que previamente se había sometido a comparación en términos de organización espacial con datos de intensidad. Las otras dos, informarían de la densidad de fibras de F-actina por sectores celulares. Especial relevancia tenía la zona cortical, planteada para analizar en

detalle la densidad de fibras en la zona más cercana a la membrana plasmática, considerada la zona activa para los procesos de secreción.

Para llevar a cabo los análisis de densidad, se reanalizaron las imágenes obtenidas en los experimentos destinados a estudios de distribución del citoesqueleto de F-actina descritos en el Resultado 4.1.1 (N= 20 células nativas; N= 20 células aisladas precedentes, en ambos casos, de dos preparaciones diferentes). No obstante, en esta ocasión se sometió a estudio solo el marcaje fluorescente de F-actina (rojo) y se utilizó el marcaje fluorescente de SNAP-25 (verde) como guía para definir el límite celular, con una extremada relevancia en caso de la muestra tisular a fin de medir células individualmente.

La densidad total de fibras de F-actina resultó significativamente menor en células cromafines aisladas frente a nativas (Fig 31, C). Este dato era esperado, considerando la distribución periférica predominante de F-actina hallada para las células aisladas (Resultado 4.1.1). Dicho patrón de distribución, resultaba en una notable reducción de fibras en la zona citosólica interna y era causante de la menor densidad hallada (Fig 31, A y B). No obstante, el estudio detallado de la densidad de F-actina en las diferentes secciones establecidas para el espacio interno celular (zona cortical y citosólica) mostraron que, pese a las esperadas diferencias de densidad en la zona citosólica (Fig 31, D), la densidad de F-actina en la zona cortical no resultó ser significativamente diferente entre células aisladas y nativas.

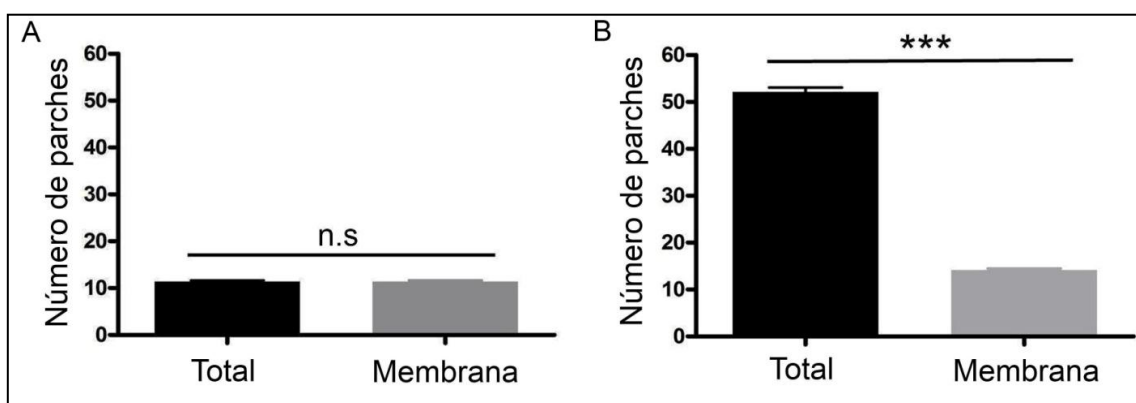




**Fig 31. Densidad de fibras de F-actina en células cromafines bovinas.** A y B, Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de F-actina (rojo) en células cromafines aisladas (A) y células nativas (B). Las líneas blancas continuas delimitan externamente el perfil celular y el núcleo (N). Las líneas blancas discontinuas definen la zona cortical (c) de 1 micra de anchura. C, Valores promedio de densidad de F-actina total para células aisladas (C. aisladas) y nativas (C. nativas). D, Valores promedio de densidad de F-actina en zona cortical y citosólica para las células aisladas y nativas. Los datos promedio se muestran como  $media \pm SEM$ . Test estadístico Two way ANOVA. Niveles de significancia: n.s: diferencia no significativa, \*\*  $P \leq 0,01$  y \*\*\*  $P \leq 0,001$ . Barras de  $1 \mu m$ .

Tras la obtención de estos resultados y conociendo la íntima relación, descrita en términos de distribución, entre la proteína fodrina y el citoesqueleto de F-actina, se planteó como estudio complementario la cuantificación del número de parches totales y corticales de esta proteína en células nativas y aisladas. Para este estudio, se utilizaron de nuevo las imágenes con el marcaje de alfa-fodrina, previamente analizadas para obtener los perfiles de distribución de la misma (Resultado 4.1.2).

El estudio fue llevado a cabo en células cromafines aisladas (N= 11 células aisladas procedentes de dos cultivos diferentes) y nativas (N= 16 células nativas procedentes de dos preparaciones diferentes de tejido adrenomedular) cuantificándose en cada una de ellas, el número total de parches fluorescentes en el área total celular (excluyendo núcleo) y en la zona cortical (zona periférica de una micra de anchura) a fin de definir el número total y cortical de parches de alfa-fodrina respectivamente. Estos datos fueron promediados y comparados mediante el test estadístico “Two-way ANOVA” (Fig 32).



**Fig 32. Cuantificación de los parches de fodrina en células cromafines bovinas.** A y B, Número de parches de alfa fodrina totales y corticales en célula cromafín aislada (A) y nativa (B). Los datos promedio se muestran como media±SEM. Test estadístico Two way ANOVA. Niveles de significancia: n.s; diferencia no significativa y \*\*\*  $P \leq 0.001$ .

El valor medio de número parches totales fue significativamente mayor que el de parches corticales en células cromafines nativas, mientras que la comparación entre estos no mostró diferencias significativas en células cromafines aisladas. Estos datos, vinculaban de nuevo el patrón de organización de las fibras de F-actina y la proteína fodrina y coincidían con las distribuciones descritas para ambos en células nativas y aisladas. Sin embargo, el resultado de mayor relevancia fue la similitud hallada para los parches de fodrina en la zona cortical de células aisladas y nativas. Este dato, unido a la densidad cortical de F-actina compartida entre ambas células, ofrecía una idea sólida sobre la alta conservación del nivel cortical de la red de F-actina y las proteínas citoesqueletales asociadas a la misma, como es el caso de la fodrina.





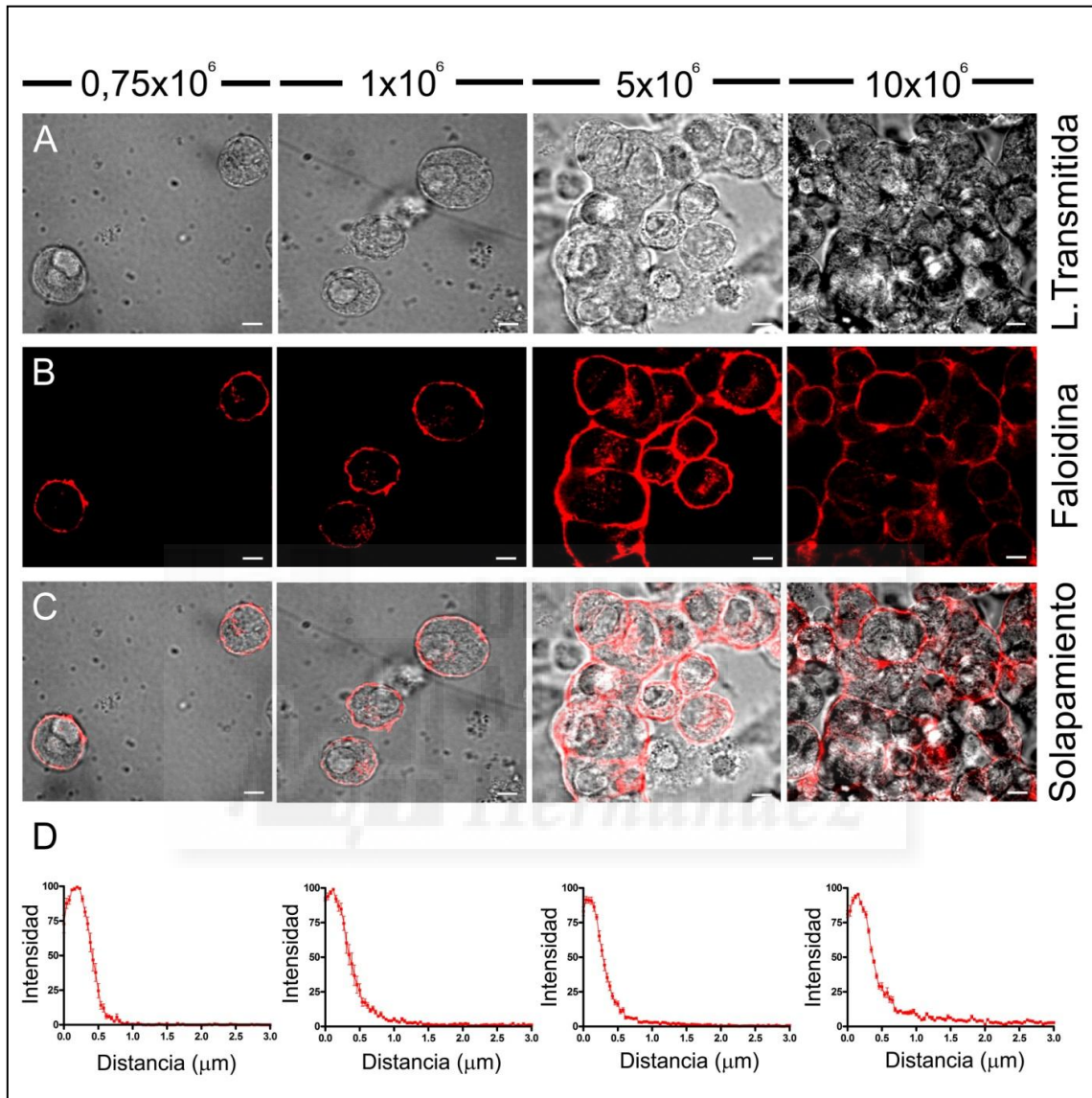
#### 4.1.4. El incremento de los contactos entre las células cromafines tras el aislamiento celular no influye en la distribución de la F-actina.

Tratando de comprender la causa de la diferente organización hallada para el citoesqueleto de F-actina tras el aislamiento celular desde la médula adrenal bovina, se plantea la investigación del posible elemento/s implicado/s. Uno de los elementos propuestos a estudio, como factor de relevancia en la transición desde una amplia distribución de fibras a una organización periférica de las mismas, fue la pérdida de la estructuración celular característica del tejido y con ello los contactos celulares post-aislamiento. Para analizar el efecto de este factor, se propuso un experimento con células cromafines aisladas de médula adrenal, obtenidas siguiendo el protocolo descrito (Materiales y Métodos 3.1) en la presente memoria de tesis doctoral, con la modificación del mismo en términos de la densidad de siembra en la placa. En esta ocasión, se trabajó con cuatro niveles diferentes de densidad de siembra:  $0,75 \times 10^6$  (densidad habitual),  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  y  $10 \times 10^6$  células por placa, con el objetivo de generar un incremento gradual en la probabilidad de contactos célula-célula y evaluar su efecto en la organización de la red de F-actina. Los ejemplos celulares más representativos, para cada una de estas densidades ensayadas (Fig 33, A-C), mostraban por sí mismos la efectividad del incremento en la densidad de siembra sobre el aumento de los contactos entre células.

A continuación, se procedió a marcar con faloidina-TRITC  $1 \mu\text{M}$  (fluorescencia roja) cada una de las muestras para poder visualizar las fibras de F-actina en las células y analizar el efecto de los contactos celulares sobre la organización de las mismas. Los registros de microscopía confocal fueron llevados a cabo con adquisición dual secuencial de la señal de fluorescencia roja y la luz transmitida

ya que esta última nos permitía conocer el estado de las células registradas. Esto, resultaba realmente importante para detectar posibles células en estadios de apoptosis o cercanos a la muerte celular causados por las altas densidades de siembra ensayadas. Con ello, se pretendía poder descartarlas pudiendo centrar el estudio en células sanas a fin de evitar otros posibles factores influyentes y analizar el efecto directo de los contactos celulares sobre la organización de F-actina.

Para cada densidad del ensayo, se analizó la distribución celular del citoesqueleto ( $n= 22$  células a la densidad de  $0,75 \times 10^6$ ,  $n= 25$  células a  $1 \times 10^6$ ,  $n= 18$  células a  $5 \times 10^6$  y  $n= 20$  células a  $10 \times 10^6$ ) en base a los perfiles de intensidad de F-actina desde la línea de membrana plasmática (definida con ayuda de la luz transmitida) hacia el interior celular (3 micras). Los perfiles de intensidad fueron promediados de modo independiente para cada una de las densidades de ensayo (Fig 33, D). Estos perfiles promedio, mostraron una organización de F-actina periférica conservada en todas las densidades de siembra e independiente de la existencia del mayor grado de contactos celulares. A la vista de estos resultados, la conclusión fue que el “factor contacto célula-célula” no ejercía efecto sobre la organización citoesqueletal, al menos tras el aislamiento celular.



**Fig 33. Distribución de las fibras de F-actina en célula cromafín bovina a diferentes densidades de siembra en placa.** A-C, Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de F-actina (rojo) y luz transmitida en células cromafínes aisladas cultivadas a diferentes densidades:  $0,75 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^6$ . D, Perfiles de distribución en base a los valores promedio de intensidad relativa de F-actina para las diferentes densidades ensayadas. Los datos promedio se muestran como  $\text{media} \pm \text{SEM}$ . Barras de  $2 \mu\text{m}$





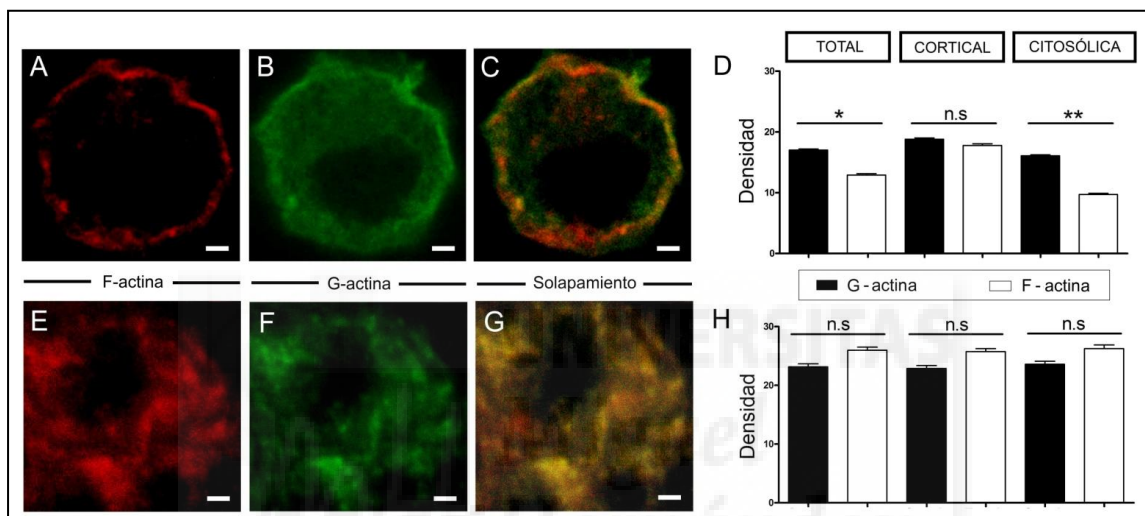
4.1.5. Los niveles de actina en su forma monomérica (G) y polimerizada (F) difieren entre las células cromafines bovinas nativas y aisladas.

En línea con la búsqueda de otros posibles factores implicados en la diferencial distribución del citoesqueleto de F-actina entre células cromafines bovinas aisladas y nativas, se focalizó la investigación en describir tales diferencias en base a una alteración en los procesos de polimerización de actina causada por el aislamiento celular y responsable de la existencia de niveles distintos de la forma globular o monomérica de actina (G-actina) y la polimerizada (F-actina) para las diferentes zonas cortical y citosólica entre células aisladas y nativas. Para abordar este estudio, se diseñó un experimento de doble marcaje a fin de poder visualizar simultáneamente la G-actina y F-actina en células aisladas y nativas. La G-actina, se marcó con fluorescencia verde haciendo uso de un anticuerpo primario anti-G-actina (anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón desarrollado en conejo) revelado por un anticuerpo secundario contra anti-G-actina conjugado con FITC (Anti-IgG de ratón desarrollado en cabra) y la F-actina se reveló en fluorescencia roja mediante incubación con faloidina-TRITC 1  $\mu$ M.

Preparadas las muestras con el marcaje previamente descrito, las células fueron analizadas en términos de intensidad por unidad de área, es decir, en términos de densidad (n=20 células aisladas; n=20 células nativas procedentes, en ambos casos, de dos procedimientos diferentes). La densidad de actina, fue estudiada en tres zonas: área celular excluyendo el espacio nuclear (densidad total), área cortical definida por una franja periférica de una micra de anchura en todo su perímetro (densidad cortical) y área citosólica obtenida por substracción del area cortical y nuclear al area celular (densidad citosólica). Las densidades

fueron cuantificadas y promediadas de modo independiente para cada sección de estudio.

El marcaje fluorescente de G-actina (verde) y F-actina (rojo), mostró una distribución similar en las células nativas, caracterizada por una extensión citosólica amplia en ambos casos (Fig 34, E-G). En las células aisladas, a pesar de mantener la distribución de G-actina ampliamente extendida en el citoplasma celular como en las células nativas, la F-actina quedaba limitada a la zona periférica (Fig 34, A-C). Los valores promedio de densidad (Fig 34, D y H), para cada una de las variantes de actina en cada una de las secciones de estudio, apoyaron tales distribuciones. Además, los datos informaban sobre una proporción equilibrada para ambas formas de actina tanto en el nivel cortical, citosólico como en toda el área celular de las células nativas (Fig 34, H), cumpliéndose esto solo en la zona cortical de las células aisladas (Fig 34, D). A pesar de las diferencias encontradas, existía una presencia conservada de G-actina en todo el espacio citoplásmico celular entre las células nativas y aisladas y en base a estos resultados, parecía evidente que no existiera una pérdida de G-actina post-aislamiento que pudiera responder a la menor densidad interna de F-actina en las células en cultivo.



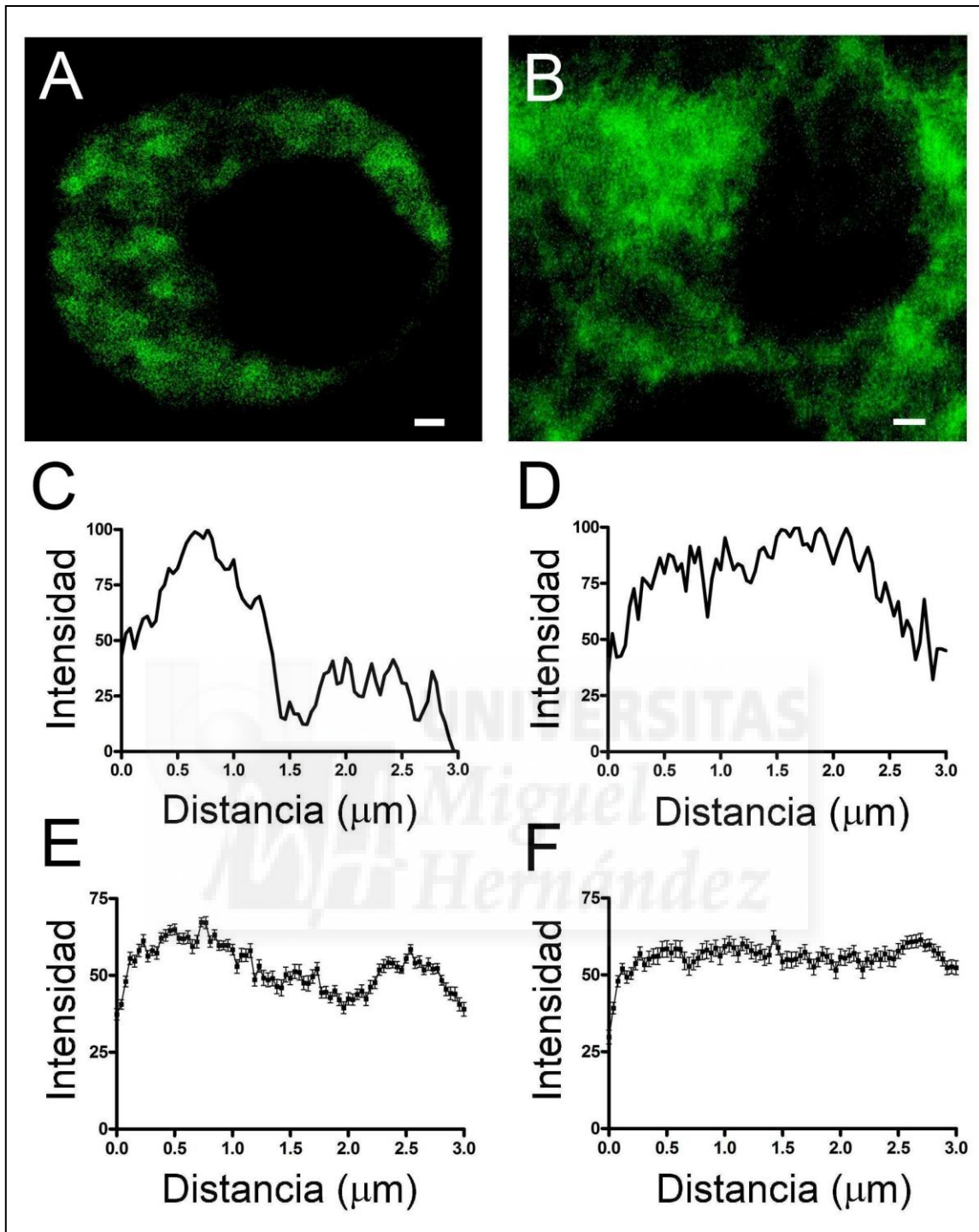
**Fig 34. Densidad de la actina globular (G) y polimerizada (F) en células cromafines bovinas.** A-C y E-G, Imágenes de microscopía confocal de F-actina en fluorescencia roja (A y E) y G-actina en verde (B y F) en células cromafines aisladas (A-C) y nativas (E-G). C y G, Imágenes de microscopía confocal resultantes del solapamiento de los canales fluorescente rojo y verde. D y H, Valores promedio de densidad de G-actina (barras negras) y F-actina (barras blancas) para el área total celular, la zona cortical y el espacio citoplásmico en células cromafines aisladas (D) y nativas (H). Los datos promedio se muestran como media $\pm$ SEM. Test estadístico Two way ANOVA. Niveles de significancia: n.s; diferencia no significativa, \*  $P \leq 0,05$  y \*\*  $P \leq 0,01$ . Barras de 1  $\mu$ m.



#### 4.1.6. Los gránulos cromafínes y las mitocondrias presentan una organización citoplásmica diferenciada entre las células cromafínes bovinas nativas y aisladas.

A fin de estudiar si una distribución de F-actina notoriamente diferente, entre célula cromafín nativa y en cultivo, podría afectar a la distribución de orgánulos celulares, se planteó el estudio de la distribución espacial de dos de las organelas clave en el proceso biológico de la secreción. De un lado, las mitocondrias, implicadas en la señal de calcio durante la exocitosis y por otro, las vesículas o gránulos cromafínes destinados a fusionarse en secreción. El objetivo del estudio, era describir la organización citoplásmica de ambas organelas celulares en células cromafínes bovinas aisladas y nativas.

Inicialmente, se procedió a desarrollar la técnica de inmunomarcaje para vesículas utilizando un anticuerpo primario contra la proteína DBH (anticuerpo policlonal IgG desarrollado en ratón) y un anticuerpo secundario contra este primario (Anti-IgG de ratón desarrollado en burro) conjugado con el fluoróforo FITC (verde) en células cromafínes aisladas y nativas. El objetivo, era hacer una primera comparación de los patrones de distribución vesicular, entre ambos niveles celulares, en base a los perfiles de fluorescencia desde la línea de membrana plasmática hacia el interior celular en una extensión total de 3 micras. Las imágenes de microscopía confocal (Fig 35, A-B), mostraron los primeros indicios sobre las diferencias notorias definidas por los perfiles de intensidad (Fig 35, C-F) en cuanto a la organización espacial de gránulos entre células aisladas y nativas, resultando en una organización bipoblacional para las células aisladas (Fig 35, C y E) y monopoblacional en las células nativas (Fig 35, D y F).



**Fig 35. Distribución vesicular en células cromafines bovinas.** A y B, Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de la proteína vesicular DBH (verde) en células cromafines aisladas (A) y nativas (B). C y D, Perfiles modelo de intensidad de fluorescencia para DBH en la célula aislada (C) y nativa (D). E y F, Perfiles promedio de intensidad de fluorescencia para DBH en células aisladas (E) y nativas (F). Los datos promedio se muestran como  $\text{media} \pm \text{SEM}$ . Barras de 1  $\mu\text{m}$ .

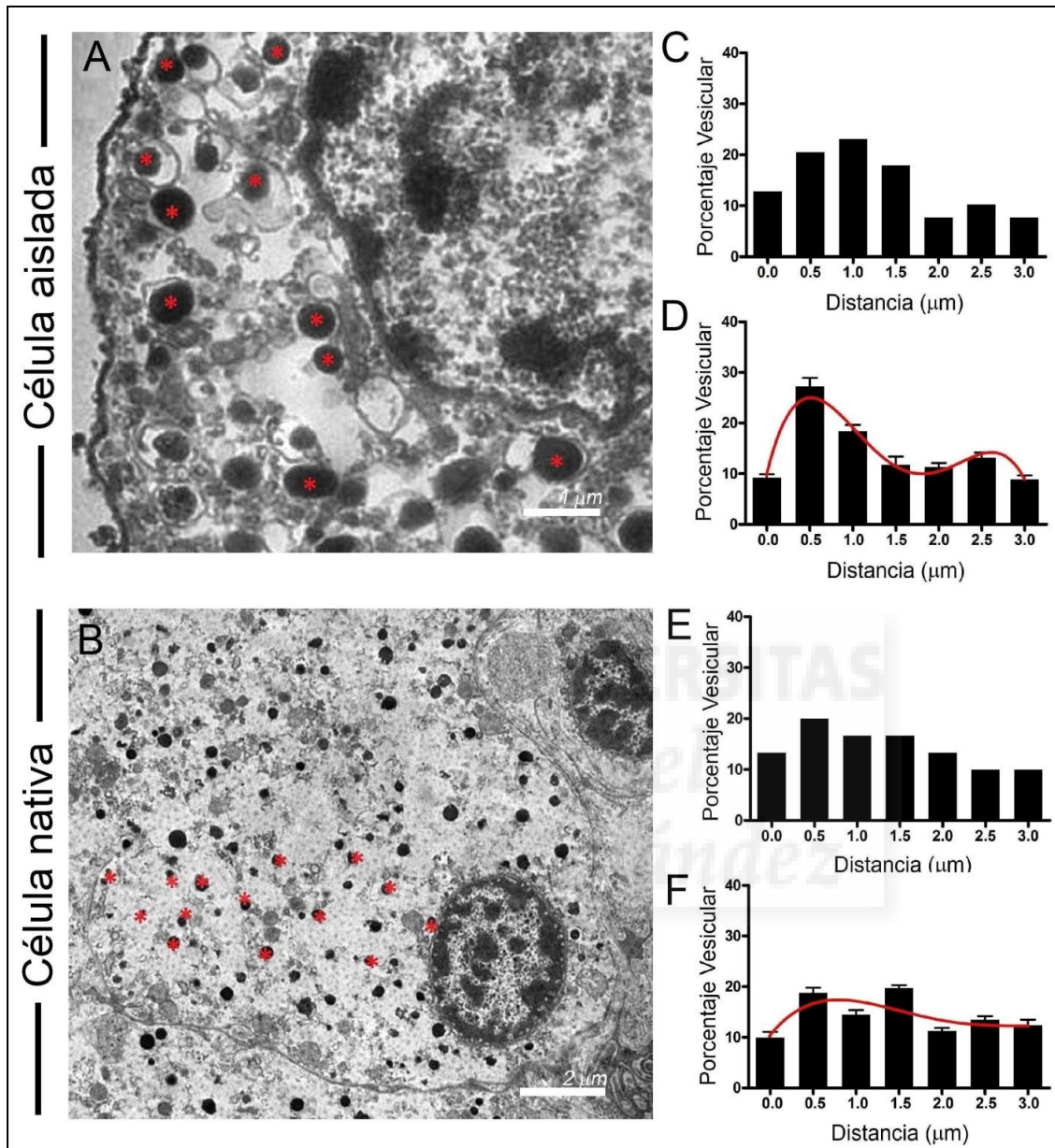
Las imágenes de inmunomarcaje obtenidas, pese a ser muy útiles para la primera aproximación al patrón de distribución de las organelas de interés, resultaron complejas para llevar a cabo una cuantificación de estructuras individuales lo que dificultaba hacer estudios de distribución basados en proporciones de las organelas. En busca del análisis cuantitativo de ambas estructuras (vesículas y mitocondrias), el estudio se orientó hacia la microscopía electrónica de transmisión (MET). Una técnica de imagen, que nos permitía ver gránulos y mitocondrias como unidades independientes.

A diferencia de las imágenes de microscopía confocal de fluorescencia, donde se podían separar los canales y estudiar por separado los marcajes diferentes para individualizar el análisis de cada tipo de estructura implicada en el experimento, las adquisiciones de microscopía electrónica ofrecían una única imagen de la célula y por ello era preciso establecer unos criterios morfológicos de selección. En el caso de mitocondrias, su identificación estuvo basada en una morfología alargada (aunque también las había esféricas) de entre 375-500  $\mu\text{m}$  de profundidad y de hasta una 1  $\mu\text{m}$  de longitud, con un interior típico cargado de membranas formando crestas y una matriz moderadamente electrodensa (Coupland, 1965a; Coupland and Weakley, 1968; Sasaki, 2010). En el caso de los gránulos, la selección sobre la imagen, estaba focalizada en estructuras de perfil entre ovalado y redondo con apariencia dependiente del método de fijación utilizado. En este caso, dado el uso combinado de glutaraldehído (fijación) y tetraóxido de osmio (post-fijación), en el protocolo de preparación de las muestras para su visualización con MET (Materiales y Métodos 3.8.2.2), los gránulos cromafines eran estructuras intensamente electro densas. Presentaban, a menudo, una membrana envolvente formada por tres capas que

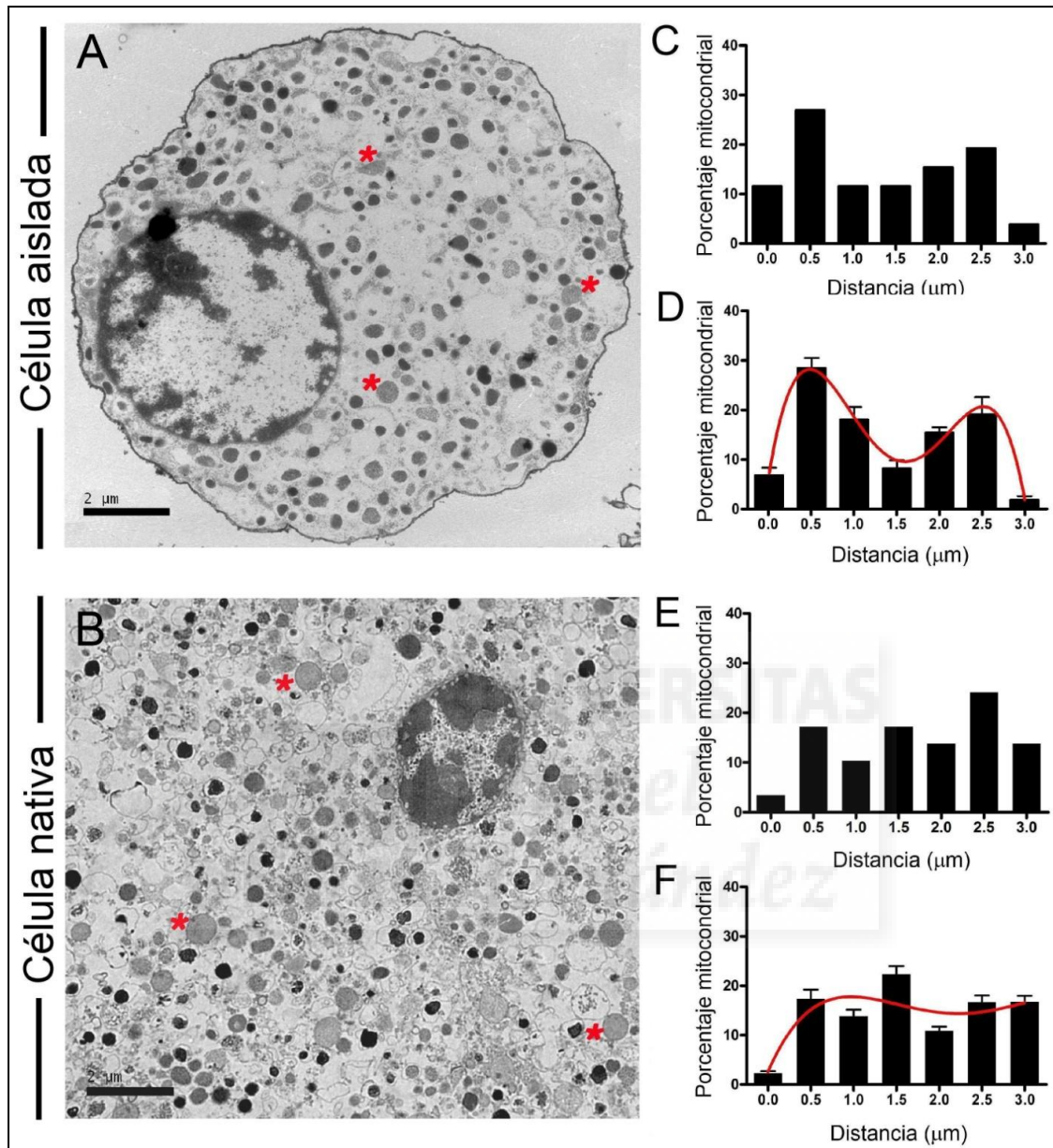
actuaba como una única unidad. Esta, podía estar en contacto directo con el contenido de los mismos o podía separarse de la sustancia interna electro densa por un halo periférico de anchura variable. En aquellos gránulos situados cerca de la membrana plasmática celular, la membrana vesicular podía mostrar diferentes grados de contacto y/o fusión con esta (Coupland, 1965a; Coupland, 1965b; Coupland and Weakley, 1968).

Con las bases establecidas para la correcta identificación de cada una de las estructuras, se aplicó el filtro threshold en las imágenes obtenidas y posteriormente se inició el análisis cuantitativo. Este análisis consistió en cuantificar mitocondrias y gránulos cromafines individualmente desde la línea de membrana hacia la envoltura nuclear haciendo uso de un cuadro de medición establecido en el plano ecuatorial celular con una longitud total de tres micras. El objetivo de dicha cuantificación, era obtener la proporción de organelas por unidad de distancia y con ello definir su frecuencia de distribución (Fig 36 y 37). El estudio se llevó a cabo en células cromafines aisladas (N= 10 células, 308 vesículas; N= 12 células, 224 mitocondrias) y nativas (N= 10 células, 302 vesículas; N= 10 células, 247 mitocondrias). Los datos obtenidos para ambas organelas, fueron promediados por separado y sobre los valores promedio se aplicó el ajuste binomial (Fig 36 y 37, D y F). Estos ajustes binomiales, dibujaron el patrón de organización espacial definido por las frecuencias de distribución encontradas, resultando en un perfil bipoblacional para las vesículas (Fig 36, D) y las mitocondrias (Fig 37, D) en las células cromafines aisladas y un perfil monopoblacional extendido para ambas organelas en las células nativas. (Fig 36, F; Fig 37, F)





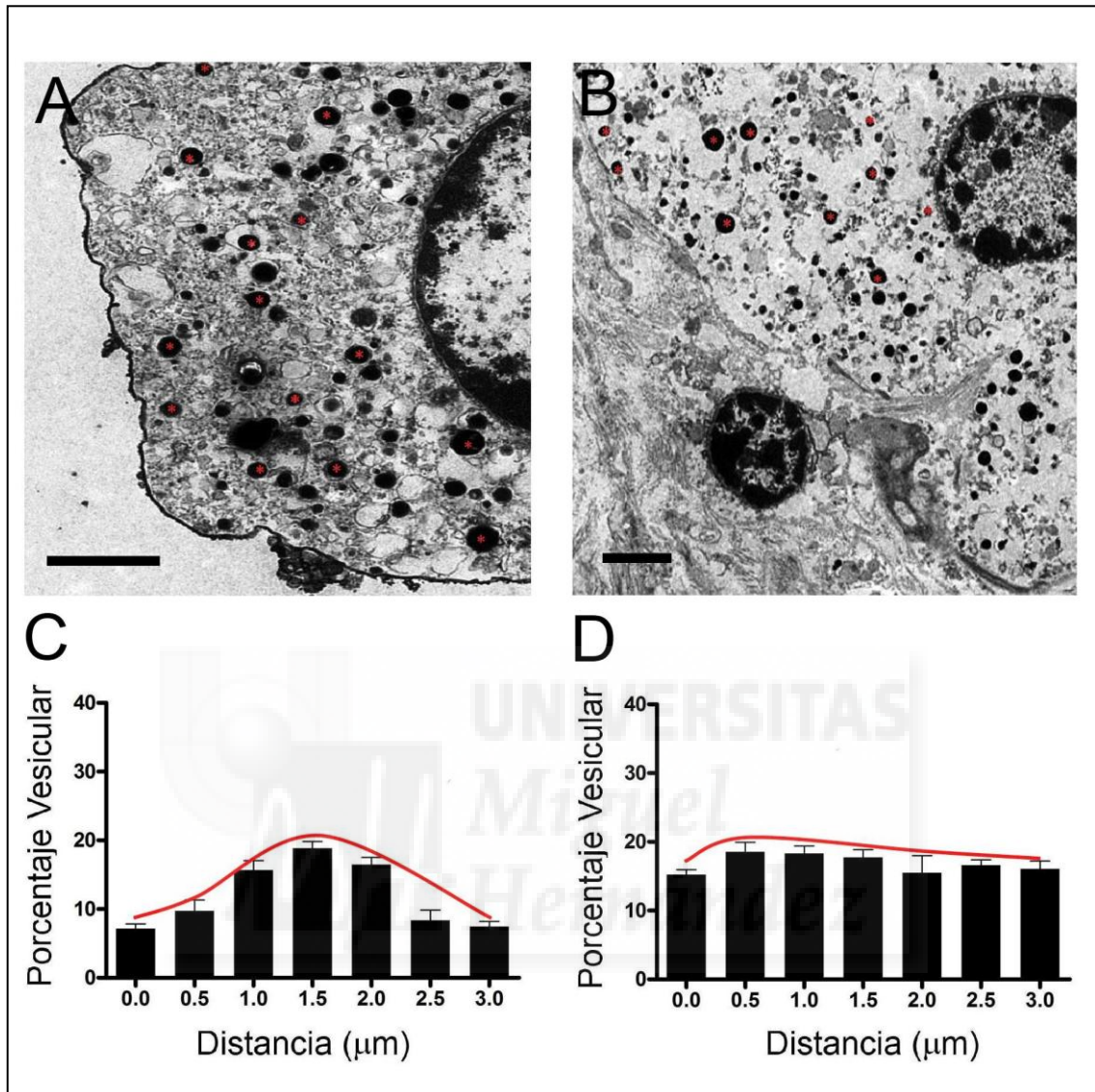
**Fig 36. Distribución vesicular en célula cromafín bovina.** A y B, Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de una célula cromafín aislada (A) y nativa (B). Los asteriscos rojos marcan algunos gránulos ejemplo sobre las imágenes. C y E, Frecuencia de distribución vesicular modelo en célula aislada (C) y nativa (E). D y F, Frecuencia de distribución vesicular promedio para células aisladas (D) y nativas (F). Los datos promedio se muestran como  $\text{media} \pm \text{SEM}$ . Las líneas rojas corresponden al mejor ajuste binomial a la distribución de datos. Barras de 1  $\mu\text{m}$  (A) y 2  $\mu\text{m}$  (B).



**Fig 37. Distribución mitocondrial en célula cromafín bovina.** A y B, Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de una célula cromafín aislada (A) y nativa (B). Los asteriscos rojos marcan algunas mitocondrias ejemplo sobre las imágenes. C y E, Frecuencia de distribución mitocondrial modelo en célula aislada (C) y nativa (E). D y F, Frecuencia de distribución mitocondrial promedio para células aisladas (D) y nativas (F). Los datos promedio se muestran como  $\text{media} \pm \text{SEM}$ . Las líneas rojas corresponden al mejor ajuste binomial a la distribución de datos. Barras de 2  $\mu\text{m}$ .

A continuación, se procedió estudiar la posible conexión entre la organización espacial hallada para estas organelas y las propias fibras de F-actina, centrandó nuestra atención fundamentalmente en los gránulos cromafines. Para ello, se hizo uso de un conocido agente disruptor de los microfilamentos de F-actina llamado Latrunculina A, abreviado comúnmente como: Lat-A (Braet et al., 1996; Coue et al., 1987). El objetivo, era poder evaluar la organización vesicular bajo esta condición experimental y compararla con la distribución obtenida previamente. Los cultivos de células cromafines aisladas y rodajas de médula adrenal, fueron incubados con esta toxina a una concentración de 1  $\mu$ M durante una hora y posteriormente tratados para su análisis bajo MET. Las imágenes obtenidas, fueron analizadas del mismo modo en que se procedió anteriormente para la obtención de las distribuciones de frecuencia (Fig 36 y 37). Los resultados, incluidos en la figura 38, demostraban el claro efecto de la disrupción citoesqueletal de F-actina sobre la configuración espacial de los gránulos cromafines. La organización vesicular bipoblacional, característica de células cromafines aisladas, se convirtió en una distribución de tipo unipoblacional asemejándose a la descrita para la célula cromafín nativa. Estos datos, reflejaban el vínculo entre las fibras de F-actina y la posición espacial vesicular, dejando lejos el papel del azar en su disposición citosólica.





**Fig 38. Distribución vesicular en células cromafines bovinas tratadas con Latrunculina A.** A y B, Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de una célula aisladas (A) y nativa (B). Los asteriscos rojos marcan algunos gránulos ejemplo sobre las imágenes. C y D, Frecuencia de distribución vesicular promedio en célula aislada (C) y nativa (D). Los datos promedio se muestran como  $\text{media} \pm \text{SEM}$ . Las líneas rojas corresponden al mejor ajuste binomial a la distribución de datos. Barras de  $1 \mu\text{m}$ .

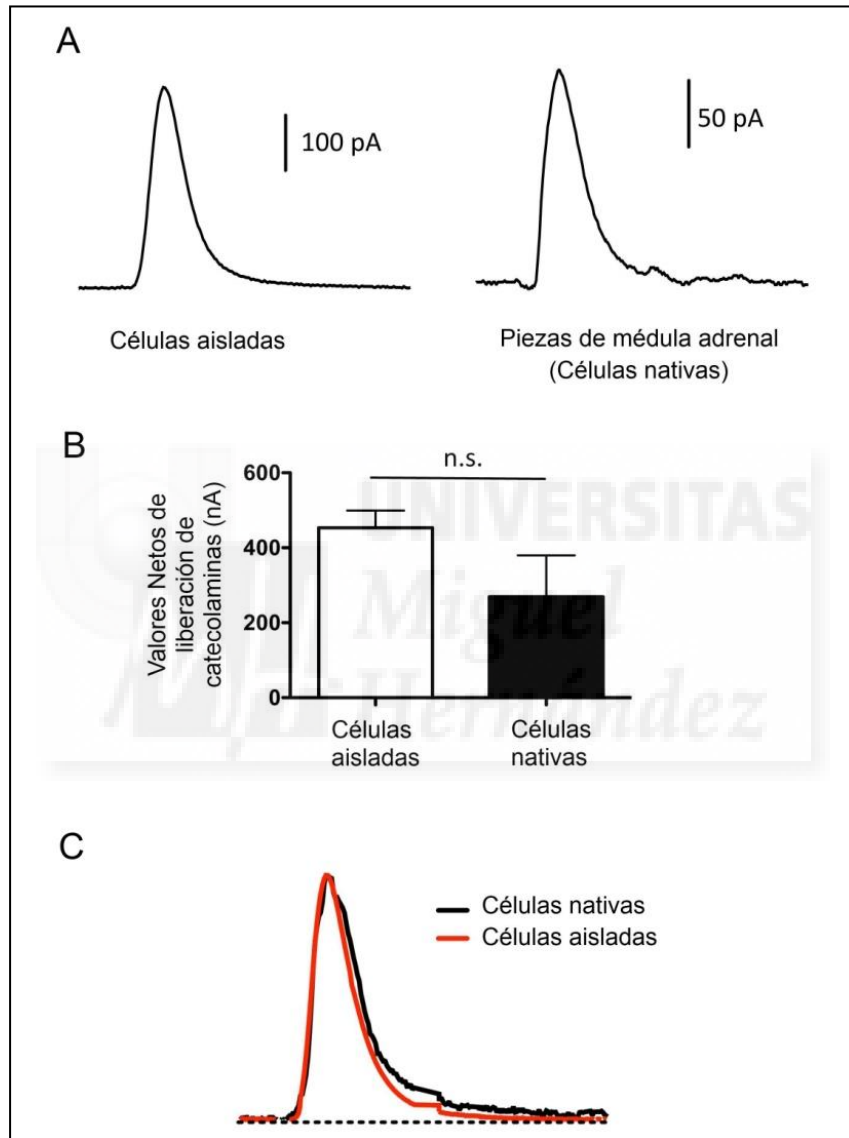
#### 4.1.7. Los datos amperométricos no revelan variaciones significativas en la cinética de secreción entre las células cromafines bovinas nativas y aisladas.

A raíz de la distribución diferencial hallada en: microfilamentos de F-actina, vesículas y mitocondrias, entre células cromafines bovinas aisladas y nativas, se planteó el análisis electrofisiológico de la secreción a fin de encontrar una posible influencia de los resultados de organización para tales estructuras y la cinética de secreción en estas células. Para desarrollar este estudio, se llevo a cabo una colaboración con el grupo de investigación del Dr. Luis Gandía en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina perteneciente a la Universidad Autónoma de Madrid (UAM). El Dr. Luis Gandía, lideraba el grupo de investigación en: neurotransmisión, canales iónicos, señales de calcio y exocitosis y tenía una gran experiencia en técnicas electrofisiológicas. Él y su estudiante post-doctoral la Dra. Carmen Nanclares, nos ayudaron a llevar a cabo este trabajo.

El trabajo estuvo centrado en mediciones amperométricas de la liberación de catecolaminas bajo estimulación con ACh (pulsos de 5s usando solución K/H con ACh 100 mM). Las mediciones, fueron llevadas a cabo en células cromafines aisladas empaquetadas ( $5 \times 10^6$  células) y piezas de tejido adrenomendular (cinco piezas de 5-8 mm<sup>3</sup> de médula adrenal). Los resultados de este estudio, fueron confeccionados a partir de los datos extraídos en nueve experimentos llevados a cabo a partir de tres preparaciones diferentes (Fig 39).

A la vista de los datos obtenidos, la respuesta amperométrica registrada en célula aislada fue de una magnitud superior a las ofrecidas para las nativas (Fig 39, A y B). No obstante, tras la normalización de los datos al valor máximo (Fig 39, C), apareció la similitud entre ambas. Una similitud más próxima en términos

de la cinética de inicio, aunque con una cinética final ligeramente más lenta en las nativas. Esta ligera diferencia, podría estar asociada a una respuesta más sostenida en células nativas relacionada con la presencia de grupos de vesículas internas de liberación lenta.



**Fig 39. Respuesta secretora en células cromafines bovinas.** A, Registros amperométricos modelo para células aisladas empaquetadas y piezas de tejido adrenomendular. B, Liberación neta de catecolaminas (nA) en valor promedio para células aisladas empaquetadas y piezas de tejido adrenomendular. C, Normalización de los datos amperométricos al valor máximo. Los datos promedio se muestran como media $\pm$ SEM. Test estadístico Two way ANOVA. Niveles de significancia: n.s; diferencia no significativa.

#### 4.1.8. Los modelos matemáticos predicen la similitud de la respuesta secretora entre las células cromafines nativas y aisladas.

Los modelos matemáticos, habían demostrado previamente ser útiles para comprender aspectos del proceso de secreción en células cromafines (Segura et al., 2000; Torregrosa-Hetland et al., 2011) y podrían ayudar ahora a comprender el impacto de las organizaciones diferenciales de orgánulos sobre la secreción. Para crear un modelo funcional, se estableció colaboración con el grupo de Matemática Aplicada y Ciencias de la Computación liderado por la Dra. Amparo Gil en la Universidad de Cantabria. La Dra. Amparo Gil, tenía una gran experiencia en el campo de la modelización matemática así como en los aspectos biológicos de la cromafín tras múltiples colaboraciones con el grupo de investigación del Dr. Luis Miguel Gutiérrez. El objetivo, era configurar un modelo con el que poder simular las distribuciones halladas para gránulos y mitocondrias de modo individualizado y no combinado (como hacen presencia de modo natural en las células), para posteriormente analizar la respuesta secretora en base a las organizaciones de cada uno de ellos, sin otros factores interferentes.

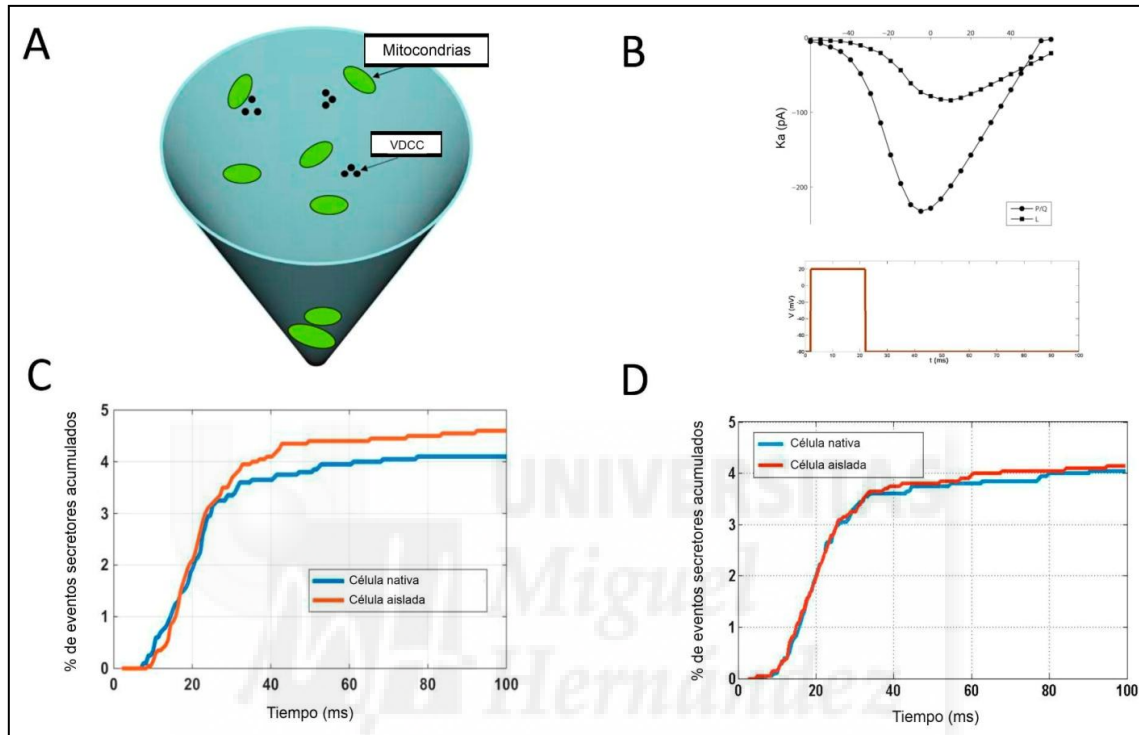
La secreción acumulada (en porcentaje), fue simulada en respuesta a un pulso despolarizante modelo (Fig 40, B) para las células aisladas y nativas (Fig 40, C y D) incluyendo inicialmente solo a los gránulos cromafines (Fig 40, C) y posteriormente a gránulos y mitocondrias (Fig. 40, D). La respuesta obtenida, considerando solamente la organización de los gránulos cromafines, era el valor promedio en base a las respuestas halladas para alrededor de unas cien configuraciones aleatorias de las distancias de vesículas respecto a los VDCC (Figura 40, A). Los cursos temporales para estas respuestas secretoras, fueron

muy similares durante los primeros 25 ms entre células nativas (línea azul) y aisladas (línea roja) (Figura 40, C). Este resultado, fue consistente con el hecho de que la subpoblación de vesículas que se liberaba primero, eran aquellas muy próximas a los VDCC y con que la proporción de estas vesículas era casi la misma en células aisladas y en células nativas (10% de la población total de gránulos secretores en ambos casos). Después de los primeros 25 ms, entraba en juego una segunda subpoblación de vesículas, situada más alejada de los VDCC, que representaba aproximadamente el 27% de los gránulos en células aisladas y aproximadamente el 19% en las células nativas del tejido adrenal. Debido al mayor tamaño de este sub-grupo vesicular en las células aisladas, cabía esperar una respuesta secretora mayor cuando la concentración de calcio en la vecindad de estas vesículas superara el nivel umbral necesario para desencadenar la liberación con respecto al de las células nativas. De ahí que, fueran detectadas pequeñas diferencias en estas respuestas modelizadas, entre células aisladas y nativas, a partir de esos 25ms del registro (Fig 40, C).

Sin embargo, esta situación cambió cuando las mitocondrias fueron incluidas en la simulación, igualándose por completo las respuestas para células aisladas y nativas (Fig 40, D). Esto se podía explicar en base a la distribución mitocondrial y su efecto sobre la señal de calcio. La población mitocondrial cercana a la membrana plasmática, era mayor en las células aisladas y podría estar actuando como una barrera más efectiva para la difusión de calcio desde los VDCC hacia otras partes del citoplasma, en particular hacia la localización de la segunda sub-población de gránulos. Como resultado a este efecto, se vería reducida la respuesta secretora en células aisladas. Sumado a esto, una distribución amplia de mitocondrias, como caracterizaba a la célula nativa,



facilitaría una señal de calcio extendida en el espacio citosólico, promoviendo el transporte de gránulos internos hacia la membrana plasmática para su posterior exocitosis.



**Fig 40. Simulación de la respuesta secretora en células cromafines bovinas mediante modelo matemático funcional.** A, Representación esquemática de la simulación tridimensional. B, Figura superior: relaciones de corriente y voltaje consideradas en los esquemas cinéticos de apertura de canales de calcio de tipo P / Q y L. Figura inferior: pulso despolarizante modelo considerado en las simulaciones. C, Respuestas secretoras acumuladas teóricas predichas por el modelo para células aisladas (línea roja) y nativas (línea azul) obtenidas utilizando las distribuciones experimentales de gránulos sin considerar mitocondrias en el medio. D, Respuestas secretoras acumuladas teóricas predichas por el modelo para células aisladas (línea roja) y nativas (línea azul) obtenidas utilizando las distribuciones de gránulos y mitocondrias experimentales.



## **4.2. Dinámica del citoesqueleto de F-actina:**

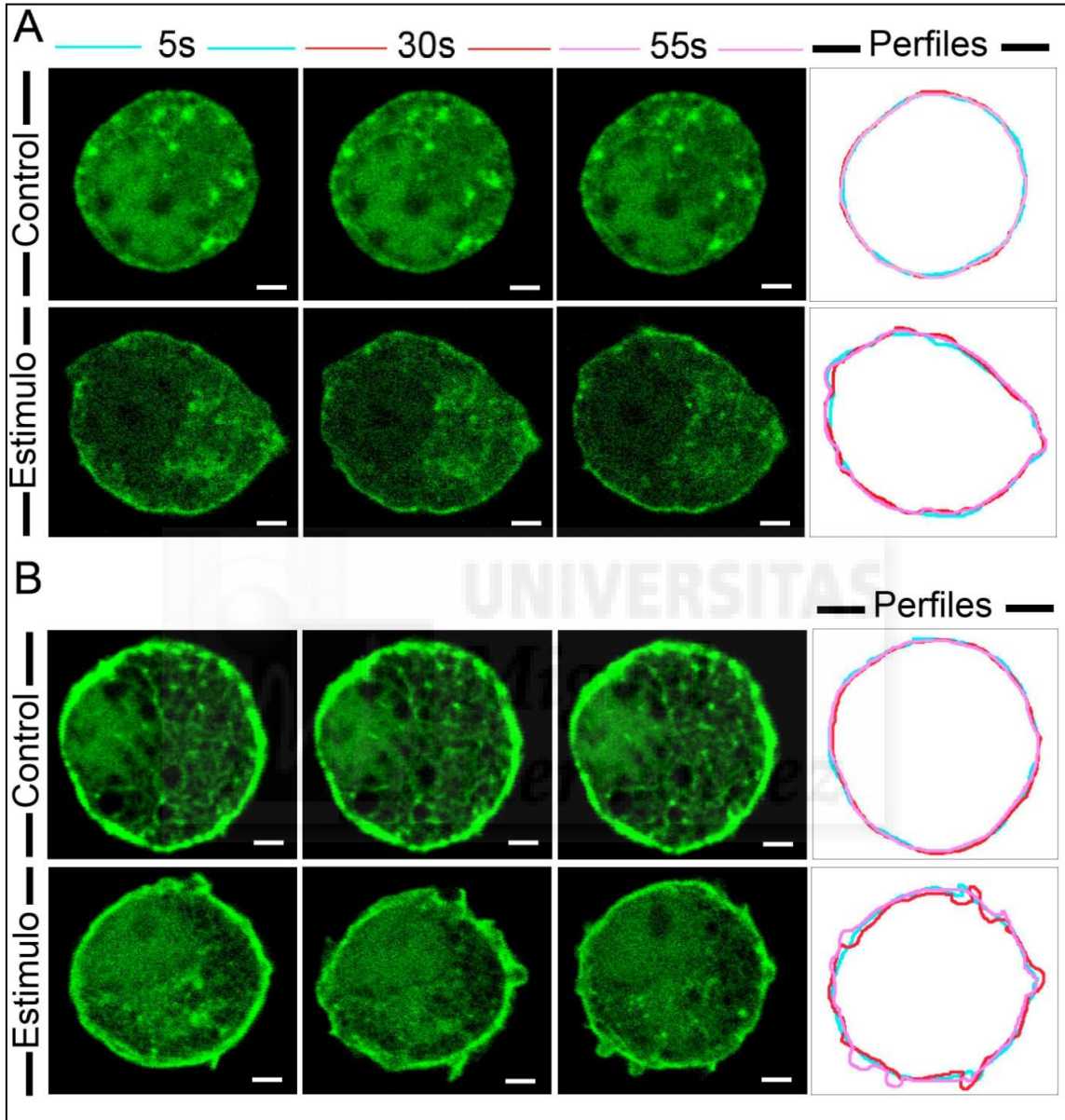
### 4.2.1. La red cortical de F-actina desarrolla una dinámica local en respuesta a estimulación en las células cromafínes bovinas aisladas.

La dinámica de la red cortical del citoesqueleto de F-actina, había sido demostrada previamente en este mismo sistema celular en términos de reorganización interna de fibras y cavidades citoesqueletales (Giner et al., 2005), ofreciendo para esta red una visión estructural dual: abierta o cerrada, según el estado de reposo o estimulación celular respectivamente. Siguiendo en la línea de la descripción dinámica de esta red altamente funcional en secreción, se planteó estudiar su capacidad para desarrollar una dinámica de alta especificidad espacial con una naturaleza próxima a la misma dinámica local desarrollada, durante los fenómenos de secreción, por la bicapa lipídica que forma la membrana plasmática (Kukulski et al., 2012; Steinhardt et al., 1994). El objetivo, era describir eventos dinámicos locales en la red cortical de F-actina que pudieran establecer un vínculo activo entre la propia red y la membrana plasmática, más allá de una organización adyacente en el espacio interno celular.

Para llevar a cabo este estudio, se utilizaron células cromafínes bovinas aisladas transfectadas con el vector EGFP-LifeAct a fin de visualizar las fibras de F-actina en fluorescencia verde en células vivas (Riedl et al., 2008). Las células, fueron estimuladas mediante despolarización de membrana celular con una solución de KCl 59 mM (K/H alto potasio) durante 40s de un modo sostenido, a través de un sistema de perfusión, en registros de 60s de duración: protocolo 10-

40-10 (Materiales y Métodos 3.7). Los registros temporales (60s), fueron tomados tanto para células estimuladas como para células control (no estimuladas) a dos temperaturas de trabajo: 22°C (T.A) (N= 10 células control; N= 10 células estimuladas) y a 30°C (N= 10 células control; N= 10 células estimuladas). La finalidad de llevar a cabo el experimento a dos temperaturas diferentes, era estudiar la existencia de una dinámica local para la red cortical de F-actina y analizar el efecto de la temperatura sobre la magnitud de la misma.

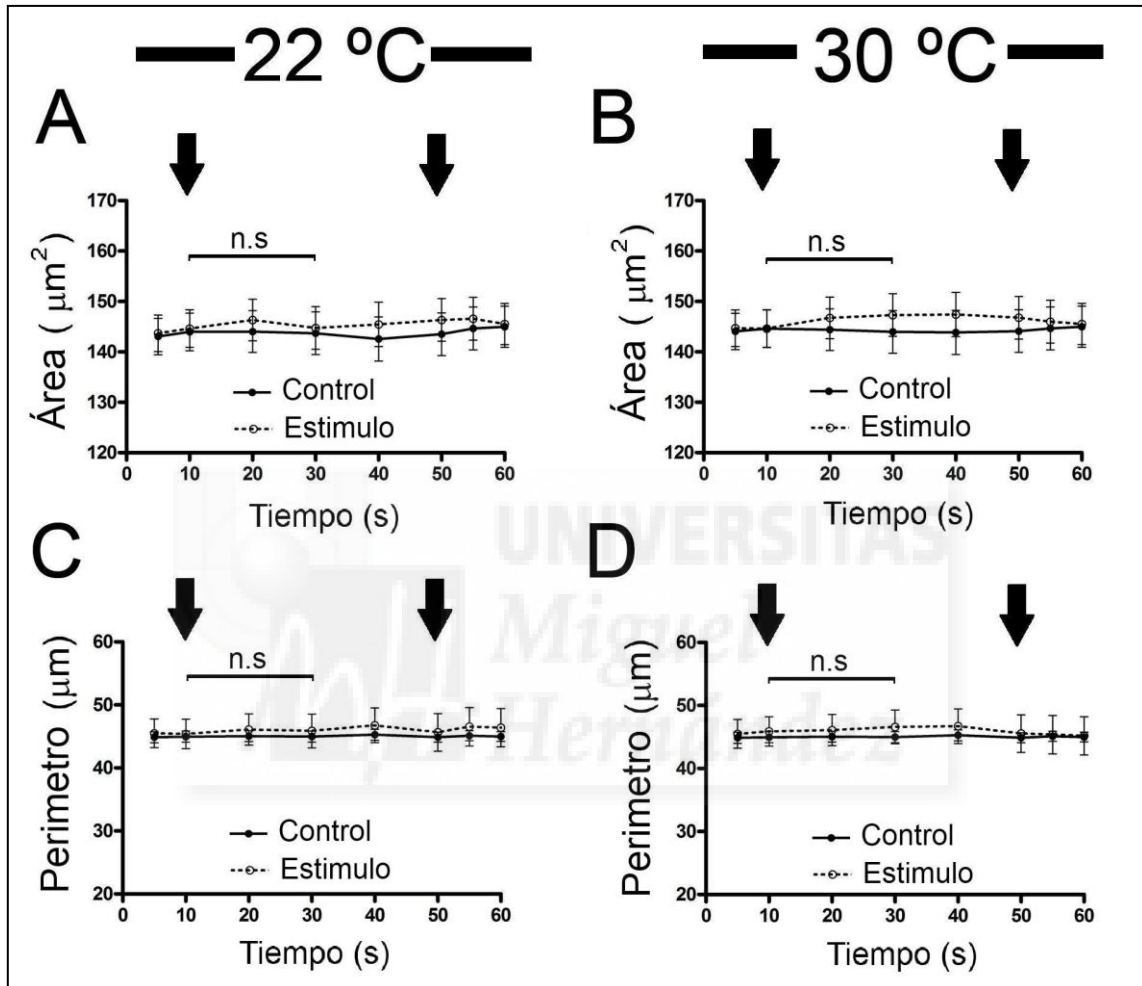
Para detectar la existencia de eventos dinámicos en la red cortical de F-actina, se estudió la evolución temporal de su perfil en los cuatro grupos de estudio (células control y estimuladas a 22 y 30 °C). Los tiempos seleccionados para el análisis fueron: 5s (pre-estimulación), 30s (estimulación), 55s (post-estimulación). En la evolución temporal de los perfiles registrados, mediante solapamiento de los mismos para los tiempos analizados (5, 30 y 55 s), se podían apreciar sinuosidades locales (Fig 41). Estos cambios locales sobre la línea del perfil de la red, tenían su máximo desarrollado en tiempo de estímulo (30s) diferenciándose del perfil dibujado en estadios previos al mismo (5s). Estos datos, indicaban una capacidad dinámica local para la red cortical de F-actina en respuesta a estimulación. Unido a ello, el notable incremento en número de tales sinuosidades con la estimulación celular a mayor temperatura (Fig 41, B), definía a esta dinámica local como un fenómeno biológico temperatura-dependiente.



**Fig 41. Evolución temporal del perfil de la red cortical de F-actina en células cromafines bovinas.** A y B, Imágenes de microscopia confocal de fluorescencia de células aisladas modelo, para las condiciones experimentales: control y estimulación mediante KCl, transfectadas con el vector de expresión EGFP-LifeAct (verde) para los tiempos: 5s, 30s y 55s registradas a 22°C (A) y a 30°C (B). Los perfiles se corresponden con la línea más externa definida por la red cortical de F-actina para los tiempos 5s (línea azul), 30s (línea roja) y 55s (línea rosa). Barras de 1 μm.

En base a los resultados obtenidos, se planteó comprobar el impacto de esta dinámica local a nivel global, esto es, estudiar el grado de influencia de las sinuosidades observadas por la red cortical de F-actina sobre los aspectos morfométricos celulares de las células cromafines. Para ello, se analizaron los parámetros de área y perímetro celular para los tiempos: 5, 10, 20, 30, 40, 50, 55 y 60s. El análisis morfométrico, se llevó a cabo en células cromafín control (N= 20 células) y estimuladas (N= 20 células) mediante despolarización de membrana celular con una solución de KCl 59 mM (K/H alto potasio) siguiendo el protocolo: 10-40-10s a 22 °C y 30 °C. A pesar de ensayar ambas temperaturas, el mayor interés residía sobre los estudios a 30 °C, condición experimental donde habíamos detectado mayores cambios locales y podría tener una mayor influencia sobre los parámetros celulares globales.

Los valores promedio obtenidos para los parámetros de área y perímetro, bajo cada condición experimental: 22 °C (Fig 42, A y C) y 30 °C (Fig 42, B y D), no presentaban cambios notables en la secuencia temporal analizada (60s). Además, el análisis estadístico realizado (Two way ANOVA) donde se sometió a comparación los datos morfométricos previos a estimulación con los referentes a tiempos de estímulo (30 s), en los que previamente se había detectado un gran desarrollo para los eventos locales de la red de F-actina, tampoco detectó cambios significativos (Fig 42). Estos resultados, demostraban la baja influencia de los eventos dinámicos locales de la red cortical de F-actina sobre aspectos morfológicos celulares y adelantaban la naturaleza compensatoria de estos eventos dinámicos.



**Fig 42. Parámetros morfométricos de células cromafines bovinas.** A-D, Valores promedio de área (A y B) y perímetro (C y D) obtenidos tras el análisis de células cromafines aisladas control y estimuladas con KCl registradas a 22 °C (A y C) y 30°C (B y D) para los tiempos: 5, 10, 20, 30, 40,50, 55 y 60 s. Los datos promedio se muestran como  $\text{media} \pm \text{SEM}$ . Las flechas delimitan el periodo de estimulación. Test estadístico Two way ANOVA. Niveles de significancia: n.s; diferencia no significativa. Barras de  $1\mu\text{m}$ .





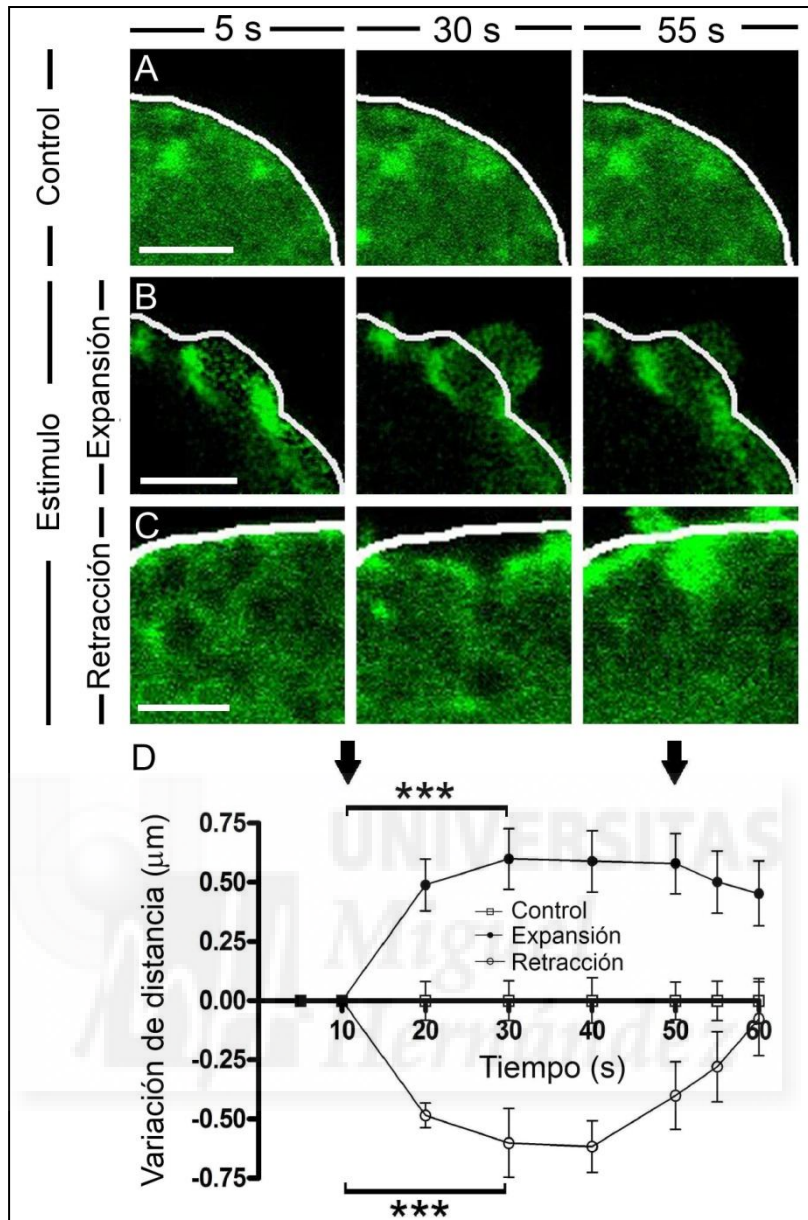
#### 4.2.2. Los eventos de dinámica local de las fibras corticales de F-actina son variaciones transitorias de distancia en el perfil celular.

Descubierta la existencia de una dinámica local para la red cortical de F-actina, se procedió a describir detalladamente los eventos locales y clasificarlos. Para este fin, se trabajó con células cromafines bovinas aisladas transfectadas con el vector EGFP-LifeAct (verde) a fin de poder ver las fibras de F-actina. Las células, fueron estimuladas mediante despolarización de membrana celular con una solución de KCl 59 mM (K/H alto potasio), siguiendo el protocolo: 10-40-10s, a fin de promover el desarrollo de los eventos dinámicos locales en red cortical. Con el objetivo de facilitar la detección y el estudio de los mismos, se trabajó a 30 °C dado el mayor desarrollo detectado para estos eventos en esta temperatura.

Tras la observación detallada del conjunto de eventos locales (N= 36 células; N= 100 eventos), se llevó a cabo la descripción y clasificación de los mismos en dos grandes grupos en base al comportamiento de las propias fibras durante estos procesos dinámicos. Un grupo, estaba caracterizado por un movimiento protruyente de fibras a modo de mecanismo de empuje de tipo local hacia el medio extracelular (Fig 43, B). El otro grupo, estaba definido por procesos de invaginación de fibras en puntos concretos de la red cortical, como mecanismo de internalización o desplazamiento hacia un punto más interno en el citoplasma celular (Fig 43, C). El primero de ellos fue definido como “expansión”, mientras que el segundo se clasificó bajo el término de “retracción”.

A continuación, se procedió a describir los eventos de expansión y retracción (N= 20 células; N= 52 expansiones; N= 50 retracciones) en términos de desplazamiento de fibras. Los desplazamientos, fueron cuantificados

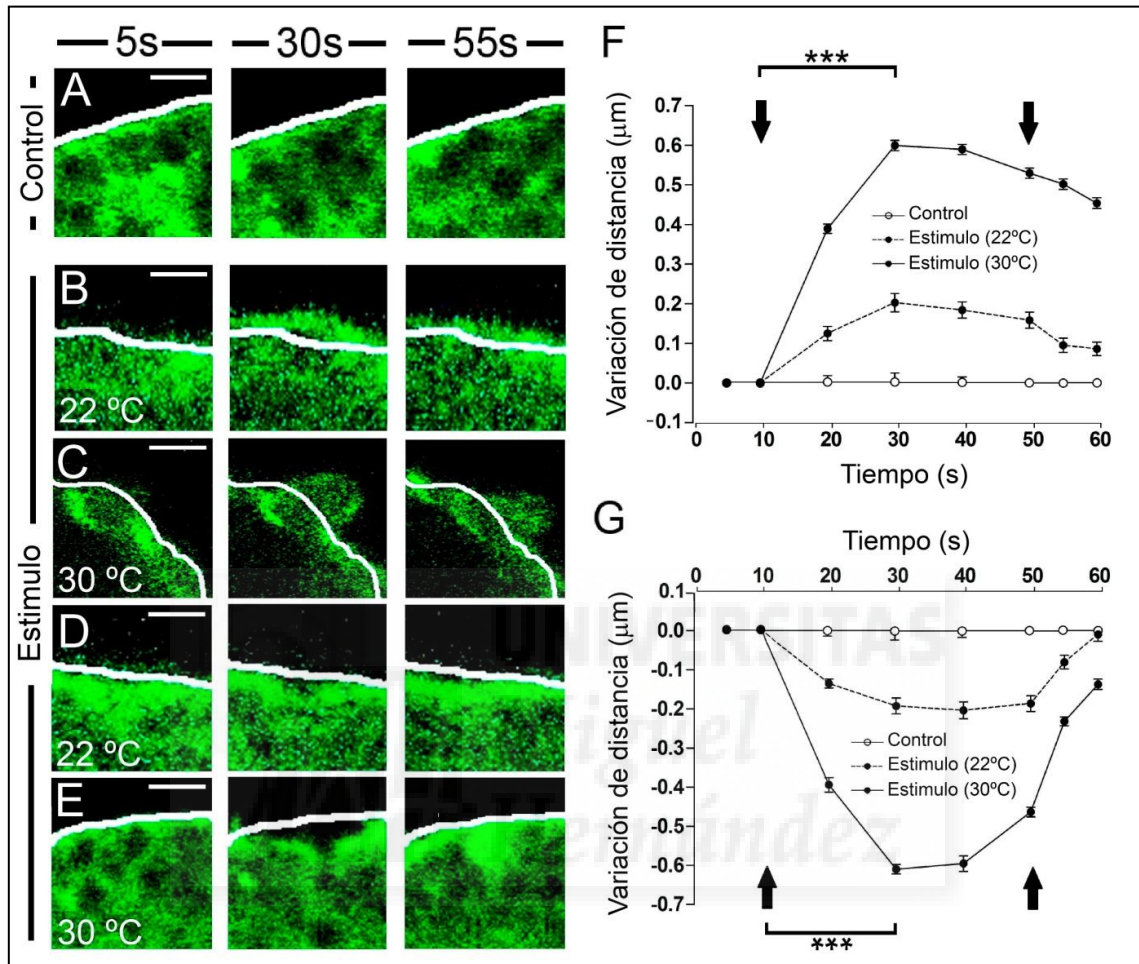
inicialmente mediante valores de distancia total entre un punto estático interno (definido en el perfil nuclear) y la línea del perfil de la red cortical de F-actina, en las zonas activas para ambos tipos de eventos, a los diferentes tiempos de estudio: 5 10, 20, 30, 40, 50, 55 y 60s. Posteriormente, estos datos de distancia total entre dos puntos, fueron convertidos en variaciones de distancia en el tiempo de la línea de perfil de la red para observar así el desplazamiento neto de las fibras en cada evento en respuesta a estímulo. Para esta conversión, se llevo a cabo la resta de cada una de las distancias obtenidas en el tiempo con respecto a la correspondiente para el tiempo 10s (inicio del estímulo). Los resultados obtenidos de variaciones de distancia (desplazamiento neto), fueron analizados de modo independiente según tipología del evento (expansiones y retracciones) y promediados por separado. Los datos promedio, informaban sobre la existencia de un desplazamiento neto en respuesta a estímulo en ambos tipos de eventos (Fig 43, D). En su parte inicial, el desplazamiento evolucionaba tras la aplicación de la estimulación, incrementándose gradualmente la distancia respecto a la posición inicial de las fibras hasta alcanzar un valor máximo alrededor del segundo 30 (20s tras el inicio del estímulo) (Fig 43, D). Este valor de variación de distancia, se mantuvo sostenidamente durante el tiempo del estímulo (Fig 43, D). Tras el cese de la estimulación, se observó un componente de recuperación donde las fibras iniciaban el regreso hacia su posición original (Fig 43, D). Este último componente citado, declaró el carácter transitorio de esta dinámica local. Los dos tipos de eventos locales (expansiones y retracciones) mostraron el patrón descrito, desarrollado en una magnitud muy similar aunque en sentidos opuestos (Fig 43, D), quedando como ganancias de distancia en el caso de expansiones y pérdidas de distancia en el caso de las retracciones.



**Fig 43. Desplazamientos netos de la red cortical de F-actina en las expansiones y retracciones de células cromafines bovinas.** A-C, Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de sectores corticales de células aisladas control (A) y estimuladas con KCl (B y C), transfectadas con el vector de expresión EGFP-LifeAct (verde) y registradas a 30°C para los tiempos: 5s, 30s y 55s. Las líneas blancas representan la posición del perfil a 5s (previo a estímulo). D, Valores promedio de variación de distancia del perfil de la red cortical de F-actina en expansiones y retracciones. Los datos promedio se muestran como  $\text{media} \pm \text{SEM}$ . Las flechas delimitan el periodo de estimulación. Test estadístico Two way ANOVA. Niveles de significancia: \*\*\*  $P \leq 0,001$ . Barras de 1µm.

Descritos los eventos locales como fenómenos de desplazamiento de fibras, se planteó estudiar si la magnitud de dichos desplazamientos mostraba dependencia a la temperatura. Para ello, se prepararon cultivos celulares de células cromafines bovinas aisladas transfectadas con el vector de expresión EGFP-LifeAct y posteriormente estimuladas mediante despolarización de membrana celular con una solución de KCl 59 mM (K/H alto potasio) con el protocolo: 10-40-10s a dos temperaturas diferentes: 22°C (N= 15 células control (30 secciones aleatorias); N= 15 células estimuladas; N= 48 expansiones; N= 50 retracciones) y 30°C (N= 15 células control (30 secciones aleatorias); N= 15 células estimuladas; N= 60 expansiones; N= 57 retracciones). El motivo de elección de estas temperaturas, residía para el caso de 22°C en ser la temperatura comúnmente utilizada en el campo e incluida en la mayor parte de la bibliografía, mientras que 30°C resultaba interesante siendo el primer valor fuera del rango de los 20°C y cercano a las condiciones fisiológicas (37°C), que no pudo ser aplicada por limitaciones sistémicas de la cámara de temperatura.

Para cada una de las condiciones experimentales establecidas, se analizaron los valores de variaciones de distancia siguiendo el mismo protocolo de medición descrito previamente en este apartado de resultados. Los valores promedio (Fig 44, F y G), informaban sobre una clara magnificación del valor neto de desplazamiento de las fibras de F-actina con el incremento de la temperatura para ambos tipos de eventos locales y con ello confirmaban la temperatura-dependencia de la dinámica local de la red cortical de F-actina desarrollada en respuesta a estímulo.



**Fig 44. Efecto de la temperatura sobre la magnitud de los eventos de dinámica local de la red cortical de F-actina en célula cromafín bovina.** A-E, Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de ejemplos representativos de expansiones (B y C) y retracciones (D y E) en sectores corticales de células cromafínes aisladas control a 30°C (A) y estimuladas (B-E) a 22°C (B y D) y 30°C (C y E), transfectadas con el vector de expresión EGFP-LifeAct (verde). Las líneas blancas representan la posición del perfil de la red cortical de F-actina a 5s (previo a estímulo). F y G, Valores promedio de variación de distancia para expansiones (F) y retracciones (G). Los datos promedio se muestran como media±SEM. Las flechas delimitan el periodo de estimulación. Test estadístico Two way ANOVA. Niveles de significancia: \*\*\* P ≤ 0,001. Barras de 1μm.



#### 4.2.3. El complejo Actina-Miosina II es el motor molecular de las expansiones y las retracciones de la red cortical de F-actina en las células cromafines bovinas aisladas.

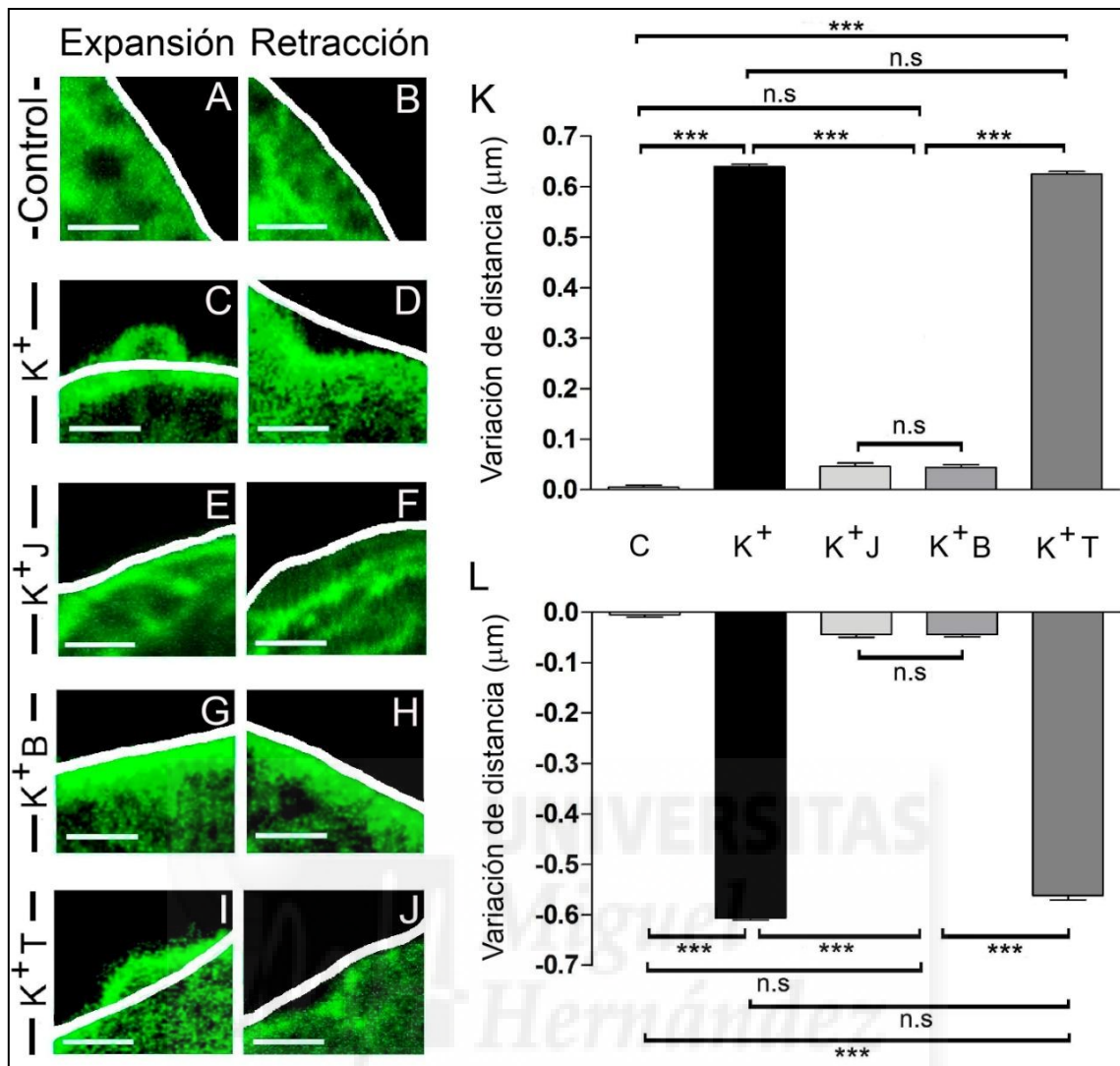
A fin de comprender la maquinaria molecular promotora de los eventos de dinámica local de la red cortical de F-actina, se planteó un estudio que fue abordado en dos fases. La primera de ellas, estaba centrada en la aplicación de una serie de fármacos con capacidad bloqueante sobre los propios procesos de ensamblaje de fibras así como un efecto inhibitor sobre diferentes proteínas vinculadas a la dinámica citoesqueletal. El objetivo de esta primera parte, era estudiar el desarrollo de las expansiones y retracciones bajo cada condición farmacológica y así determinar que elementos podrían estar controlando los eventos dinámicos locales de F-actina. La segunda parte del estudio, consistía en sobreexpresar la forma mutada de la proteína candidata tras los resultados de la primera fase experimental y valorar el efecto sobre la dinámica local de la red cortical de F-actina.

Los fármacos utilizados para la primera parte del estudio, fueron tres: jasplakinolide (1  $\mu\text{M}$ ) con el fin de estabilizar los filamentos de F-actina mediante la inhibición del desensamblaje de los mismos, blebbistatina (5  $\mu\text{M}$ ) para inhibir la capacidad motora de miosina II sobre F-actina y estabilizar las fibras en términos de movilidad y taxol (0,1  $\mu\text{M}$ ), destinado a bloquear la movilidad de microtúbulos. Cada uno de ellos, fue aplicado sobre placas de cultivo con células cromafines bovinas aisladas, previamente transfectadas con el vector EGFP-LifeAct (verde) para ver las fibras de F-actina y así poder evaluar los eventos de dinámica local bajo cada condición farmacológicas ensayada. Todos los fármacos se aplicaron de modo individualizado y nunca combinando varios



tratamientos en una misma placa. Transcurridos los tiempos de incubación propios para cada tratamiento (Materiales y Métodos 3.6), las células tratadas fueron estimuladas mediante despolarización de membrana celular con una solución de KCl 59 mM (K/H alto potasio) siguiendo el protocolo 10-40-10s a 30°C, a fin de promover la dinámica local en la red de F-actina. Este grupo de estudio, formado por las células tratadas y estimuladas, fue usado para valorar el efecto de la estabilización e inhibición conseguida con los fármacos, sobre fibras de F-actina, miosina II y microtúbulos, en la aparición y desarrollo de los eventos. A este grupo de estudio, se unieron dos grupos controles formados por: células cromafines aisladas sin tratamiento farmacológico estimuladas a 30°C (control farmacológico) y células cromafines aisladas sin tratamiento farmacológico ni estimulación (control de estimulación). Los tres grupos celulares anteriormente citados, fueron analizados por separado para valorar los eventos de dinámica local bajo cada condición individualmente. La valoración, se estableció en el momento de máximo desarrollo para los eventos locales correspondiente con el segundo 30 del registro y estuvo centrada en la medición de la variación de distancia a tiempo de evolución máxima para cada evento detectado tal y como se describió en el apartado de resultados anterior (Resultado 4.2.2). Estos valores de variación de distancia máxima, fueron promediados de modo independiente para expansiones y retracciones bajo cada condición incluida en el estudio: control (N= 10 células; N= 40 secciones), estimulación sin tratamiento farmacológico previo (N= 10 células; N= 50 expansiones; N= 46 retracciones), tratamiento con jasplakinolide y estimulación (N= 10 células; N= 40 secciones), tratamiento con blebbistatina y estimulación (N= 10 células; N= 40 secciones), tratamiento con taxol y estimulación (N= 10 células; N= 45 expansiones; N= 40 retracciones).





**Fig 45. Efecto farmacológico sobre los eventos de dinámica local de la red cortical de F-actina en célula cromafín bovina.** A-J, Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de sectores corticales representativos de células cromafines aisladas transfectadas con el vector de expresión EGFP-LifeAct (verde) registradas a 30°C para el tiempo de registro 30 s. A y B, Célula control (control de estimulación). C y D, Célula estimulada con KCl sin tratamiento farmacológico (control farmacológico). E y F, Célula estimulada con KCl previamente tratada con jasplakinolide 1 µM. G y H, Célula estimulada con KCl previamente tratada con blebbistatina 5 µM. I y J, Célula estimulada con KCl previamente tratada con taxol 0,1 µM. Las líneas blancas representan la posición del perfil de F-actina a 5s (previo a estímulo). K y L, Valores promedio de variación de distancia a 30s para expansiones (K) y retracciones (L) en las diferentes condiciones de experimentación ensayadas: C (Control: sin estímulo, ni tratamiento farmacológico), K<sup>+</sup> (Estimulación sin tratamiento farmacológico; Control farmacológico), K<sup>+</sup> J (jasplakinolide y estimulación), K<sup>+</sup> B (blebbistatina y estimulación), K<sup>+</sup> T (taxol y estimulación). Los datos promedio se muestran como media±SEM. Test estadístico Two way ANOVA. Niveles de significancia: n.s: Diferencia no significativa, \*\*\* P≤ 0,001. Barras de 1 µm.

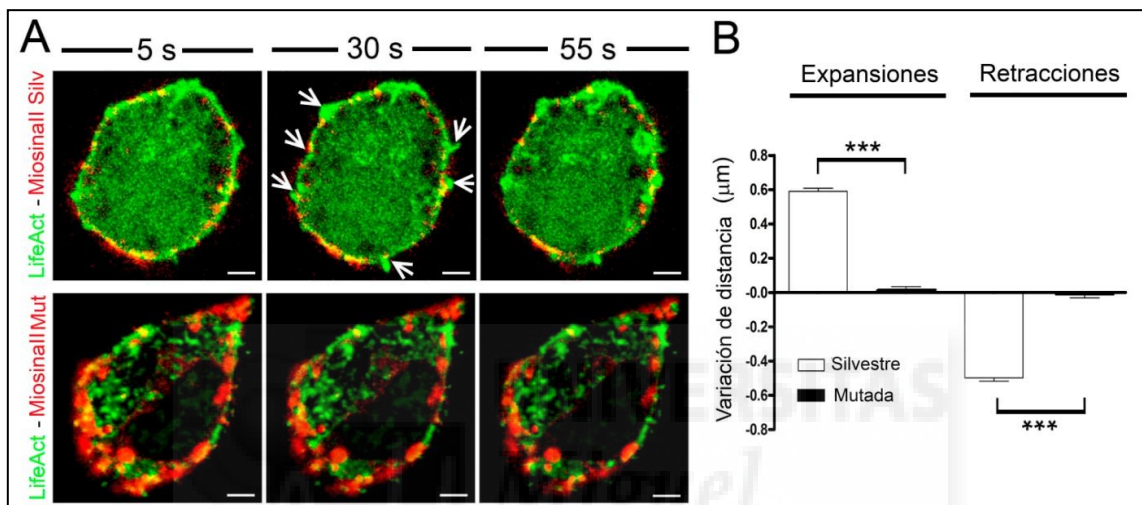
Los datos promedio (Fig 45, K y L), informaban sobre la esperada ausencia de variación de distancia en las células control no estimuladas (grupo experimental: C), dado que no se registro ningún evento dinámico local en este grupo de estudio ante la ausencia de estímulo. Dato contrastado con la variación de distancia obtenida en promedio  $\approx 0,6 \mu\text{m}$ , para ambos tipos de eventos locales dinámicos, en las células estimuladas sin tratamiento farmacológico previo (Grupo experimental: K+). Muy cercano en valores respecto a estos últimos datos citados, para células estimuladas sin tratamiento, fueron los registrados para células tratadas con taxol (Grupo experimental: K+ T), informando sobre la baja influencia de la motilidad de los microtúbulos en la dinámica local de la red cortical de F-actina. Las variaciones de distancia registradas en los grupos de células tratadas con los fármacos: jasplakinolide (Grupo experimental: K+ J) y blebbistatina (Grupo experimental: K+ B), fueron muy similares entre sí y ambos significativamente reducidos (entorno a  $0,05 - 0,1 \mu\text{m}$ ) respecto a la máxima variación de distancia en promedio (entorno a  $0,6 \mu\text{m}$ ) en las células estimuladas sin tratamiento farmacológico (Grupo experimental: K+). Este dato, delataba la notoria influencia de la estabilización de fibras de F-actina y la inhibición de movimiento de las mismas por bloqueo de su motor molecular, la miosina II, sobre la dinámica local de la red cortical de F-actina. Tales resultados, adjudicaban al sistema “actina-miosina II” un importante papel como motor molecular de las expansiones y retracciones corticales.

Con el fin de confirmar el papel clave de la miosina II en el control de la dinámica local de F-actina durante la formación de expansiones y retracciones, se inició la segunda fase del estudio. En este caso, el estudio estaba centrado en inducir una prevalencia citoplásmica de la proteína Miosina II en su forma

mutada para estudiar las consecuencias en términos de eventos locales. Para ello, se hizo uso de la técnica de la transfección en células cromafines bovinas aisladas con la versión mutada de la subunidad reguladora de la miosina II (pRLC-T18A-S19A-DsRed). La mutación, basada en dos cambios de secuencia en su cadena, la convertía en un elemento no fosforilable y por tanto, incapaz de ser activada por calcio. Estudios previos, llevados a cabo por el grupo, ofrecieron evidencias sobre su influencia en la dinámica de gránulos mediante la inmovilización citoesquelética inducida por la misma (Neco et al., 2004). Como control en este estudio, se usaron células cromafines bovinas aisladas transfectadas con la forma silvestre de la subunidad reguladora de la miosina II (pRLC-wt-DsRed). Las versiones mutante y no mutada (silvestre) de la miosina II, fueron sobreexpresadas ambas en fluorescencia roja y se combinaron con la sobreexpresión de EGFP-LifeAct en verde a fin de detectar la F-actina y estudiar la evolución de los eventos locales bajo cada condición experimental ensayada.

Siguiendo el protocolo de medición utilizado en la primera parte del estudio, se analizó la variación de distancia a tiempo 30 s para las expansiones y retracciones detectadas (N= 10 células; N= 30 zonas) en las células cromafines aisladas doblemente transfectadas y estimuladas con KCl a 30°C. Los valores de variación de distancia obtenidos, fueron promediados de manera separada para cada tipo de evento y bajo cada condición experimental. Tal y como muestran las imágenes (Fig 46, A) y el gráfico de barras con los valores de variación de distancia promedio a 30s (Fig 46, B), la expresión de la forma mutada tuvo una influencia dramática en la dinámica local de la red cortical de F-actina, aboliendo por completo tanto las expansiones como las retracciones, mientras que la miosina II en su forma silvestre apoyaba ambos eventos. Estos

datos confirmaban solidamente que la dinámica del binomio F-actin-miosina II, eran un mecanismo molecular esencial para las expansiones y retracciones locales.



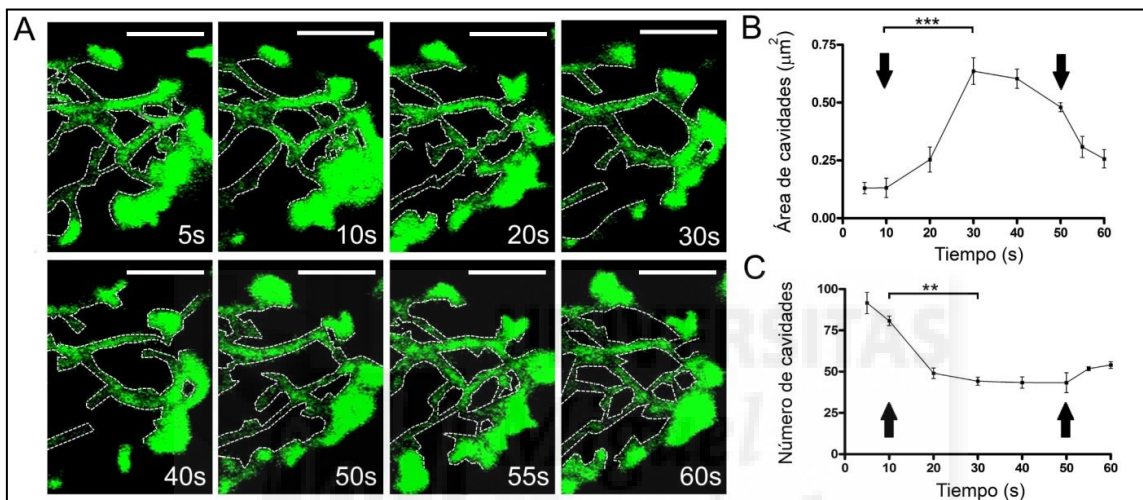
**Fig 46. La miosina II controla los eventos locales de expansión y retracción de la red cortical de F-actina.** (A) Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de células cromafines con una transfección doble de EGFP-LifeAct (verde) combinado con la versión silvestre (no mutante) y mutante de la RFP-Miosina II (roja), estimuladas con KCl a 30°C para los tiempos: 5 s (antes de la estimulación), 30 s (durante la estimulación) y 55 s (después de la estimulación). Las flechas indican la ubicación de los cambios locales. (B) Valores promedio de la variación de distancia normalizada de la red cortical de F-actina a 30 s para eventos de expansión y retracción (n = 10 células, n = 30 zonas) bajo la condición experimental de una sobreexpresión de Miosina II silvestre (barras blancas) y mutada (barras negras). Los datos promedio se muestran como media±SEM. Test estadístico Two way ANOVA. Niveles de significancia: \*\*\* P ≤ 0,001. Barras de 1 μm.

#### 4.2.4. Las cavidades de la red cortical de F-actina sufren modificaciones en las zonas de dinámica local de fibras.

Entendiendo los eventos de dinámica local de la red cortical de F-actina, como fenómenos de desplazamiento de fibras controlados por el binomio Actina-Miosina II, se planteó estudiar el efecto de tales desplazamientos sobre las cavidades internas de la red cortical. Trabajos científicos previos del grupo (Giner et al., 2005), habían demostrado una relación estrecha entre la reorganización de las fibras en la red cortical y el remodelamiento de las cavidades internas de la misma. El objetivo de este estudio, residía en averiguar si existía un remodelaje de cavidades con carácter local asociado a la dinámica local de la red citoesqueletal cortical de F-actina.

Para el estudio, se utilizaron células cromafines bovinas aisladas transfectadas con el vector de expresión EGFP-LifeAct (verde) a fin de poder ver con fluorescencia verde las fibras de la red cortical de F-actina. Las células fueron estimuladas mediante despolarización de membrana celular con una solución de KCl 59 mM (K/H alto potasio) siguiendo el protocolo 10-40-10s a 30°C. Posteriormente, se procedió a detectar los eventos de dinámica local y a analizar las cavidades incluidas en la red cortical (primera micra) para la zona abordada por cada evento local detectado (N= 10 células; N= 35 secciones; N= 306 cavidades). El análisis de las cavidades, fue abordado desde dos perspectivas: tamaño de cavidades individuales (área) y número de cavidades totales. Ambos parámetros, fueron estudiados con ayuda de un análisis threshold de las imágenes a los tiempos: 5, 10, 20, 30, 40, 50, 55 y 60 s del registro.

Tanto las imágenes de fluorescencia como los datos promedio obtenidos, informaban sobre la existencia de variaciones en las cavidades inmersas en las secciones de red cortical implicadas en eventos de dinámica local (Fig 47). Las variaciones detectadas, consistían fundamentalmente en la aparición de cavidades más amplias (Fig 47, A y B) quedando estas reducidas en número (Fig 47, A y C). Dichos cambios, se iniciaban con el periodo de estimulación alcanzando un valor máximo alrededor del segundo 30 del registro, coincidiendo con el momento de máxima variación de distancia detectada previamente en los desplazamientos de las fibras para los eventos locales. Unido a esto, se podía observar un componente de recuperación en ambos parámetros (Fig 47, B y C), tal y como fue descrito también para las fibras de F-actina en expansiones y retracciones. Este componente de recuperación, resultó ser más rápido en el tiempo para el tamaño de cavidades que para el número de estas. En cualquier caso, la existencia de dicha recuperación convertía el proceso de remodelación local de cavidades en un fenómeno transitorio. Todos estos datos tomados en conjunto, confirmaban la existencia de un proceso de remodelación de cavidades de carácter local asociado a expansiones y retracciones y definían una evolución temporal dinámica compartida entre cavidades y fibras de F-actina en la red cortical.



**Fig 47. Variaciones en las cavidades intra-red cortical de F-actina bajo zonas de dinámica local en células cromafines bovinas.** A, Secuencia temporal de imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de un sector cortical modelo de una célula aislada representativa transfectada con el vector de expresión EGFP-LifeAct (verde) y estimulada a 30°C, registrada a: 5, 10, 20, 30, 40, 50, 55 y 60 s. Las líneas blancas discontinuas delimitan las cavidades. B y C, Valores promedio de área (B) y número de cavidades (C) intra-red. Los datos promedio se muestran como media±SEM. Las flechas delimitan el tiempo de estímulo. Test estadístico Two way ANOVA. Niveles de significancia: \*\*  $P \leq 0,01$  y \*\*\*  $P \leq 0,001$ . Barras de 1 µm.





#### 4.2.5. La dinámica local de fibras conlleva un transporte en “bloque” de los gránulos y las mitocondrias en las células cromafines bovinas aisladas.

Los cambios configuracionales en la red cortical de F-actina en células cromafines, habían sido relacionados previamente con el transporte vesicular (Giner et al., 2007; Giner et al., 2005; Gutierrez and Gil, 2011; Gutierrez and Villanueva, 2018) y la movilidad mitocondrial (Villanueva et al., 2014). En línea con estos estudios, se pretendía analizar si los eventos de expansión y retracción promovían un transporte de gránulos cromafines y mitocondrias con la misma naturaleza local que caracterizaba a estos fenómenos dinámicos.

Para poder abordar este análisis, se utilizó la transfección de células cromafines bovinas con los vectores EGFP-LifeAct (verde) y NPY-RFP (rojo), a fin de poder ver las fibras de F-actina y las vesículas respectivamente. Para el marcaje mitocondrial, se hizo uso de mitotracker Red CMXRos (rojo) 1  $\mu$ M. Las células, fueron sometidas a estimulación mediante despolarización de membrana celular con una solución de KCl 59 mM (K/H alto potasio) siguiendo el protocolo 10-40-10s a 30°C, con el fin de promover los eventos de dinámica local en red cortical de F-actina. Detectados los eventos de expansión y retracción, se analizó el desplazamiento de las: fibras, vesículas y mitocondrias, inmersas en estas zonas de dinámica local e incluídas en la primera micra de extensión coincidiendo con la extensión propia de la red cortical de F-actina. Los datos de desplazamiento, fueron expresados en términos de variaciones de distancia (desplazamiento neto) tal y como fue descrito previamente (Resultado 4.2.2).

Los elementos incluídos en este estudio fueron los siguientes:

- Variaciones de distancia entre la línea del perfil de fibras a cada tiempo de estudio y la hallada a tiempo 10s (“referencia”), para definir el desplazamiento neto de fibras en zonas activas y compararlo con el tipo de desplazamiento llevado a cabo por los gránulos y mitocondrias en estas zonas.
- Variaciones de distancia entre el centroide vesicular/mitocondrial y la referencia, para detectar desplazamientos vesiculares asociados la dinámica local.
- Variaciones de distancia entre el centroide vesicular/mitocondrial y la posición del perfil de fibras de F-actina a cada tiempo de estudio, para estudiar la existencia de un desplazamiento vesicular asociado a la propia dinámica de fibras en eventos de dinámica local.
- Variaciones de distancia entre un agregado de actina interno estático y la referencia, como control de movilidad. Este dato, resultaba relevante a fin de discernir un movimiento vesicular/mitocondrial asociado a dinámica local de fibras y no en base a la movilidad celular.

Los datos de variación de distancia obtenidos para las: fibras (N=55 células, N= 74 expansiones, N= 71 retracciones), los gránulos cromafines (N=25 células, N=223 vesículas, N=40 expansiones, N=37 retracciones) y las mitocondrias (N= 30 células; N= 34 expansiones; N= 34 retracciones), fueron promediados individualmente y de modo independiente para las expansiones y las retracciones. En el caso de las mitocondrias, no se logró hallar zonas de retracción con desplazamientos mitocondriales representativos, debido a ello, los estudios estuvieron centrados en los eventos de expansión

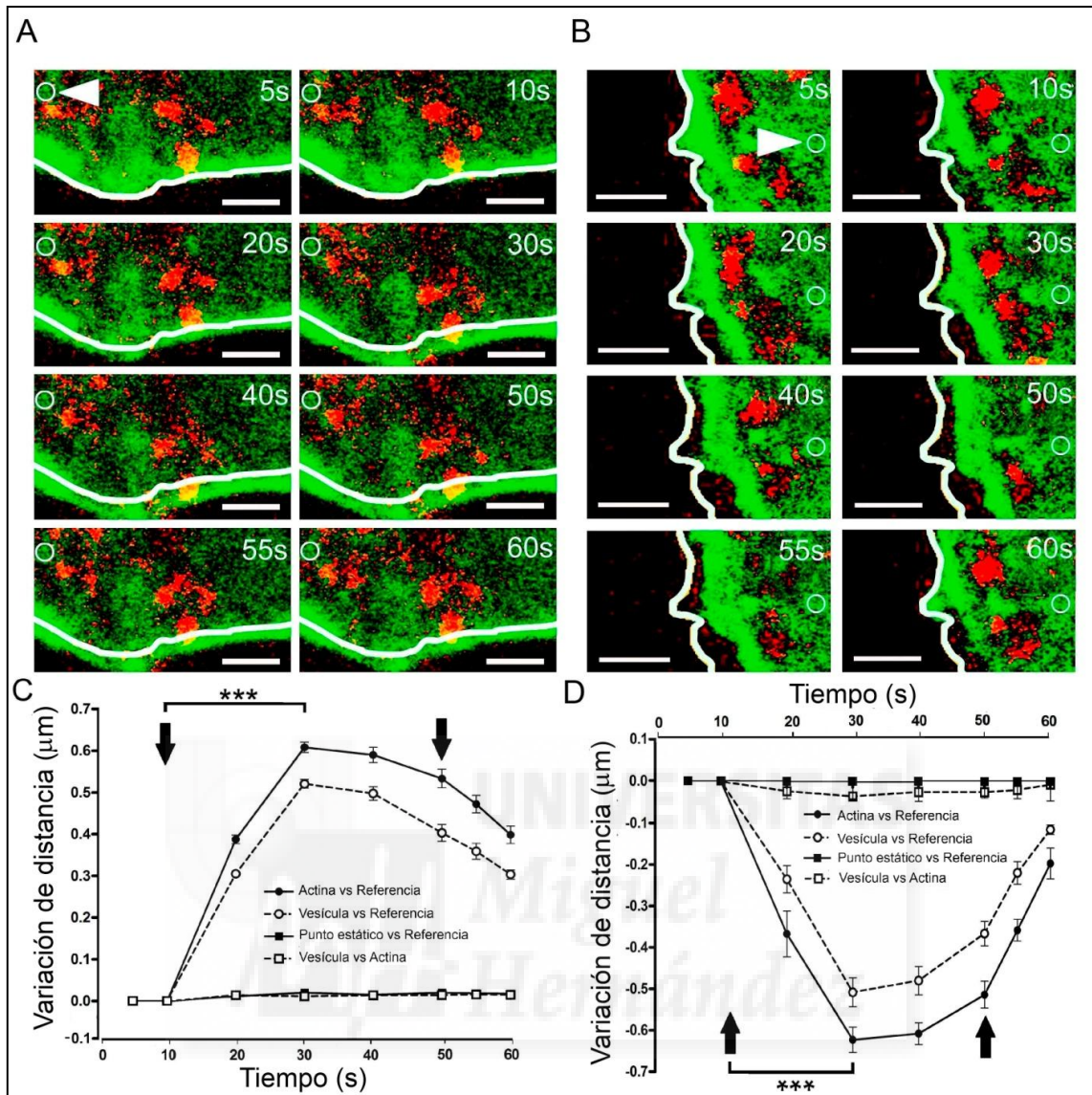
Los valores promedio de variación de distancia, tanto para los gránulos cromafines (Fig 48, C y D) como para las mitocondrias (Fig 49, B), mostraban un desplazamiento de organelas con evolución temporal paralela al de la F-actina y de una magnitud neta similar ( $\approx 0,4 \mu\text{m}$  para el caso de las mitocondrias y  $\approx 0,5 \mu\text{m}$  en el caso de las vesículas, frente  $\approx 0,6 \mu\text{m}$  para F-actina) (Fig 48 y Fig 49). Unido a que los desplazamientos de F-actina y de cada una de las organelas resultaron notoriamente cercanos en magnitud, la pequeña diferencia hallada ( $\approx 0,1 \mu\text{m}$ ) podría estar asociada al propio protocolo de medición para gránulos y mitocondrias, basado en su centroide (punto central de su volumen). Tal y como se podía apreciar en las imágenes (Fig 48, A y B; Fig 49, A), el centroide quedaba distanciado del perfil de la red cortical de F-actina desde el tiempo 5s. Tomando en consideración todos estos resultados, se confirmaba la existencia de un desplazamiento de gránulos y mitocondrias en regiones de dinámica local de la red cortical de F-actina, coincidente en términos de desplazamiento neto con las fibras de F-actina.

Siguiendo con la interpretación de los datos, resultaba interesante que el desplazamiento de organelas, observado en expansiones y retracciones, tuviera lugar en el mismo sentido que el desarrollado por F-actina y que no fuera detectada una variación de distancia entre cada una de las organelas y las fibras (Fig 48 y 49). Unido a todo lo anterior, existía un componente de recuperación posicional compartido para los gránulos (Fig 48, C y D) y las mitocondrias (Fig 49, B) con respecto a la F-actina en los tiempos finales del registro. Todos estos datos tomados en conjunto, informaban de que los desplazamientos detectados en las organelas eran el resultado de un movimiento ligado a la dinámica local de F-actina. Con ello, los eventos de expansión y retracción se convertían en

fenómenos de transporte con una elevada especificidad espacial dentro de la red cortical de F-actina. Estos fenómenos de transporte, podrían ser interpretados como un transporte “en bloque” capaz de movilizar toda una sección citosólica situada bajo las zonas dinámicas.

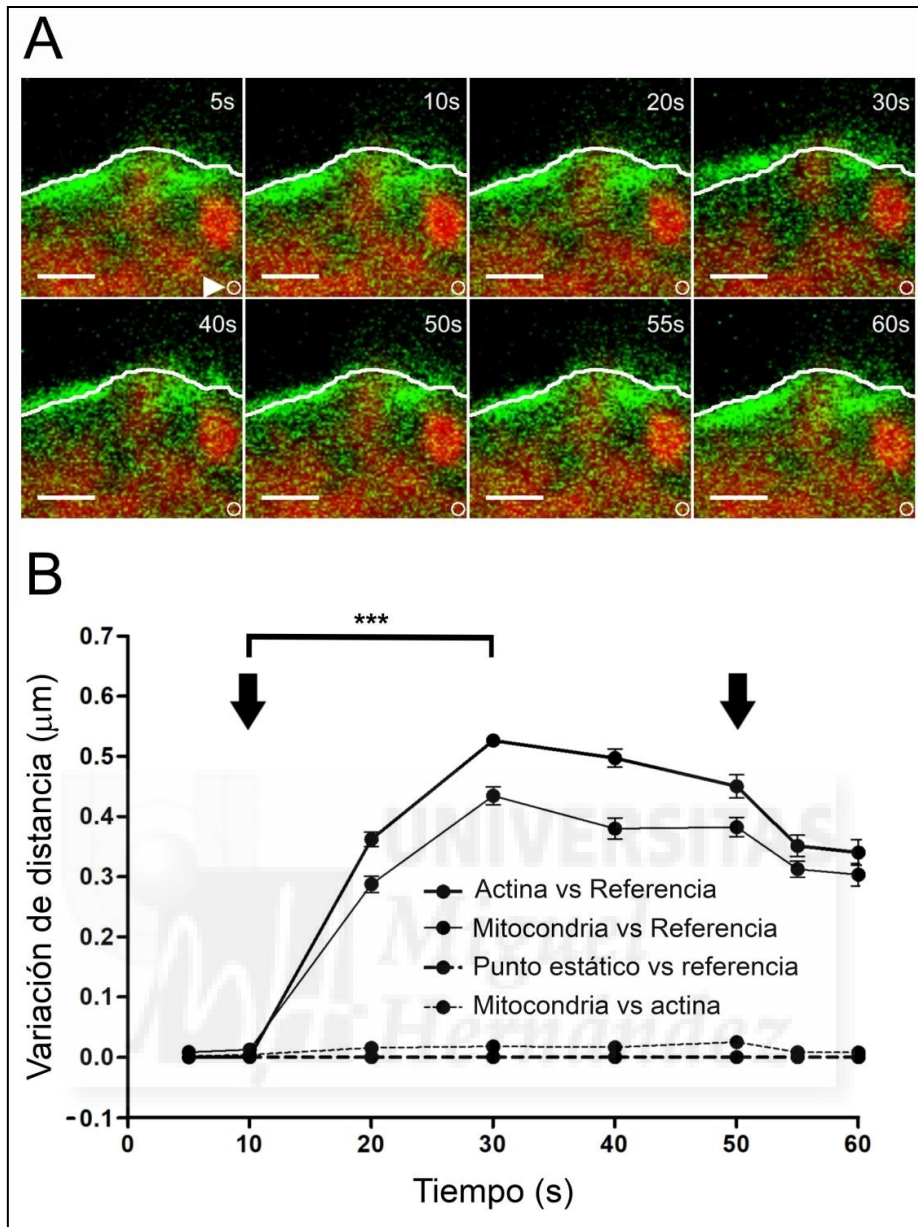
La variación de distancia nula entre el agregado de F-actina interno estático y la referencia (Fig 48 y Fig 49), reflejó la estabilidad de las células analizadas y confirmó la validez de los datos así como de los desplazamientos descritos.





**Fig 48. Desplazamiento vesicular en zonas de expansión y retracción en células cromafines bovinas.**

A y B, Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de una secuencia temporal modelo para una expansión (A) y una retracción (B) de una célula aislada con transfección doble EGFP-LifeAct (verde) y NPY-RFP (rojo) estimulada con KCl a 30°C. Las líneas blancas representan la posición del perfil de F-actina a 5s (previo a estímulo). El círculo blanco marcado por la flecha blanca indica el agregado de F-actina estático usado como control de movimiento para cada secuencia temporal. C y D, Valores promedio de variación de distancia para los pares estructurales analizados en expansiones (C) y retracciones (D). Los datos promedio se muestran como  $\text{media} \pm \text{SEM}$ . Las flechas negras delimitan el tiempo de estímulo. Test estadístico Two way ANOVA. Niveles de significancia: \*\*\*  $P \leq 0,001$ . Barras de 1  $\mu\text{m}$ .



**Fig 49. Desplazamiento mitocondrial en zonas de expansión de célula cromafín bovina.** A, Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de una secuencia temporal para una expansión modelo en una célula aislada transectada con EGFP-LifeAct (verde) y posteriormente marcada con Mitotracker Red CMXRos (rojo) estimulada con KCl a 30°C. Las líneas blancas representan la posición del perfil de F-actina a 5s (previo a estímulo). El círculo blanco marcado por la flecha blanca indica el agregado de F-actina estático usado como control de movimiento para la secuencia temporal. B, Valores promedio de variación de distancia para los pares estructurales analizados. Los datos promedio se muestran como media±SEM. Las flechas negras delimitan el tiempo de estímulo. Test estadístico Two way ANOVA. Niveles de significancia: \*\*\*  $P \leq 0,001$ . Barras de 1 µm.

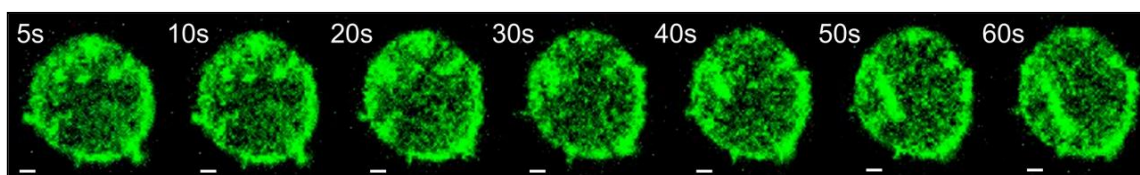


#### 4.2.6. Los microfilamentos de F-actina pueden desarrollar cometas con efecto “impulso” sobre las vesículas cromafines.

Inmersos en el estudio de los eventos dinámicos locales de la red cortical de F-actina en células cromafines bovinas estimuladas, se hizo patente la aparición de unas estructuras cuya morfología era notoriamente similar a las “colas de actina” descritas previamente en otros sistemas celulares. Estas colas de actina, habían sido consideradas un elemento estructural de los llamados “cometas de actina”, un concepto que incluía el par estructural siguiente: el elemento mediador de la propulsión (colas de actina) y el elemento propulsado (Temm-Grove et al., 1994). Los cometas de actina, fueron caracterizados morfológicamente como estructuras con un alto grado de alineamiento de fibras en su periferia (Zhukarev et al., 1995) y una alta densidad en microfilamentos de F-actina internos entrecruzados en su interior (Cameron et al., 2001). Unido a esto, se describió la dependencia de calcio para su ensamblaje y desensamblaje y con ello su desarrollo ligado a estimulación (Larson et al., 2005). Funcionalmente, fueron propuestos como auténticos sistemas de propulsión celular y de organelas (Taunton et al., 2000; Temm-Grove et al., 1994). Pese a haber sido detectadas y caracterizadas en múltiples sistemas celulares, estas estructuras no habían sido descritas antes en células cromafines bovinas, siendo nuestros resultados pioneros en su presentación para este modelo celular neuroendocrino.

Las colas de actina, fueron observadas en células cromafines bovinas aisladas transfectadas con el vector EGFP-LifeAct y estimuladas con KCl a 30°C. Estas estructuras, consistían en formaciones lineales elongadas durante el tiempo de estimulación a partir de agregados de F-actina intracelulares no

necesariamente corticales (Fig 50), representando así otra modalidad de dinámica de fibras no limitada a la zona cortical.



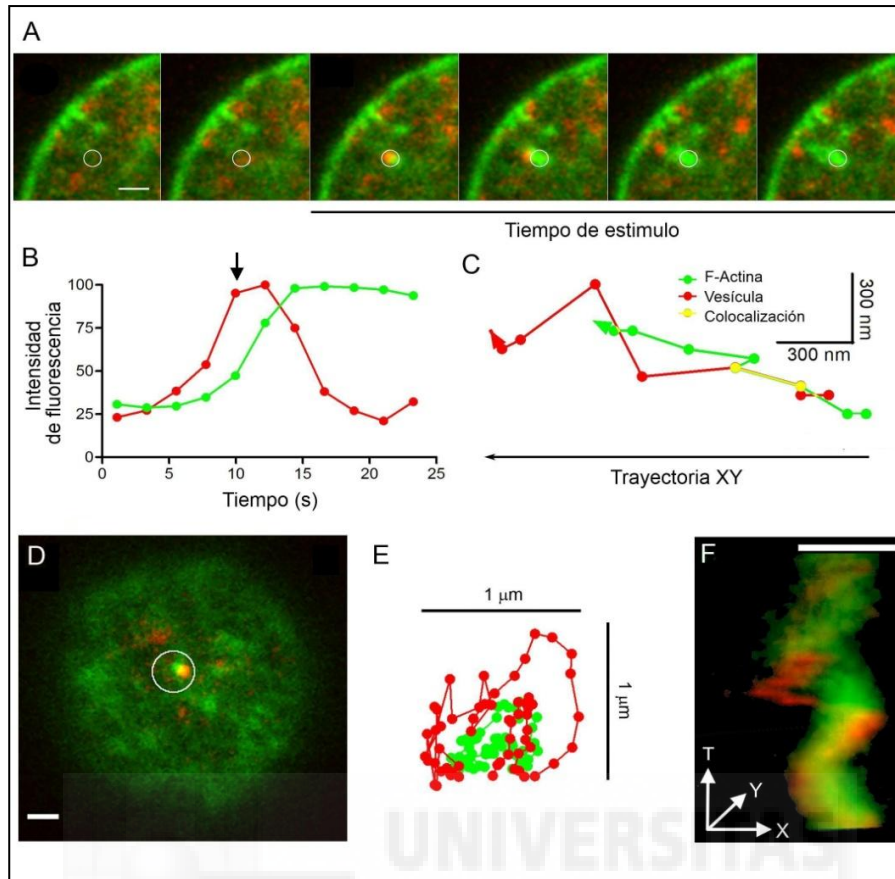
**Fig 50. Evolución temporal de una cola de F-actina en célula cromafín bovina.** Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de una célula cromafín aislada con transfección del vector EGFP-LifeAct (verde) y estimulada a 30°C a tiempos de registro: 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 s. Barras de 1  $\mu$ m.

Tras el hallazgo de las colas de actina en la célula cromafín y conocidos los aspectos funcionales descritos para tales estructuras en el transporte de las organelas en otros sistemas celulares, se planteó estudiar el posible vínculo entre estas y los gránulos cromafínes así como analizar su influencia sobre la propulsión vesicular. Para ello, se utilizaron cultivos de células cromafínes aisladas con doble transfección EGFP-LifeAct (verde) y NPY-RFP (rojo) a fin de poder visualizar las fibras de F-actina en verde y las vesículas en rojo. Estas células fueron sometidas a estimulación mediante despolarización de membrana celular con una solución de KCl 59 mM (K/H alto potasio) siguiendo el protocolo 10-40-10s a 30°C. Las secuencias temporales de imágenes fluorescentes registradas por microscopía confocal (N=12 cometas; N= 30 células), mostraban como origen para las colas de F-actina a los propios agregados de F-actina, los cuales se mostraban vinculados a su vez a gránulos cromafínes (Fig 51, A), pudiéndose plantear como origen de las colas: la propia vesícula. Los resultados obtenidos tras analizar los niveles de fluorescencia para esta región origen, mostraban incrementos en el canal verde (F-actina) coincidiendo con la reducción de los niveles de fluorescencia roja (vesículas) en respuesta a estímulo (Fig 51,



B). Esto, indicaba un proceso de polimerización de actina en el origen del cometa ligado a la desaparición vesicular en el campo analizado (movimiento vesicular). Estos datos presentaban la enlongación de la cola de F-actina, por polimerización de fibras, como un fenómeno de propulsión vesicular y con ello vinculaban a los cometas de F-actina con el transporte de los gránulos cromafínes.

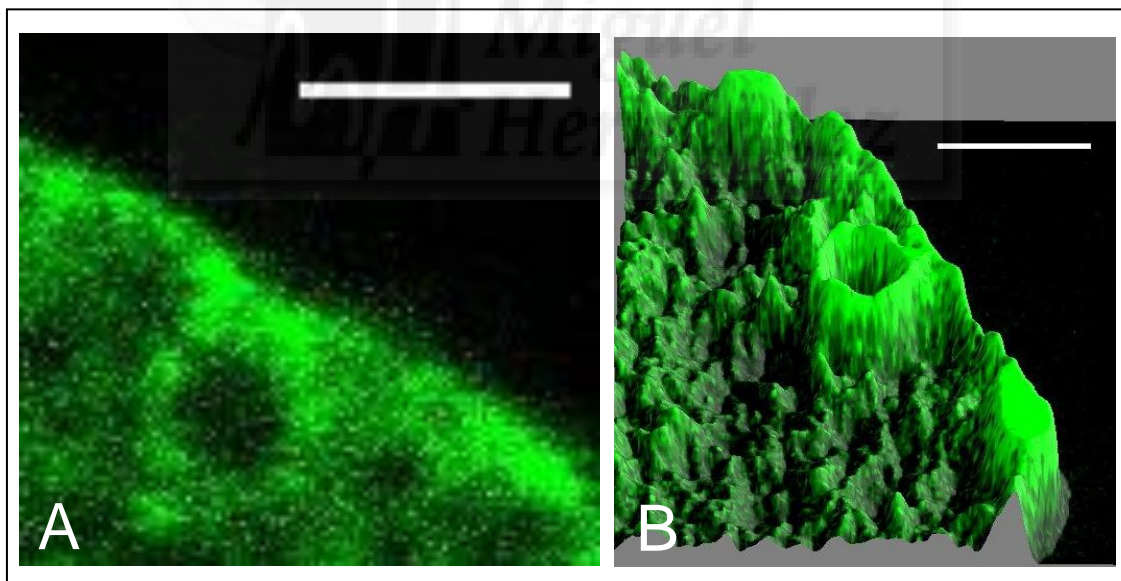
El estudio individualizado de las trayectorias para cada uno de los elementos estructurales de los cometas (vesículas y colas de F-actina), detectados en el plano ecuatorial celular, mostró desplazamientos de orientación similar y tramos compartidos (colocalización) (Fig 51, C), lo que apoyaba un movimiento conjunto de ambas estructuras. Este movimiento conjunto, se pudo observar también para las trayectorias XY (Fig 51, E) de cometas localizados en planos celulares polares (top) (Fig 51, D). La reconstrucción espacio-temporal XYT de un cometa de F-actina modelo (Fig 51, F), demostró que este movimiento conjunto de F-actina y vesículas se desarrollaba de un modo espiralizado y no lineal. La espiralización observada, podía ser el resultado de las propiedades físicas de empuje por polimerización de actina desde su origen en el agregado vinculado al gránulo, lo que planteaba un proceso de polimerización en la base de la cola y no en su extremo más apical.



**Fig 51. Evolución, trayectoria y modelo de desplazamiento para los cometas de F-actina en célula cromafín bovina.** A, Secuencia temporal de imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de una sección cortical en plano ecuatorial de una célula aislada transfectada con el vector EGFP-LifeAct (verde) y NPY-RFP (rojo) estimulada con KCl a 30°C. Las imágenes corresponden a un intervalo temporal de 4,4s. El círculo blanco identifica la región origen del cometa. B, Valores de intensidad de fluorescencia en el tiempo para F-actina (verde) y vesícula (rojo) en la región origen del cometa (círculo blanco, A). La flecha negra indica el inicio de la estimulación. C, Trayectorias XY de F-actina (verde) y vesícula (rojo) para el cometa detectado en plano ecuatorial celular (A) durante el tiempo de estimulación. Salto temporal de 2,2s para una distancia total representada de 1,5  $\mu\text{m}$ . Las secciones amarillas marcan la colocalización en las trayectorias XY de F-actina y vesícula. D, Imagen de microscopía confocal de fluorescencia en plano polar "top" de una célula aislada con transfección doble del vector EGFP-LifeAct (verde) y NPY-RFP (rojo) estimulada con KCl a 30°C. El círculo blanco marca un cometa modelo. E, Trayectorias XY de F-actina (verde) y vesícula (rojo) para el cometa detectado en plano polar celular (D) durante el tiempo de estimulación. F, Reconstrucción XYT de F-actina (verde) y vesícula (rojo) para el cometa detectado en plano polar celular (D) durante el tiempo de estimulación. Barras de 1  $\mu\text{m}$ .

4.2.7. La red cortical de F-actina es capaz de desarrollar anillos de una naturaleza transitoria en las células cromafines bovinas aisladas.

Durante el desarrollo de los estudios de dinámica local de la red de F-actina cortical en células cromafines aisladas estimuladas, se observó un proceso dinámico capaz de generar nuevas estructuras citoesqueletales. Dichas estructuras, eran formaciones corticales de arquitectura sostenida por las fibras de F-actina con una morfología similar a la de un anillo, factor que dió paso al término con el que fueron asignados: anillos de F-actina (Fig 52). Pese a la novedad estructural que ofrecían, se observaron con una frecuencia (4/10; 40%) mucho menor que la hallada para expansiones y retracciones (10/10; 100%) en células cromafines estimuladas.

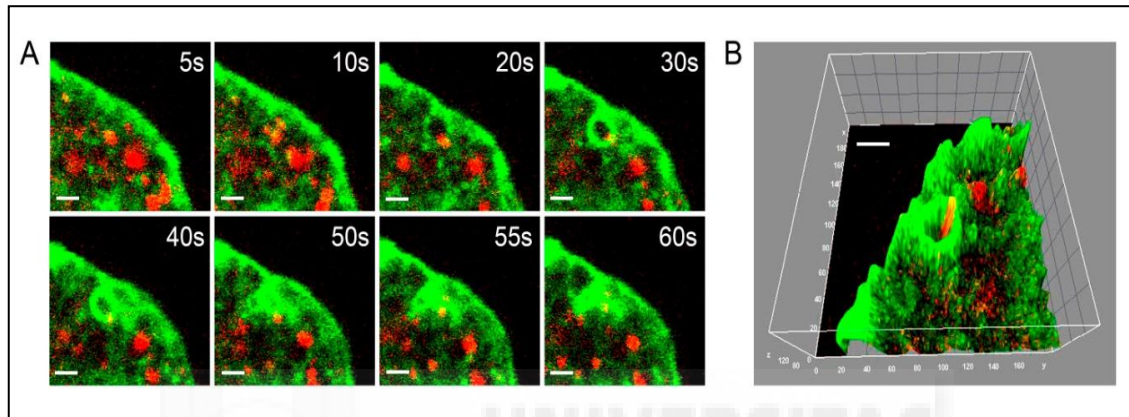


**Fig 52. Anillo cortical modelo de F-actina en célula cromafín bovina.** A, Imagen de microscopía confocal de fluorescencia de un anillo de F-actina modelo en sector cortical de célula aislada transfectada con el vector EGFP-LifeAct (verde) y estimulada con KCl a 30°C para el tiempo de registro 30s. B, Proyección 3D del anillo de F-actina modelo (A). Barras de 1  $\mu$ m.

Las imágenes de fluorescencia obtenidas de la red cortical de F-actina en células cromafines estimuladas expresando EGFP-LifeAct (verde), mostraron para estos anillos un desarrollo estructural ligado a estímulo a partir de agregados corticales de F-actina o pequeños repliegues de fibras situados en la zona periférica. Además, también fueron detectados como parte estructural de algunas retracciones en su fase final. Sin embargo, no mostraron una asociación constante con dichos eventos. En cualquier caso, estas estructuras aparecían siempre *de novo* en la red cortical y tras un tiempo de evolución morfológica, asociada al periodo de estimulación, desaparecían como tales, esto es, se perdía la arquitectura de anillo. Tras la pérdida estructural citada, se observaron dos comportamientos: desaparición estructural completa o presencia final en una versión desestructurada formando una masa densa de fibras aglutinadas. El segundo comportamiento mencionado, fue detectado con la mayor frecuencia (72%). No obstante, independientemente del origen y/o la morfología final adoptada, la evolución temporal descrita definía estas estructuras como elementos de naturaleza transitoria, igual que las expansiones y las retracciones.

Tratando de abordar la funcionalidad los anillos de F-actina, adoptó especial interés su morfología. Estas estructuras recordaban a las cavidades citoesqueléticas y por tanto podrían desempeñar papeles similares, como el albergue vesicular. Sin embargo, lo primero que había que demostrar era la existencia de vesículas visitantes en el espacio que estos definían. Para poder estudiarlo, se planteó un experimento con células cromafines bovinas aisladas con transfección doble para los vectores EGFP-LifeAct (verde) y NPY-RFP (rojo) a fin de poder ver en color verde las fibras y en rojo las vesículas. Los registros

temporales de microscopía confocal obtenidos (N= 10 células; N= 15 anillos), demostraron la presencia de gránulos cromafines (Fig 53).



**Imagen 53. Evolución temporal de un anillo modelo de F-actina en la red cortical de célula cromafín bovina.** A, Secuencia temporal de imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de un anillo cortical de F-actina en un sector cortical de una célula aislada en su plano ecuatorial transfecteda con el vector de expresión EGFP-LifeAct (verde) y NPY-RFP (red) y estimulada a 30°C. B, Proyección 3D del anillo de F-actina (verde) y la vesícula (rojo) a tiempo de registro 30s. Barras de 1  $\mu\text{m}$ .



# 5. DISCUSIÓN

---

## 5.0. Discusión general en base a los resultados.

Las células cromafines aisladas y mantenidas en cultivo, se han usado ampliamente como modelo secretor para investigar las bases moleculares de la exocitosis y endocitosis. Sin embargo, la distribución de las fibras de actina en las células cromafines aisladas, como fue descrito años atrás para los canales de calcio y las proteínas SNARE, está alterada con respecto a las células nativas. Las variantes detectadas en arquitectura de fibras, pueden ser interpretadas como el resultado de una desestabilización tras el aislamiento celular. Una desestabilización, que podría estar ligada no solo a la pérdida del esquema celular y los contactos entre células en el seno de la unidad tisular, sino también a la pérdida de la matriz extracelular y con ella de algunos componentes como las integrinas, de las que han sido descritas influencias estructurales sobre el citoesqueleto de actina. De aquí, derivaría la relevancia de los cultivos tridimensionales, para aplicaciones futuras, con la intención de lograr un acercamiento al nivel más fisiológico.

Conocido el papel del citoesqueleto en la organización de la maquinaria de exocitosis, la diferencia hallada en la distribución de organelas podría ser una consecuencia directa de las propias diferencias en la arquitectura de actina y estar indirectamente vinculada a la desestabilización citoesqueletal post-aislamiento.

A pesar de todas las diferencias halladas, el descubrimiento de la conservada densidad de F-actina y los parches de fodrina, en zona cortical de células aisladas y nativas, confirmaría la validez del modelo aislado como modelo funcional para estudios de secreción. De otro lado, la distribución coincidente entre la proteína fodrina y la actina filamentosa, supone un refuerzo importante tanto al vínculo descrito entre esta espectrina y la actina, como al concepto de fodrina como proteína del citoesqueleto de F-actina en la célula cromafín. Además, parecería lógico pensar en funciones emergentes para la misma que podrían abarcar desde su implicación en la polimerización del filamento de actina, hasta su participación en la estabilidad de la forma polimerizada de la fibra.

Paralelamente a las relevantes consideraciones que derivan de los resultados de la configuración de las fibras de F-actina, la capacidad dinámica local detectada en la red cortical de F-actina, a modo de expansiones y retracciones durante la estimulación, describe una nueva tendencia de reacción del citoesqueleto de F-actina bajo estímulo. Una tendencia basada en cambios sutiles y locales, en vez de transformaciones generales de toda la red. Un concepto, que encaja perfectamente con la especificidad del proceso secretor en la línea de membrana plasmática, definida por las zonas activas a su vez delimitadas por los complejos de fusión.

En relación con esta tendencia de reacción "local", se define un tráfico dirigido en zonas activas que implica movilidad de vesículas y mitocondrias con especificidad espacial así como cambios locales intrared, remodelándose las cavidades por zonas.



Las nuevas formas dinámicas de actina halladas (anillos y cometas), ofrecen alternativas citopámicas funcionales para el albergue y tráfico de vesículas, respectivamente.





## 5.1. Arquitectura de citoesqueleto de F-actina:

### 5.1.1. El citoesqueleto de F-actina interno de las células cromafines bovinas sufre una desestabilización tras el aislamiento celular.

Las diferencias de organización espacial que mostraron los microfilamentos de F-actina entre las células cromafines bovinas aisladas, mantenidas en cultivo celular, en comparación con las células cromafines nativas, inmersas en el tejido adrenomedular, fueron notables. Una distribución de F-actina predominantemente cortical para las células aisladas, contrastaba con una amplia presencia citosólica de estas fibras en las células nativas, otorgando al citoesqueleto de F-actina una arquitectura significativamente diferente entre ambos tipos celulares.

La observación y cuantificación de la actina monomérica (G-actina) en el citoplasma de las células cromafines aisladas, sugería que la distribución cortical de actina filamentosa (F-actina) no podía ser resuelta en base a una pérdida de actina tras el aislamiento celular. Esta, debía ser interpretada más bien como la consecuencia de una desestabilización del citoesqueleto interno tras el proceso de aislamiento celular, a juzgar por la aparente reducción de la F-actina citoplásmica en las células aisladas con respecto a las células nativas.

En busca del origen de dicha desestabilización para la actina filamentosa interna en las células aisladas, se planteó inicialmente atribuirlo a la pérdida de los contactos “célula-célula” post-aislamiento, dada la estrecha relación existente entre la actina y la formación de uniones adherentes entre células (Mege et al., 2006; Wojciak-Stothard et al., 1998). Sin embargo, la simulación de una

organización tisular, mediante un alto grado de contactos celulares en la placa de cultivo por una siembra a alta densidad, no reveló datos significativos sobre la existencia de alguna influencia en la distribución citoplásmica de las fibras por parte de estos contactos celulares. Respecto a estos resultados, cabía considerar el componente “artificial” de los contactos simulados en la placa. Estos, eran tan solo el producto de sembrar, bajo unas densidades elevadas, las células sometidas previamente a un proceso de aislamiento que las convirtió en unidades independientes. La complejidad de la naturaleza de las interacciones celulares en la unidad tisular, era superior al simple contacto físico, lo que sugería abordar la interpretación de la desestabilización citoesquelética desde un punto de vista más amplio. Una interpretación centrada no solo en las interacciones intercelulares, sino en la red de interacciones moleculares existentes en el seno de la matriz extracelular, que se perderían con la eliminación de la matriz y sus componentes tras el proceso de aislamiento.

#### 5.1.2. Existen funciones no descritas para la proteína fodrina vinculada al citoesqueleto de F-actina en las células cromafines bovinas.

La proteína fodrina, había sido vinculada a la membrana plasmática en numerosos trabajos científicos en base a su localización adyacente a esta estructura celular (Aunis and Bader, 1988; Fujimoto and Ogawa, 1987; Langley et al., 1986; Scarfone et al., 1988). El concepto de su relación con membranas, quedó ampliado incluyendo también a las membranas de vesículas y mitocondrias (Langley et al., 1986). Además, se describió su capacidad de interacción con actina (Levine and Willard, 1981) mediada por su subunidad alfa (Perrin and Aunis, 1985). Esto último, ofrecería una explicación a la elevada similitud de organización entre dicha proteína y la F-actina en las células

cromafines aisladas en el estado de reposo celular (Aunis and Bader, 1988; Fujimoto et al., 1991), así como bajo estimulación (Fujimoto and Ogawa, 1987). Todas estas aportaciones, promovieron la consideración de fodrina como una proteína del citoesqueleto de actina (Nakano et al., 2001).

Los resultados incluidos en la presente memoria de tesis doctoral sobre una distribución coincidente entre la fodrina y la actina filamentosa, a pesar de las diferencias de organización citoplásmica descubiertas entre las células cromafines aisladas y las nativas, suponían un refuerzo importante tanto al vínculo descrito entre la espectrina y la actina, como al concepto de fodrina como proteína del citoesqueleto de F-actina en la célula cromafín. Paralelamente y basándonos en este vínculo sólido entre ambas proteínas, nuestros resultados hacían reflexionar sobre la existencia de funciones emergentes para fodrina. Parecía lógico pensar que, dado que había sido demostrado el vínculo de fodrina con múltiples membranas celulares y con F-actina, pudiera existir un mecanismo para mediar interacciones funcionales entre el citoesqueleto de F-actina y esas estructuras (membrana plasmática, vesículas y/o mitocondrias). Sumado a esto, el hecho de no haber hallado una organización de la espectrina vinculada con la actina monomérica (G-actina), pero sí con su forma polimerizada (F-actina), plantearía más funciones emergentes para fodrina. Estas, podrían abarcar desde su implicación en la polimerización del filamento de actina, hasta su participación en la estabilidad de la forma polimerizada de la fibra posteriormente al proceso de polimerización.

### 5.1.3. La célula cromafín bovina aislada como modelo celular neuroendocrino para los estudios de secreción.

La marcada diferencia en la arquitectura de las fibras de F-actina entre las células cromafínes bovinas aisladas y las células presentes en el tejido adrenomedular, indicaba que dicho modelo celular en cultivo se podría alejar del comportamiento fisiológico de las células en su estado nativo. Tomando en consideración este distanciamiento, unido a la implicación de esta estructura celular en el proceso secretor, podría ponerse en duda la idoneidad de la célula cromafín aislada como modelo para estudios de secreción.

A pesar de las citadas diferencias en distribución por parte de las fibras de F-actina en el espacio citoplásmico celular, nuestros datos mostraron que tanto la densidad de microfilamentos como la cantidad de parches de fodrina, estaban conservados en la zona cortical. Estos datos, planteaban un sistema citoesquelético de F-actina cortical conservado entre células cromafínes aisladas y nativas. Dado que la red citoesquelética cortical de F-actina, se localizaba en las inmediaciones de la membrana plasmática celular, escenario de los procesos secretores, quedaba inferida la validez de la célula cromafín aislada como modelo neuroendocrino para estudios de secreción, dando fiabilidad a los resultados obtenidos bajo su utilización en experimentación. Independientemente de esto, la distribución diferencial descrita para el citoesqueleto de F-actina, entre las células cromafínes aisladas y nativas, era un hecho. Por ello, nuestros resultados aconsejan considerar el empleo de modelos más fisiológicos como cultivos tridimensionales o de tejido “in situ” de la médula adrenal, con el objetivo de alcanzar estudios de relevancia fisiológica en

aspectos como el transporte vesicular interno asociado a una distribución citoesquelética de F-actina interna más uniforme.

#### 5.1.4 Los cultivos tridimensionales son una herramienta de aproximación de los estudios de secreción al nivel fisiológico usando la célula cromafín aislada.

En la unidad tisular, las células presentan una condición de contactos célula-célula inmersas en una matriz extracelular formada por múltiples elementos con los que también interactúan, dotando de una alta complejidad a las redes moleculares existentes en el tejido. Las interacciones entre las células y los componentes de la matriz, permiten una gran comunicación entre el medio extracelular y el espacio intracelular y de esta comunicación, deriva la capacidad de la matriz para influir sobre los elementos y procesos celulares (Jiao et al., 2017; Ramdi et al., 1993; Reventos et al., 1989; Schwartz, 1992). Un ejemplo claro de la influencia potencial por parte de los elementos de la matriz extracelular sobre el espacio intracelular, es la que envuelve a integrinas y microfilamentos de actina (Li and Springer, 2017; Niewiarowska et al., 1984; Rodriguez Fernandez and Ben-Ze'ev, 1989; Schwartz, 1992). Sobre esta relación bioquímica, ha sido descrita la capacidad de las integrinas para influir sobre la organización de los microfilamentos (Walzog et al., 1994), así como sobre los procesos de polimerización de la actina (Vicente-Manzanares et al., 2009). Conocida dicha influencia, apareció una interpretación interesante que daría explicación a la desestabilización citoesquelética de la F-actina interna hallada en las células cromafínes aisladas. En esta interpretación, la matriz extracelular adoptaría un papel funcional como regulador de la arquitectura del citoesqueleto de F-actina y unido a ello, el origen de la desestabilización citoesquelética de la F-actina interna podría residir en la pérdida del componente

matricial post-aislamiento. Con ello, quedaría definida la relevancia de considerar a la matriz extracelular y sus componentes a fin de llevar a cabo estudios de neurosecreción con las células cromafines en presencia de una distribución citoesquelética de F-actina interna más fisiológica.

#### 5.1.5. La distribución espacial de las vesículas y las mitocondrias está dirigida por el citoesqueleto de F-actina en las células cromafines bovinas.

En el desarrollo de la exocitosis, existen múltiples elementos clave y la organización espacial de todos ellos está vinculada a su funcionalidad en el proceso. Conocer la distribución de cada uno de estos elementos implicados, es importante no solo para hacer descripciones funcionales individuales de los mismos, sino para una comprensión de la relación entre ellos. Con todo ello, podríamos alcanzar un mayor conocimiento sobre el mecanismo molecular de la maquinaria exocitótica y su función durante la secreción.

Las vesículas y las mitocondrias, son dos de los elementos de la maquinaria exocitótica con un papel importante en secreción. Muchos grupos de investigación, han trabajado en la definición de las diferentes poblaciones citoplásmicas, así como en el análisis funcional de cada una de estas agrupaciones vesiculares (Kuromi and Kidokoro, 2005; Rizzoli and Betz, 2004; Rizzoli and Jahn, 2007) y mitocondriales (Greco et al., 1982; Rossi et al., 2011; Shimada et al., 1984; Villanueva et al., 2014; Vos et al., 2010; Wong et al., 1970).

Unido a estas investigaciones, ha sido descrita la relación funcional entre los elementos de la maquinaria de secreción en las células cromafines. Por un lado, entre los canales de calcio dependientes de voltaje, el retículo endoplásmico y



las mitocondrias, componentes de la triada activa en la señalización de calcio durante la exocitosis (Garcia-Sancho, 2014; Hernandez-Guijo et al., 2001). Por otro, entre las mitocondrias y las proteínas SNAREs en las zonas activas de secreción (Villanueva et al., 2014).

Son varios los trabajos científicos que han establecido, a la base de las relaciones funcionales entre los elementos de la maquinaria exocitótica, una organización estratégica mediada por la red citoesquelética de F-actina (Torregrosa-Hetland et al., 2011; Torregrosa-Hetland et al., 2010; Villanueva et al., 2012b; Villanueva et al., 2014). Con ello, tras el descubrimiento de una distribución diferencial de las fibras de F-actina, entre las células cromafines aisladas y las nativas, resultaba muy interesante estudiar la organización citoplásmica de vesículas y mitocondrias en ambas arquitecturas citoesqueléticas. Nuestros resultados, mostraron unas distribuciones vesiculares y mitocondriales diferentes entre las células cromafines bovinas aisladas y nativas. No obstante, los patrones observados eran compartidos por estas dos organelas en ambos tipos celulares. Ese patrón de distribución compartido, basado en una organización bipoblacional en las células aisladas y unipoblacional en las nativas, encajaba con la organización espacial esperada en relación con la distribución hallada para los microfilamentos de F-actina en cada una de ellas. En el caso de células aisladas, el patrón citoesquelético de F-actina a modo de anillo cortical definiría dos poblaciones: una población cortical internalizada en la propia red de fibras corticales y una segunda población localizada fuera del anillo en la zona citoplásmica más interna. Sin embargo, en el caso de las células nativas, la distribución unipoblacional hallada para gránulos y mitocondrias, ofrecía un patrón espacial de amplia distribución en el

espacio citosólico de igual modo que había sido descrito para las propias fibras. Estos resultados en conjunto, consolidaban la capacidad del citoesqueleto de F-actina para dirigir la organización de los elementos de la maquinaria de secreción en base a la propia configuración de sus fibras, tanto en el sistema aislado como en el nativo.

Independientemente de la distribución diferencial descrita para: citoesqueleto, mitocondrias y vesículas, entre el sistema aislado y el nativo, la densidad de fibras conservada en la red cortical de F-actina entre ambos sistemas, hacía compatible con estos resultados la idea de la triada funcional en secreción, así como otras relaciones publicadas entre elementos de la maquinaria de secreción.

#### 5.1.6. El efecto compensatorio entre las organelas iguala la cinética de secreción entre las células cromafines bovinas nativas y las aisladas.

Tras someter a estudio electrofisiológico a las células cromafines aisladas y nativas, los datos amperométricos fueron muy similares entre ambas. Estos resultados anunciaban inicialmente una baja influencia sobre la respuesta secretora por parte de las distribuciones diferenciales descritas para: fibras de F-actina, vesículas y mitocondrias, en el sistema aislado y nativo.

A fin de poder contrastar estos resultados de amperometría, se llevó a cabo posteriormente una modelización de la respuesta secretora en células aisladas y nativas. Para ello, se hizo uso de modelos matemáticos estocásticos que habían demostrado previamente ser útiles para entender aspectos del proceso de secreción en células cromafines (Segura et al., 2000; Torregrosa-Hetland et al., 2011). Estos, permitieron simular el porcentaje de eventos secretores en el

tiempo en base a las distribuciones descritas de las organelas, en las células aisladas y nativas, con la particularidad de poder incluir en la simulación inicialmente solo una de estas (vesículas) y posteriormente ambas (vesículas y mitocondrias). La cinética de las respuestas secretoras obtenidas, para las células aisladas y nativas, resultó ser muy similar en las dos simulaciones planteadas, acercándose a los estudios obtenidos por amperometría.

Independientemente de la similitud en la cinética del proceso, fueron halladas diferencias para el número máximo de eventos, entre las células aisladas y las nativas, en la simulación donde se había considerado solo la organización de vesículas, mientras que estas no fueron apreciables en la simulación donde se incluyeron ambas organelas. Este dato, nos hizo tomar en consideración la relación entre la organización de estas organelas citoesqueletalmente definidas y la capacidad celular de mantener un ritmo de secreción activa en el tiempo. Por otro lado, la similitud entre la proporción de eventos secretores observados en la respuesta modelizada bajo la consideración de la distribución de vesículas y mitocondrias, podría tener su origen en una compensación por parte del efecto combinado de ambas organelas. Esta interpretación de los resultados, planteaba que a pesar de las diferencias de distribución vesicular y mitocondrial, entre las células aisladas y nativas, la configuración compartida entre estas organelas en cada sistema celular definida por las fibras de F-actina, ejercía un efecto que igualaba los perfiles de secreción en términos del número de eventos.

No obstante, en base a todo lo anteriormente citado, solo podríamos afirmar la relación funcional entre la organización de organelas y la capacidad celular de sostener eventos de secreción en el tiempo. La similitud registrada por técnicas electrofisiológicas en la liberación neta de catecolaminas y la respuesta

secretora obtenida por modelización, entre las células cromafines aisladas y nativas, podría no ser correspondida con una cinética de secreción equivalente entre ambas. Cabe recordar, que hasta la fecha no hemos sido capaces de hacer mediciones amperométricas en célula nativa única y que además los datos procedentes de modelos matemáticos han sido un apoyo para la interpretación de los fenómenos biológicos y no resultados científicos en sí mismos. Es más, han sido publicados trabajos científicos que demostraron un acoplamiento más rápido entre la respuesta secretora y la entrada de calcio en las células nativas (Albillos et al., 2000; Moser and Neher, 1997). Sumado a estos datos, los resultados incluidos en la tesis doctoral de la Dra. López-Font I, con una formación predoctoral en el laboratorio del Dr. Luis Miguel Gutiérrez, confirmaron una colocalización entre los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo P/Q, L y N con proteínas del complejo SNARE (syntaxina 1A) tres veces superior en las células cromafines nativas respecto a las aisladas. La necesidad de un mayor acoplamiento entre ambos elementos en la unidad tisular, podría ser la base del citado acoplamiento más rápido entre la respuesta secretora y la entrada de calcio en tejido y ambos deberían ser considerados para explicar la existencia de diferencias temporales para el proceso secretor entre el sistema de la célula cromafín aislada y la nativa.

## 5.2. Dinámica del citoesqueleto de F-actina:

### 5.2.1. La dinámica local de la red cortical de F-actina representa su vínculo funcional con la membrana plasmática en las células cromafines bovinas aisladas.

La elasticidad que caracteriza a la bicapa lipídica, le permite desarrollar sinuosidades capaces de evolucionar morfológicamente hasta dar lugar a auténticos plegamientos hacia la zona citosólica, así como protuberancias hacia la matriz extracelular. Ambos fenómenos han sido descritos como parte de procesos biológicos de endocitosis (Kukulski et al., 2012; Simunovic and Bassereau, 2014) y exocitosis (Plattner, 1976; Steinhardt et al., 1994) respectivamente. Este vínculo, establecido entre las citadas formaciones en la línea de membrana y los procesos celulares endocitóticos y exocitóticos, ha dotado de un carácter funcional a dichas sinuosidades de membrana.

Los eventos de dinámica local de la red cortical de F-actina, que han sido descritos como parte de los resultados de esta tesis doctoral, estaban basados en protuberancias e invaginaciones del perfil de esta red citoesquelética y presentaban un alto grado de similitud morfológica con las citadas sinuosidades de la membrana plasmática. Dicha similitud morfológica, entre los fenómenos descritos para la bicapa lipídica y la red cortical de F-actina situada en las inmediaciones de la misma, sugería una conexión significativa entre ambas estructuras celulares más allá de la que aportaría su propia organización espacial próxima. Esta, podría definirse como un vínculo funcional basado en morfologías, desarrolladas por estructuras celulares adyacentes, ligadas a un

mismo proceso a fin de complementarse en términos de ejecución de un modo altamente sincronizado en el espacio y en el tiempo.

Un refuerzo a este planteamiento, vino dado por algunos trabajos científicos recientes en los que habían sido descritas múltiples invaginaciones en la membrana plasmática con vesículas corticales sostenidas a una distancia constante (Kukulski et al., 2012). Conocida la dinámica vesicular vinculada al citoesqueleto de F-actina cerca de la membrana plasmática y la dinámica local de este último, este hecho podría ser explicado en base a la propia red de F-actina. Las vesículas corticales, podrían permanecer a una distancia constante de la membrana durante el tiempo de evolución del proceso de invaginación con el cambio morfológico asociado en la propia membrana, movilizadas por una red cortical de fibras de F-actina que también sufriría cambios morfológicos en sintonía con la membrana plasmática adyacente.

#### 5.2.2. Los cometas de F-actina son un sistema de reposición vesicular rápido en las células cromafines bovinas aisladas.

Las colas de F-actina, han sido presentadas como estructuras dinámicas con un desarrollo basado en el proceso de la polimerización y una localización no necesariamente cortical. El vínculo encontrado entre estas colas y las vesículas cromafines, dotaba a estos elementos de la base estructural para ser considerados bajo el término “cometa” y con ello quedaba confirmada a existencia de tales estructuras en las células cromafines aisladas.

La organización de fibras de actina en los cometas, había sido descrita previamente como una distribución espacial alejada de la que estas presentan en lamelipodios. Sin embargo, se encontró para ambos un mecanismo

compartido de nucleación basado en polimerización de las fibras (Cameron et al., 2001). Esta nucleación, otorgaba a los cometas una movilidad propulsada (Cameron et al., 2001) y los convertía en auténticos sistemas de transporte. Este sistema de propulsión basado en actina, había sido vinculado al transporte de microorganismos patógenos intracelulares como *Listeria monocytogenes* (Sechi et al., 1997; Temm-Grove et al., 1994) y de organelas tales como endosomas y lisosomas en otros sistemas celulares como ovocitos de xenopus sp (Taunton et al., 2000). Nuestros resultados, demostraron que los cometas de F-actina, detectados en cromafines, se desarrollaban también por polimerización de fibras. Con un origen en los agregados de actina, vinculados a vesículas, el proceso de polimerización de actina se traducía en un efecto “impulso” sobre los gránulos. Cabría la posibilidad de que el agregado inicial, cuya polimerización posterior daría lugar a la cola del cometa de actina, fuera un elemento presente en la base del gránulo cromafín con un desarrollo dependiente de estimulación y un origen en la propia vesícula. Este concepto, encontraría un sólido apoyo con el descubrimiento de la maquinaria proteica de nucleación de actina (N-WASP, el complejo Arp2/3...etc.) en las membranas de los endosomas y los lisosomas, descrito en otros sistemas celulares (Taunton et al., 2000). Además, las trayectorias helicoidales observadas para tales estructuras encajarían con un comportamiento físico de empuje desde la base del gránulo asociado a la propia polimerización (Bernheim-Groswasser et al., 2005) y este movimiento sería mucho más fácil de interpretar partiendo del concepto que incluía un agregado de actina vinculado a la vesícula como origen de la estructura polimerizada posterior, que daría forma al cometa.

En cualquier caso, todos los cometas de F-actina detectados en célula cromafín, tenían un desarrollo muy rápido permitiendo un transporte vesicular a mayor velocidad que el ofrecido por el remodelamiento de la red cortical o la propia dinámica de fibras. Unido a esto, las distancias de desplazamiento citoplásmico abarcadas por estos cometas, calculadas en base a las trayectorias registradas, fueron mayores que las alcanzadas por otros mecanismos de transporte asociados a F-actina. De este modo, estas estructuras podrían ser consideradas sistemas de transporte potentes para una rápida movilización de poblaciones vesiculares distales, resultando relevantes en la reposición vesicular inmediata en las zonas activas de secreción.

### 5.2.3. Los anillos de F-actina son cavidades de nueva formación con una función en secreción para las células cromafínes bovinas aisladas.

La morfología propia de los anillos de F-actina, descrita para células cromafínes aisladas en la presente memoria de tesis doctoral, acercaría estas estructuras a las cavidades internas de la red cortical de F-actina en términos morfológicos. Unido a esto, haber hallado gránulos cromafínes en el interior de dichos anillos, podría plantear también una equivalencia en términos funcionales entre ambas estructuras. Con ello, nuestros resultados presentaban a los anillos de F-actina como cavidades de nueva formación con capacidad de reservorio vesicular.

Además, nuestros resultados demostraron que la posición de los gránulos dentro de los anillos, compartía la lateralización propia de las vesículas en las cavidades de la red cortical de F-actina en las células cromafínes aisladas. De este modo se reproducía en los anillos, la organización vesicular interna descrita previamente en este sistema celular para las cavidades citoesqueletales



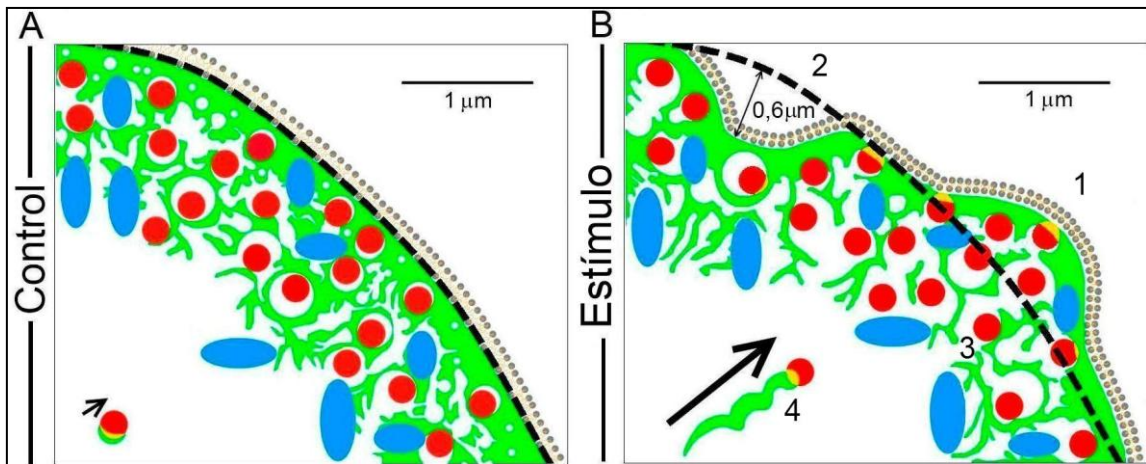
(Torregrosa-Hetland et al., 2011). Esta disposición lateral de las vesículas, había sido vinculada en estudios previos, mediante un modelo matemático, con una alta probabilidad de secreción y con una respuesta exocitótica más rápida que para posiciones centralizadas (Torregrosa-Hetland et al., 2011). Dado el valor estratégico en exocitosis de esta organización vesicular ligada a las paredes de la cavidad, los anillos de F-actina podrían ser estructuras capaces de albergar vesículas con una configuración altamente activa en secreción.

#### 5.2.4. El modelo integrado de sistemas de transporte para organelas mediados por el citoesqueleto de F-actina en las células cromafines bovinas aisladas.

El tráfico vesicular, representa el sistema de movilización eficaz y efectivo de las vesículas hasta la zona cortical, así como el incremento de su probabilidad de acercamiento a las zonas activas situadas en la membrana plasmática. Estudios previos llevados a cabo por el grupo de investigación (Giner et al., 2007; Giner et al., 2005), habían demostrado la plasticidad de la barrera cortical de F-actina durante el proceso secretor. Una plasticidad, basada en la capacidad de dicha estructura para cambiar su función de retención vesicular y permitir el transporte de los gránulos cromafines hacia la membrana plasmática (Giner et al., 2007; Gutierrez, 2012).

El trabajo incluido en la presente tesis doctoral, aportó el descubrimiento de una variedad de tipologías de transporte que afectaban no solo a las vesículas sino también a organelas como las mitocondrias. Dichas tipologías de transporte, quedarían resumidas en la figura 54 y eran las siguientes: el transporte de orgánulos vinculado a los eventos de expansión (1) y retracción (2) de la red cortical de F-actina, la dinámica de gránulos cromafines en el interior

de la red cortical por el remodelamiento de los huecos (3) y la movilización vesicular mediada por los cometas de F-actina (4).



**Fig 54. Modelo integrado de las modalidades de transporte vesicular local en células cromafínes bovinas.** A, Representación de la red cortical de F-actina (verde), vesículas (rojo) y mitocondrias (azul) en ausencia de estímulo. B, Representación de la red cortical de F-actina (verde), vesículas (rojo) y mitocondrias (azul) bajo estimulación. La línea negra discontinua marca el perfil de la red cortical de F-actina previo a estímulo. Los números identifican cada una de las variantes de transporte mediadas por F-actina: el transporte de orgánulos vinculado a los eventos de expansión (1) y retracción (2) de la red cortical de F-actina, la dinámica de gránulos cromafínes en el interior de la red cortical por el remodelamiento de las cavidades (3) y la movilización vesicular mediada por los cometas de F-actina (4). Barras de 1  $\mu\text{m}$ .

El transporte de los gránulos ligado a los eventos de expansión (1) y retracción (2) de la red cortical de F-actina, estaba basado en un desplazamiento de los gránulos cromafínes por asociación a las fibras corticales. Esta variante de transporte, tenía un carácter local del mismo modo que los propios eventos a los que estaba asociada y se desarrollaba “en bloque”, esto es, implicando a todas las vesículas corticales inmersas en la zona de dinámica local. En este transporte “en bloque”, las vesículas se movían en el mismo sentido que las fibras y se desplazaban con la misma magnitud que ellas. También se describieron fenómenos de transporte en bloque para algunas organelas tales

como las mitocondrias, principalmente asociados a zonas de expansión. En este sentido, este tipo de transporte era capaz de movilizar zonas enteras del citoplasma celular, situadas bajo las zonas de dinámica local de fibras corticales, incluyendo los orgánulos presentes en estas.

Unido a la dinámica local de fibras, apareció un remodelamiento local de las cavidades en el interior de la red cortical de F-actina. Dado que el tráfico vesicular, había sido asociado previamente en las células cromafines a la dinámica de estas cavidades citoesqueletales y las variaciones en su dimensión, se planteó como tercer mecanismo implicado en la dinámica de los gránulos cromafines a estos cambios en el esquema de huecos (3). Siguiendo con la funcionalidad aportada por las cavidades citoesqueletales en la movilidad vesicular, cabría citar a los anillos corticales de F-actina desarrollados en respuesta a estímulo. A pesar de no constituir un mecanismo de transporte propiamente dicho para los gránulos, sí estaban implicados en la dinámica de los mismos ya que su descripción, como cavidades de nueva formación, los caracterizaría como nuevos espacios de movilidad controlada para estos.

Por último, cabría mencionar la modalidad de transporte vesicular promovido por los cometas de F-actina (4). A diferencia de las variantes previamente descritas, esta modalidad de transporte tenía como base fundamental la polimerización de las fibras de F-actina y no su dinámica. Los cometas, ejercían sobre los gránulos un impulso derivado de su desarrollo por polimerización desde su origen, promoviendo así su movilización por el espacio citoplásmico a una velocidad mayor que la que ofrecían los sistemas antes descritos (1, 2 y 3).



## 6. CONCLUSIONES

---

1. La célula cromafín bovina aislada, mantenida en cultivo celular, muestra una organización de F-actina predominantemente cortical con una menor presencia perinuclear, que contrasta con una amplia distribución de fibras en las células nativas del tejido adrenomedular.
2. Las organizaciones espaciales descritas para las fibras de F-actina, son compartidas por proteínas citoesqueletales como la fodrina en células cromafínes bovinas nativas y aisladas.
3. A pesar de la diferente arquitectura para el citoesqueleto de F-actina en células cromafínes bovinas nativas y aisladas, la densidad de fibras de F-actina así como el número de parches de fodrina, están altamente conservados entre ambas en la zona cortical.
4. La distribución de las vesículas y las mitocondrias es bipoblacional en las células cromafínes bovinas aisladas mientras que en las células nativas es unipoblacional, encajando ambos patrones con la distribución descrita del citoesqueleto de F-actina en los dos tipos celulares.
5. Pese a la diferente configuración hallada para las: fibras de F-actina, vesículas y mitocondrias, entre las células cromafínes bovinas nativas y las aisladas, los datos de amperometría en población celular no muestran diferencias significativas en la cinética de secreción entre ambas.

6. El modelo matemático utilizado para los estudios de cinética de secreción, respalda los resultados amperométricos en base a una compensación por parte del efecto combinado de vesículas y mitocondrias que iguala los perfiles de secreción.

7. Las fibras de F-actina corticales, son capaces de desarrollar una dinámica local a modo de expansiones y retracciones mediadas por el complejo F-actina - miosina II (complejo actomiosina) en células cromafínes bovinas aisladas estimuladas.

8. Los eventos de expansión y retracción de la red cortical de F-actina, conducen el transporte local de organelas implicando el desplazamiento “en bloque” de toda una región citoplásmica bajo estas zonas dinámicas y consecuentemente de todos los componentes citosólicos en la proximidad de las zonas de secreción en respuesta a estimulación.

9. Las cavidades internas de la red de F-actina cambian en tamaño y número en respuesta a estímulo unido a los eventos de dinámica local y tales variaciones estructurales se encuentran relacionadas con la regulación del tráfico vesicular a nivel cortical en células cromafínes bovinas aisladas estimuladas.

10. Las células cromafínes bovinas aisladas estimuladas son capaces de desarrollar cometas, a partir de agregados de F-actina polimerizados, con un efecto propulsor de los gránulos cromafínes dentro de la célula.

11. La red cortical de F-actina, puede generar anillos de fibras a modo de cavidades de nueva formación de carácter transitorio en células cromafínes bovinas aisladas estimuladas.

12. El citoesqueleto de F-actina participa en un amplio conjunto de mecanismos implicados en la dinámica vesicular y mitocondrial consolidando la importancia de su: distribución, movilidad y capacidad de remodelado en respuesta a estímulo, en el tráfico de organelas hacia las zonas activas de secreción.







## 6. CONCLUSIONS

---

1. F-actin cytoskeleton shows prevalent cortical organization and minor perinuclear presence in isolated bovine chromaffin cells in cell culture, contrasting with wide distribution of F-actin fibers in native bovine chromaffin cells from adrenal medulla tissue.
2. Cytoskeletal proteins such as fodrin share the previously described spatial organization with F-actin fibers in both isolated and native bovine chromaffin cells.
3. Apart from architecture differences for F-actin cytoskeleton between isolated and native bovine chromaffin cells, F-actin fibers density and number of fodrin clusters are highly conserved at cortical zone from both kind of cells.
4. Vesicles and mitochondria are distributed in two cytoplasmic populations at isolated bovine chromaffin cells, but these organelles appear as a wide single cytoplasmic population in native cells. Both patterns fit in the described F-actin cytoskeleton distribution for isolated and native bovine chromaffin cells.
5. Despite of configurational differences for F-actin fibers, vesicles and mitochondria between isolated and native bovine chromaffin cells, amperometry data in cell population do not show significant differences at secretion kinetics level between them.

6. Mathematical models used for secretion kinetics studies support amperometric results by compensation based on the combined effect of vesicles and mitochondria that equalizes secretion profiles between isolated and native bovine chromaffin cells.
7. F-actin cortical fibers are able to develop local dynamics in terms of expansion and retraction events mediated by the F-actin - myosin II complex (actomyosin complex) in stimulated isolated bovine chromaffin cells.
8. F-actin cortical network expansion and retraction events drive local transport of organelles implying the displacement of whole subplasmalemmal space under these dynamic zones and consequently all cytosolic components in the proximity of secretory zones in response to stimulation.
9. F-actin network cavities are remodelled in terms of size and number under stimulation linked to local dynamics events and these structural variations has been related to vesicular trafficking regulation at cortical level in stimulated isolated bovine chromaffin cells.
10. Stimulated isolated bovine chromaffin cells can develop F-actin comets by F-actin aggregates polymerization propelling chromaffin granules inside cell.
11. F-actin cortical network is able to create fibers rings like new cavities with a transient condition in stimulated isolated bovine chromaffin cells.
12. F-actin cytoskeleton take part of a wide set of mechanisms involved in vesicles and mitochondria dynamics verifying the relevance of its: distribution, motion and remodeling ability by stimulation, for organelles trafficking to secretion active zones.

## 7. DESARROLLOS FUTUROS

---

Los desarrollos futuros, que emanan de la presente tesis doctoral, están centrados en la aplicación de los hallazgos en términos de citoarquitectura y dinámica funcional del citoesqueleto de F-actina.

Por un lado, el desarrollo futuro que emana de la influencia descrita por parte de la matriz extracelular sobre el citoesqueleto de F-actina, está vinculado a la investigación en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. La enfermedad de Alzheimer (EA), es la forma más común de demencia caracterizada por la presencia de ovillos neurofibrilares intracelulares y depósitos extracelulares de beta-amiloide. La propuesta futura, estaría centrada en estudiar la influencia ejercida por los depósitos de beta-amiloide sobre la citoarquitectura funcional de F-actina, con el objetivo de detectar el efecto indirecto derivado de estos componentes extracelulares en las alteraciones de la neurosecreción y el proceso de la neurodegeneración base del deterioro cognitivo y trastornos conductuales que caracterizan esta enfermedad.

Por otro lado, considerando la descrita capacidad dinámica del complejo acto-miosina II y el transporte dependiente de F-actina, aparece una aplicación nanotecnológica muy interesante. Esta aplicación, consiste en el diseño de sistemas de transporte guiados basados en los microfilamentos de F-actina a modo de carriles de paso y en la miosina II como principal componente propulsor. El objetivo final de la misma, es poder configurar un circuito de tráfico molecular controlado. Dicha propuesta, podría resultar muy útil en el campo clínico, especialmente para la farmacoterapia dirigida, o en el desarrollo de los chips en investigación.



## 7. FUTURE DEVELOPMENTS

---

Future developments emerged from this PhD thesis are focused on taking advantage of F-actin cytoskeleton cytoarchitecture and functional dynamics findings.

On the one hand, a possible future development is related to scientific research in neurodegenerative diseases such as Alzheimer taking into account described extracellular matrix influence on F-actin cytoskeleton. Alzheimer Disease (AD) is most common kind of dementia characterized by intracellular neurofibrillary tangles and extracellular beta-amyloid deposits. The future proposal would be focused on studying beta-amyloid deposits influence on F-actin functional cytoarchitecture in order to detect indirect effect from these extracellular components on neurosecretion disturbance and neurodegeneration process basis of the cognitive impairment and behavioral disorders that characterize this disease.

On the other, a very interesting nanotechnological application emerges from acto-myosin II complex dynamic capacity and derivative F-actin dependent transport. The application consist of guided transport systems design based on F-actin microfilaments like molecular trafficking tracks and myosin II as the main propeller component. The final objective is creating a spatial circuit with controlled molecular trafficking. This proposal could be very useful at clinical field especially for targeted pharmacotherapy or for research chips development (lab-on-a-chip).



## 8. BIBLIOGRAFÍA / REFERENCES

---

- **Alabi, A. A. and Tsien, R. W.** (2012). Synaptic vesicle pools and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, a013680.
- **Albertini, D. F. and Clark, J. I.** (1975). Membrane-microtubule interactions: concanavalin A capping induced redistribution of cytoplasmic microtubules and colchicine binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 4976-80.
- **Albillos, A., Carbone, E., Gandia, L., Garcia, A. G. and Pollo, A.** (1996a). Opioid inhibition of Ca<sup>2+</sup> channel subtypes in bovine chromaffin cells: selectivity of action and voltage-dependence. *Eur J Neurosci* **8**, 1561-70.
- **Albillos, A., Gandia, L., Michelena, P., Gilabert, J. A., del Valle, M., Carbone, E. and Garcia, A. G.** (1996b). The mechanism of calcium channel facilitation in bovine chromaffin cells. *J Physiol* **494 ( Pt 3)**, 687-95.
- **Albillos, A., Neher, E. and Moser, T.** (2000). R-Type Ca<sup>2+</sup> channels are coupled to the rapid component of secretion in mouse adrenal slice chromaffin cells. *J. Neurosci.* **20**, 8323-8330.
- **Ales, E., Tabares, L., Poyato, J. M., Valero, V., Lindau, M. and de Toledo, G. A.** (1999). High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nature Cell Biology* **1**, 40-44.
- **Almers, W.** (1990). Exocytosis. *Annu.Rev.Physiol* **52**, 607-624.
- **Almers, W. and Tse, F. W.** (1990). Transmitter release from synapses: does a preassembled fusion pore initiate exocytosis? *Neuron* **4**, 813-818.
- **Allersma, M. W., Bittner, M. A., Axelrod, D. and Holz, R. W.** (2006). Motion matters: secretory granule motion adjacent to the plasma membrane and exocytosis. *Mol.Biol.Cell* **17**, 2424-2438.
- **Allison, A. C. and Davies, P.** (1974). Interactions of membranes, microfilaments, and microtubules in endocytosis and exocytosis. *Adv Cytopharmacol* **2**, 237-48.
- **Ammar, M. R., Kassas, N., Chasserot-Golaz, S., Bader, M. F. and Vitale, N.** (2013). Lipids in Regulated Exocytosis: What are They Doing? *Front Endocrinol (Lausanne)* **4**, 125.
- **Aoki, R., Kitaguchi, T., Oya, M., Yanagihara, Y., Sato, M., Miyawaki, A. and Tsuboi, T.** (2010). Duration of fusion pore opening and the amount of hormone released are regulated by myosin II during kiss-and-run exocytosis. *Biochem J* **429**, 497-504.
- **Arnette, C., Frye, K. and Kaverina, I.** (2016). Microtubule and Actin Interplay Drive Intracellular c-Src Trafficking. *Plos One* **11**, e0148996.
- **Ashby, M. C. and Tepikin, A. V.** (2001). ER calcium and the functions of intracellular organelles. *Semin.Cell Dev.Biol.* **12**, 11-17.
- **Aunis, D. and Bader, M. F.** (1988). The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells. *J.Exp.Biol.* **139**, 253-266.
- **Aunis, D., Bader, M. F., Langley, O. K. and Perrin, D.** (1987). Tubulin- and actin-binding proteins in chromaffin cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **493**, 435-447.
- **Aunis, D. and Langley, K.** (1999). Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta Physiol Scand* **167**, 89-97.
- **Bader, M. F., Bernier-Valentin, F., Rousset, B. and Aunis, D.** (1984). The adrenal paraneurone: tubulin organization. *Can J Physiol Pharmacol* **62**, 502-11.

- **Bader, M. F., Doussau, F., Chasserot-Golaz, S., Vitale, N. and Gasman, S.** (2004). Coupling actin and membrane dynamics during calcium-regulated exocytosis: a role for Rho and ARF GTPases. *Biochim.Biophys.Acta* **1742**, 37-49.
- **Balseiro-Gomez, S., Flores, J. A., Acosta, J., Ramirez-Ponce, M. P. and Ales, E.** (2016). Transient fusion ensures granule replenishment to enable repeated release after IgE-mediated mast cell degranulation. *J Cell Sci* **129**, 3989-4000.
- **Ballesta, J. J., Palmero, M., Hidalgo, M. J., Gutierrez, L. M., Reig, J. A., Viniegra, S. and Garcia, A. G.** (1989). Separate binding and functional sites for omega-conotoxin and nitrendipine suggest two types of calcium channels in bovine chromaffin cells. *J.Neurochem.* **53**, 1050-1056.
- **Baum, S. G., Wittner, M., Nadler, J. P., Horwitz, S. B., Dennis, J. E., Schiff, P. B. and Tanowitz, H. B.** (1981). Taxol, a microtubule stabilizing agent, blocks the replication of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 4571-5.
- **Becker, K. A. and Hart, N. H.** (1999). Reorganization of filamentous actin and myosin-II in zebrafish eggs correlates temporally and spatially with cortical granule exocytosis. *J Cell Sci* **112 ( Pt 1)**, 97-110.
- **Becherer, U., Moser, T., Stuhmer, W. and Oheim, M.** (2003). Calcium regulates exocytosis at the level of single vesicles. *Nat.Neurosci.* **6**, 846-853.
- **Berberian, K., Torres, A. J., Fang, Q., Kisler, K. and Lindau, M.** (2009). F-actin and myosin II accelerate catecholamine release from chromaffin granules. *J.Neurosci.* **29**, 863-870.
- **Bernheim-Groswasser, A., Prost, J. and Sykes, C.** (2005). Mechanism of actin-based motility: a dynamic state diagram. *Biophys J* **89**, 1411-9.
- **Biales, B., Dichter, M. and Tischler, A.** (1976). Electrical excitability of cultured adrenal chromaffin cells. *J Physiol* **262**, 743-53.
- **Boldogh, I. R. and Pon, L. A.** (2006). Interactions of mitochondria with the actin cytoskeleton. *Biochim.Biophys.Acta* **1763**, 450-462.
- **Borges, R., Gandia, L. and Carbone, E.** (2018). Old and emerging concepts on adrenal chromaffin cell stimulus-secretion coupling. *Pflugers Arch* **470**, 1-6.
- **Borisovska, M., Zhao, Y., Tsytsyura, Y., Glyvuk, N., Takamori, S., Matti, U., Rettig, J., Sudhof, T. and Bruns, D.** (2005). v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion. *EMBO J.* **24**, 2114-2126.
- **Bossu, J. L., De, W. M. and Feltz, A.** (1991). Two types of calcium channels are expressed in adult bovine chromaffin cells. *J.Physiol* **437**, 621-634.
- **Boujemaa-Paterski, R., Galland, R., Suarez, C., Guerin, C., They, M. and Blanchoin, L.** (2014). Directed actin assembly and motility. *Methods Enzymol* **540**, 283-300.
- **Braet, F., De Zanger, R., Jans, D., Spector, I. and Wisse, E.** (1996). Microfilament-disrupting agent latrunculin A induces and increased number of fenestrae in rat liver sinusoidal endothelial cells: comparison with cytochalasin B. *Hepatology* **24**, 627-35.
- **Breckenridge, L. J. and Almers, W.** (1987). Currents through the fusion pore that forms during exocytosis of a secretory vesicle. *Nature* **328**, 814-817.
- **Bretscher, A. and Weber, K.** (1978). Purification of microvilli and an analysis of the protein components of the microfilament core bundle. *Exp Cell Res* **116**, 397-407.
- **Bubb, M. R., Senderowicz, A. M., Sausville, E. A., Duncan, K. L. and Korn, E. D.** (1994). Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *J Biol Chem* **269**, 14869-71.
- **Buchthal, F., Deutsch, A. and et al.** (1947). On the effect of adenosine triphosphate on myosin threads. *Acta Physiol Scand* **13**, 167-80.
- **Bunn, S. J. and Boyd, T. L.** (1992). Characterization of histamine-induced catecholamine secretion from bovine adrenal medullary chromaffin cells. *J Neurochem* **58**, 1602-10.



- **Burgess, T. L. and Kelly, R. B.** (1987). Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu Rev Cell Biol* **3**, 243-93.
- **Burgoyne, R. D. and Cheek, T. R.** (1987a). Cytoskeleton: role of fodrin in secretion. *Nature* **326**, 448.
- **Burgoyne, R. D. and Cheek, T. R.** (1987b). Reorganisation of peripheral actin filaments as a prelude to exocytosis. *Biosci.Rep.* **7**, 281-288.
- **Burgoyne, R. D., Fisher, R. J. and Graham, M. E.** (2001). Regulation of kiss-and-run exocytosis. *Trends Cell Biol* **11**, 404-5.
- **Burgoyne, R. D., Morgan, A., Barnard, R. J., Chamberlain, L. H., Glenn, D. E. and Kibble, A. V.** (1996). SNAPs and SNAREs in exocytosis in chromaffin cells. *Biochem.Soc.Trans.* **24**, 653-657.
- **Bustos, G., Cruz, P., Lovy, A. and Cardenas, C.** (2017). Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Calcium Communication and the Regulation of Mitochondrial Metabolism in Cancer: A Novel Potential Target. *Front Oncol* **7**, 199.
- **Cameron, L. A., Svitkina, T. M., Vignjevic, D., Theriot, J. A. and Borisy, G. G.** (2001). Dendritic organization of actin comet tails. *Curr Biol* **11**, 130-5.
- **Carlier, M. F.** (1990). Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Adv Biophys* **26**, 51-73.
- **Caviston, J. P. and Holzbaur, E. L.** (2006). Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport. *Trends Cell Biol.* **16**, 530-537.
- **Celler, K., Koning, R. I., Koster, A. J. and van Wezel, G. P.** (2013). Multidimensional view of the bacterial cytoskeleton. *J Bacteriol* **195**, 1627-36.
- **Cena, V., Nicolas, G. P., Sanchez-Garcia, P., Kirpekar, S. M. and Garcia, A. G.** (1983). Pharmacological dissection of receptor-associated and voltage-sensitive ionic channels involved in catecholamine release. *Neuroscience* **10**, 1455-62.
- **Cocchia, D. and Michetti, F.** (1981). S-100 antigen in satellite cells of the adrenal medulla and the superior cervical ganglion of the rat. An immunochemical and immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* **215**, 103-12.
- **Cooper, J. A.** (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* **105**, 1473-8.
- **Coue, M., Brenner, S. L., Spector, I. and Korn, E. D.** (1987). Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett* **213**, 316-8.
- **Coupland, R. E.** (1965a). (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**, 231-54.
- **Coupland, R. E.** (1965b). Electron microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla: II. Normal innervation. *J Anat* **99**, 255-72.
- **Coupland, R. E. and MacDougall, J. D.** (1966). Adrenaline formation in noradrenaline-storing chromaffin cells in vitro induced by corticosterone. *J Endocrinol* **36**, 317-24.
- **Coupland, R. E. and Weakley, B. S.** (1968). Developing chromaffin tissue in the rabbit: an electron microscopic study. *J Anat* **102**, 425-55.
- **Criado, M.** (2018). Acetylcholine nicotinic receptor subtypes in chromaffin cells. *Pflugers Arch* **470**, 13-20.
- **Crivellato, E., Nico, B. and Ribatti, D.** (2008). The chromaffin vesicle: advances in understanding the composition of a versatile, multifunctional secretory organelle. *Anat Rec (Hoboken)* **291**, 1587-602.
- **Cymerman, A., Robinson, S. M. and McCullough, D.** (1972). Alteration of rat brain catecholamine metabolism during exposure to hypobaric hypoxia. *Can J Physiol Pharmacol* **50**, 321-7.
- **Chang, C. F., Gutierrez, L. M., Mundina-Weilenmann, C. and Hosey, M. M.** (1991). Dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. II. Functional effects of differential phosphorylation of channel subunits. *J.Biol.Chem.* **266**, 16395-16400.

- **Chapman, E. R., An, S., Barton, N. and Jahn, R.** (1994). SNAP-25, a t-SNARE which binds to both syntaxin and synaptobrevin via domains that may form coiled coils. *J.Biol.Chem.* **269**, 27427-27432.
- **Chasey, D.** (1969). Observations on the central pair of microtubules from the cilia of *Tetrahymena pyriformis*. *J Cell Sci* **5**, 453-8.
- **Chikando, A. C., Kettlewell, S., Williams, G. S., Smith, G. and Lederer, W. J.** (2011). Ca<sup>2+</sup> dynamics in the mitochondria - state of the art. *J.Mol.Cell Cardiol.* **51**, 627-631.
- **De Brabander, M., Geuens, G., Nuydens, R., Willebrords, R. and De Mey, J.** (1982). Microtubule stability and assembly in living cells: the influence of metabolic inhibitors, taxol and pH. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **46 Pt 1**, 227-40.
- **DePina, A. S. and Langford, G. M.** (1999). Vesicle transport: the role of actin filaments and myosin motors. *Microsc.Res.Tech.* **47**, 93-106.
- **Desnos, C., Schonn, J. S., Huet, S., Tran, V. S., El-Amraoui, A., Raposo, G., Fanget, I., Chapuis, C., Menasche, G., de Saint, B. G. et al.** (2003). Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites. *J.Cell Biol.* **163**, 559-570.
- **Doreian, B. W., Fulop, T. G. and Smith, C. B.** (2008). Myosin II activation and actin reorganization regulate the mode of quantal exocytosis in mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* **28**, 4470-8.
- **dos Remedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V., Tsubakihara, M., Berry, D. A. and Nosworthy, N. J.** (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* **83**, 433-73.
- **Douglas, W. W.** (1968). Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol* **34**, 451-74.
- **Douglas, W. W.** (1974). Involvement of calcium in exocytosis and the exocytosis--vesiculation sequence. *Biochem.Soc.Symp.*, 1-28.
- **Douglas, W. W., Kanno, T. and Sampson, S. R.** (1967). Influence of the ionic environment on the membrane potential of adrenal chromaffin cells and on the depolarizing effect of acetylcholine. *J Physiol* **191**, 107-21.
- **Douglas, W. W. and Rubin, R. P.** (1961). The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J Physiol* **159**, 40-57.
- **Drabikowski, W. and Nowak, E.** (1968). The interaction of alpha-actinin with F-actin and its abolition by tropomyosin. *Eur J Biochem* **5**, 209-14.
- **Duchen, M. R.** (2004). Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes* **53 Suppl 1**, S96-102.
- **Duchen, M. R. and Szabadkai, G.** (2010). Roles of mitochondria in human disease. *Essays Biochem.* **47**, 115-137.
- **Duxbury, M. S., Ashley, S. W. and Whang, E. E.** (2004). Inhibition of pancreatic adenocarcinoma cellular invasiveness by blebbistatin: a novel myosin II inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* **313**, 992-7.
- **Eichler, T. W., Kogel, T., Bukoreshtliev, N. V. and Gerdes, H. H.** (2006). The role of myosin Va in secretory granule trafficking and exocytosis. *Biochem.Soc.Trans.* **34**, 671-674.
- **El-Yazbi, A. F., Abd-Elrahman, K. S. and Moreno-Dominguez, A.** (2015). PKC-mediated cerebral vasoconstriction: Role of myosin light chain phosphorylation versus actin cytoskeleton reorganization. *Biochem Pharmacol* **95**, 263-78.
- **Elander, A., Sjostrom, M., Lundgren, F., Schersten, T. and Bylund-Fellenius, A. C.** (1985). Biochemical and morphometric properties of mitochondrial populations in human muscle fibres. *Clin.Sci.(Lond)* **69**, 153-164.

- **Faigle, W., Colucci-Guyon, E., Louvard, D., Amigorena, S. and Galli, T.** (2000). Vimentin filaments in fibroblasts are a reservoir for SNAP23, a component of the membrane fusion machinery. *Mol Biol Cell* **11**, 3485-94.
- **Farrell, K. B., McDonald, S., Lamb, A. K., Worcester, C., Peersen, O. B. and Di Pietro, S. M.** (2017). Novel function of a dynein light chain in actin assembly during clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* **216**, 2565-2580.
- **Fatt, P. and Katz, B.** (1952). Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol* **117**, 109-28.
- **Faurbye, A., Vestergaard, P., Kobbernagel, F. and Nielsen, A.** (1951). Adrenal cortical function in chronic schizophrenia (stress, adrenaline-test, ACTH-test). *Acta Endocrinol (Copenh)* **8**, 215-46.
- **Feldberg, W., Minz, B. and Tsudzimura, H.** (1934). The mechanism of the nervous discharge of adrenaline. *J Physiol* **81**, 286-304.
- **Fenwick, E. M., Marty, A. and Neher, E.** (1982). Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol* **331**, 599-635.
- **Fernandez, J. M., Granja, R., Izaguirre, V., Gonzalez-Garcia, C. and Cena, V.** (1995). omega-Conotoxin GVIA blocks nicotine-induced catecholamine secretion by blocking the nicotinic receptor-activated inward currents in bovine chromaffin cells. *Neurosci.Lett.* **191**, 59-62.
- **Fernstrom, J. D. and Fernstrom, M. H.** (2007). Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *J Nutr* **137**, 1539S-1547S; discussion 1548S.
- **Fillenz, M. and Howe, P. R.** (1971). Life cycle of vesicles in sympathetic nerve terminals. *J Physiol* **218 Suppl**, 67P-68P.
- **Fix, M., Melia, T. J., Jaiswal, J. K., Rappoport, J. Z., You, D., Sollner, T. H., Rothman, J. E. and Simon, S. M.** (2004). Imaging single membrane fusion events mediated by SNARE proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 7311-7316.
- **Fowler, V. M. and Pollard, H. B.** (1982). In vitro reconstitution of chromaffin granule-cytoskeleton interactions: ionic factors influencing the association of F-actin with purified chromaffin granule membranes. *J Cell Biochem* **18**, 295-311.
- **Fujimoto, T., Lee, K., Miwa, S. and Ogawa, K.** (1991). Immunocytochemical Localization of Fodrin and Ankyrin in Bovine Chromaffin Cells-Invitro. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **39**, 1485-1493.
- **Fujimoto, T. and Ogawa, K.** (1987). Distribution of Fodrin in Chromaffin Cells of the Rat Adrenal-Medulla During Secretion. *Acta Histochemica et Cytochemica* **20**, 702-702.
- **Fujita, T.** (1977). Concept of paraneurons. *Arch Histol Jpn* **40 Suppl**, 1-12.
- **Funkenstein, D. H. and Meade, L. W.** (1954). Norepinephrine-like and epinephrine-like substances and the elevation of blood pressure during acute stress. *J Nerv Ment Dis* **119**, 380-97.
- **Garcia-Sancho, J.** (2014). The coupling of plasma membrane calcium entry to calcium uptake by endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Physiol* **592**, 261-8.
- **Garcia-Sancho, J., de Diego, A. M. and Garcia, A. G.** (2012). Mitochondria and chromaffin cell function. *Pflugers Arch.* **464**, 33-41.
- **Garcia, A. G., Albillos, A., Cano-Abad, M. F., Garcia-Palomero, E., Hernandez-Guijo, M., Herrero, C. J., Lomax, R. B. and Gandia, L.** (1998). Calcium channels for exocytosis in chromaffin cells. *Adv.Pharmacol.* **42**, 91-94.
- **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.

- **Garcia, A. G., Padin, F., Fernandez-Morales, J. C., Maroto, M. and Garcia-Sancho, J.** (2012). Cytosolic organelles shape calcium signals and exo-endocytotic responses of chromaffin cells. *Cell Calcium* **51**, 309-320.
- **Garcia, A. G., Sala, F., Reig, J. A., Viniegra, S., Frias, J., Fonteriz, R. and Gandia, L.** (1984). Dihydropyridine BAY-K-8644 activates chromaffin cell calcium channels. *Nature* **309**, 69-71.
- **Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Malacombe, M., Way, M. and Bader, M. F.** (2004). Regulated exocytosis in neuroendocrine cells: a role for subplasmalemmal Cdc42/N-WASP-induced actin filaments. *Mol.Biol.Cell* **15**, 520-531.
- **Geisow, M.** (1980). Pathways of endocytosis. *Nature* **288**, 434-6.
- **Giese, K. C. and Spudich, J. A.** (1997). Phenotypically selected mutations in myosin's actin binding domain demonstrate intermolecular contacts important for motor function. *Biochemistry* **36**, 8465-73.
- **Giner, D., Lopez, I., Villanueva, J., Torres, V., Viniegra, 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**, 659-69.
- **Giner, D., Neco, P., Frances, M. M., Lopez, I., Viniegra, S. and Gutierrez, L. M.** (2005). Real-time dynamics of the F-actin cytoskeleton during secretion from chromaffin cells. *J.Cell Sci.* **118**, 2871-2880.
- **Goldmann, W. H.** (2018). Intermediate filaments and cellular mechanics. *Cell Biol Int* **42**, 132-138.
- **Gordon, M. L.** (1950). An immediate response of the demedullated adrenal gland to stress. *Endocrinology* **47**, 13-8.
- **Gormal, R. S., Nguyen, T. H., Martin, S., Papadopulos, A. and Meunier, F. A.** (2015). An Acto-Myosin II Constricting Ring Initiates the Fission of Activity-Dependent Bulk Endosomes in Neurosecretory Cells. *Journal of Neuroscience* **35**, 1380-1389.
- **Graceffa, P. and Dominguez, R.** (2003). Crystal structure of monomeric actin in the ATP state. Structural basis of nucleotide-dependent actin dynamics. *J Biol Chem* **278**, 34172-80.
- **Grant, N. J., Hepp, R., Krause, W., Aunis, D., Oehme, P. and Langley, K.** (1999). Differential expression of SNAP-25 isoforms and SNAP-23 in the adrenal gland. *J Neurochem* **72**, 363-72.
- **Grant, N. J., Konig, F., Aunis, D. and Langley, K.** (1994). Expression of GAP-43 (neuromodulin) during the development of the rat adrenal gland. *Brain Res Dev Brain Res* **82**, 265-76.
- **Greco, G., Martino, G. and Tota, B.** (1982). Further characterization of two mitochondrial populations in tuna heart ventricle. *Comp Biochem.Physiol B* **71**, 71-75.
- **Grumet, M. and Lin, S.** (1980). A platelet inhibitor protein with cytochalasin-like activity against actin polymerization in vitro. *Cell* **21**, 439-44.
- **Gurunathan, S., Chapman-Shimshoni, D., Trajkovic, S. and Gerst, J. E.** (2000). Yeast exocytic v-SNAREs confer endocytosis. *Mol.Biol.Cell* **11**, 3629-3643.
- **Gutierrez, L. M.** (2012). New insights into the role of the cortical cytoskeleton in exocytosis from neuroendocrine cells. *Int.Rev.Cell Mol.Biol.* **295**, 109-137.
- **Gutierrez, L. M., Brawley, R. M. and Hosey, M. M.** (1991). Dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. I. Roles of subunits in channel activity. *J.Biol.Chem.* **266**, 16387-16394.
- **Gutierrez, L. M. and Gil, A.** (2011). Modeling F-actin cortex influence on the secretory properties of neuroendocrine cells. *Commun.Integr.Biol.* **4**, 413-415.
- **Gutierrez, L. M. and Villanueva, J.** (2018). The role of F-actin in the transport and secretion of chromaffin granules: an historic perspective. *Pflugers Arch* **470**, 181-186.

- **Hall, C. E., Jakus, M. A. and Schmitt, F. O.** (1946). An investigation of cross striations and myosin filaments in muscle. *Biol Bull* **90**, 32-50.
- **Halliburton, W. D.** (1887). On Muscle-Plasma. *J Physiol* **8**, 133-202.
- **Hasson, T. and Mooseker, M. S.** (1995). Molecular motors, membrane movements and physiology: emerging roles for myosins. *Curr.Opin.Cell Biol.* **7**, 587-594.
- **Hegyi, G., Szilagy, L. and Belagyi, J.** (1988). Influence of the bound nucleotide on the molecular dynamics of actin. *Eur J Biochem* **175**, 271-4.
- **Heinemann, C., Chow, R. H., Neher, E. and Zucker, R. S.** (1994). Kinetics of the secretory response in bovine chromaffin cells following flash photolysis of caged Ca<sup>2+</sup>. *Biophys.J.* **67**, 2546-2557.
- **Helle, K. B. and Serck-Hanssen, G.** (1975). The adrenal medulla: a model for studies of hormonal and neuronal storage and release mechanisms. *Mol Cell Biochem* **6**, 127-46.
- **Hendesi, H., Barbe, M. F., Safadi, F. F., Monroy, M. A. and Popoff, S. N.** (2015). Integrin mediated adhesion of osteoblasts to connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) induces cytoskeleton reorganization and cell differentiation. *Plos One* **10**, e0115325.
- **Hernandez-Guijo, J. M., Maneu-Flores, V. E., Ruiz-Nuno, A., Villarroya, M., Garcia, A. G. and Gandia, L.** (2001). Calcium-dependent inhibition of L, N, and P/Q Ca<sup>2+</sup> channels in chromaffin cells: role of mitochondria. *J.Neurosci.* **21**, 2553-2560.
- **Heuser, J. E. and Reese, T. S.** (1973). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J.Cell Biol.* **57**, 315-344.
- **Hillarp, N. A. and Hokfelt, B.** (1953). Evidence of adrenaline and noradrenaline in separate adrenal medullary cells. *Acta Physiol Scand* **30**, 55-68.
- **Hogeboom, G. H., Schneider, W. C. and Pallade, G. E.** (1947). The isolation of morphologically intact mitochondria from rat liver. *Proc Soc Exp Biol Med* **65**, 320.
- **Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W. and Kabsch, W.** (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**, 44-9.
- **Hollenbeck, P. J.** (1996). The pattern and mechanism of mitochondrial transport in axons. *Front Biosci.* **1**, d91-102.
- **Hong, F., Brizendine, R. K., Carter, M. S., Alcalá, D. B., Brown, A. E., Chattin, A. M., Haldeman, B. D., Walsh, M. P., Facemyer, K. C., Baker, J. E. et al.** (2015). Diffusion of myosin light chain kinase on actin: A mechanism to enhance myosin phosphorylation rates in smooth muscle. *J Gen Physiol* **146**, 267-80.
- **Horwitz, S. B., Parness, J., Schiff, P. B. and Manfredi, J. J.** (1982). Taxol: a new probe for studying the structure and function of microtubules. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **46 Pt 1**, 219-26.
- **Hotulainen, P., Paunola, E., Vartiainen, M. K. and Lappalainen, P.** (2005). Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. *Mol Biol Cell* **16**, 649-64.
- **Howell, S. L. and Tyhurst, M.** (1982). Microtubules, microfilaments and insulin-secretion. *Diabetologia* **22**, 301-308.
- **Hu, K., Rickman, C., Carroll, J. and Davletov, B.** (2004). A common mechanism for the regulation of vesicular SNAREs on phospholipid membranes. *Biochem.J.* **377**, 781-785.
- **Huber, K.** (2006). The sympathoadrenal cell lineage: specification, diversification, and new perspectives. *Dev Biol* **298**, 335-43.
- **Hull, F. E., Radloff, J. F. and Sweeley, C. C.** (1975). beta-Hydroxy fatty acid production during fatty acid oxidation by heart mitochondria. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* **7**, 13-21.



- **Huttner, W. B., Schiebler, W., Greengard, P. and De Camilli, P.** (1983). Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *J Cell Biol* **96**, 1374-88.
- **Iijima, T., Matsumoto, G. and Kidokoro, Y.** (1992). Synaptic activation of rat adrenal medulla examined with a large photodiode array in combination with a voltage-sensitive dye. *Neuroscience* **51**, 211-9.
- **Jackson, A. P.** (1992). Endocytosis in the brain: the role of clathrin light-chains. *Biochem Soc Trans* **20**, 653-5.
- **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. *J Biol Chem* **268**, 14694-700.
- **Jena, B. P., Cho, S. J., Jeremic, A., Stromer, M. H. and bu-Hamdah, R.** (2003). Structure and composition of the fusion pore. *Biophys.J.* **84**, 1337-1343.
- **Jiao, R., Cui, D., Wang, S. C., Li, D. and Wang, Y. F.** (2017). Interactions of the Mechanosensitive Channels with Extracellular Matrix, Integrins, and Cytoskeletal Network in Osmosensation. *Front Mol Neurosci* **10**, 96.
- **Jockusch, B. M., Burger, M. M., DaPrada, M., Richards, J. G., Chaponnier, C. and Gabbiani, G.** (1977). alpha-Actinin attached to membranes of secretory vesicles. *Nature* **270**, 628-9.
- **Jones, L. J., Carballido-Lopez, R. and Errington, J.** (2001). Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**, 913-22.
- **Kajiwara, R., Sand, O., Kidokoro, Y., Barish, M. E. and Iijima, T.** (1997). Functional organization of chromaffin cells and cholinergic synaptic transmission in rat adrenal medulla. *Jpn J Physiol* **47**, 449-64.
- **Kanno, T.** (1998). Intra- and intercellular Ca<sup>2+</sup> signaling in paraneurons and other secretory cells. *Jpn J Physiol* **48**, 219-27.
- **Kao, L. S. and Schneider, A. S.** (1986). Calcium mobilization and catecholamine secretion in adrenal chromaffin cells. A Quin-2 fluorescence study. *J Biol Chem* **261**, 4881-8.
- **Kasai, M., Asakura, S. and Oosawa, F.** (1962). The cooperative nature of G-F transformation of actin. *Biochim Biophys Acta* **57**, 22-31.
- **Kelly, R. B.** (1985). Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science* **230**, 25-32.
- **Kirazov, E. P. and Lagnado, J. R.** (1977). Interactions of myo-inositol with brain microtubules. *FEBS Lett* **81**, 173-8.
- **Klein, R. L. and Thureson-Klein, A.** (1971). An electron microscopic study of noradrenaline storage vesicles isolated from bovine splenic nerve trunk. *J Ultrastruct Res* **34**, 473-91.
- **Klinger, A., Reimann, F. M., Klinger, M. H. and Stange, E. F.** (1997). Clathrin-mediated endocytosis of high density lipoprotein3 in human intestinal Caco-2 cells. A post-embedding immunocytochemical study. *Biochim Biophys Acta* **1345**, 65-70.
- **Kogel, T., Bittins, C. M., Rudolf, R. and Gerdes, H. H.** (2010). Versatile roles for myosin Va in dense core vesicle biogenesis and function. *Biochem Soc Trans* **38**, 199-204.
- **Korn, E. D., Carlier, M. F. and Pantaloni, D.** (1987). Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science* **238**, 638-44.
- **Kubota, H.** (2002). Function and regulation of cytosolic molecular chaperone CCT. *Vitam Horm* **65**, 313-31.
- **Kukulski, W., Schorb, M., Kaksonen, M. and Briggs, J. A.** (2012). Plasma membrane reshaping during endocytosis is revealed by time-resolved electron tomography. *Cell* **150**, 508-20.

- **Kuromi, H. and Kidokoro, Y.** (2005). Exocytosis and endocytosis of synaptic vesicles and functional roles of vesicle pools: lessons from the *Drosophila* neuromuscular junction. *Neuroscientist*. **11**, 138-147.
- **Lang, T., Bruns, D., Wenzel, D., Riedel, D., Holroyd, P., Thiele, C. and Jahn, R.** (2001). SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J.* **20**, 2202-2213.
- **Lang, T., Halemani, N. D. and Rammner, B.** (2008). Interplay between lipids and the proteinaceous membrane fusion machinery. *Prog.Lipid Res.* **47**, 461-469.
- **Lang, T., Margittai, M., Holzler, H. and Jahn, R.** (2002). SNAREs in native plasma membranes are active and readily form core complexes with endogenous and exogenous SNAREs. *J.Cell Biol.* **158**, 751-760.
- **Lang, T., Wacker, I., Wunderlich, I., Rohrbach, A., Giese, G., Soldati, T. and Almers, W.** (2000). Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells. *Biophys.J.* **78**, 2863-2877.
- **Langley, O. K. and Aunis, D.** (1984). Ultrastructural immunocytochemical demonstration of D2-protein in adrenal medulla. *Cell Tissue Res* **238**, 497-502.
- **Langley, O. K., Perrin, D. and Aunis, D.** (1986). Alpha-fodrin in the adrenal gland: localization by immunoelectron microscopy. *J.Histochem.Cytochem.* **34**, 517-525.
- **Lara, B., Gandia, L., Martinez-Sierra, R., Torres, A. and Garcia, A. G.** (1998). Q-type Ca<sup>2+</sup> channels are located closer to secretory sites than L-type channels: functional evidence in chromaffin cells. *Pflugers Arch.* **435**, 472-478.
- **Larson, L., Arnaudeau, S., Gibson, B., Li, W., Krause, R., Hao, B., Bamburg, J. R., Lew, D. P., Demarex, N. and Southwick, F.** (2005). Gelsolin mediates calcium-dependent disassembly of Listeria actin tails. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1921-6.
- **Lee, R. W. and Trifaro, J. M.** (1981). Characterization of anti-actin antibodies and their use in immunocytochemical studies on the localization of actin in adrenal chromaffin cells in culture. *Neuroscience* **6**, 2087-2108.
- **Lehman, W. J. and Rebhun, L. I.** (1971). The structural elements responsible for contraction in the ciliate *Spirostomum*. *Protoplasma* **72**, 153-78.
- **Levine, J. and Willard, M.** (1981). Fodrin: axonally transported polypeptides associated with the internal periphery of many cells. *J Cell Biol* **90**, 631-42.
- **Li, J. and Springer, T. A.** (2017). Integrin extension enables ultrasensitive regulation by cytoskeletal force. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 4685-4690.
- **Li, X. D., Rhodes, T. E., Ikebe, R., Kambara, T., White, H. D. and Ikebe, M.** (1998). Effects of mutations in the gamma-phosphate binding site of myosin on its motor function. *J Biol Chem* **273**, 27404-11.
- **Lindau, M. and Almers, W.** (1995). Structure and function of fusion pores in exocytosis and ectoplasmic membrane fusion. *Curr.Opin.Cell Biol.* **7**, 509-517.
- **Lindau, M. and de Toledo, G. A.** (2003). The fusion pore. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1641**, 167-173.
- **Lomakin, A. J., Lee, K. C., Han, S. J., Bui, D. A., Davidson, M., Mogilner, A. and Danuser, G.** (2015). Competition for actin between two distinct F-actin networks defines a bistable switch for cell polarization. *Nat Cell Biol* **17**, 1435-45.
- **Lopez-Font, I., Torregrosa-Hetland, C. J., Villanueva, J. and Gutierrez, L. M.** (2010). t-SNARE cluster organization and dynamics in chromaffin cells. *J.Neurochem.* **114**, 1550-1556.
- **Lopez, M. G., Villarroja, M., Lara, B., Martinez, S. R., Albillos, A., Garcia, A. G. and Gandia, L.** (1994). Q- and L-type Ca<sup>2+</sup> channels dominate the control of secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett.* **349**, 331-337.
- **Lowitzsch, K. and Hopf, H. C.** (1972). [Refractory period and repetitive stimulation transmission in human mixed peripheral nerves]. *J Neurol Sci* **17**, 255-70.

- **Lukyanetz, E. A. and Neher, E.** (1999). Different types of calcium channels and secretion from bovine chromaffin cells. *Eur.J.Neurosci.* **11**, 2865-2873.
- **Markin, V. S., Kozlov, M. M. and Borovjagin, V. L.** (1984). On the theory of membrane fusion. The stalk mechanism. *Gen.Physiol Biophys.* **3**, 361-377.
- **Maruyama, K. and Ebashi, S.** (1965). Alpha-actinin, a new structural protein from striated muscle. II. Action on actin. *J Biochem* **58**, 13-9.
- **Matthews, E. K.** (1967). Membrane potential measurement in cells of the adrenal gland. *J Physiol* **189**, 139-48.
- **McGough, A., Pope, B., Chiu, W. and Weeds, A.** (1997). Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J Cell Biol* **138**, 771-81.
- **McIntosh, R. P., McIntosh, J. E. and Starling, L.** (1987). Effects of modifiers of cytoskeletal structures on the dynamics of release of LH from sheep anterior pituitary cells stimulated with gonadotrophin-releasing hormone, K<sup>+</sup> or phorbol ester. *J Endocrinol* **112**, 289-98.
- **McNally, J. M., Woodbury, D. J. and Lemos, J. R.** (2004). Syntaxin 1A drives fusion of large dense-core neurosecretory granules into a planar lipid bilayer. *Cell Biochem.Biophys.* **41**, 11-24.
- **Mege, R. M., Gavard, J. and Lambert, M.** (2006). Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 541-8.
- **Meissner, G.** (1986). Ryanodine activation and inhibition of the Ca<sup>2+</sup> release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **261**, 6300-6.
- **Meunier, F. A. and Gutierrez, L. M.** (2016). Captivating New Roles of F-Actin Cortex in Exocytosis and Bulk Endocytosis in Neurosecretory Cells. *Trends Neurosci* **39**, 605-13.
- **Mikoshiba, K., Furuichi, T. and Miyawaki, A.** (1994). Structure and function of IP3 receptors. *Semin Cell Biol* **5**, 273-81.
- **Miranda-Ferreira, R., de Pascual, R., Caricati-Neto, A., Gandia, L., Jurkiewicz, A. and Garcia, A. G.** (2009). Role of the endoplasmic reticulum and mitochondria on quantal catecholamine release from chromaffin cells of control and hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* **329**, 231-40.
- **Misonou, H., Ohara-Imaizumi, M. and Kumakura, K.** (1997). Regulation of the priming of exocytosis and the dissociation of SNAP-25 and VAMP-2 in adrenal chromaffin cells. *Neurosci.Lett.* **232**, 182-184.
- **Miyazaki, S.** (1993). IP3 receptor-mediated spatial and temporal Ca<sup>2+</sup> signaling of the cell. *Jpn J Physiol* **43**, 409-34.
- **Mockrin, S. C. and Korn, E. D.** (1983). Kinetics of polymerization and ATP hydrolysis by covalently crosslinked actin dimer. *J Biol Chem* **258**, 3215-21.
- **Mochida, S., Westenbroek, R. E., Yokoyama, C. T., Zhong, H., Myers, S. J., Scheuer, T., Itoh, K. and Catterall, W. A.** (2003). Requirement for the synaptic protein interaction site for reconstitution of synaptic transmission by P/Q-type calcium channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 2819-2824.
- **Moll, R. and Franke, W. W.** (1982). Intermediate filaments and their interaction with membranes. The desmosome-cytokeratin filament complex and epithelial differentiation. *Pathol Res Pract* **175**, 146-61.
- **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.
- **Montiel, C., Artalejo, A. R. and Garcia, A. G.** (1984). Effects of the novel dihydropyridine BAY-K-8644 on adrenomedullary catecholamine release evoked by calcium reintroduction. *Biochem Biophys Res Commun* **120**, 851-7.



- **Moro, M. A., Michelena, P., Sanchez-Garcia, P., Palmer, R., Moncada, S. and Garcia, A. G.** (1993). Activation of adrenal medullary L-arginine: nitric oxide pathway by stimuli which induce the release of catecholamines. *Eur J Pharmacol* **246**, 213-8.
- **Moser, T. and Neher, E.** (1997). Rapid exocytosis in single chromaffin cells recorded from mouse adrenal slices. *J.Neurosci.* **17**, 2314-2323.
- **Nachmias, V. T.** (1976). Adenosine 5'-phosphate and assembly of actin filaments in vitro. *J Mol Biol* **107**, 623-9.
- **Nakano, M., Nogami, S., Sato, S., Terano, A. and Shirataki, H.** (2001). Interaction of syntaxin with alpha-fodrin, a major component of the submembranous cytoskeleton. *Biochem.Biophys.Res.Communic.* **288**, 468-475.
- **Nakata, T. and Hirokawa, N.** (1992). Organization of cortical cytoskeleton of cultured chromaffin cells and involvement in secretion as revealed by quick-freeze, deep-etching, and double-label immunoelectron microscopy. *J.Neurosci.* **12**, 2186-2197.
- **Nanclares, C., Baraibar, A. M. and Gandia, L.** (2018). L-type calcium channels in exocytosis and endocytosis of chromaffin cells. *Pflugers Arch* **470**, 53-60.
- **Neco, 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.
- **Neco, P., Gil, A., del Mar, F. M., Viniestra, S. and Gutierrez, L. M.** (2002). The role of myosin in vesicle transport during bovine chromaffin cell secretion. *Biochem.J.* **368**, 405-413.
- **Neco, P., Giner, D., del Mar, F. M., Viniestra, S. and Gutierrez, L. M.** (2003a). Differential participation of actin- and tubulin-based vesicle transport systems during secretion in bovine chromaffin cells. *Eur.J.Neurosci.* **18**, 733-742.
- **Neco, P., Giner, D., Viniestra, S., Borges, R., Villarroel, A. and Gutierrez, L. M.** (2004). New roles of myosin II during vesicle transport and fusion in chromaffin cells. *J.Biol.Chem.* **279**, 27450-27457.
- **Neco, P., Rossetto, O., Gil, A., Montecucco, C. and Gutierrez, L. M.** (2003b). Taipoxin induces F-actin fragmentation and enhances release of catecholamines in bovine chromaffin cells. *J.Neurochem.* **85**, 329-337.
- **Niewiarowska, J., Cierniewski, C. S. and Tuszyński, G. P.** (1984). Association of fibronectin with the platelet cytoskeleton. *J Biol Chem* **259**, 6181-7.
- **Nishimura, S., Sorimachi, M. and Yamagami, K.** (1981). Exocytotic secretion of catecholamines from the cat adrenal medulla by sodium deprivation: involvement of calcium influx mechanism. *Br J Pharmacol* **72**, 305-17.
- **Nogales, E.** (2015). An electron microscopy journey in the study of microtubule structure and dynamics. *Protein Sci* **24**, 1912-9.
- **Oheim, M. and Stuhmer, W.** (2000). Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex. *Eur.Biophys.J.* **29**, 67-89.
- **Orci, L., Gabbay, K. H. and Malaisse, W. J.** (1972). Pancreatic beta-cell web: its possible role in insulin secretion. *Science* **175**, 1128-30.
- **Parpura, V. and Mohideen, U.** (2008). Molecular form follows function: (un)snaring the SNAREs. *Trends Neurosci.* **31**, 435-443.
- **Perrin, D. and Aunis, D.** (1985). Reorganization of alpha-fodrin induced by stimulation in secretory cells. *Nature* **315**, 589-592.
- **Pinessi, L., Sabbatini, F., De Mattei, M. and Gentile, S.** (1984). [Neuroendocrine correlations in the pathogenesis and pathology of Parkinson disease]. *Minerva Med* **75**, 2539-42.
- **Plattner, H.** (1976). Membrane disruption, fusion and resealing in the course of exocytosis in Paramecium cells. *Exp Cell Res* **103**, 431-5.

- **Poisner, A. M. and Bernstein, J.** (1971). A possible role of microtubules in catecholamine release from the adrenal medulla: effect of colchicine, vinca alkaloids and deuterium oxide. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **177**, 102-108.
- **Pollard, T. D.** (1983). Measurement of rate constants for actin filament elongation in solution. *Anal Biochem* **134**, 406-12.
- **Potokar, M., Kreft, M., Li, L., Daniel Andersson, J., Pangrsic, T., Chowdhury, H. H., Pekny, M. and Zorec, R.** (2007). Cytoskeleton and vesicle mobility in astrocytes. *Traffic* **8**, 12-20.
- **Pozzan, T. and Rizzuto, R.** (2000). High tide of calcium in mitochondria. *Nat.Cell Biol.* **2**, E25-E27.
- **Ramdi, H., Legay, C. and Lievremont, M.** (1993). Influence of matricial molecules on growth and differentiation of entrapped chondrocytes. *Exp Cell Res* **207**, 449-54.
- **Reig, J. A., Vinięgra, S., Ballesta, J. J., Palmero, M. and Guitierrez, L. M.** (1993). Naphthalenesulfonamide derivatives ML9 and W7 inhibit catecholamine secretion in intact and permeabilized chromaffin cells. *Neurochem.Res.* **18**, 317-323.
- **Reventos, J., Perrard-Sapori, M. H., Chatelain, P. G. and Saez, J. M.** (1989). Leydig cell and extracellular matrix effects on Sertoli cell function: biochemical and morphologic studies. *J Androl* **10**, 359-65.
- **Rickman, C. and Davletov, B.** (2003). Mechanism of calcium-independent synaptotagmin binding to target SNAREs. *J.Biol.Chem.* **278**, 5501-5504.
- **Riedl, J., Crevenna, A. H., Kessenbrock, K., Yu, J. H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T. A., Werb, Z. et al.** (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat.Methods* **5**, 605-607.
- **Riedl, J., Flynn, K. C., Raducanu, A., Gartner, F., Beck, G., Bosl, M., Bradke, F., Massberg, S., Aszodi, A., Sixt, M. et al.** (2010). Lifeact mice for studying F-actin dynamics. *Nat.Methods* **7**, 168-169.
- **Rizzoli, S. O. and Betz, W. J.** (2004). The structural organization of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Science* **303**, 2037-2039.
- **Rizzoli, S. O. and Jahn, R.** (2007). Kiss-and-run, collapse and 'readily retrievable' vesicles. *Traffic* **8**, 1137-44.
- **Robinson, M. S.** (1994). The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 538-44.
- **Rodriguez Fernandez, J. L. and Ben-Ze'ev, A.** (1989). Regulation of fibronectin, integrin and cytoskeleton expression in differentiating adipocytes: inhibition by extracellular matrix and polylysine. *Differentiation* **42**, 65-74.
- **Rosa, J. M., de Diego, A. M., Gandia, L. and Garcia, A. G.** (2007). L-type calcium channels are preferentially coupled to endocytosis in bovine chromaffin cells. *Biochem Biophys Res Commun* **357**, 834-9.
- **Rosa, J. M., Torregrosa-Hetland, C. J., Colmena, I., Gutierrez, L. M., Garcia, A. G. and Gandia, L.** (2011). Calcium entry through slow-inactivating L-type calcium channels preferentially triggers endocytosis rather than exocytosis in bovine chromaffin cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **301**, C86-98.
- **Rosario, L. M., Soria, B., Feuerstein, G. and Pollard, H. B.** (1989). Voltage-sensitive calcium flux into bovine chromaffin cells occurs through dihydropyridine-sensitive and dihydropyridine- and omega-conotoxin-insensitive pathways. *Neuroscience* **29**, 735-747.
- **Rose, S. D., Lejen, T., Casaletti, L., Larson, R. E., Pene, T. D. and Trifaro, J. M.** (2003). Myosins II and V in chromaffin cells: myosin V is a chromaffin vesicle molecular motor involved in secretion. *J.Neurochem.* **85**, 287-298.
- **Rossi, A. E., Boncompagni, S., Wei, L., Protasi, F. and Dirksen, R. T.** (2011). Differential impact of mitochondrial positioning on mitochondrial Ca(2+) uptake and Ca(2+) spark suppression in skeletal muscle. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **301**, C1128-C1139.

- **Rudolf, R., Bittins, C. M. and Gerdes, H. H.** (2011). The role of myosin V in exocytosis and synaptic plasticity. *J.Neurochem.* **116**, 177-191.
- **Salaun, C., James, D. J. and Chamberlain, L. H.** (2004). Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic*, **5**, 255-264.
- **Sasaki, S.** (2010). Determination of altered mitochondria ultrastructure by electron microscopy. *Methods Mol Biol* **648**, 279-90.
- **Scarfone, E., Dememes, D., Perrin, D., Aunis, D. and Sans, A.** (1988). Alpha-fodrin (brain spectrin) immunocytochemical localization in rat vestibular hair cells. *Neurosci.Lett.* **93**, 13-18.
- **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.
- **Schwartz, M. A.** (1992). Transmembrane signalling by integrins. *Trends Cell Biol* **2**, 304-8.
- **Sechi, A. S., Wehland, J. and Small, J. V.** (1997). The isolated comet tail pseudopodium of *Listeria monocytogenes*: a tail of two actin filament populations, long and axial and short and random. *J Cell Biol* **137**, 155-67.
- **Segura, J., Gil, A. and Soria, B.** (2000). Modeling study of exocytosis in neuroendocrine cells: influence of the geometrical parameters. *Biophys.J.* **79**, 1771-1786.
- **Sellers, J. R., Pato, M. D. and Adelstein, R. S.** (1981). Reversible phosphorylation of smooth muscle myosin, heavy meromyosin, and platelet myosin. *J Biol Chem* **256**, 13137-42.
- **Shelanski, M. L. and Taylor, E. W.** (1968). Properties of the protein subunit of central-pair and outer-doublet microtubules of sea urchin flagella. *J Cell Biol* **38**, 304-15.
- **Shimada, T., Horita, K., Murakami, M. and Ogura, R.** (1984). Morphological studies of different mitochondrial populations in monkey myocardial cells. *Cell Tissue Res.* **238**, 577-582.
- **Simunovic, M. and Bassereau, P.** (2014). Reshaping biological membranes in endocytosis: crossing the configurational space of membrane-protein interactions. *Biol Chem* **395**, 275-83.
- **Sollner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. and Rothman, J. E.** (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**, 318-24.
- **Speier, S. and Rupnik, M.** (2003). A novel approach to in situ characterization of pancreatic beta-cells. *Pflugers Arch* **446**, 553-8.
- **Spruce, A. E., Breckenridge, L. J., Lee, A. K. and Almers, W.** (1990). Properties of the fusion pore that forms during exocytosis of a mast cell secretory vesicle. *Neuron* **4**, 643-654.
- **Steinhardt, R. A., Bi, G. and Alderton, J. M.** (1994). Cell membrane resealing by a vesicular mechanism similar to neurotransmitter release. *Science* **263**, 390-3.
- **Straight, A. F., Cheung, A., Limouze, J., Chen, I., Westwood, N. J., Sellers, J. R. and Mitchison, T. J.** (2003). Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor. *Science* **299**, 1743-7.
- **Sudhof, T. C.** (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* **27**, 509-47.
- **Sulochana, H. R., Bashyam, I., Narayan, S. and Jayaraman, J.** (1977). Physiological correlates of calcium-accumulating properties of mitochondria: fish-muscle mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* **9**, 337-48.
- **Svitkina, T.** (2009). Imaging cytoskeleton components by electron microscopy. *Methods Mol Biol* **586**, 187-206.
- **Takehita, N., Evangelinos, M., Zhou, L., Serizawa, T., Somera-Fajardo, R. A., Lu, L., Takaya, N., Nienhaus, G. U. and Fischer, R.** (2017). Pulses of Ca<sup>2+</sup> coordinate actin

assembly and exocytosis for stepwise cell extension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 5701-5706.

- **Tang, D. D. and Gerlach, B. D.** (2017). The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration. *Respir Res* **18**, 54.
- **Taunton, J., Rowning, B. A., Coughlin, M. L., Wu, M., Moon, R. T., Mitchison, T. J. and Larabell, C. A.** (2000). Actin-dependent propulsion of endosomes and lysosomes by recruitment of N-WASP. *J Cell Biol* **148**, 519-30.
- **Taylor, D. L., Reidler, J., Spudich, J. A. and Stryer, L.** (1981). Detection of actin assembly by fluorescence energy transfer. *J Cell Biol* **89**, 362-7.
- **Temm-Grove, C. J., Jockusch, B. M., Rohde, M., Niebuhr, K., Chakraborty, T. and Wehland, J.** (1994). Exploitation of microfilament proteins by *Listeria monocytogenes*: microvillus-like composition of the comet tails and vectorial spreading in polarized epithelial sheets. *J Cell Sci* **107 ( Pt 10)**, 2951-60.
- **Thomas, M. J., Sjaastad, I., Andersen, K., Helm, P. J., Wasserstrom, J. A., Sejersted, O. M. and Ottersen, O. P.** (2003). Localization and function of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-exchanger in normal and detubulated rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* **35**, 1325-37.
- **Tomatis, V. M., Papadopulos, A., Malintan, N. T., Martin, S., Wallis, T., Gormal, R. S., Kendrick-Jones, J., Buss, F. and Meunier, F. A.** (2013). Myosin VI small insert isoform maintains exocytosis by tethering secretory granules to the cortical actin. *Journal of Cell Biology* **200**, 301-320.
- **Torregrosa-Hetland, C. J., Villanueva, J., Giner, D., Lopez-Font, I., Nadal, A., Quesada, I., Viniestra, S., Exposito-Romero, G., Gil, A., Gonzalez-Velez, V. et al.** (2011). The F-actin cortical network is a major factor influencing the organization of the secretory machinery in chromaffin cells. *J. Cell Sci.* **124**, 727-734.
- **Torregrosa-Hetland, C. J., Villanueva, J., Lopez-Font, I., Garcia-Martinez, V., Gil, A., Gonzalez-Velez, V., Segura, J., Viniestra, S. and Gutierrez, L. M.** (2010). Association of SNAREs and calcium channels with the borders of cytoskeletal cages organizes the secretory machinery in chromaffin cells. *Cell Mol. Neurobiol.* **30**, 1315-1319.
- **Totsukawa, G., Yamakita, Y., Yamashiro, S., Hosoya, H., Hartshorne, D. J. and Matsumura, F.** (1999). Activation of myosin phosphatase targeting subunit by mitosis-specific phosphorylation. *J Cell Biol* **144**, 735-44.
- **Trifaro, J., Rose, S. D., Lejen, T. and Elzagallaai, A.** (2000). Two pathways control chromaffin cell cortical F-actin dynamics during exocytosis. *Biochimie* **82**, 339-352.
- **Trifaro, J. M., Bader, M. F. and Doucet, J. P.** (1985). Chromaffin cell cytoskeleton: its possible role in secretion. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **63**, 661-679.
- **Trifaro, J. M., Rodriguez Del, C. A. and Vitale, M. L.** (1992). Dynamic changes in chromaffin cell cytoskeleton as prelude to exocytosis. *Mol. Neurobiol.* **6**, 339-358.
- **Trifaro, J. M. and Vitale, M. L.** (1993). Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *Trends Neurosci.* **16**, 466-472.
- **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.
- **Trybus, K. M. and Lowey, S.** (1985). Mechanism of smooth muscle myosin phosphorylation. *J Biol Chem* **260**, 15988-95.
- **Vicente-Manzanares, M., Choi, C. K. and Horwitz, A. R.** (2009). Integrins in cell migration--the actin connection. *J Cell Sci* **122**, 199-206.
- **Villa, A., Garcia-Simon, M. I., Blanco, P., Sese, B., Bogonez, E. and Satrustegui, J.** (1998). Affinity chromatography purification of mitochondrial inner membrane proteins with calcium transport activity. *Biochim Biophys Acta* **1373**, 347-59.

- **Villanueva, J., Torregrosa-Hetland, C. J., Garcia-Martinez, V., del Mar Frances, M., Viniegra, S. and Gutierrez, L. M.** (2012a). The F-actin cortex in chromaffin granule dynamics and fusion: a minireview. *J Mol Neurosci* **48**, 323-7.
- **Villanueva, J., Torregrosa-Hetland, C. J., Gil, A., Gonzalez-Velez, V., Segura, J., Viniegra, S. and Gutierrez, L. M.** (2010). The organization of the secretory machinery in chromaffin cells as a major factor in modeling exocytosis. *HFSP.J.* **4**, 85-92.
- **Villanueva, J., Torres, V., Torregrosa-Hetland, C. J., Garcia-Martinez, V., Lopez-Font, I., Viniegra, S. and Gutierrez, L. M.** (2012b). F-actin-myosin II inhibitors affect chromaffin granule plasma membrane distance and fusion kinetics by retraction of the cytoskeletal cortex. *J Mol Neurosci* **48**, 328-38.
- **Villanueva, J., Viniegra, S., Gimenez-Molina, Y., Garcia-Martinez, V., Exposito-Romero, G., Frances, M. D., Garcia-Sancho, J. and Gutierrez, L. M.** (2014). The position of mitochondria and ER in relation to that of the secretory sites in chromaffin cells. *Journal of Cell Science* **127**, 5105-5114.
- **Vitale, M. L., Rodriguez Del, C. A., Tchakarov, L. and Trifaro, J. M.** (1991). Cortical filamentous actin disassembly and scinderin redistribution during chromaffin cell stimulation precede exocytosis, a phenomenon not exhibited by gelsolin. *J.Cell Biol.* **113**, 1057-1067.
- **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.
- **Vos, M., Lauwers, E. and Verstreken, P.** (2010). Synaptic mitochondria in synaptic transmission and organization of vesicle pools in health and disease. *Front Synaptic.Neurosci.* **2**, 139.
- **Waelkens, E., Gettemans, J., De Corte, V., De Ville, Y., Goris, J., Vandekerckhove, J. and Merlevede, W.** (1995). Microfilament dynamics: regulation of actin polymerization by actin-fragmin kinase and phosphatases. *Adv Enzyme Regul* **35**, 199-227.
- **Walzog, B., Seifert, R., Zakrzewicz, A., Gaetgens, P. and Ley, K.** (1994). Cross-linking of CD18 in human neutrophils induces an increase of intracellular free Ca<sup>2+</sup>, exocytosis of azurophilic granules, quantitative up-regulation of CD18, shedding of L-selectin, and actin polymerization. *J Leukoc Biol* **56**, 625-35.
- **Weber, T., Zemelman, B. V., McNew, J. A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T. H. and Rothman, J. E.** (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**, 759-772.
- **Westhead, E. W.** (1987). Lipid composition and orientation in secretory vesicles. *Ann N Y Acad Sci* **493**, 92-100.
- **Wickstead, B. and Gull, K.** (2011). The evolution of the cytoskeleton. *J Cell Biol* **194**, 513-25.
- **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 Fischer-Colbrie, R.** (1998). Regulation of the biosynthesis of large dense-core vesicles in chromaffin cells and neurons. *Cell Mol Neurobiol* **18**, 193-209.
- **Wojciak-Stothard, B., Entwistle, A., Garg, R. and Ridley, A. J.** (1998). Regulation of TNF-alpha-induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in human endothelial cells. *J Cell Physiol* **176**, 150-65.
- **Wolosewick, J. J. and Porter, K. R.** (1979). Microtrabecular lattice of the cytoplasmic ground substance. Artifact or reality. *J Cell Biol* **82**, 114-39.
- **Wong, D. T., Van Frank, R. M. and Horng, J. S.** (1970). Demonstration of two mitochondrial populations y rate zonal centrifugation. *Life Sci.II* **9**, 1013-1020.
- **Wu, L. G., Hamid, E., Shin, W. and Chiang, H. C.** (2014). Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms. *Annu Rev Physiol* **76**, 301-31.



- **Xu, L., Cohn, A. H. and Meissner, G.** (1993). Ryanodine sensitive calcium release channel from left ventricle, septum, and atrium of canine heart. *Cardiovasc Res* **27**, 1815-9.
- **Yang, S. T., Kreutzberger, A. J. B., Lee, J., Kiessling, V. and Tamm, L. K.** (2016). The role of cholesterol in membrane fusion. *Chem Phys Lipids* **199**, 136-143.
- **Zhang, L., Marcu, M. G., Nau-Staudt, K. and Trifaro, J. M.** (1996). Recombinant scinderin enhances exocytosis, an effect blocked by two scinderin-derived actin-binding peptides and PIP2. *Neuron* **17**, 287-296.
- **Zhang, Y., Yoshida, A., Sakai, N., Uekusa, Y., Kumeta, M. and Yoshimura, S. H.** (2017). In vivo dynamics of the cortical actin network revealed by fast-scanning atomic force microscopy. *Microscopy (Oxf)*, 1-11.
- **Zhukarev, V., Ashton, F., Sanger, J. M., Sanger, J. W. and Shuman, H.** (1995). Organization and structure of actin filament bundles in Listeria-infected cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **30**, 229-46.
- **Zimmerberg, J., Curran, M. and Cohen, F. S.** (1991). A lipid/protein complex hypothesis for exocytotic fusion pore formation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **635**, 307-317.
- **Zinder, O. and Pollard, H. B.** (1980). The chromaffin granule: recent studies leading to a functional model for exocytosis. *Essays Neurochem.Neuropharmacol.* **4**, 125-162.



## 9. ANEXOS

---

### ANEXO I

**Gimenez-Molina Y.** Cytoskeleton and neurotransmission. Molecular basis and protein interactions on vesicular transport and fusion in a neuroendocrine model. Revista Doctorado UMH. 2015; 2(1): p4.

### ANEXO II

Villanueva J, **Gimenez-Molina Y**, Viniegra S, Gutiérrez LM. F-actin cytoskeleton and the fate of organelles in chromaffin cells. J Neurochem. 2016 Jun; 137(6):860-6. doi: 10.1111/jnc.13560.PMID: 26843469.

### ANEXO III

**Gimenez-Molina Y**, Villanueva J, Nanclares C, Lopez-Font I, Viniegra S, Francés MDM, Gandia L, Gil A, Gutiérrez LM. The differential organization of F-Actin alters the distribution of organelles in cultured when compared to native chromaffin cells. Front Cell Neurosci. 2017 May 4; 11:135. doi: 10.3389/fncel.2017.00135.

### ANEXO IV

\***Gimenez-Molina Y**, Villanueva J, Francés MDM, Viniegra S, and Gutiérrez LM. Multiple mechanisms driving F-actin-dependent transport of organelles in bovine chromaffin cells during secretion. Front Cell Neurosci. 2018. \*En revisión.







ANEXO I

---



Citoesqueleto y neurotransmisión. Bases moleculares e interacciones proteicas del transporte y fusión vesicular en un modelo neuroendocrino

Cytoskeleton and neurotransmission. Molecular basis and protein interactions on vesicular transport and fusion in a neuroendocrine model

---

**Yolanda Giménez Molina**

Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular  
Universidad Miguel Hernández de Elche

**Correspondencia/ Correspondence:**

ygimenez@umh.es

**Recibido/ Received:**

26.05.2015

**Aceptado/ Accepted:**

17.07.2015

---

**Cómo citar este trabajo | How to cite this paper**

Giménez Molina Y. Citoesqueleto y neurotransmisión. Bases moleculares e interacciones proteicas del transporte y fusión vesicular en un modelo neuroendocrino. Revista Doctorado UMH. 2015;2(1):p4.

## RESUMEN

El estudio de la red citoesqueletal y su función en el proceso de liberación de neurotransmisores y hormonas por exocitosis conocido con el término de neurosecreción es fundamental para entender como realizan su función los sistemas nervioso y endocrino. Son muchas las publicaciones que han venido contribuyendo a la elucidación de las bases moleculares y etapas del proceso en la célula cromafín, un excelente modelo neuroendocrino, utilizando una estrategia multidisciplinar que combina herramientas moleculares bioquímicas y de biología molecular, con un análisis biofísico de alta resolución temporal de la secreción y de imagen por microscopia confocal dinámica, FRET y TIRFM de los fenómenos de transporte vesicular e interacción proteica. La línea de investigación propuesta como cuerpo central de esta futura tesis doctoral pretende profundizar en el estudio de la configuración estructural citoesqueletal y su dinámica así como de proteínas participantes e interacciones entre estas, que gobiernan las etapas de transporte, atraque vesicular y de fusión de membranas constituyentes del proceso exocitótico. Dicho conocimiento resultará esencial para el desarrollo de terapias específicas para enfermedades tales como el Parkinson o el Alzheimer cuya etiología tiene base en defectos de la neurotransmisión.

**Palabras clave:** F-actina, citoesqueleto, vesículas, transporte, neurosecreción, exocitosis.

## ABSTRACT

The study of cytoskeleton network role on neurotransmitter and hormone release by exocytosis is central to understand the neuronal and endocrine function. There are a relevant number of scientific papers which has been contributing to the elucidation of the molecular mechanisms and stages of exocytosis in the excellent model of neuroendocrine chromaffin cells combining biochemistry and molecular biology with high temporal resolution secretory biophysics and confocal dynamic microscopy, FRET and TIRFM to visualize vesicle transport and protein interactions. Central structure of PhD student's future work will pretend to characterize cytoskeleton structure and dynamic of this network in detail. Moreover, this work will be focused on studying the molecular mechanisms and interactions involved in the exocytotic stages of vesicle transport, granule docking and maturation, and finally, membrane fusion. This knowledge will be useful to develop specific therapies against neurotransmission disorders related with several diseases such as Parkinson or Alzheimer.

**Key words:** F-actin, cytoskeleton, vesicles, transport, neurosecretion, exocytosis.

## INTRODUCCIÓN

El citoesqueleto es una estructura a modo de red de filamentos entrecruzados extendida por todo el espacio citoplasmático de la célula. En esta estructura cabe destacar tres elementos: microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos de F-actina, siendo estos últimos los elementos centrales de la futura tesis doctoral aquí presentada (1). La propiedad de la "heterogeneidad" es la que mejor caracteriza esta red de actina y el modelo estructural que de un modo más adecuado la define es el modelo de "cajas o jaulas" dinámicas (1; 2; 3; 4). La dinámica asociada a esta estructura tiene su base en la acción de los conocidos "motores moleculares del citoesqueleto" como son: miosina II, tropomiosina, formidina, caldesmon, escinderina o las anexinas (II, IV). Todos ellos son proteínas o complejos proteicos implicados en promover el movimiento de las fibras pero cada uno de ellos utiliza un mecanismo molecular diferente (5; 6; 7). Esta citada dinámica es la responsable de los cambios conformacionales en la red asociados a estímulo a través de los movimientos de las fibras citoesqueletales. Dichas variaciones de conformación en la estructura suponen un cambio desde un sistema de red cerrada que actúa como albergue y retención vesicular hacia un sistema de red abierta que funciona como vía de paso de las mismas hacia los sitios activos en membrana. La funcionalidad de esta red para nada está limitada al establecimiento y mantenimiento estructural de la célula, sino que es mucho más amplia participando en: motilidad, señalización así como más íntimamente ligado a las etapas de la secreción y en contacto directo pues con los procesos de fusión vesicular con la membrana plasmática, esto es, participación en la exocitosis (8; 9), proceso por el cual se liberan hacia el medio extracelular: hormonas, enzimas digestivas y neurotransmisores. En este proceso

cabe destacar varias etapas: transporte vesicular hasta la zona cortical, transporte vesicular por la zona cortical hasta punto de secreción, formación poro de fusión así como apertura del mismo y cabe añadir que en todas ellas juega un papel importante el citoesqueleto (2). Esto ha sido reportado por múltiples estudios realizados en la célula cromafín, un modelo celular neuroendocrino altamente aceptado para estudios de neurosecreción y que será también nuestro modelo de estudio en este futuro trabajo de tesis. Para un mayor acercamiento al conocimiento de las mismas cabe citar que son unas células embriológicamente derivadas de la cresta neural localizadas en la zona medular de la glándula adrenal también conocida como glándula suprarrenal (dada su localización sobre los riñones) así como en los ganglios del sistema nervioso autónomo. Son las primeras (células cromafines de la médula adrenal) las inervadas por los nervios espláncnicos y las responsables de secretar adrenalina (epinefrina), noradrenalina (norepinefrina) y encefalina, todos ellos compuestos con un papel muy importante en la respuesta de lucha-huída.

## EL CONTEXTO DE LA INVESTIGACIÓN Y EL PUNTO DE PARTIDA

Es muy notable el número de trabajos científicos centrados en el estudio del citoesqueleto, su caracterización estructural y la definición de su papel a nivel de neurosecreción, entre los cuales tienen una elevada representación los desarrollados por este grupo de investigación. Todos ellos han contribuido enormemente en el mayor acercamiento y mejor conocimiento de esta estructura celular y son los trabajos que configuran hoy en día el contexto de nuestra investigación.

Actualmente se conoce al detalle la configuración espacial citoesqueletal a nivel de célula aislada con modelos 3D de dicha estructura (1; 2; 10) lo que ha

permitido el conocimiento de su posición espacial de tipo cortical (cerca a membrana) así como la organización espacial de vesículas y mitocondrias en base a esta (11), donde se ha encontrado cierta asociación entre la distribución citoesquelética periférica y la de estos dos elementos que se muestran en dos poblaciones bien definidas encajando con la configuración del pre- y post- citoesqueleto cortical.

La estructura interna citoesquelética ha sido también interpretada haciendo uso de imágenes obtenidas por microscopía confocal (10; 12) detectándose en todas ellas una alta heterogeneidad en cuanto a lo que a cavidades internas respecta demostrando además una alta capacidad de cambio estructural de las mismas ante estímulo. Desde entonces se conoce la posibilidad de dos configuraciones en dicha estructura: abierta y cerrada, en base al estado y conformación de las cavidades en cada momento. Ambos estados del citoesqueleto tienen su explicación en la propiedad de la dinámica (4), propiedad definida en base a la asociación existente entre fibras del citoesqueleto y los motores moleculares como es el caso de la Miosina II (1; 6). Tanto es así que la presencia de inhibidores de F-actina como de Miosina II anulan la capacidad de comportamiento a modo de "Gel activo" que típicamente caracteriza al citoesqueleto (7; 13). Siguiendo en la línea de los motores moleculares citoesqueléticos también se sabe que en nuestro sistema, la proteína contráctil miosina II no solo genera transporte vesicular vinculado a actina sino que parece afectar a la fusión de vesículas ya atracadas, con lo cual parece participar en etapas de fusión de membranas así como está implicada en la expansión del poro de fusión durante el proceso excitotóxico (14; 15;16). Tomando como punto de partida este contexto científico, surge la presente línea de trabajo sobre la estructura citoesquelética a fin de seguir conociéndola y caracterizándola morfológicamente y a nivel funcional.

## OBJETIVOS DEL FUTURO TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PREDOCTORAL

Los objetivos planteados para este futuro trabajo son la continuación lógica de los proyectos financiados al grupo de investigación y que están avalados por publicaciones recientes en revistas de prestigio (PNAS, J. Biol. Chem., Eur. J. Neurosci., Neuroscience, etc). Dichos objetivos han sido planteados a dos niveles: celular y tisular.

A nivel celular los objetivos propuestos, organizados desde los aspectos más generales de mi estudio hacia los más específicos, son los siguientes:

- Estudios de área total celular y sus variaciones con la llegada de estímulo. Esto está encaminado hacia la detección de cambios globales de área y/o delimitados a zonas específicas de membrana que podríamos asociar a protuberancias formadas en determinados sectores de las células como resultado de la propia exocitosis y que a su vez dado que serían indicativos de actividad excitotóxica en las mismas serían zonas de interés para nuestros estudios a nivel de las fibras y agregados de F-actina frente a estímulo.
- Cuantificación de la densidad total de F-actina en célula control y estimulada. Estudiar los cambios en la densidad de F-actina post-estímulo, nos daría información sobre una posible formación de novo o destrucción de fibras de F-actina en las células asociada al estímulo.
- Análisis de los cambios de densidad de F-actina a nivel de agregado con la llegada del estímulo en zonas activas. Con ello se pretende conocer con detalle la configuración de fibras existente en zonas activas en situación previa y posterior a estímulo.
- Estudio comportamental de las fibras de F-actina ante estímulo. Con ello se pretende encontrar y definir los diferentes patrones de comportamiento de las fibras del citoesqueleto ante la llegada del estímulo. El estudio de los diferentes patrones de

comportamiento no solo consistirá en el análisis espacial de los cambios de intensidad hallados sino en un estudio temporal detallado de cada uno de los cambios detectados.

- Estudios de asociación entre los diferentes tipos de comportamientos de las fibras de F-actina y los tipos de fusión vesicular. Se pretenden reproducir las condiciones óptimas para llevar a cabo cada una de los dos tipos de fusión vesicular y registrar los diferentes comportamientos de las fibras con la llegada del estímulo para posteriormente poder encontrar una relación entre uno o varios de los comportamientos dados y los tipos de fusión vesicular (Kiss-and-Run y Full Fusion).
- Análisis de configuración espacial de los agregados de F-actina frente a las vesículas. Será la parte de nuestros estudios destinada a analizar la relación espacial predominante existente entre los agregados (elementos implicados en el transporte en el proceso excitotónico) y las vesículas (elemento a transportar hasta las zonas activas para la secreción de su contenido). Este estudio se verá ampliado con el estudio espacial combinado de los huecos (cavidades generadas entre fibras y agregados citoesqueletales) y las vesículas a fin de conocer la posición predominante vesicular respecto a este otro elemento de la red con el objetivo de poder identificarlo o no como reservorio de las mismas dentro de esta compleja estructura.
- Estudio bioquímico de las principales proteínas de unión del citoesqueleto a membrana. Se pretende conocer que proteína/s son las mayoritariamente implicadas en el anclaje de esta estructura a la cara interna de la bicapa lipídica y cuál es su distribución espacial. Se han planteado además estudios de colocalización entre dicha/s proteínas y las fibras de F-actina a fin de conocer el grado de asociación espacial entre ambas. Estos análisis de colocalización se llevarán a cabo a dos niveles: a nivel cualitativo y cuantitativo estando este último basado en los valores de uno de los coeficientes más ampliamente

utilizados en este sentido, Coeficiente de Pearson (R).

Por otro lado, a nivel tisular los objetivos propuestos son:

- Estudio morfológico de la estructura citoesqueletal. Se propone conocer la distribución espacial del citoesqueleto en las células embebidas en el tejido de la medula adrenal. Para ello se llevarán a cabo estudios tridimensionales y reconstrucciones del citoesqueleto en el eje "z" a fin de compararlo posteriormente con la ya descrita y publicada distribución del mismo en la célula cromafín aislada (2; 10).
- Estudios de distribución espacial de las vesículas y mitocondrias. Se pretende conocer la distribución espacial de ambos elementos en las células embebidas en el tejido a fin de poder establecer comparación con los datos ya publicados por el grupo previamente en relación a la distribución espacial de ambos elementos a nivel de célula cromafín aislada (11). Por otro lado, dado que estudios previos del grupo avalan en célula aislada una distribución en el espacio de vesículas y mitocondrias asociada íntimamente a la propia distribución espacial del citoesqueleto, se pretende investigar la posible existencia de tal relación de distribución entre estas tres estructuras a nivel tisular.
- Estudios de distribución de la/s proteína/s de anclaje citoesqueletales. Tras el estudio en célula aislada de la/s proteína/s implicadas en el anclaje del citoesqueleto, se pretende conocer la distribución espacial de las mismas en células inmersas en el tejido y someter a comparación con los datos de distribución obtenidos para célula aislada.
- Estudios de colocalización entre la/s proteína/s de anclaje y las fibras de F-actina. Se estudiará el grado de asociación espacial que hay entre este par de estructuras a dos niveles: a nivel cualitativo y cuantitativo (Coeficiente de Pearson (R)) y se usarán los datos obtenidos para establecer comparación con los datos para célula aislada.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La línea de investigación a abordar se desarrollará tomando como material central de trabajo las células cromafines bovinas procedentes de la parte medular de la glándula adrenal bovina, de donde se extraerán las mismas a modo de células en cultivo y rodaja tisular para los respectivos estudios propuestos. En cuanto a la metodología, el trabajo propuesto se fundamenta en el empleo de una metodología multidisciplinar que combina herramientas bioquímicas y de biología molecular, con un análisis biofísico de alta resolución temporal de la secreción y de imagen por microscopia de los fenómenos de transporte vesicular e interacción proteica. Algunas de las técnicas de mayor relevancia en el desarrollo de esta investigación serán: el cultivo primario de células cromafines bovinas así como la técnica de obtención de rodaja tisular a partir de glándula adrenal con el que obtendremos el material de trabajo y estudio. Las técnicas de inmunohistoquímica, las cuales nos permitirán la visualización fluorescente de estructuras celulares de interés. La microscopia confocal dinámica, que nos permitirá visualizar los cambios en intensidad o posición a lo largo del tiempo de una molécula u orgánulo marcada con fluorescencia así como la visualización de cambios estructurales y aportación de datos sobre movilidad in vivo de la estructura citoesquelética en base a estímulo. La microscopia electrónica que pese a ofrecernos imágenes estáticas de células ya fijadas en las que no podremos llevar a cabo estimulación, nos permitirá cubrir objetivos difícilmente alcanzables mediante estudio de imágenes de fluorescencia ya que nos ofrece la posibilidad de observar con un mayor nivel de resolución y con ello en mayor nivel de detalle las vesículas y mitocondrias en la célula así como la visualización clara de la membrana y el núcleo celular lo cual nos permitirá a su vez hacer estudios

con un mínimo valor de error. También se prevé el uso de la técnica de FRET (Fluorescence/Förster resonance energy transfer) que permite visualizar y medir la interacción entre dos proteínas "in vivo". Además con ella podremos obtener mapas estructurales de complejos de proteínas y datos de distancias intra o intermoleculares en el rango 10-100 Ångstrons. Otra técnica a usar será la técnica de TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescence Microscope) con la que podremos investigar la presencia de moléculas fluorescentes excitadas por una onda evanescente que penetra unos 300 nm en la zona de contacto de las células con la superficie de cultivo. Por ello los fenómenos de membrana, en nuestro caso la interacción de proteínas SNARE en la membrana plasmática o de GFP-actina o miosina en la zona cortical, se estudian con relativa precisión espacial y elevada resolución temporal haciendo uso del mismo. Por último cabe citar los programas informáticos de análisis de imagen como es en nuestro caso el Image J y el usado para el graficado de datos GraphPad Prism. Todo este conjunto de técnicas, utilizadas ordinariamente en el laboratorio del Dr. Luis Miguel Gutiérrez, unidas al conocimiento en biología molecular adquirido en los últimos años en colaboración con grupos como el del Dr. Criado perteneciente también al Instituto de Neurociencias de Alicante, Alvaro Villarreal (CSIC-Bilbao), así como el laboratorio de la Dra. Gertrude Bunt y el Dr. Walter Stuhmer (Instituto Max Planck de Medicina experimental, Göttingen, Alemania), con documentada experiencia en el manejo de las técnicas de FRET y TIRFM nos permitirán alcanzar la consecución de los objetivos del trabajo propuesto.



## CONCLUSIÓN

El citoesqueleto es una estructura a modo de red de filamentos extendida por el citoplasma de la célula con una funcionalidad para nada limitada al establecimiento y mantenimiento estructural de la célula, sino que aborda funciones más amplias en relación con procesos muy complejos como es el de la neurosecreción (1; 2; 8; 9). El trabajo aquí presentado es una visión preliminar de lo que esperamos sea una línea de investigación que permita aportar nuevos datos en el campo de la neurobiología especialmente en el área de la neurosecreción con el que se pretende abordar un estudio desde un enfoque basado en la biología celular y molecular del proceso centrándonos en el estudio de la estructura citoesqueletal y varios elementos íntimamente ligados a esta compleja red y a su vez altamente implicados en el proceso neurosecretor (vesículas y mitocondrias) utilizando como modelo celular de estudio la célula cromafín. Tras abordar el estado actual del área científica en cuestión se han propuesto una serie de objetivos específicos que abarcarán estudios a dos niveles: nivel celular y tisular. Para ello se ha diseñado un conjunto de experimentos variados que con su desarrollo y posterior análisis de los datos nos aporten información variada que abarque desde los comportamientos de los agregados de F-actina frente a estímulo y posible asociación de los mismos a los tipos de exocitosis vesicular hasta la distribución espacial de dicha estructura en los dos niveles descritos (célula cromafín aislada y célula inmersa en el tejido medular) así como de otros elementos en estrecha relación con la red (vesículas y mitocondrias), pasando por ofrecernos una visión del sistema de anclaje de esta estructura celular a membrana y del grado de asociación entre esta/s proteína/s y las fibras de F-actina en base a estudios de colocalización entre ambos elementos. Todos ellos han sido desarrollados con la finalidad de alcanzar un mejor conocimiento de la estructura citoesqueletal y con ello de su papel en el proceso excitotico en el que tiene su base el proceso de la neurosecreción en busca de

generar así un avance en este campo de la ciencia en el que pueden tener respuesta muchas alteraciones consideradas hoy en día base de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o el Alzheimer (17).

## REFERENCIAS

1. Gutiérrez LM. New insights into the role of the cortical cytoskeleton in exocytosis from neuroendocrine cells. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012;295:109-37.
2. Villanueva J, Torregrosa-Hetland CJ, García-Martínez V, del Mar Francés M, Viniestra S, Gutiérrez LM. The F-actin cortex in chromaffin granule dynamics and fusion: a minireview. *J Mol Neurosci.* 2012 Oct;48(2):323-7.
3. Villanueva J, Gimenez-Molina Y1, Viniestra S1, Gutiérrez LM. F-actin cytoskeleton and the fate of organelles in chromaffin cells. *J Neurochem.* 2016 Jun;137(6):860-6.
4. Giner D, Neco P, Francés Mdel M, López I, Viniestra S, Gutiérrez LM. Real-time dynamics of the F-actin cytoskeleton during secretion from chromaffin cells. *J Cell Sci.* 2005 Jul 1;118(Pt 13):2871-80.
5. Gutierrez LM, Hidalgo MJ, Palmero M, Ballesta JJ, Reig JA, Garcia AG, et al. Phosphorylation of myosin light chain from adrenomedullary chromaffin cells in culture. *Biochem J.* 1989 Dec 1;264(2):589-96.
6. Papadopoulos A, Tomatis VM, Kasula R, Meunier FA. The cortical acto-Myosin network: from diffusion barrier to functional gateway in the transport of neurosecretory vesicles to the plasma membrane. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013 Oct 21;4:153.
7. Villanueva J, Torres V, Torregrosa-Hetland CJ, Garcia-Martinez V, López-Font I, Viniestra S, et al. F-actin-myosin II inhibitors affect chromaffin granule plasma membrane distance and fusion kinetics by retraction of the cytoskeletal cortex. *J Mol Neu-*

- roschi. 2012 Oct;48(2):328-38.
8. Augustine GJ, Burns ME, DeBello WM, Pettit DL, Schweizer FE. Exocytosis: proteins and perturbations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996;36:659-701.
  9. Burgoyne RD, Morgan A. Regulated exocytosis. *Biochem J.* 1993 Jul 15;293 (Pt 2):305-16.
  10. Tchakarov LE, Zhang L, Rosé SD, Tang R, Trifaró JM. Light and electron microscopic study of changes in the organization of the cortical actin cytoskeleton during chromaffin cell secretion. *J Histochem Cytochem.* 1998 Feb;46(2):193-203.
  11. Villanueva J, Viniestra S, Gimenez-Molina Y, García-Martínez V, Expósito-Romero G, del Mar Frances M, et al. The position of mitochondria and ER in relation to that of the secretory sites in chromaffin cells. *J Cell Sci.* 2014 Dec 1;127(Pt 23):5105-14.
  12. Giner D, López I, Villanueva J, Torres V, Viniestra S, Gutiérrez LM. Vesicle movements are governed by the size and dynamics of F-actin cytoskeletal structures in bovine chromaffin cells. *Neuroscience.* 2007 May 11;146(2):659-69.
  13. Kovács M, Tóth J, Hetényi C, Málnási-Csizmadia A, Sellers JR. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J Biol Chem.* 2004 Aug 20;279(34):35557-63.
  14. Neco P, Fernández-Peruchena C, Navas S, Gutiérrez LM, de Toledo GA, Alés E. Myosin II contributes to fusion pore expansion during exocytosis. *J Biol Chem.* 2008 Apr 18;283(16):10949-57.
  15. Neco P, Gil A, Del Mar Francés M, Viniestra S, Gutiérrez LM. The role of myosin in vesicle transport during bovine chromaffin cell secretion. *Biochem J.* 2002 Dec 1;368(Pt 2):405-13.
  16. Neco P, Giner D, Viniestra S, Borges R, Villarroel A, Gutiérrez LM. New roles of myosin II during vesicle transport and fusion in chromaffin cells. *J Biol Chem.* 2004 Jun 25;279(26):27450-7.
  17. Garcia-Reitböck P, Anichtchik O, Bellucci A, Iovino M, Ballini C, Fineberg E, et al. SNARE protein redistribution and synaptic failure in a transgenic mouse model of Parkinson's disease. *Brain.* 2010 Jul;133(Pt 7):2032-44.



ANEXO II

---





ANEXO III

---





# The Differential Organization of F-Actin Alters the Distribution of Organelles in Cultured When Compared to Native Chromaffin Cells

Yolanda Gimenez-Molina<sup>1</sup>, José Villanueva<sup>1</sup>, Carmen Nanclares<sup>2</sup>,  
Inmaculada Lopez-Font<sup>1,3</sup>, Salvador Viniestra<sup>1</sup>, Maria del Mar Francés<sup>1</sup>, Luis Gandia<sup>2</sup>,  
Amparo Gil<sup>4</sup> and Luis M. Gutiérrez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Neurociencias, Centro Mixto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Miguel Hernández, Alicante, Spain, <sup>2</sup> Instituto Teófilo Hernando, Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, <sup>3</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Alicante, Spain, <sup>4</sup> Department Matemática Aplicada y Ciencias de la Computación, Universidad de Cantabria, Santander, Spain

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Hansen Wang,  
University of Toronto, Canada

### Reviewed by:

Silvio O. Rizzoli,  
Gesellschaft für Wissenschaftliche  
Datenverarbeitung (MPG), Germany  
Nicolas Vitale,  
Centre National de la Recherche  
Scientifique, France  
Thomas F. J. Martin,  
University of Wisconsin-Madison,  
USA

### \*Correspondence:

Luis M. Gutiérrez  
luisguti@umh.es

**Received:** 16 February 2017

**Accepted:** 21 April 2017

**Published:** 04 May 2017

### Citation:

Gimenez-Molina Y, Villanueva J,  
Nanclares C, Lopez-Font I,  
Viniestra S, Francés MM, Gandia L,  
Gil A and Gutiérrez LM (2017)  
The Differential Organization  
of F-Actin Alters the Distribution  
of Organelles in Cultured When  
Compared to Native Chromaffin Cells.  
*Front. Cell. Neurosci.* 11:135.  
doi: 10.3389/fncel.2017.00135

Cultured bovine chromaffin cells have been used extensively as a neuroendocrine model to study regulated secretion. In order to extend such experimental findings to the physiological situation, it is necessary to study mayor cellular structures affecting secretion in cultured cells with their counterparts present in the adrenomedullary tissue. F-actin concentrates in a peripheral ring in cultured cells, as witnessed by phalloidin-rodhamine labeling, while extends throughout the cytoplasm in native cells. This result is also confirmed when studying the localization of  $\alpha$ -fodrin, a F-actin-associated protein. Furthermore, as a consequence of this redistribution of F-actin, we observed that chromaffin granules and mitochondria located into two different cortical and internal populations in cultured cells, whereas they are homogeneously distributed throughout the cytoplasm in the adrenomedullary tissue. Nevertheless, secretion from isolated cells and adrenal gland pieces is remarkably similar when measured by amperometry. Finally, we generate mathematical models to consider how the distribution of organelles affects the secretory kinetics of intact and cultured cells. Our results imply that we have to consider F-actin structural changes to interpret functional data obtained in cultured neuroendocrine cells.

**Keywords:** F-actin cytoskeleton, fodrin, vesicles, mitochondria, confocal microscopy, transmission electron microscopy

## INTRODUCTION

Adrenomedullary chromaffin cells are widely used as a neuroendocrine model to study the exocytosis of dense core vesicles. The secretory process in these cells involves granule transport, the translocation of the secretory vesicles to the plasma membrane, their docking at secretory sites and finally, the fusion of the vesicle with the plasma membrane that results in the extrusion of their soluble contents (Burgoyne et al., 1993). Distinct cellular structures play fundamental roles in different stages of this secretory cascade, such as the cortical cytoskeleton (Trifaro et al., 2008; Gutierrez, 2012; Meunier and Gutierrez, 2016; Villanueva et al., 2016), while organelles

like the mitochondria and endoplasmic reticulum appear to control and shape the elevations in intracellular calcium that govern multiple steps of this cascade (Garcia-Sancho and Verkhatsky, 2008; Garcia et al., 2012; Garcia-Sancho et al., 2012).

Interestingly, the vast majority of studies into secretory processes in chromaffin cells have been carried out on isolated and cultured cells (Livett, 1984), assuming that this “*in vitro*” model is a fair correlate of the “native” cells present in the adrenomedullary tissue. However, the aggregation of PC12 cells in culture enhances the release of catecholamines (Baldwin and Saltzman, 2001) and electrical coupling occurs among the cells that form part of the rat adrenomedullary gland (Moser, 1998), evidence of the importance of cell–cell contacts in shaping secretory responses. Indeed, it was proposed that the culture of whole adrenal tissue from rats could be a better physiological correlate of adrenomedullary cells than dissociated cells (Fujinaga et al., 1999).

To assess this postulate, we examined the state of the F-actin cytoskeleton and the distribution organelles like chromaffin granules and mitochondria in isolated cultured cells and in cells that form part of the bovine adrenomedullary tissue. Surprisingly, we found that the F-actin cytoskeleton clearly adopts a distinct distribution *in vitro* and *in situ*, which may affect the distribution of chromaffin granules and mitochondria. Since these organelles are essential to shape and regulate the neuroendocrine cell’s secretory behavior, our results stress the importance of the F-actin cytoskeleton in controlling the cells secretory responses. Accordingly, our data suggest that isolated and cultured cells may not be appropriate to study the true physiological characteristics of the secretory process. In addition, we have used mathematical models to understand how these structural changes between isolated and native cells might influence the secretory responses from both cellular conditions.

## MATERIALS AND METHODS

### Chromaffin Cell Preparation and Culture

Chromaffin cells were isolated from bovine adrenal glands by collagenase digestion, and they were further separated from the cell debris and erythrocytes by centrifugation on Percoll gradients as described elsewhere (Gutierrez et al., 1989, 1995). The cells were maintained as monolayer cultures in Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 10  $\mu$ M cytosine arabinoside, 10  $\mu$ M 5-fluoro-2’-deoxyuridine, 50 IU/ml penicillin, and 50  $\mu$ g/ml streptomycin. The cells were plated at a density of 150,000 cells/cm<sup>2</sup> on 22 mm diameter poly-lysine coated coverslips. For the experiments, the cell culture media was replaced with basal Krebs/HEPES (K/H) solution containing: 134 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 11 mM glucose, 0.56 mM ascorbic acid, and 15 mM HEPES [pH 7.4]. For microscopy experiments, cells were used between the third and sixth day after plating on glass coverslips (24 mm) in plastic Costar dishes (35 mm) at a density of 10<sup>6</sup> cells/ml (2 ml per dish), performing all the experiments at room temperature (21–22°C). For

catecholamine secretion experiments, cells were plated at a density of 10<sup>6</sup> cells/ml in plastic Petri dishes (60 mm, 5 ml per dish).

### Preparation of Bovine Adrenomedullary Slices

In order to prepare the tissue slices, adrenal glands were dissected to separate the cortex from the medulla, and the medulla was then cut into small pieces and embedded in 4% low fusion agarose (Type VII-A, Sigma, Co., Madrid, Spain) to be cut by vibratome (Leica VT 1000). We obtained tissue slices (ca. 180 nm) at 6 Hz frequency from agarose cubes and all of them were submerged in BBS free calcium buffer (125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM D-glucose) immediately after the cutting process. These slices were processed for immunohistochemistry the same day of collection as described below and then were maintained at 4°C. The slices were used for confocal microscopy on the second or third day after collection and all experiments were performed at room temperature (21–22°C).

### Confocal Microscopy of the F-Actin Cytoskeleton, $\alpha$ -Fodrin, and Chromaffin Granules

Cells and tissue slices were first fixed and then permeabilized using a modified method described previously (Lopez et al., 2007). Briefly, the samples were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) diluted in phosphate buffered saline solution (PBS) (20 min for cells and 30 min for tissue slices) and they were then permeabilized (10 min with 0.2% Triton X-100 in 3.6% formaldehyde for cells and 1 h with 0.5% Triton X-100 in 3.6% formaldehyde for tissue slices). The different application time was required in order to ensure a complete access of the antibodies to the cell interior. After that, in both cases the samples were washed twice with PBS for 15 min and twice with 1% BSA in PBS for 15 min.

The samples were then labeled to study the different cellular structures by confocal microscopy. F-actin structures were labeled with phalloidin coupled to rhodamine (Sigma-Aldrich, Madrid, catalog number P1951), at room temperature (21–22°C) during 45 min.

G-actin was labeled with a monoclonal antibody [1:200 dilution, Abcam Research Products, Cambridge, UK, Catalog number AB3280, Clon number ACTN05 (C4)]. The  $\alpha$ -fodrin protein was labeled using a mouse anti- $\alpha$ -fodrin antibody (Abcam Research Products, Cambridge, UK, Catalog number AB131575, Clon number 3D7, Bath number GR196944-2). In addition, SNAP-25 was labeled with a polyclonal goat antibody (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EEUU, Catalog number sc-7538, Bath number L0902). All primary antibodies were used at 1:200 dilutions in PBS.

Both G-actin and  $\alpha$ -fodrin primary antibodies were visualized using a secondary antibody coupled to FITC (Anti-mouse to IgG produced in goat, Sigma Aldrich-Madrid, Catalog Number F-2012, Bach number SLBG3032). Two different secondary antibodies were used to visualize SNAP-25 labeling, one coupled



to rhodamine (Anti-goat to IgG produced in rabbit, Santa Cruz Biotechnology, Texas, EEUU, Catalog number sc-3945) and the other to FITC (Anti-goat to IgG produced in donkey, Santa Cruz Biotechnology, Texas, EEUU, Catalog number sc-2024). All secondary antibodies were used at 1:200 dilutions in PBS.

All labeled cells and tissue slices were viewed on an Olympus Fluoview FV300 confocal laser system mounted on a IX-71 inverted microscope and using a 100X PLAN-Apo oil-immersion objective with 1.45 n.a. Excitation was achieved with Ar and HeNe visible light lasers.

## Transmission Electron Microscopy of Chromaffin Granules and Mitochondria

Bovine chromaffin cell pellets and adrenomedullary tissue (2–3 mm<sup>3</sup>) were fixed at 4°C with 2.5% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer [pH 7.0] (2 h for cell pellets and 4 h for medulla tissue), and then washed overnight at 4°C in a solution of 0.2 M cacodylate buffer, sucrose and distilled water. After post-fixing at 4°C with 1% osmium tetroxide in 0.2 M cacodylate buffer (2 h for cell pellets and 4 h for adrenomedullary tissue) and extensive washing with distilled water, samples were stained at 4°C with 2% aqueous uranyl acetate (1 h for cell pellets and 2 h for adrenomedullary tissue). Subsequently, the samples were washed again, dehydrated through an ethanol series (30, 50, 70, 80, 96, and 99%: 15 min each one) and incubated twice for 15 min with propylene oxide at room temperature. Finally, the cell pellets and adrenomedullary pieces were embedded in epoxy resin and ultra-thin sections (70 nm) were obtained on a Leica UC6 ultramicrotome and transferred to copper grids (200 mesh). After staining with uranyl acetate for 5 min and lead citrate for 1 min, the ultrathin sections were analyzed on a JEOL 1011 a 80 kv transmission electron microscope with Gatan BioScam mod 792 digital camera to capture the images.

## Data Analysis from Microscopy Images

All microscopy images were analyzed with the Image J free software using the appropriate plug-ins to: automatically detect particles in thresholded images, calculate the area, perform density studies and intensity profile determinations, and perform 3D reconstructions. Graphics were prepared with IgorPro Graphpad Prism (GraphPad software, San Diego, CA, USA) and Adobe Photoshop 7.0. The non-parametric, the two-way ANOVA test was used to establish the significance of the experimental data (samples were considered significantly different when  $P < 0.05$ ). The data were expressed as the mean  $\pm$  SEM from experiments performed on (n) individual cells, vesicles from at least two different cultures or adrenal tissue preparations.

## On-line Measurement of the Catecholamine Released by Native and Isolated Bovine Chromaffin Cells after Stimulation

To measure catecholamine release from intact isolated bovine chromaffin cell populations, cells were carefully recovered from the Petri dish using a rubber policeman and centrifuged at 800 rpm for 10 min. The cell pellet was resuspended in 200  $\mu$ l

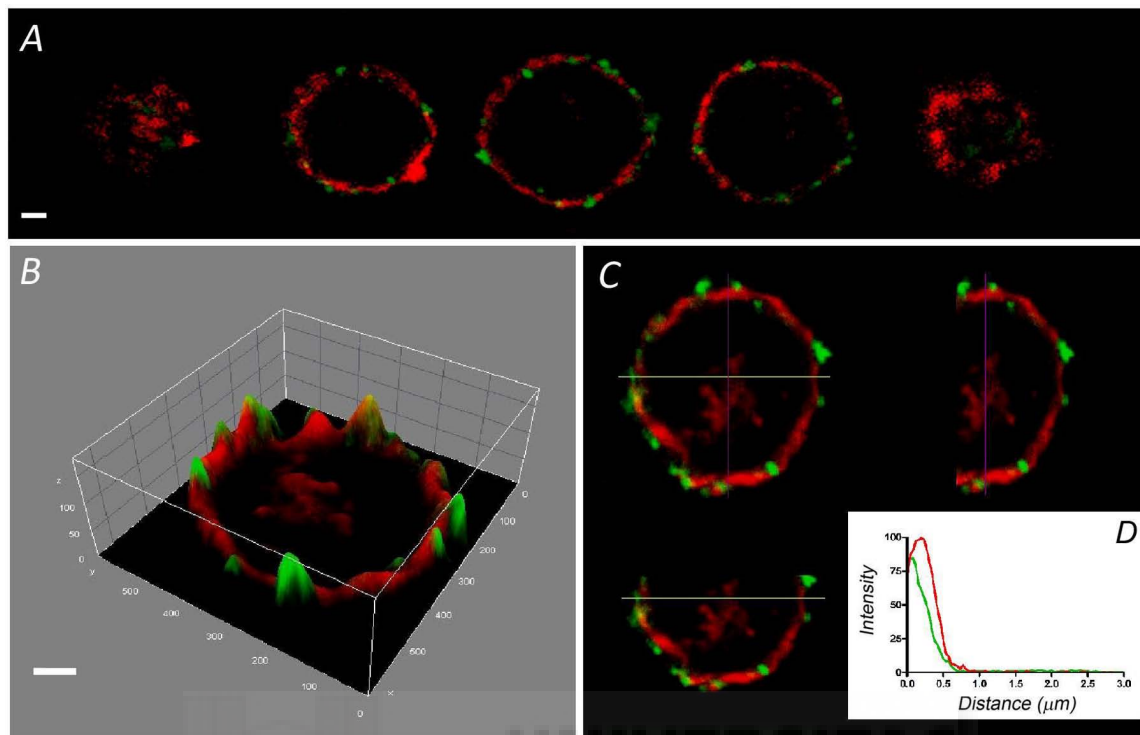
of Krebs-HEPES (composition in mM: NaCl 144; KCl 5.9; CaCl<sub>2</sub> 2; MgCl<sub>2</sub> 1.2; glucose 11; HEPES 10 [pH 7.4]) and the cells were introduced into a microchamber for superfusion at the rate of 2 ml/min. To measure catecholamine release in adrenomedullary bovine tissue, small pieces of tissue (ca. 5–8 mm<sup>3</sup>) were obtained from adrenal glands and introduced into a microchamber for superfusion with Krebs-HEPES at the rate of 2 ml/min.

The microchamber had a volume of 100  $\mu$ l and it was covered with a jacket to continuously circulate external water at 37°C. To detect the catecholamines released, the liquid flowed from the superfusion chamber to an electrochemical detector (Metrohn AG CH-9100 Herisau, Switzerland) equipped with a glassy carbon working electrode, an Ag/AgCl reference electrode and a gold auxiliary electrode. Catecholamines were oxidized at +0.65 V and the oxidation current was recorded on line by a PC placed at the outlet of the microchamber under the amperometric mode, assessing the amount of catecholamines secreted (Borges et al., 1986). Secretion was stimulated to with 5 s pulses of a Krebs-HEPES solution containing 100  $\mu$ M Acetylcholine (ACh) and the solutions were rapidly exchanged through electrovalves driven by a PC.

## Modeling the Effect of Granule and Mitochondrial Organization on Chromaffin Cell Secretion

To simulate secretory events we used a Monte Carlo algorithm that proved to be successful in the study of calcium buffered diffusion (Gil et al., 2000), of the influence of geometrical factors on the exocytotic response of neuroendocrine cells (Segura et al., 2000; Torregrosa-Hetland et al., 2011) and of presynaptic terminals (Gil and Gonzalez-Velez, 2010). The algorithm implements a microscopic simulation in which the fundamental variables are the number of ions and buffers. The average values of the output of our simulations converge to macroscopic results when considering symmetric configurations.

Calcium-induced secretory events in the sub-membrane domain of spherical cells (as is the case of chromaffin cells in close approximation) can be adequately described using a conical subdomain where the different processes involved take place: calcium entry through voltage-dependent calcium channels (VDCCs); the kinetic reactions of calcium and buffers; the diffusion of mobile buffers and calcium ions; and the binding of calcium ions to secretory granules. The base of the cone represents the membrane of the cell where calcium channels cluster. We consider these clusters to be formed by two P/Q- and one L-type calcium channels, according to experimental estimations of channel populations involved in chromaffin cell secretion (Lukyanetz and Neher, 1999). A schematic representation of the 3-D simulation domain is shown in **Figure 8A**, in which three clusters of VDCCs and a few mitochondria are also represented. The simulation of currents through these channel types is made using a simple stochastic scheme where every channel of the total population can transit from its present state to an open, closed or inactive state in response to voltage and calcium concentrations. The current to voltage relationships considered in the channel gating kinetic



**FIGURE 1 | Distribution of F-actin in cultured bovine chromaffin cells.** Sequential confocal images of a representative chromaffin cell in culture labeled with rhodamine-phalloidin (red fluorescence), and anti-SNAP 25 in green (A). (B) The intensity distribution of the central image of (A) is shown depicting the concentration of fluorescence at the cell periphery. A pseudo-3 D reconstruction highlights the peripheral labeling present in the three spatial axis (C). (D) The individual fluorescence profiles were averaged to obtain the distribution of F-actin fluorescence relative to the position of the plasma membrane labeled with anti-SNAP-25 (green). Data from cultured cells ( $n = 16$  cells, two different cell preparations). Bars in (A,B) represent  $1 \mu\text{m}$ .

schemes for P/Q- and L-type calcium channels are shown in **Figure 8B**.

The conical domain is mapped by a 3-D regular orthogonal grid with a distance between grid points  $\Delta x$ . The 3-D diffusion of mobile particles in the simulation domain is modeled as a random walk process. The first-order kinetic reactions of calcium ions and buffers are interpreted and resolved probabilistically. This also applies to the binding of calcium ions to secretory granules which are, in this sense, interpreted as an additional calcium buffer in the medium. The kinetic model of Klingauf and Neher (1997) for the secretory sensor of vesicles in chromaffin cells is used in the algorithm.

Apart from granules, mitochondria are also considered in the simulation domain. The mitochondria and secretory granules inside the simulation domain are distributed based on experimental findings from isolated cells and cells in adrenal slices. Mitochondria are modeled as permeable obstacles to diffusion and when calcium ions are trapped in the diffusion process by a compartment corresponding to mitochondria, the obstructed diffusion inside the mitochondrial matrix is simulated by moving them in exactly the same way that calcium ions are moved in the cytoplasm, but only after a number “N” of simulation steps. The waiting time in the mitochondrial matrix can be estimated by taken into account experimental evidence from chromaffin cells that suggests the amount of calcium taken

up by the subpopulation of mitochondria in the immediate vicinity of the VDCC clusters can be very large during the maximal stimulation of calcium entry through calcium channels, in the order of a few  $100 \mu\text{M}$  (Villalobos et al., 2002).

## Ethics Statement

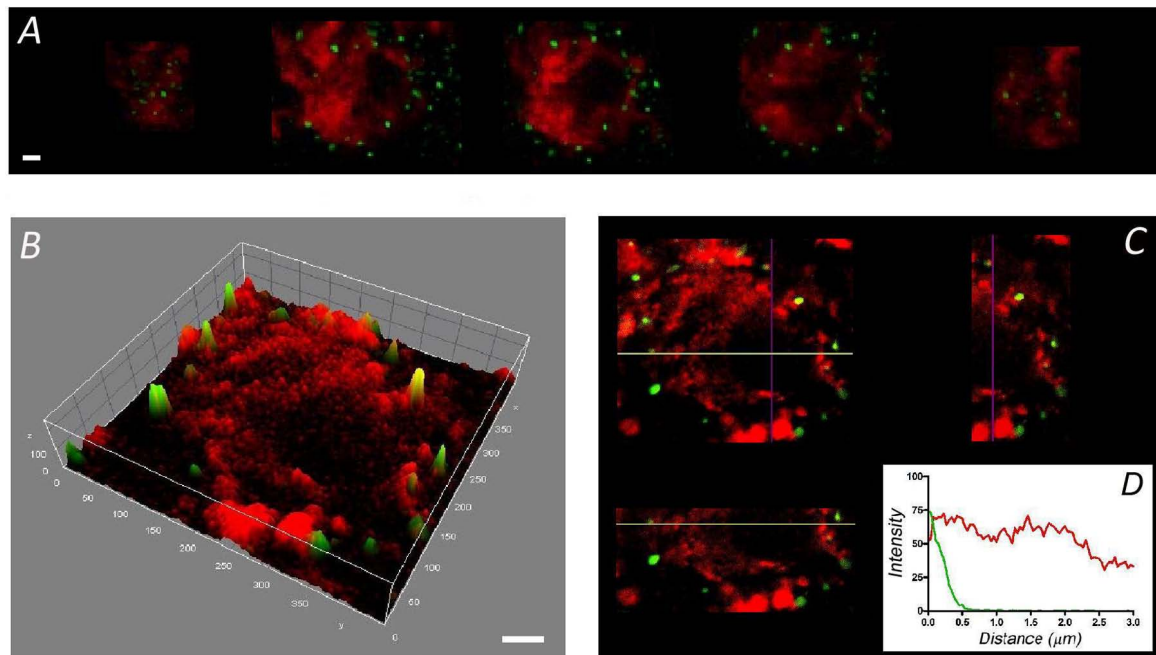
Adrenal glands were obtained from an industrial slaughterhouse (Matadero de Orihuela SA) subjected to strict regulations of the Ministries of Agriculture, Industry and Health of Spain in accordance with EC normative.

All the protocols described in this article were approved by the Organo Evaluador de Proyecto of University Miguel Hernández, the office in charge of the observation of the Ethics in animal care and experimentation in our institution.

## RESULTS

### The F-Actin Cytoskeleton Accumulates in the Cortical Area of Isolated Cells whereas it Is Distributed Evenly throughout the Cells in the Tissue

The F-actin cortical cytoskeleton has been characterized extensively in cultured bovine chromaffin cells as a factor that



**FIGURE 2 | Distribution of F-actin in chromaffin cells from adrenal medulla slices.** Sequential confocal images of cells in slices of adrenomedullary tissue labeled with rhodamine-phalloidin (red) and anti-SNAP-25 (green) **(A)** showing a broader cytoplasmic distribution of F-actin, as confirmed by the intensity study of the central image **(B)**, and the spatial plane analysis **(C)**. **(D)** The individual fluorescence profiles were averaged to obtain the distribution of F-actin fluorescence (red line) relative to the plasma membrane position (green line) of cells in the adrenal medulla ( $n = 16$  cells, two different tissue preparations). Bars in **(A,B)** represent  $1 \mu\text{m}$ .

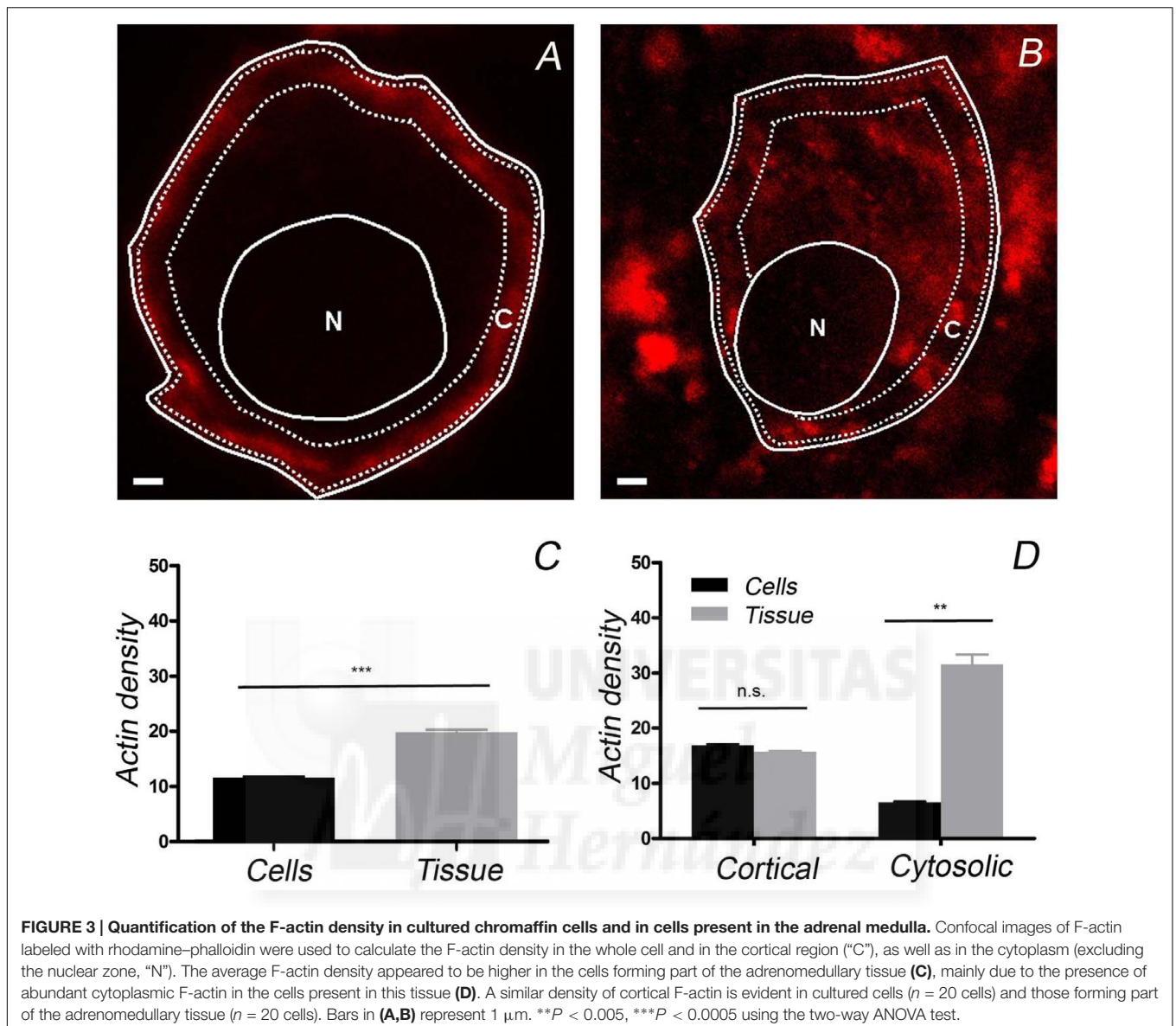
strongly influences secretory behavior in this neuroendocrine model (Trifaro et al., 2008; Gutierrez, 2012; Meunier and Gutierrez, 2016). Interestingly, few such studies have been performed on the native cells that form part of the adrenal medulla. Therefore, we set out to compare the distribution of this essential structural element in dissociated and cultured cells with that in bovine adrenomedullary slices by confocal fluorescent microscopy. Rhodamine-phalloidin clear labeled the cortical F-actin in fixed and permeabilized cultured cells as described in a variety of earlier studies. The sequence of confocal planes from a representative cell revealed the accumulation of fluorescence in the cortical region forming a peripheral ring (**Figure 1A**), as also evident after fluorescence integration studies (**Figure 1B**) and in the analysis of the different spatial axis (**Figure 1C**). In these images the position of the cell membrane was visualized using an antibody against SNAP-25 (green fluorescence in **Figure 1**). Moreover, after averaging the fluorescent profiles for many cells corresponding to two different cell cultures ( $n = 16$  cells, **Figure 1D**), the virtual absence of internal F-actin is notable. Interestingly, the distribution of F-actin in cells present in adrenomedullary slices is quite different (**Figure 2**) with phalloidin staining distributed in patches not only in the cortical region but also throughout the cytoplasm. The presence of these patches is clear in fluorescence intensity studies (**Figure 2B**) and throughout the different spatial planes (**Figure 2C**). Hence, averaging a high number of these profiles ( $n = 16$ ) indicates that sustained levels of F-actin are distributed throughout the cytoplasmic space (**Figure 1D**).

To calculate the F-actin density in different regions of the cells studied, the fluorescence intensity was calculated for the cortical region expanding  $1 \mu\text{m}$  from the cell's periphery and divided by the area occupied (**C** in **Figures 3A,B**). Similarly, the F-actin fluorescence density in the cell interior was calculated, excluding the nuclear region (**N** in **Figures 3A,B**). After averaging the fluorescence density in the cell area excluding the nucleus, it was evident that the density of F-actin was lower in cultured chromaffin cells ( $n = 20$ , from three cell preparations) when compared with that in adrenomedullary cells ( $n = 20$ , from three adrenal tissue preparations) (**Figure 3C**). This is due to the more extended distribution of cytoplasmic F-actin in native cells as the density of cortical F-actin was similar in both cell types (**Figure 3D**).

To address whether the absence of cytoplasmic F-actin in cultured cells was due to a lack of g-actin for polymerization, the distribution of g-actin was evaluated using specific antibodies (Supplementary Figure S1). There was considerable g-actin present in the cytoplasm of cultured cells that is not polymerized, whereas in cells within the adrenomedullary tissue the g-actin co-localized with F-actin, indicating significant polymerization of actin throughout the cytoplasm.

This difference in the distribution of F-actin could not be attributed to the absence of cell to cell contacts or the limited access of phalloidin in cultured cells since increasing the density of cells in cell cultures or prolonging the experimental time of incubation did not affect the F-actin distribution (Supplementary Figure S2).

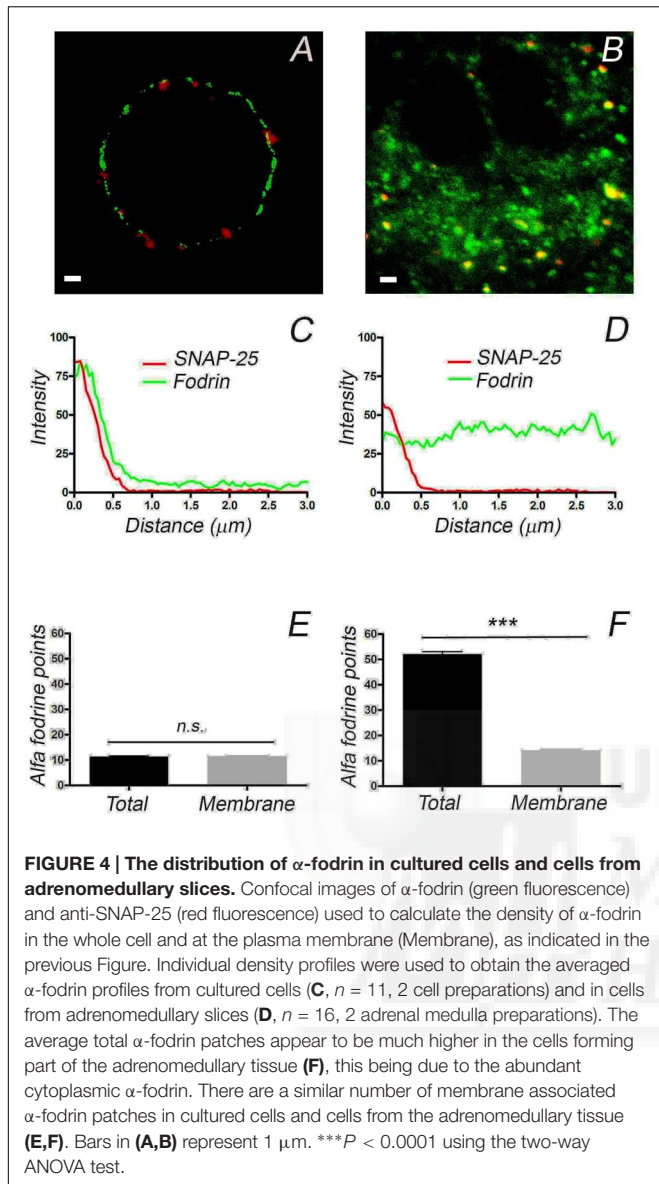




### Differential Distribution of $\alpha$ -Fodrin between Isolated Adrenal Cells and Those Present in the Adrenal Gland

The differences in the distribution of F-actin in cultured and native cells present in the adrenomedullary tissue was an unexpected finding that could affect the distribution of other proteins and organelles, thereby influencing the secretory behavior of these cells. The protein  $\alpha$ -fodrin associates with both F-actin and the plasma membrane, and it becomes redistributed during secretion (Perrin and Aunis, 1985; Langley et al., 1986; Burgoyne and Cheek, 1987; Perrin et al., 1987). Therefore, we assessed whether the distribution of this protein also differed in these cells, in line with the changes observed for F-actin. Using a mouse monoclonal antibody against  $\alpha$ -fodrin, a punctate distribution of this protein that was clearly associated with the

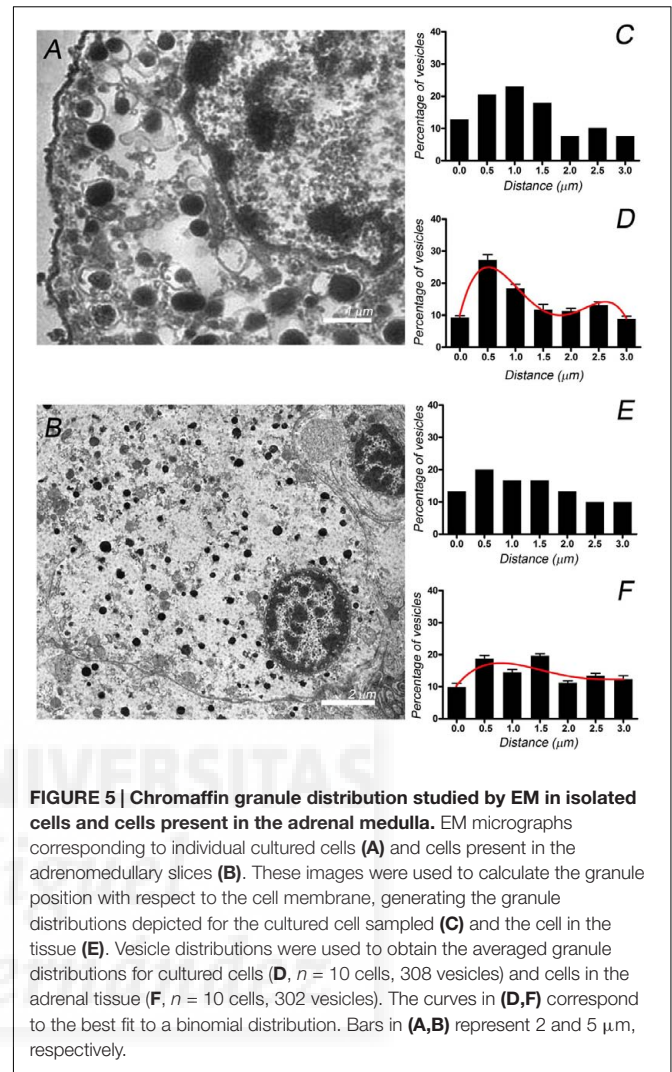
cell periphery was evident in confocal fluorescence microscopy images of cultured cells (Figure 4A), while it was more extensively distributed throughout the cytoplasm in the cells forming part of the adrenomedullary tissue (Figure 4B). Again, the intensity profiles from individual cells and profile averaging confirmed the broad cytoplasmic distribution of  $\alpha$ -fodrin in the intact tissue (Figure 4D) ( $n = 16$ ), in contrast to its concentration at the cortex of cultured cells (Figure 4C) ( $n = 11$ ). Interestingly, the number of peripheral  $\alpha$ -fodrin puncta was very similar at the periphery of both cell types but obviously, there was a considerable number of cytoplasmic  $\alpha$ -fodrin patches in the tissue that were absent in cultured cells (Figures 4E,F). Therefore, it seems clear that both cultured cells and those forming part of the intact adrenomedullary tissue have a very similar cortical density of F-actin and  $\alpha$ -fodrin, whereas there



is a dense cytoplasmic F-actin structure in the latter to which intracellular  $\alpha$ -fodrin associates.

### The Distribution of Chromaffin Granules and Mitochondria Differs in the Adrenal Gland and in Cultured Cells

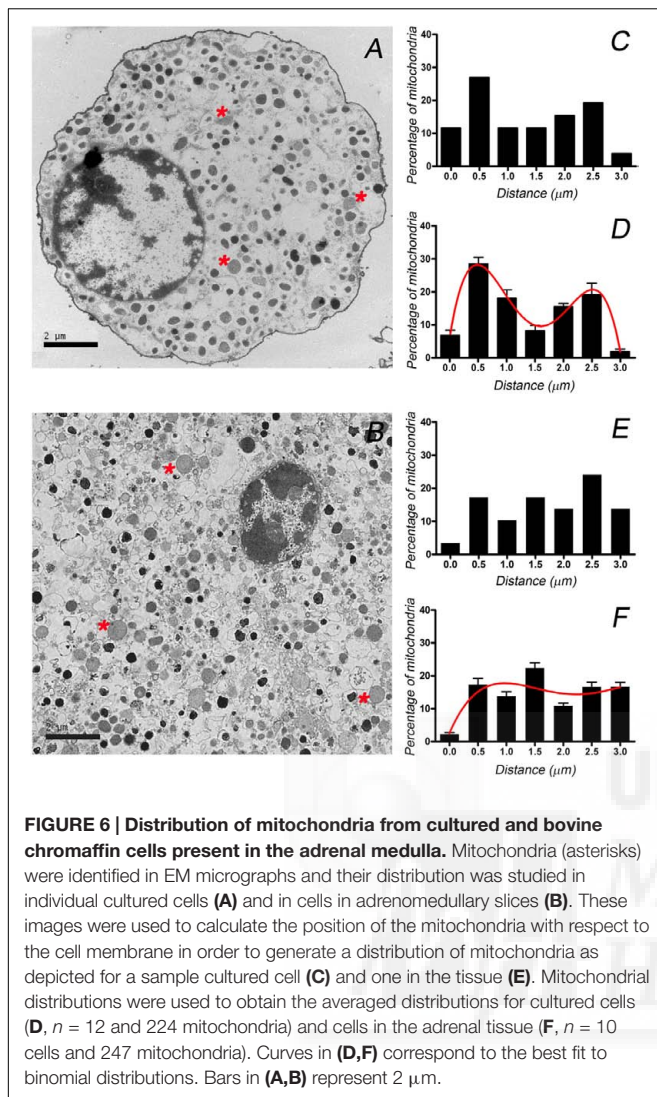
To examine whether or not the different distributions of F-actin in the isolated and native cells influences the distribution of organelles essential for secretion, we studied the distribution of chromaffin granules by electron microscopy (Figures 5A,B). The position of dense chromaffin granules was obtained by manual distance measurements of vesicles located in the studied section delimited from the plasma membrane limit to 3  $\mu\text{m}$  inside cytoplasm and used to build granular distributions for individual cells (Figures 5C,E). Mean values of granules distribution (Figures 5D,F) were obtained by averaging corresponding data



from 10 isolated cells ( $n = 308$  vesicular distances, two cell preparations) and 10 “native” cells present in the adrenal tissue ( $n = 302$  vesicular distances, two adrenal tissue preparations). Interestingly, chromaffin granules seem to present a biphasic distribution in the isolated cells with two different cortical and internal populations, whereas their distribution was more homogeneous in the cells present in the adrenal medulla. Furthermore, in an additional experiment the treatment of the cells with latrunculin A, altering F-actin organization in our cells (Giner et al., 2005), caused the redistribution of the vesicles resulting in the disappearance of the biphasic distribution (Supplementary Figure S3).

In parallel, the differential distribution of chromaffin vesicles between the cultured and the cells present in the adrenal medulla has been supported also by experiments performed using chromaffin granule labeling with anti-Dopamine  $\beta$ -Hydroxylase (Supplementary Figure S4).

The differential distribution of granules between the cultured cells and those forming part of the tissue could reflect how the distinct cytoskeletal organization influences the distribution



of other major organelles. Thus, we studied the distribution of mitochondria in electron microscopy images since individual mitochondria can be clearly distinguished in such images by their shape, lower density and internal cristae (Figure 6, see asterisks). Again, the distance of the mitochondria to the cell membrane was used to define their distribution in individual cells (Figures 6C,E) and averaged to obtain the mean distributions (Figures 6D,F) for cultured ( $n = 10$ ) and the cells present in the adrenal tissue ( $n = 10$ ). The resulting distributions again sustain the notion that mitochondria present a bimodal distribution in isolated cells indicating the presence of distinct cortical and internal populations, whereas they were more homogeneously distributed in the native cells in the medullary tissue. The results obtained for cultured cells are in agreement with recent confocal microscopy studies (Villanueva et al., 2014), that in addition proved that the alteration of F-actin organization caused the redistribution of mitochondria with the subsequent disappearance of the biphasic distribution.

Therefore, our results strongly suggest that the F-actin distribution in the native and isolated cells is responsible for the differences in the distribution of major organelles like chromaffin granules and mitochondria, potentially affecting the secretory behavior of chromaffin cells.

## Secretory Behavior of Native and Isolated Bovine Chromaffin Cells

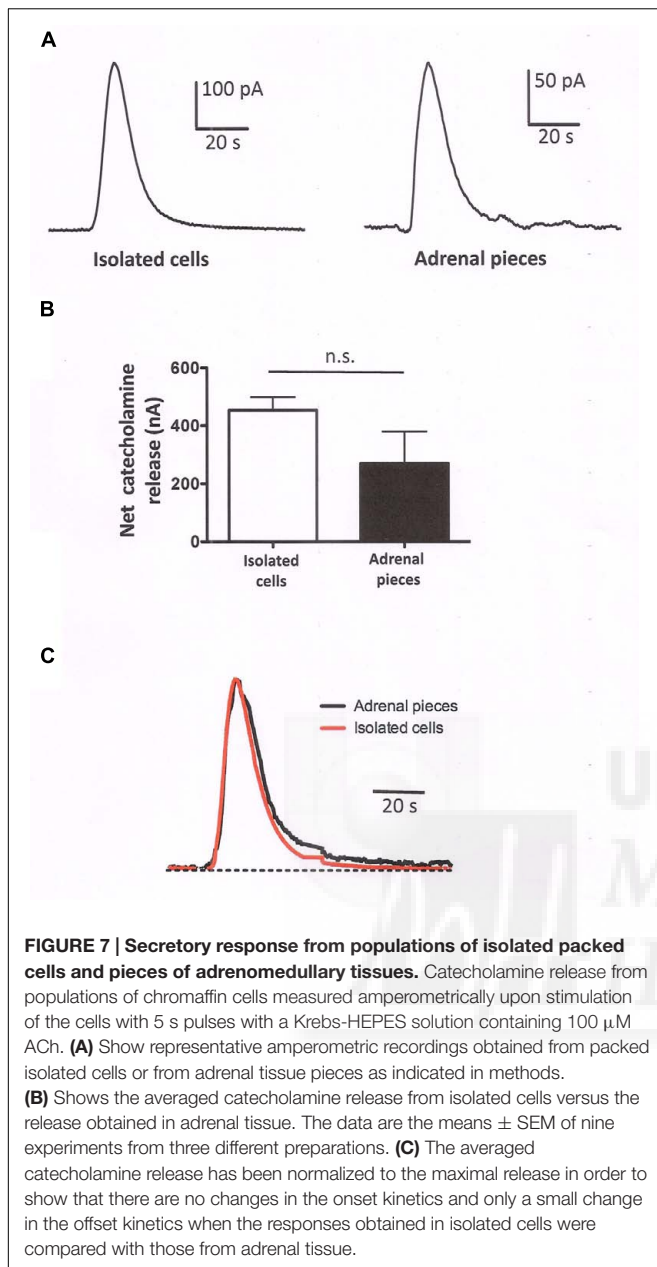
To assess whether the secretory response of isolated cells and cells forming part of the native adrenal tissue differs, we evaluated the catecholamine release from both cell types using an amperometric approach using populations of packed cells. Isolated chromaffin cells ( $5 \times 10^6$  cells) were packed in a microchamber and their secretory response examined when stimulated by acetylcholine (ACh, 100  $\mu\text{M}$ ), the physiological neurotransmitter at the splanchnic nerve-chromaffin synapse (Figure 7A). The secretory responses of the isolated cells were compared with those obtained from small pieces (five pieces of about 5–8  $\text{mm}^3$ ) of the native adrenal gland after exhaustive rinsing with a basal Krebs-HEPES solution. When measured by amperometry ( $n = 9$  experiments), the responses in the isolated cells were of a higher magnitude (Figure 7B) but when normalized to the maximal value, these responses were remarkably similar in terms of the onset kinetics yet with a slightly slower offset kinetics in the intact cells (Figure 7C). Therefore, it appears that the kinetics of catecholamine release do not differ greatly in isolated cells and in cells forming part of the adrenal gland, despite the important changes in cytoskeletal organization and organelle distribution described above, and in any case, a small change in the offset kinetics could be associated with a more sustained response in native cells and this might be related with the presence of slow releasable internal vesicle pools.

## DISCUSSION

### The Internal F-Actin Cytoskeleton Is Destabilized When Cells Are Isolated from the Adrenal Gland

Cultured chromaffin cells have been used extensively as a secretory model to investigate the molecular basis of the exocytosis cycle (Burgoyne, 1995; Trifaro et al., 2008; Gutierrez, 2012; Papadopoulos et al., 2013; Meunier and Gutierrez, 2016). However, in cultured cells the distribution of calcium channels and SNARE proteins may be altered with respect to that in native cells (Lopez et al., 2007), which may affect the functional properties of the cells when isolated from a tissue like the adrenal medulla. The data presented here shows that the F-actin cytoskeleton, the major structural element supporting cell shape, organelle transport (Villanueva et al., 2016) and an essential element of the secretory machinery (Gutierrez, 2012; Papadopoulos et al., 2013; Meunier and Gutierrez, 2016), is also altered dramatically after isolation and culture. These changes are not surprising since cell-to-cell contacts and cell adhesion exert a significant influence on the cytoskeleton (Kaibuchi, 1999; Braga, 2002).





## Essential Proteins Associated with F-Actin and Organelles Are Distributed Distinctly in Isolated Cells and Chromaffin Cells in the Adrenomedullary Tissue

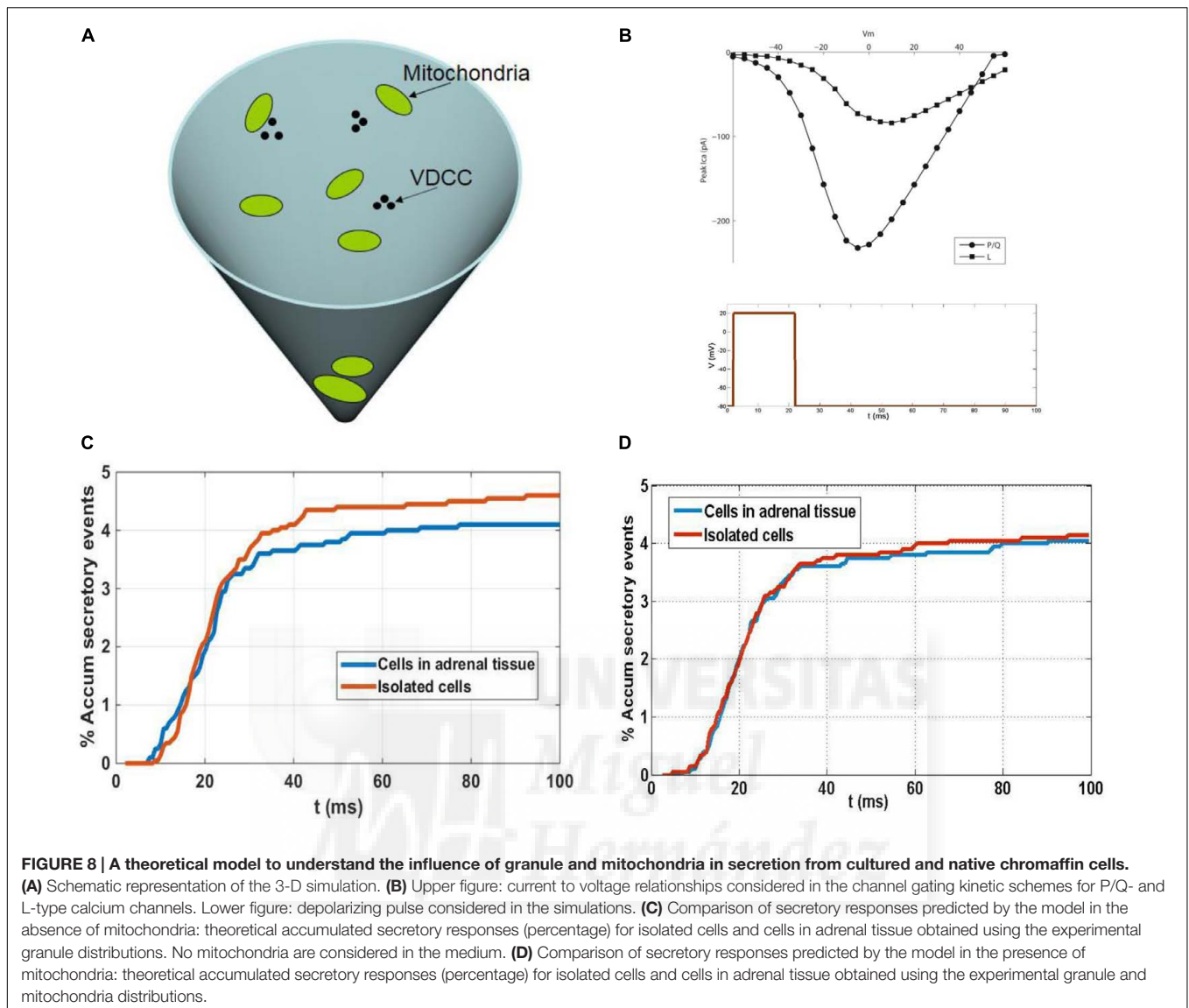
The differences in F-actin distribution between isolated and native chromaffin cells, were also reflected in the localization of the fodrin protein, a protein that associates with F-actin. The interaction between F-actin and fodrin was first reported on the basis of their co-sedimentation in enriched fractions (Levine and Willard, 1981), and fodrin was characterized as a cortical protein, “lining” the cell membrane in neural and

non-neural tissues as reflected in its name (from “fodros,” lining in Greek). The  $\alpha$  subunit of fodrin was then shown to bind to F-actin in the submembrane space, which was also responsible for its reorganization during cell stimulation (Perrin and Aunis, 1985). Today,  $\alpha$ -fodrin is considered as a cytoskeletal-related protein (Haneji et al., 1997), and it has been associated with other relevant exocytotic proteins like syntaxin 1, 3 and 4, forming part of the fusion pore (Nakano et al., 2001; Jena et al., 2003). The spatial distribution of  $\alpha$ -fodrin in isolated and native chromaffin cells defined here confirms its association with F-actin not only in the submembrane domain, as described previously, but also in important cytoplasmic domains in native chromaffin cells. Given the relationship between both these elements, the common spatial distribution confirms our data regarding the differences in F-actin distribution, raising questions regarding the possible role of the association of  $\alpha$ -fodrin with F-actin in the cell interior of native cells.

An important consequence of the distinct F-actin organization in cultured and native chromaffin cells is the altered localization of organelles like chromaffin granules and mitochondria. In this context the cortical F-actin structure in neuroendocrine cells was seen to act as a system to “anchor” chromaffin granules (Oheim and Stuhmer, 2000; Johns et al., 2001) and mitochondria (Villanueva et al., 2014) in the vicinity of active sites. Therefore, it is not a surprise that there is a dense meshwork of F-actin in the interior of the native cells described here that is absent from isolated and cultured cells. This F-actin network helps to stabilize a larger population of internal organelles and consequently, alter their cellular distribution.

## Functional Models Analyzing the Impact of Organelle Distribution in the Secretory Responses between the Intact and Isolated Chromaffin Cells

It is important to consider what possible functional impact the distinct distribution of F-actin and organelles might have on cultured and native cells. We addressed this issue by using mathematical models that have proven useful to understand aspects of the secretory process in chromaffin cells (Segura et al., 2000; Torregrosa-Hetland et al., 2011). The accumulated secretory response (as a percentage) was defined by our model for isolated cells and cells in adrenal tissue (Figure 8C), simulating the response to a depolarizing pulse (Figure 8B). No mitochondria were considered in the medium in these simulations and the results shown are the average of a few 100 random configurations of the distances of vesicles from the VDCC. Random configurations were generated according to the experimental granule distributions summarized (Figure 8D) and as a result, the time courses of the secretory responses were very similar during the first 25 ms (Figure 8C). This result was consistent with the fact that the sub-population of vesicles that are released first are those that are in very close proximity to the VDCC, and that the proportion of these vesicles is nearly the same in isolated cells and in native cells in adrenal tissue (10% of the whole population of secretory



granules in both cases). After the first 25 ms, a second sub-pool of vesicles situated further away from the VDCC come into play, a sub-pool of granules that represents approximately 27% of the granules in individual cells and approximately 19% in the native cells in adrenal tissue (Figure 8D). Due to the larger size of this sub-pool of vesicles in isolated cells, a larger secretory response would be expected when the calcium concentration in the vicinity of these vesicles surpasses the threshold level needed to trigger release relative to that in the native cells in adrenal tissue (Figure 8C). However, this situation changes when mitochondria are considered in the medium, as the larger population of mitochondria close to the cell membrane in isolated cells than in the native cells in adrenal tissue (Figure 8D) act as a more effective barrier for the diffusion of calcium from the VDCC toward other parts of the cytoplasm, and in particular toward the location of the second sub-pool of granules. As a result, a larger reduction in the secretory response would

be expected in isolated cells than in cells in adrenal tissue. The combined effects on vesicles and mitochondria, acting in opposite directions, influences the release of granules (as shown in Figure 8D), although the results obtained with our model indicate that one effect could actually compensate for the other. As a result, the secretory time courses in isolated cells and in native cells in adrenal tissue would look similar despite the differences in the distribution of their granules and mitochondria. This theoretical result is consistent with the results showing similar secretory behaviors of the two cell populations studied in our amperometric experiments (Figure 7), although the temporal resolution of this technique studying the release of 1000s of cells is relatively limited. In this sense, we should mention that ours and other lab efforts to measure secretion from individual cells forming part of the bovine adrenal medulla has been unsuccessful (Drs Antonio G. Garcia and Ricardo Borges personal communication).



## Thus, Are Isolated and Cultured Neuroendocrine Chromaffin Cells an Inadequate Model to Study Secretion?

The distinct distribution of F-actin between isolated and native chromaffin cells is relevant given the importance of this structure as a decisive organizer of the functional configuration of the exocytotic machinery. Differences in cytoskeletal organization alter the spatial distribution of proteins (e.g.,  $\alpha$ -fodrin), and of organelles and vesicles, which could be relevant when considering if isolated chromaffin cells are an appropriate model to study secretion. Although cultured chromaffin cells display such differences in an element that strongly influences the configuration of the secretory apparatus, and consequently they do not fully reflect the true physiological system, they do maintain the native level of cortical F-actin in a similar fashion as in native cells. The presence of this conserved peripheral cytoskeletal network probably means that isolated cells are indeed a reliable model to study membrane-related processes such as secretion but not all aspects of chromaffin cell biology. In these sense, for example, the study of organelle transport may differ clearly when comparing the situation of a low F-actin density cytoplasm found in cultured cells with the really structured network characteristic of native cell cytoplasm. Therefore, the development of strategies allowing working with native cells appears essential in order

to fully understand the “physiological” transport and secretory machineries in neuroendocrine models.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

YG-M, JV, CN, IL-F, MMF, performed and analyzed the experiments, YG-M, JV, SV, LG, and LMG designed the experiments, AG performed the model simulations, and LG, AG, and LMG wrote, reviewed and edited the manuscript. All authors approved the final manuscript.

## ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by grants from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2011-25095 and BFU2015-63684-P, MINECO, FEDER, UE) to LMG.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2017.00135/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Baldwin, S. P., and Saltzman, W. M. (2001). Aggregation enhances catecholamine secretion in cultured cells. *Tissue Eng.* 7, 179–190. doi: 10.1089/107632701300062796
- Braga, V. M. (2002). Cell-cell adhesion and signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 546–556. doi: 10.1016/S0955-0674(02)00373-3
- Borges, R., Sala, F., and García, A. G. (1986). Continuous monitoring of catecholamine release from perfused cat adrenals. *J. Neurosci. Methods* 16, 289–300.
- Burgoyne, R. D. (1995). Mechanisms of catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells. *J. Physiol. Pharmacol.* 46, 273–283.
- Burgoyne, R. D., and Cheek, T. R. (1987). Cytoskeleton: role of fodrin in secretion. *Nature* 326:448. doi: 10.1038/326448a0
- Burgoyne, R. D., Morgan, A., Robinson, I., Pender, N., and Cheek, T. R. (1993). Exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J. Anat.* 183(Pt 2), 309–314.
- Fujinaga, M., Chen, J. J., and Scott, J. C. (1999). Characterization of the rat adrenal medulla cultured in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 35, 33–42. doi: 10.1007/s11626-999-0041-5
- García, A. G., Padin, F., Fernández-Morales, J. C., Maroto, M., and García-Sancho, J. (2012). Cytosolic organelles shape calcium signals and exocytotic responses of chromaffin cells. *Cell Calcium* 51, 309–320. doi: 10.1016/j.ceca.2011.12.004
- García-Sancho, J., de Diego, A. M., and García, A. G. (2012). Mitochondria and chromaffin cell function. *Pflugers Arch.* 464, 33–41. doi: 10.1007/s00424-012-1074-2
- García-Sancho, J., and Verkhratsky, A. (2008). Cytoplasmic organelles determine complexity and specificity of calcium signalling in adrenal chromaffin cells. *Acta Physiol.* 192, 263–271. doi: 10.1111/j.1748-1716.2007.01812.x
- Gil, A., and Gonzalez-Velez, V. (2010). Exocytotic dynamics and calcium cooperativity effects in the calyx of Held synapse: a modelling study. *J. Comput. Neurosci.* 28, 65–76. doi: 10.1007/s10827-009-0187-x
- Gil, A., Segura, J., Pertusa, J. A., and Soria, B. (2000). Monte carlo simulation of 3-D buffered Ca(2+) diffusion in neuroendocrine cells. *Biophys. J.* 78, 13–33. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76569-6
- Giner, D., Neco, P., Francés, M. M., López, I., Viniegra, S., and Gutiérrez, L. M. (2005). Real-time dynamics of the F-actin cytoskeleton during secretion from chromaffin cells. *J. Cell Sci.* 118, 2871–2880. doi: 10.1242/jcs.02419
- Gutiérrez, L. M. (2012). New insights into the role of the cortical cytoskeleton in exocytosis from neuroendocrine cells. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 295, 109–137. doi: 10.1016/B978-0-12-394306-4.00009-5
- Gutiérrez, L. M., Hidalgo, M. J., Palmero, M., Ballesta, J. J., Reig, J. A., García, A. G., et al. (1989). Phosphorylation of myosin light chain from adrenomedullary chromaffin cells in culture. *Biochem. J.* 264, 589–596. doi: 10.1042/bj2640589
- Gutiérrez, L. M., Quintanar, J. L., Viniegra, S., Salinas, E., Moya, F., and Reig, J. A. (1995). Anti-syntaxin antibodies inhibit calcium-dependent catecholamine secretion from permeabilized chromaffin cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206, 1–7. doi: 10.1006/bbrc.1995.1001
- Haneji, N., Nakamura, T., Takio, K., Yanagi, K., Higashiyama, H., Saito, I., et al. (1997). Identification of alpha-fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjogren's syndrome. *Science* 276, 604–607. doi: 10.1126/science.276.5312.604
- Jena, B. P., Cho, S. J., Jeremic, A., Stromer, M. H., and Abu-Hamad, R. (2003). Structure and composition of the fusion pore. *Biophys. J.* 84, 1337–1343. doi: 10.1016/S0006-3495(03)74949-2
- Johns, L. M., Levitan, E. S., Shelden, E. A., Holz, R. W., and Axelrod, D. (2001). Restriction of secretory granule motion near the plasma membrane of chromaffin cells. *J. Cell Biol.* 153, 177–190. doi: 10.1083/jcb.153.1.177
- Kaibuchi, K. (1999). Regulation of cytoskeleton and cell adhesion by Rho targets. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 22, 23–38. doi: 10.1007/978-3-642-58591-3\_2
- Klingauf, J., and Neher, E. (1997). Modeling buffered Ca<sup>2+</sup> diffusion near the membrane: implications for secretion in neuroendocrine cells. *Biophys. J.* 72, 674–690. doi: 10.1016/S0006-3495(97)78704-6
- Langley, O. K., Perrin, D., and Aunis, D. (1986). Alpha-fodrin in the adrenal gland: localization by immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 34, 517–525. doi: 10.1177/34.4.3512700
- Levine, J., and Willard, M. (1981). Fodrin: axonally transported polypeptides associated with the internal periphery of many cells. *J. Cell Biol.* 90, 631–642. doi: 10.1083/jcb.90.3.631
- Livett, B. G. (1984). Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol. Rev.* 64, 1103–1161.

- Lopez, I., Giner, D., Ruiz-Nuno, A., Fuentealba, J., Viniegra, S., Garcia, A. G., et al. (2007). Tight coupling of the t-SNARE and calcium channel microdomains in adrenomedullary slices and not in cultured chromaffin cells. *Cell Calcium* 41, 547–558. doi: 10.1016/j.ceca.2006.10.004
- Lukyanetz, E. A., and Neher, E. (1999). Different types of calcium channels and secretion from bovine chromaffin cells. *Eur. J. Neurosci.* 11, 2865–2873. doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00707.x
- Meunier, F. A., and Gutierrez, L. M. (2016). Captivating new roles of F-actin cortex in exocytosis and bulk endocytosis in neurosecretory cells. *Trends Neurosci.* 39, 605–613. doi: 10.1016/j.tins.2016.07.003
- Moser, T. (1998). Low-conductance intercellular coupling between mouse chromaffin cells in situ. *J. Physiol. Lond.* 506, 195–205. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.195bx.x
- Nakano, M., Nogami, S., Sato, S., Terano, A., and Shirataki, H. (2001). Interaction of syntaxin with alpha-fodrin, a major component of the submembranous cytoskeleton. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288, 468–475. doi: 10.1006/bbrc.2001.5795
- Oheim, M., and Stuhmer, W. (2000). Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex. *Eur. Biophys. J.* 29, 67–89. doi: 10.1007/s002490050253
- Papadopoulos, A., Tomatis, V. M., Kasula, R., and Meunier, F. A. (2013). The cortical acto-Myosin network: from diffusion barrier to functional gateway in the transport of neurosecretory vesicles to the plasma membrane. *Front. Endocrinol.* 4:153. doi: 10.3389/fendo.2013.00153
- Perrin, D., and Aunis, D. (1985). Reorganization of alpha-fodrin induced by stimulation in secretory cells. *Nature* 315, 589–592. doi: 10.1038/315589a0
- Perrin, D., Langley, O. K., and Aunis, D. (1987). Anti- $\alpha$ -fodrin inhibits secretion from permeabilized chromaffin cells. *Nature* 326, 498–501. doi: 10.1038/326498a0
- Segura, J., Gil, A., and Soria, B. (2000). Modeling study of exocytosis in neuroendocrine cells: influence of the geometrical parameters. *Biophys. J.* 79, 1771–1786. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76429-0
- Torregrosa-Hetland, C. J., Villanueva, J., Giner, D., Lopez-Font, I., Nadal, A., Quesada, I., et al. (2011). The F-actin cortical network is a major factor influencing the organization of the secretory machinery in chromaffin cells. *J. Cell Sci.* 124, 727–734. doi: 10.1242/jcs.078600
- Trifaro, J. M., Gasman, S., and Gutierrez, L. M. (2008). Cytoskeletal control of vesicle transport and exocytosis in chromaffin cells. *Acta Physiol.* 192, 165–172. doi: 10.1111/j.1748-1716.2007.01808.x
- Villalobos, C., Nunez, L., Montero, M., Garcia, A. G., Alonso, M. T., Chamero, P., et al. (2002). Redistribution of  $Ca^{2+}$  among cytosol and organelle during stimulation of bovine chromaffin cells. *FASEB J.* 16, 343–353. doi: 10.1096/fj.01-0630com
- Villanueva, J., Gimenez-Molina, Y., Viniegra, S., and Gutierrez, L. M. (2016). F-actin cytoskeleton and the fate of organelles in chromaffin cells. *J. Neurochem.* 137, 860–866. doi: 10.1111/jnc.13560
- Villanueva, J., Viniegra, S., Gimenez-Molina, Y., Garcia-Martinez, V., Exposito-Romero, G., Frances, M. D., et al. (2014). The position of mitochondria and ER in relation to that of the secretory sites in chromaffin cells. *J. Cell Sci.* 127, 5105–5114. doi: 10.1242/jcs.160242

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Gimenez-Molina, Villanueva, Nanclares, Lopez-Font, Viniegra, Francés, Gandía, Gil and Gutiérrez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.





ANEXO IV

---



1 **Multiple mechanisms driving F-actin-dependent transport of**  
2 **organelles in bovine chromaffin cells during secretion**

3  
4  
5 Yolanda Gimenez-Molina<sup>1</sup>, José Villanueva<sup>1</sup>, Maria del Mar Frances<sup>1</sup>, Salvador  
6 Viniegra, and Luis M. Gutiérrez<sup>1</sup>

7  
8 1. Instituto de Neurociencias, Centro Mixto CSIC-Universidad Miguel Hernández,  
9 Cra de Valencia S/N, Sant Joan d'Alacant, 03550 Alicante, Spain.

10  
11 \*Corresponding author: Luis Miguel Gutiérrez, Instituto de Neurociencias, Centro  
12 Mixto Universidad Miguel Hernández-CSIC, Crta de Valencia S/N, Sant Joan  
13 d'Alacant, 03550 Alicante, Spain. Email: [luisguti@umh.es](mailto:luisguti@umh.es)

14  
15  
16 **Running title:** F-actin dynamics during secretion

17  
18 **Key words:** Chromaffin cells, F-actin dynamics, organelle transport, vesicles,  
19 mitochondria, secretion.  
20

21 **SUMMARY STATEMENT**

22 F-actin dynamics drive the transport of chromaffin vesicles and mitochondria during  
23 secretion using a variety of mechanisms that are first identified in its complexity and  
24 extension in this work.

25

26 **ABSTRACT**

27 Neuroendocrine chromaffin cells represent an excellent model to study the  
28 molecular mechanisms associated with the exo-endocytotic cycle of neurotransmitter  
29 release. In this study, EGFP-Lifeact and confocal microscopy has been used to  
30 analyze the re-organization of the F-actin cytoskeleton associated to organelle  
31 transport during secretion with unprecedented detail. The temperature-sensitive and  
32 myosin II-dependent changes observed affect specific regions of the sub-membrane  
33 space, generating expansions that drive the transport of dense core vesicles towards  
34 the plasmalemma. Interestingly, not only vesicles but also mitochondria are  
35 transported towards the plasmalemma during these expansions. Simultaneously, we  
36 found F-actin cytoskeletal retraction withdraws vesicles from the sub-plasmalemmal  
37 space, forming novel empty internal spaces into which organelles can be transported.  
38 In addition to these well-coordinated, F-actin-myosin II dependent processes that  
39 drive the transport of the majority of vesicles, fast transport of chromaffin vesicles  
40 was observed, albeit less frequently, which used F-actin comet tails nucleated from  
41 the granular membrane. Thus, upon cell stimulation F-actin structures use diverse  
42 mechanisms to transport organelles to and from the membrane during the exo-  
43 endocytotic cycle.

44

## 45 INTRODUCTION

46 The cytoskeleton plays a key function in exocytosis and the molecular events that  
47 control it. In neuroendocrine cells, F-actin was initially considered to fulfil a role as a  
48 cortical barrier that prevents the access of secretory vesicles (SVs) to active sites  
49 (Aunis and Bader, 1988; Cheek and Burgoyne, 1986; Trifaro et al., 1985). This vision  
50 has evolved as the cytoskeleton has become considered as a more dynamic element  
51 and it has been attributed a role in transport based on the interaction of actin fibers  
52 with SVs (Johns et al., 2001; Lang et al., 2000; Oheim and Stuhmer, 2000; Steyer  
53 and Almers, 1999). To act as both a retentive barrier and a transport system, cortical  
54 F-actin must undergo a profound re-organization during the secretory cycle. This  
55 involves the shift from a dense cortical structure parallel to the plasma membrane in  
56 the resting state to a more open structure with spaces that allow vesicles to cross it  
57 and reach the membrane when the cell is stimulated (Giner et al., 2005). These  
58 transitory changes in the disposition of F-actin are governed by the motor activity of  
59 myosin II molecules, which is mediated by the phosphorylation of the regulatory light  
60 chain in a calcium-dependent manner (Cote et al., 1986; Gutierrez et al., 1989). In  
61 addition, other molecular motors like myosin V are essential to transport granules  
62 from the cell interior to the periphery in chromaffin cells in order to replenish the  
63 vesicle pools exhausted by secretion (Rose et al., 2003; Rudolf et al., 2003).

64 In addition to the possible transport of chromaffin vesicles along actin tracks or  
65 fibers, F-actin could also transport vesicles that appear to be trapped inside cages  
66 formed in the peripheral cytoskeleton (Giner et al., 2007), thereby following the  
67 dynamics of the overall F-actin structure. Similarly, other studies support the idea that  
68 entire regions of the cytosol could transport vesicles as if on a conveyor belt,  
69 therefore vectoring the overall transport of vesicles during exocytosis toward the cell  
70 periphery (Maucort et al., 2014). More recently, a new potential transport mechanism  
71 was described based on the coordinated displacement of F-actin structures  
72 embedding chromaffin granules, a process defined as a “cast” system (Papadopoulos  
73 et al., 2015). Therefore, the transport of vesicles by F-actin in neuroendocrine cells  
74 appears to occur via distinct mechanisms, probably as a function of the different  
75 regions of the cytosol in which it is acting.

76 The goal of this study was to reveal the different F-actin structures and mechanisms  
77 that cooperate in the transport of chromaffin granules during the secretory process.  
78 Our results highlight the concept that multiple mechanisms cooperate to transport not

79 only chromaffin vesicles but also other organelles, such as mitochondria, which  
80 appear to be important in shaping the dynamics of the secretory process.

81

## 82 **RESULTS**

83

### 84 **Chromaffin cell stimulation evokes local changes in the F-actin cortical** 85 **cytoskeleton without affecting its overall profile**

86 To carry out a detailed study of the subtle changes to the F-actin chromaffin  
87 cytoskeleton provoked by cell stimulation, we assessed the EGFP-LifeAct expression  
88 in cultured bovine chromaffin cells by fluorescence confocal microscopy after  
89 depolarizing the cells with KCl at room temperature (22 °C), since this is the most  
90 common experimental condition used in bibliography. Rapid inspection of the images  
91 revealed no obvious changes in the F-actin labelling of control unstimulated cells  
92 (Fig. 1A), whereas changes to the peripheral F-actin cortex were evident in  
93 stimulated cells (Fig. 1B, movie 1), not apparently associated with an increase in cell  
94 size. The absence of a change in overall size was further evidenced when the  
95 temporal evolution of the area and perimeter of the cells was analysed (Fig. 1G and  
96 H), the averaged values corresponding to 20 cells from 3 different cultures (Fig. 1. I  
97 and J).

98 A more detailed inspection of the peripheral F-actin structure revealed clear local  
99 changes in terms of expansions or retractions (Fig. 2). The most external aspect of  
100 the peripheral F-actin profile extended in particular zones, extending about 0.2  $\mu\text{m}$   
101 from its initial position when stimulated at room temperature (22 °C: Fig. 2B and F, as  
102 indicated by the white line). No such change was seen in control unstimulated cells.  
103 By contrast, in other areas of the stimulated cells there was a retraction of the cortical  
104 F-actin band of a similar magnitude relative to the initial reference position indicated  
105 by the white line (Fig. 2D and G). Both these changes were transient and they  
106 reached a maximum around 20 s after initiating the stimulus, with partially recovery  
107 towards the resting level within tenths of a second. These effects were enhanced  
108 when the temperature was increased to 30 °C, in which case displacements of  
109 around 0.6  $\mu\text{m}$  were evident (representing a speed of 0.03  $\mu\text{m/s}$ ). This represented a  
110 3-fold enhancement in F-actin displacement when compared to the expansion and  
111 retraction at room temperature (see movie 2). As mentioned earlier for 22°C  
112 experiments, changing the temperature to 30°C did not affect significantly the



113 magnitude of the overall cellular profile and area (data not shown).

114

### 115 **Myosin II appears to control the expansion and retraction of F-actin**

116 In order to test if these local changes are associated with the activity of the F-actin  
117 cytoskeleton, we evaluated the effect of chemicals that specifically interact with F-  
118 actin or its molecular motor, myosin II. We first incubated cells expressing EGFP-  
119 LifeAct for 15 min with the F-actin stabilizer jasplakinolide (1  $\mu$ M) at room  
120 temperature (Bubb et al., 1994; Zhang et al., 2017). When the F-actin dynamics were  
121 assessed by confocal microscopy, both types of local changes that were induced by  
122 stimulation were almost totally abolished in the presence of this compound, as shown  
123 by the variations in distance relative to the initial profile (see white line in Fig. 3E, F).  
124 Hence, it would appear that F-actin activity drives these changes. Moreover, in cells  
125 exposed to blebbistatin (5  $\mu$ M) for 30 min, a specific inhibitor of myosin II (Limouze et  
126 al., 2004; Villanueva et al., 2012) the F-actin displacements were again impaired  
127 (Fig. 3G, H). Conversely, in the presence of the microtubule stabilizer paclitaxel (0.1  
128  $\mu$ M, 30 min: (Horwitz et al., 1982; Neco et al., 2003), no changes were observed in  
129 the extent of expansion or retraction in response to the depolarization of these cells  
130 (Fig. 3I, J). These results indicate that the local expansions and retractions in cortical  
131 F-actin were provoked by the dual activity of F-actin and myosin II, whereas other  
132 major cytoskeletal elements like microtubules were not involved.

133 In order to further confirm the key role of myosin II controlling F-actin dynamics  
134 during the formation of expansions and retractions we over-expressed in our cells a  
135 fluorescence tagged form of the wild-type regulatory subunit of myosin II (pRLC-wt-  
136 DsRed), and a mutant unphosphorylatable form (pRLC-T18A-S19A-DsRed) (Neco et  
137 al., 2004). The expression of this mutated form has a dramatic influence in F-actin  
138 dynamics (see movie 4) and in our experiments completely abolished the local  
139 expansions and retractions while the expression of the fluorescence tagged wild type  
140 was fully active supporting these events (Additional Figure 1 and movie 3). In  
141 consequence, it is clear that the dynamics of the binome F-actin-myosin II are  
142 essential for the molecular mechanism that govern local expansions and retractions.

143

### 144 **The generation of new empty spaces in conjunction with local changes in** 145 **cortical F-actin**

146 It would be expected that the displacement of F-actin structures has an impact on the

147 presence of F-actin structures in the adjacent regions. Thus, we assessed the  
148 possible re-organization of F-actin in cells expressing EGFP-LifeAct. The changes  
149 that affect F-actin disposition followed similar dynamics to those reported for local  
150 changes in earlier studies (Fig. 4A and movie 5). These changes were related to the  
151 increase in the area of the pre-existing cavities (Fig. 4B) and the decrease in their  
152 number (Fig. 4C). Similarly, we detected the infrequent formation of new cavities that  
153 appeared to be generated from sub-plasmalemmal F-actin retraction, and the  
154 appearance of rings (Fig.S1). Moreover, it was also evident that vesicles could be  
155 trapped inside these structures, moving accordingly and that they were linked to their  
156 F-actin borders (movie 6).

157

### 158 **Local F-actin dynamics promotes a sub-plasmalemmal displacement of** 159 **vesicles**

160 To assess whether these F-actin displacements drive vesicles towards the plasma  
161 membrane, we co-expressed EGFP-LifeAct and RFP-NPY in our cells, thereby  
162 labelling F-actin and chromaffin granules. When expansion was obtained by KCl  
163 stimulation of a cell at 30 °C, there was a clear displacement of the cortical F-actin  
164 zone around 0.6  $\mu\text{m}$  from its initial position (as indicated by the white line describing  
165 the F-actin profile in Fig. 5A, movie 7). Interestingly, vesicles displayed a similar  
166 maximal displacement of 0.5  $\mu\text{m}$  20 s after applying the stimulus (Fig. 5C).  
167 Furthermore, when measured relative to the position of the F-actin barrier at each  
168 moment, there was no detectable displacement between the two markers (Fig. 5C,  
169 vesicles and F-actin profile). Similar conclusions were reached when we studied the  
170 displacement of the vesicles in relation to F-actin retraction (Fig. 5B, D). Again,  
171 measuring the variation in distance between the F-actin profile and the vesicle's  
172 centroid indicated that the transient movement of chromaffin granules during  
173 stimulation occurred in association with the cortical cytoskeleton. Therefore, it  
174 appears that the local displacement of cortical actin filaments in chromaffin cells,  
175 reflected by the regions of expansion and retraction, guide the movement of vesicles  
176 upon stimulation.

177

### 178 **Mitochondria also move in association with local F-actin displacements**

179 It is conceivable that displacement of the F-actin cytoskeleton that carries  
180 chromaffin granules could also drive the movement of other organelles. To explore

181 this possibility, we simultaneously labeled F-actin (as indicated above) and  
182 mitochondria using Mitotracker Red. KCl stimulation of cells at 30 °C provoked  
183 displacement of the F-actin cortical cytoskeleton within 10-20 s (Fig. 6A, at 10 s),  
184 which was estimated to move 0.4-0.45  $\mu\text{m}$  relative to its initial position. Interestingly,  
185 the mitochondria observed in these images (in red) were also displaced to a similar  
186 extent, with an average mitochondrial displacement in cells from different cultures of  
187 c.a. 0.5  $\mu\text{m}$  (Fig. 6B). Again, the displaced mitochondria were associated to the  
188 cytoskeleton as they moved relative to static points, although the distance between  
189 these two elements remained constant. Interestingly, we did not observe  
190 mitochondrial movements associated with retractions, indicating the relative absence  
191 of mitochondria in the regions where cortical retraction occurred. Consequently, the  
192 changes in F-actin associated with local expansions drove the transport of  
193 organelles, implying the possible displacement of all cytosolic components in  
194 response to stimulation.

195

### 196 **Propelling tail comets, an exception to the conventional form of vesicle** 197 **transport**

198 In our experiments studying EGFP-LifeAct and RFP-NPY expression, we observed  
199 one exception to the transport of organelles described above, this involving the  
200 infrequent rapid movement of granules with F-actin tails (N=11 comets in 150  
201 stimulated cells). The examples provided in Figure 7 are representative from 11  
202 events found in 150 stimulated cells. .These “comet” like structures originated where  
203 F-actin aggregates contacted vesicles laterally (see circle in Fig. 7A). In this case, the  
204 F-actin involved seems to be recruited as soon as the stimulus initiated (“de novo” F-  
205 actin: Fig. 7B), while the granule seems to be the site of initial recruitment. The  
206 granules affected were transported at a speed of 0.1  $\mu\text{m}/\text{s}$ , 3 times faster than those  
207 associated with local changes, and they moved towards the plasma membrane (Fig.  
208 7C). During this movement the vesicle and its F-actin tail displayed lateral contacts  
209 that were evident in X/Y images (Fig. 7D and movie 9). These contacts generated an  
210 oscillatory lateral movement (Fig. 7E) that finally propelled the vesicle in a helicoid  
211 manner (Fig. 7F).

212

## 213 **DISCUSSION**

214 **F-actin dynamics during stimulation involve subtle local changes rather than**

## 215 **general cortical transformations**

216 The main idea behind this study was to examine in detail the changes to F-actin  
217 during cell stimulation, considering that they are likely to be local and subtle rather  
218 than general and of considerable magnitude. In effect, local expansion and retraction  
219 produces displacements of 0.5-0.6  $\mu\text{m}$  that have a relatively low or no impact on the  
220 overall size of the cells, which are 20  $\mu\text{m}$  in diameter. This is consistent with earlier  
221 evidence of the local nature of F-actin fragmentation (Perrin and Aunis, 1985; Vitale  
222 et al., 1995) or remodeling (Giner et al., 2005; Papadopulos et al., 2015) in cultured  
223 chromaffin cells. Indeed, the detailed study of the changes in the cell perimeter and  
224 in the cortical area detected no significant variation in cell size. This may reflect  
225 compensatory changes in response to F-actin cortical expansion and retraction in the  
226 same cell. In contrast to our neuroendocrine model, significant changes in the size of  
227 cells following stimulation have been reported in other secretory systems, such as in  
228 mast cells and beta-cells (Levi-Schaffer et al., 2000; Semino et al., 1990).

229 We also show here that the magnitude of these changes is temperature-dependent,  
230 reaching a remarkable displacement of 0.6  $\mu\text{m}$  at 30  $^{\circ}\text{C}$ , double the size of a typical  
231 granule. Moreover, these local expansions and retractions are dependent on the  
232 activity of contractile systems, such as that involving F-actin and myosin II. As such,  
233 they would be expected to be sensitive to changes in temperature within the  
234 physiological range for exocytotic responses (Dinkelacker et al., 2000; Gil et al.,  
235 2001; Walker et al., 1996).

236

## 237 **Organelles are transported in a coordinated fashion during F-actin re-** 238 **organization**

239 The movements observed are restricted to specific areas of the F-actin/myosin II  
240 cortical structure and they could fulfil different roles, such as the re-organization of  
241 the subcortical region to facilitate secretion in the case of expansions, or the  
242 endocytotic cycle in terms of retractions. Indeed, we demonstrate these changes are  
243 associated with the transport of vesicles and other organelles like mitochondria in a  
244 coordinated manner. In this sense, our data agrees well with the reported role of  
245 myosin II in coordinating the recruitment of vesicles during exocytosis, acting as a  
246 “casting net” that replenishes the “docking” zones that are exhausted after long  
247 lasting or repetitive cell stimulation (Papadopulos et al., 2015). Nevertheless, the  
248 data presented indicate that such a transport mechanism could be used to move

249 entire zones of cytoplasm carrying different organelles in both directions, towards the  
250 plasma membrane in the case of expansion and recovering organelles from the sub-  
251 plasmalemmal area by retraction.

252 During this coordinate transport chromaffin vesicles and mitochondria could interact  
253 actively with F-actin fibers through a direct link with motors like myosin V (Rose et al.,  
254 2003; Rudolf et al., 2003) or myosin VI, as recently described (Tomatis et al., 2013).  
255 This idea is clearly supported by the movement of vesicles in association to F-actin  
256 fibers in TIRFM experiments (Lang et al., 2000).

257 Alternatively, organelles can move in an F-actin-dependent manner when they are  
258 found in the interior of cytoskeletal “cages”, structures that are dynamic in nature.  
259 The presence of these F-actin cages and their movement in association with the  
260 activity of myosin II has been demonstrated in both the cortical area (Giner et al.,  
261 2007), and in the cell interior (Giner et al., 2005; Neco et al., 2003). The fact that we  
262 observed the movement of entire zones of the cytosol encompassing vesicles and  
263 mitochondria supports this notion. Furthermore, the careful analysis of the size of F-  
264 actin limited cavities also indicates significant changes during cell stimulation.

265

### 266 **Other minor transport systems cooperate with F-actin displacement, such as F- 267 actin comets**

268 The majority of organelles that move actively during secretion is clearly associated  
269 with the movement of pre-existing F-actin fibers and cages, apparently coordinated  
270 within the global displacement of these structures. Nevertheless, we found that  
271 vesicles can also be directly propelled by F-actin tail comets that emerge from the F-  
272 actin aggregates at the membrane of chromaffin granules during stimulation,  
273 although this form of transport occurs less frequently. The formation of these  
274 propulsive F-actin comet tails was first described in bacteria in relation to the  
275 movement of pathogenic *Listeria* through the cytoplasm of mammalian host cells  
276 (Loisel et al., 1999). Subsequently, these comets were shown to propel endosomes  
277 and lysosomes in *Xenopus* eggs (Taunton et al., 2000). As with chromaffin granules,  
278 the F-actin was nucleated at the external membrane of the endosomes and  
279 lysosomes in *Xenopus*, a process shown to be preceded by recruitment of the N-  
280 WASP protein. Indeed, as this protein mediates the formation of “de novo” F-actin at  
281 the interface between the plasmalemma and chromaffin granule membrane (Gasman  
282 et al., 2004), it is reasonable to think that it might also mediate the initiation of

283 propulsion tails in the interior of the chromaffin cell cytoplasm. At present, there is  
284 much evidence that F-actin comet tails propel endocytic vesicles in a range of  
285 systems (Collins et al., 2011), although this is the first report to our knowledge of the  
286 formation of propulsive F-actin tails during exocytosis and in the direction of the  
287 plasma membrane.

288

### 289 **An integrated model of F-actin mediated organelle transport during secretion in** 290 **chromaffin cells**

291 The data presented here emphasizes that different mechanisms are utilized by F-  
292 actin to drive organelle transport during the secretory process in a neuroendocrine  
293 model such as chromaffin cells in culture. Therefore, we have devised a simplified  
294 scheme that models these different events (Fig. 8), depicting the initial state of the  
295 cortical cytoskeleton and its associated granules and mitochondria at rest, as well as  
296 the changes driven by F-actin in response to stimulation. In the resting state, F-actin  
297 is organized as a dense network of cross-linked fibers beneath the plasma  
298 membrane (green structures in Fig. 8), impeding access of the majority of vesicles  
299 (red) and mitochondria (blue) to release sites. This dense barrier is wider than the  
300 size of 1-2 vesicles (c.a. 0.3-0.5  $\mu\text{m}$ ) and it is continuous with a complex system of F-  
301 actin cages to which organelles are either attached or embedded, at a distance of  
302 around 1-1.5  $\mu\text{m}$  from the cell cortex.

303 During cell stimulation, the F-actin cortex experiences local changes in the form of  
304 expansions and retractions, displacing the F-actin cytoskeleton and its associated  
305 organelles by a distance of 0.5-0.6  $\mu\text{m}$  (Fig. 8, panel B). In addition to this movement,  
306 the size of the empty spaces left by the cytoskeletal cages is also altered, increasing  
307 the space in which organelles can move (the spaces limited by green structures in  
308 panel B of Fig. 8). Therefore, the movement of the majority of vesicles and organelles  
309 is a combination of that driven by their direct association with F-actin structures and  
310 the access they have to space left by the changes in the same F-actin network.

311 In addition to these dominant mechanisms, F-actin also promotes the direct  
312 movement of a small proportion of vesicles during stimulation via tail comets, such as  
313 some vesicles associated with F-actin aggregates (see short arrow in Fig. 8A).  
314 During stimulation, these vesicles move in a helical manner towards the cell  
315 membrane, propelled by the polymerization of F-actin in the form of a comet that  
316 emerges from the F-actin associated with the granule membrane (long arrow in Fig.



317 8B).

318 Together, these mechanisms used by F-actin ensure the movement not only of  
319 vesicles but also, that of relevant organelles, such as mitochondria. In this way the  
320 replenishment of the granules exocytosed can be accomplished and the  
321 requirements of the secretory process for calcium and other elements fulfilled. These  
322 transient changes are clearly different from the continuous transport of organelles  
323 that serve to locate mitochondria and granules in different subpopulations (Gimenez-  
324 Molina et al., 2017). In addition to trafficking, F-actin-myosin II plays a fundamental  
325 role in the fusion mechanism itself (Neco et al., 2004) and this implies the  
326 translocation of vesicles in close apposition with the membrane, this type of  
327 displacement could be studied in a near future with the spatial resolution of the new  
328 superresolution microscopy techniques as demonstrated in other neurosecretory  
329 systems (Izeddin et al., 2011; O'Loughlin et al., 2018; Urban et al., 2011)

330

## 331 **MATERIALS AND METHODS**

### 332 **Chromaffin cell transfection and culture**

333 Chromaffin cells were isolated from bovine adrenal glands by collagenase digestion  
334 and they were separated from the debris by centrifugation on Percoll gradients, as  
335 described previously (Gil et al., 2002; Gil et al., 1998; Gutierrez et al., 1998; Gutierrez  
336 et al., 1995). The cells were maintained as monolayer cultures in Dulbecco's modified  
337 Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 10 mM  
338 cytosine arabinoside, 10 mM 5-fluoro-29-deoxyuridine, 50 U/ml penicillin and 50  
339 mg/ml streptomycin. The cells were harvested and plated at a density of 150,000  
340 cells/cm<sup>2</sup> on 22 mm diameter poly-lysine coated coverslips, and they were studied  
341 between the third and sixth day after plating.

342 To perform the experiments, the cell culture medium was replaced with  
343 Krebs/HEPES (K/H) basal solution containing (in mM): NaCl, 134; KCl, 4.7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,  
344 1.2; MgCl<sub>2</sub>, 1.5; CaCl<sub>2</sub>, 2.5; glucose, 11; ascorbic acid, 0.56; and Na-HEPES, 15 [pH  
345 7.4]. The cells were stimulated by depolarization using a K/H solution with high K<sup>+</sup>  
346 (59 mM) obtained by iso-osmotically replacing NaCl by KCl in K/H basal solution.  
347 Stimulation protocol was applied between 10 to 50 s in the 60 s total time shown in  
348 the registers.

## 349 **Dynamic confocal imaging of the F-actin cytoskeleton, vesicles and** 350 **mitochondria**

351 F-actin structures were labeled with the EGFP-tagged, 17 amino acid LifeAct  
352 peptide that binds to F-actin without altering its dynamics *in vivo* or *in vitro*, as  
353 described previously (Riedl et al., 2008). Dense-core vesicles were labeled by NPY–  
354 mRFP plasmid transfection, as described elsewhere (Aoki et al., 2010; Taraska et al.,  
355 2003). Myosin II activity and location were studied by expression of a tagged  
356 fluorescent form of the wild type regulatory subunit of myosin II (pRLC-wt-DsRed),  
357 and a mutant non-active unphosphorylatable form (pRLC-T18A-S19A-DsRed)(Neco  
358 et al., 2004) in double expression experiments with EGFP-LifeAct. Single and dual  
359 transfection of isolated chromaffin cells using the Amaxa basic nucleofactor kit  
360 (Lonza, red VVPG-1001) served to visualize the F-actin cytoskeleton and chromaffin  
361 granules in living primary mammalian neurons (Program 0-005, Amaxa GmbH.  
362 Koehl, Germany).

363 Two days after transfection, the cells were incubated for 15 min with Mitotracker Red  
364 FM (0.1  $\mu$ M: Invitrogen-Molecular Probes ref M22425), to visualize the mitochondria in  
365 live cells as described previously (Villanueva et al., 2014). Fluorescence confocal  
366 images were obtained with an Olympus Fluoview FV300 confocal laser system mounted  
367 on an IX-71 inverted microscope incorporating a 100X PLAN-Apochromatic oil-  
368 immersion objective with 1.45 NA. Excitation was achieved with argon and helium-neon  
369 visible light lasers, and dual fluorescence was registered by sequential acquisition using  
370 a 488 nm argon ion 40 mW to excite EGFP and a 543 nm He/Ne 10 mW for RFP.

371 Images were recorded from live cells at two temperatures (22 °C and 30 °C) to evaluate  
372 the effect of temperature on F-actin dynamics. The pharmacological agents used were  
373 jasplakinolide (1 $\mu$ M for 15 min: Calbiochem, ref 420107), blebbistatin (5 $\mu$ M for 30 min:  
374 Calbiochem ref 203391) and paclitaxel (taxol, 1  $\mu$ M for 30 min: Sigma ref T-7402),  
375 minimal concentrations and incubations to reach maximal specific effect.

376

### 377 **Data analysis from confocal microscopy images**

378 All microscopy images were analyzed with Image J software using integrated  
379 measurements (particle analyzer, perimeter, area, mean gray value, and threshold),  
380 and some plug-ins (multitracker, colocalization analysis and 3D reconstruction) to:  
381 automatically detect and quantify particles and cavities in thresholded images;



382 calculate the area and perimeter; and measure the variations in distance and  
383 intensity. Finally, we also used the Confocal Uniovi Image J version for 2D  
384 projections and 3D reconstructions of the F-actin structural responses linked to local  
385 F-actin dynamics. Displacements of F-actin fibers, vesicles and cortical  
386 mitochondria populations linked to cortical F-actin dynamics under stimulation are  
387 shown as distance variations with our scale of 26 pixels/ $\mu\text{m}$ . Firstly, we measured  
388 distances between an internal static point near the nucleus called “reference” to the:  
389 F-actin external profile line, individual vesicle or mitochondria centroid included at  
390 cortical active zones for expansion and retraction events. These distances were  
391 measured at 5, 10, 20, 30, 40, 50, 55 and 60 s. Then distance variations were  
392 obtained by subtracting each one to the own distance at 10s (stimulus start time).

393 Graphs were obtained with Graphpad Prism (GraphPad software, San Diego, CA,  
394 USA) and Adobe Photoshop 7.0. A two way ANOVA test was used to establish the  
395 significance of the experimental data (considered significant at  $p < 0.05$ ). Significance  
396 level symbol meaning: n.s:  $P > 0.05$ , \*:  $P \leq 0.05$ , \*\*:  $P \leq 0.01$ , \*\*\*:  $P \leq 0.001$ , \*\*\*\*:  $P \leq$   
397 0.0001. The data were expressed as the mean  $\pm$  SEM values from experiments  
398 performed on individual cells (n cells), and on single expansion and retraction events  
399 (n events), from at least three different cultures.

400

#### 401 **Ethics statement**

402 Adrenal glands were obtained from an industrial slaughterhouse (Matadero de  
403 Orihuela SA) that is subject to strict regulations laid down by the Spanish Ministries  
404 of Agriculture, Industry and Health, and in accordance with EC guidelines. All the  
405 protocols used in this study were approved by the “Organo Evaluador de Proyecto” at  
406 the University Miguel Hernández, the office in charge of overseeing the ethical issues  
407 associated with animal care and experimentation at our institute.

408

#### 409 **COMPETING INTERESTS**

410 The authors declare no competing interests.

411

#### 412 **FUNDING**

413 This study was supported by grants from the Spanish Ministerio de Economía y  
414 Competitividad (BFU2015-63684-P, MINECO, FEDER, UE) to LMG.

415

## 416 REFERENCES

417

418 Aoki, R., Kitaguchi, T., Oya, M., Yanagihara, Y., Sato, M., Miyawaki, A. and  
419 Tsuboi, T. (2010). Duration of fusion pore opening and the amount of hormone  
420 released are regulated by myosin II during kiss-and-run exocytosis. *Biochem J* **429**,  
421 497-504.

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

424 Bubb, M. R., Senderowicz, A. M., Sausville, E. A., Duncan, K. L. and Korn, E.  
425 D. (1994). Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization  
426 and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *J. Biol. Chem* **269**,  
427 14869-14871.

428 Collins, A., Warrington, A., Taylor, K. A. and Svitkina, T. (2011). Structural  
429 organization of the actin cytoskeleton at sites of clathrin-mediated endocytosis.  
430 *Curr Biol* **21**, 1167-75.

431 Cote, A., Doucet, J. P. and Trifaro, J. M. (1986). Phosphorylation and  
432 dephosphorylation of chromaffin cell proteins in response to stimulation.  
433 *Neuroscience* **19**, 629-645.

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

436 Dinkelacker, V., Voets, T., Neher, E. and Moser, T. (2000). The readily  
437 releasable pool of vesicles in chromaffin cells is replenished in a temperature-  
438 dependent manner and transiently overfills at 37 degrees C. *J. Neurosci* **20**, 8377-  
439 8383.

440 Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Malacombe, M., Way, M. and Bader, M. F.  
441 (2004). Regulated exocytosis in neuroendocrine cells: a role for subplasmalemmal  
442 Cdc42/N-WASP-induced actin filaments. *Mol. Biol. Cell* **15**, 520-531.

443 Gil, A., Gutierrez, L. M., Carrasco-Serrano, C., Alonso, M. T., Viniegra, S. and  
444 Criado, M. (2002). Modifications in the C terminus of the synaptosome-associated  
445 protein of 25 kDa (SNAP-25) and in the complementary region of synaptobrevin  
446 affect the final steps of exocytosis. *J. Biol. Chem* **277**, 9904-9910.

447 Gil, A., Viniegra, S. and Gutierrez, L. M. (1998). Dual effects of botulinum  
448 neurotoxin A on the secretory stages of chromaffin cells. *Eur. J. Neurosci* **10**, 3369-  
449 3378.

450 Gil, A., Viniegra, S. and Gutierrez, L. M. (2001). Temperature and PMA affect  
451 different phases of exocytosis in bovine chromaffin cells. *Eur. J. Neurosci* **13**, 1380-  
452 1386.

453 Gimenez-Molina, Y., Villanueva, J., Nanclares, C., Lopez-Font, I., Viniegra, S.,  
454 Frances, M. D. M., Gandia, L., Gil, A. and Gutierrez, L. M. (2017). The  
455 Differential Organization of F-Actin Alters the Distribution of Organelles in Cultured  
456 When Compared to Native Chromaffin Cells. *Front Cell Neurosci* **11**, 135.

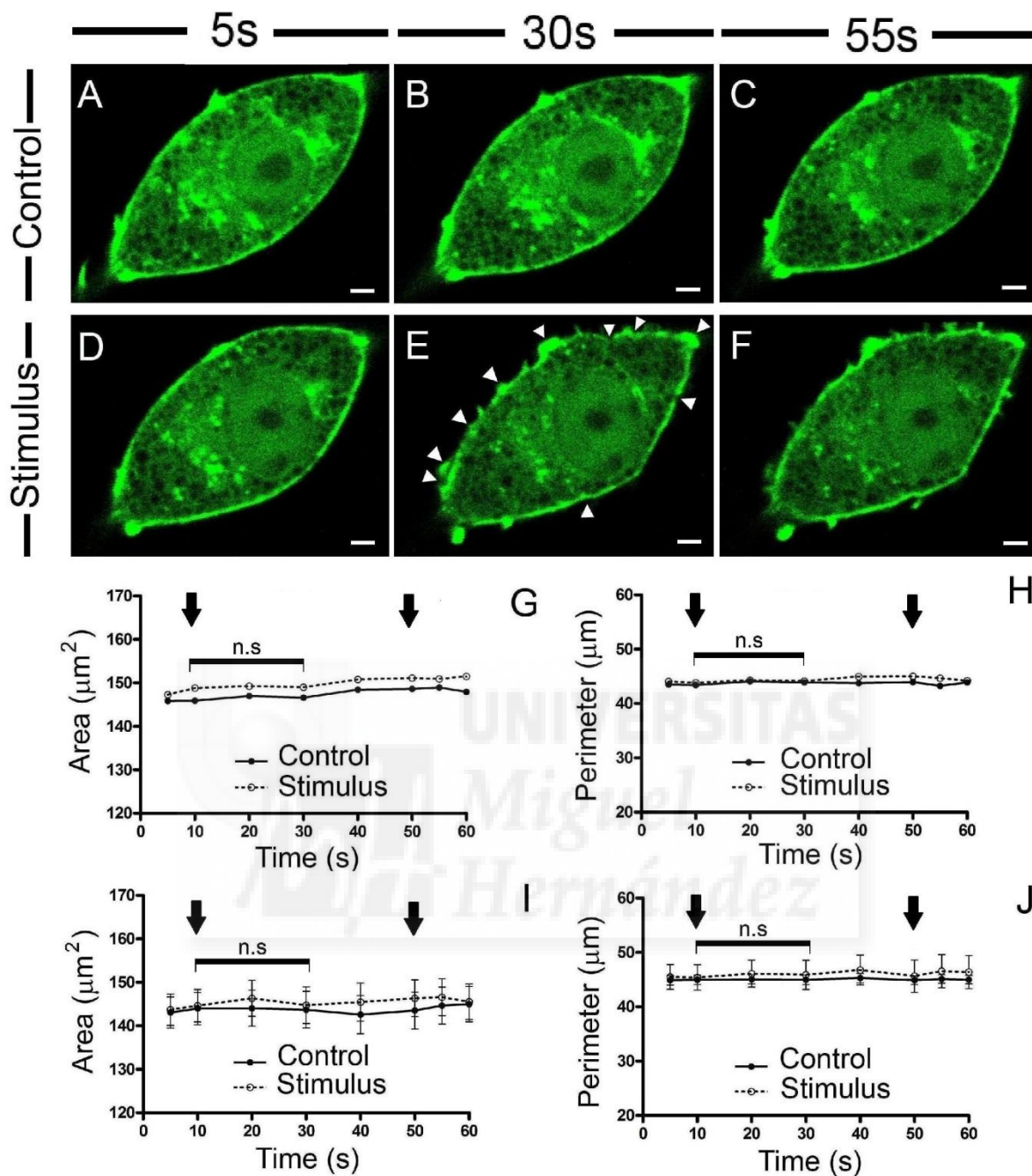
457 Giner, D., Lopez, I., Villanueva, J., Torres, V., Viniegra, S. and Gutierrez, L.  
458 M. (2007). Vesicle movements are governed by the size and dynamics of F-actin  
459 cytoskeletal structures in bovine chromaffin cells. *Neuroscience* **146**, 659-69.

460 Giner, D., Neco, P., Frances, M. M., Lopez, I., Viniegra, S. and Gutierrez, L. M.  
461 (2005). Real-time dynamics of the F-actin cytoskeleton during secretion from  
462 chromaffin cells. *J. Cell Sci* **118**, 2871-2880.

- 463 Gutierrez, L. M., Gil, A. and Viniegra, S. (1998). Preferential localization of  
464 exocytotic active zones in the terminals of neurite-emitting chromaffin cells. *Eur.*  
465 *J. Cell Biol* **76**, 274-278.
- 466 Gutierrez, L. M., Hidalgo, M. J., Palmero, M., Ballesta, J. J., Reig, J. A.,  
467 Garcia, A. G. and Viniegra, S. (1989). Phosphorylation of myosin light chain from  
468 adrenomedullary chromaffin cells in culture. *Biochem. J* **264**, 589-596.
- 469 Gutierrez, L. M., Quintanar, J. L., Viniegra, S., Salinas, E., Moya, F. and Reig,  
470 J. A. (1995). Anti-syntaxin antibodies inhibit calcium-dependent catecholamine  
471 secretion from permeabilized chromaffin cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*  
472 **206**, 1-7.
- 473 Horwitz, S. B., Parness, J., Schiff, P. B. and Manfredi, J. J. (1982). Taxol: a  
474 new probe for studying the structure and function of microtubules. *Cold Spring*  
475 *Harb Symp Quant Biol* **46 Pt 1**, 219-26.
- 476 Izeddin, I., Specht, C. G., Lelek, M., Darzacq, X., Triller, A., Zimmer, C. and  
477 Dahan, M. (2011). Super-resolution dynamic imaging of dendritic spines using a  
478 low-affinity photoconvertible actin probe. *Plos One* **6**, e15611.
- 479 Johns, L. M., Levitan, E. S., Shelden, E. A., Holz, R. W. and Axelrod, D. (2001).  
480 Restriction of secretory granule motion near the plasma membrane of chromaffin  
481 cells. *J. Cell Biol* **153**, 177-190.
- 482 Lang, T., Wacker, I., Wunderlich, I., Rohrbach, A., Giese, G., Soldati, T. and  
483 Almers, W. (2000). Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of  
484 secretory granules in PC-12 cells. *Biophys. J* **78**, 2863-2877.
- 485 Levi-Schaffer, F., Slovik, D., Armetti, L., Pickholtz, D. and Tseitou, E. (2000).  
486 Activation and inhibition of mast cells degranulation affect their morphometric  
487 parameters. *Life Sci* **66**, PL283-90.
- 488 Limouze, J., Straight, A. F., Mitchison, T. and Sellers, J. R. (2004). Specificity  
489 of blebbistatin, an inhibitor of myosin II. *J. Muscle Res. Cell Motil* **25**, 337-341.
- 490 Loisel, T. P., Boujemaa, R., Pantaloni, D. and Carlier, M. F. (1999).  
491 Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins.  
492 *Nature* **401**, 613-6.
- 493 Maucort, G., Kasula, R., Papadopoulos, A., Nieminen, T. A., Rubinsztein-  
494 Dunlop, H. and Meunier, F. A. (2014). Mapping organelle motion reveals a  
495 vesicular conveyor belt spatially replenishing secretory vesicles in stimulated  
496 chromaffin cells. *Plos One* **9**, e87242.
- 497 Neco, P., Giner, D., del Mar, F. M., Viniegra, S. and Gutierrez, L. M. (2003).  
498 Differential participation of actin- and tubulin-based vesicle transport systems  
499 during secretion in bovine chromaffin cells. *Eur. J. Neurosci* **18**, 733-742.
- 500 Neco, P., Giner, D., Viniegra, S., Borges, R., Villarroel, A. and Gutierrez, L. M.  
501 (2004). New roles of myosin II during vesicle transport and fusion in chromaffin  
502 cells. *J. Biol. Chem* **279**, 27450-27457.
- 503 O'Loughlin, T., Masters, T. A. and Buss, F. (2018). The MYO6 interactome  
504 reveals adaptor complexes coordinating early endosome and cytoskeletal dynamics.  
505 *EMBO Rep*.
- 506 Oheim, M. and Stuhmer, W. (2000). Tracking chromaffin granules on their way  
507 through the actin cortex. *Eur. Biophys. J* **29**, 67-89.
- 508 Papadopoulos, A., Gomez, G. A., Martin, S., Jackson, J., Gormal, R. S., Keating,  
509 D. J., Yap, A. S. and Meunier, F. A. (2015). Activity-driven relaxation of the  
510 cortical actomyosin II network synchronizes Munc18-1-dependent neurosecretory  
511 vesicle docking. *Nat Commun* **6**, 6297.

- 512 Perrin, D. and Aunis, D. (1985). Reorganization of alpha-fodrin induced by  
513 stimulation in secretory cells. *Nature* **315**, 589-592.
- 514 Riedl, J., Crevenna, A. H., Kessenbrock, K., Yu, J. H., Neukirchen, D., Bista,  
515 M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T. A., Werb, Z. et al. (2008). Lifeact: a  
516 versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods* **5**, 605-607.
- 517 Rose, S. D., Lejen, T., Casaletti, L., Larson, R. E., Pene, T. D. and Trifaro, J.  
518 M. (2003). Myosins II and V in chromaffin cells: myosin V is a chromaffin vesicle  
519 molecular motor involved in secretion. *J. Neurochem* **85**, 287-298.
- 520 Rudolf, R., Kogel, T., Kuznetsov, S. A., Salm, T., Schlicker, O., Hellwig, A.,  
521 Hammer, J. A., III and Gerdes, H. H. (2003). Myosin Va facilitates the distribution  
522 of secretory granules in the F-actin rich cortex of PC12 cells. *J. Cell Sci* **116**, 1339-  
523 1348.
- 524 Semino, M. C., Gagliardino, A. M., Bianchi, C., Rebolledo, O. R. and  
525 Gagliardino, J. J. (1990). Early changes in the rat pancreatic B cell size induced by  
526 glucose. *Acta Anat (Basel)* **138**, 293-6.
- 527 Steyer, J. A. and Almers, W. (1999). Tracking single secretory granules in live  
528 chromaffin cells by evanescent-field fluorescence microscopy. *Biophys. J* **76**, 2262-  
529 2271.
- 530 Taraska, J. W., Perrais, D., Ohara-Imaizumi, M., Nagamatsu, S. and Almers, W.  
531 (2003). Secretory granules are recaptured largely intact after stimulated exocytosis  
532 in cultured endocrine cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 2070-2075.
- 533 Taunton, J., Rowning, B. A., Coughlin, M. L., Wu, M., Moon, R. T., Mitchison,  
534 T. J. and Larabell, C. A. (2000). Actin-dependent propulsion of endosomes and  
535 lysosomes by recruitment of N-WASP. *J Cell Biol* **148**, 519-30.
- 536 Tomatis, V. M., Papadopulos, A., Malintan, N. T., Martin, S., Wallis, T.,  
537 Gormal, R. S., Kendrick-Jones, J., Buss, F. and Meunier, F. A. (2013). Myosin VI  
538 small insert isoform maintains exocytosis by tethering secretory granules to the  
539 cortical actin. *Journal of Cell Biology* **200**, 301-320.
- 540 Trifaro, J. M., Bader, M. F. and Doucet, J. P. (1985). Chromaffin cell  
541 cytoskeleton: its possible role in secretion. *Can. J. Biochem. Cell Biol* **63**, 661-679.
- 542 Urban, N. T., Willig, K. I., Hell, S. W. and Nagerl, U. V. (2011). STED nanoscopy  
543 of actin dynamics in synapses deep inside living brain slices. *Biophys J* **101**, 1277-  
544 84.
- 545 Villanueva, J., Torres, V., Torregrosa-Hetland, C. J., Garcia-Martinez, V.,  
546 Lopez-Font, I., Viniestra, S. and Gutierrez, L. M. (2012). F-actin-myosin II  
547 inhibitors affect chromaffin granule plasma membrane distance and fusion kinetics  
548 by retraction of the cytoskeletal cortex. *J Mol Neurosci* **48**, 328-38.
- 549 Villanueva, J., Viniestra, S., Gimenez-Molina, Y., Garcia-Martinez, V., Exposito-  
550 Romero, G., Frances, M. D., Garcia-Sancho, J. and Gutierrez, L. M. (2014). The  
551 position of mitochondria and ER in relation to that of the secretory sites in  
552 chromaffin cells. *Journal of Cell Science* **127**, 5105-5114.
- 553 Vitale, M. L., Seward, E. P. and Trifaro, J. M. (1995). Chromaffin cell cortical  
554 actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the  
555 initial rate of exocytosis. *Neuron* **14**, 353-363.
- 556 Walker, A., Glavinovic, M. I. and Trifaro, J. (1996). Temperature dependence of  
557 release of vesicular content in bovine chromaffin cells. *Pflugers Arch* **432**, 885-892.
- 558 Zhang, Y., Yoshida, A., Sakai, N., Uekusa, Y., Kumeta, M. and Yoshimura, S. H.  
559 (2017). In vivo dynamics of the cortical actin network revealed by fast-scanning  
560 atomic force microscopy. *Microscopy (Oxf)*, 1-11.
- 561





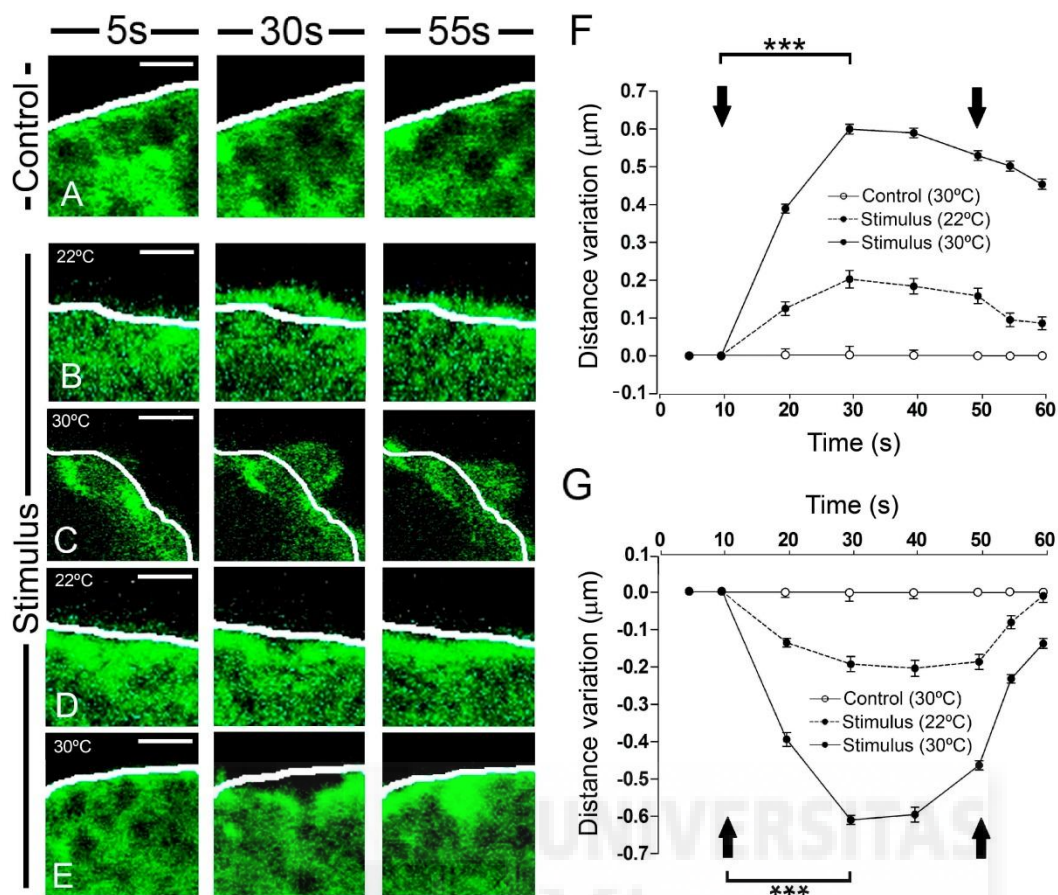
562

563 **Fig.1. Chromaffin cell stimulation promotes local changes in the cortical F-**  
 564 **actin cytoskeleton without varying the overall cell profile.** (A-F) Confocal  
 565 fluorescence images of a control (A-C) and stimulated chromaffin cell by KCl  
 566 depolarization (D-F) expressing EGFP-LifeAct to show F-actin (green) at temporal  
 567 series of 5 s (A and D), 30 s (B and E) and 55 s (C and F) for a 60 s total time  
 568 recordings at room temperature (22°C). White triangles show local changes on F-  
 569 actin cortical profile. (G-H) Changes in the area (G) and perimeter (H) for this  
 570 representative cell under control and stimulation conditions. Arrows indicate the

571 beginning and the end of stimulation. (I-J) Mean  $\pm$  SEM values of the area (I) and  
572 perimeter (J) for control (n= 20 cells) and stimulated cells (n= 20 cells). Statistical  
573 significance was assessed by Two way ANOVA: n.s: non-significant results. Scale  
574 bars represent 1  $\mu$ m.

575

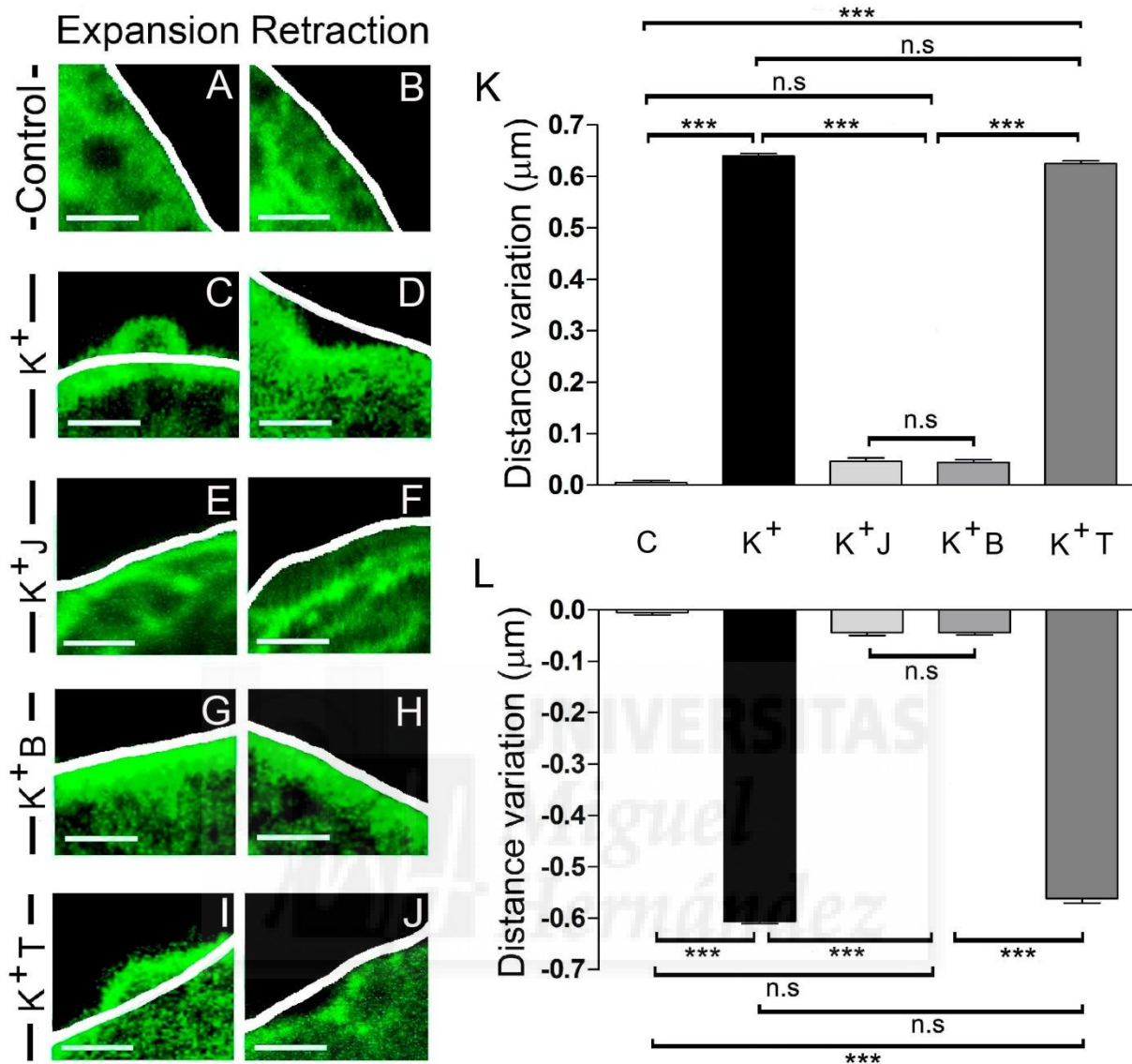




576

577 **Fig 2. Time course and temperature dependence of the local changes at the F-**  
 578 **actin cortical barrier.** (A-E) Confocal fluorescence images acquired in the equatorial  
 579 plane of cultured chromaffin cells expressing EGFP-LifeAct to show F-actin cortical  
 580 barrier (green) from a control cell (A) and stimulated cells by KCl depolarization (B-E)  
 581 for 5 s, pre-stimulus; 30 s, stimulus; and 55 s, post-stimulus. (B-E) Expansion (B-C)  
 582 and retraction (D-E) events developed in stimulated cells were analyzed individually  
 583 for 22°C (B, expansion; D, retraction) and 30°C (C, expansion; E, retraction) to study  
 584 the temperature influence. White lines indicate the initial position ( $t_0$ ) of F-actin  
 585 cortical barrier profile for each register. F-actin displacements magnitude was  
 586 measured in terms of distance variation at active zones of expansions and  
 587 retractions. (F-G) Mean  $\pm$  SEM of the normalized distance variation of the F-actin  
 588 cortical barrier for expansion (F) and retraction (G) events in control (n=15 cells,  
 589 n=30 sections) and stimulated cells for 22 °C (n=15 cells, n=48 expansions, n=50  
 590 retractions) and 30 °C (n=15 cells, n=60 expansions, n=57 retractions). Arrows  
 591 indicate the beginning and end of stimulation. Statistical significance was assessed  
 592 by Two way ANOVA: \*\*\* P<0.001. Scale bars: 1  $\mu$ m.

593



594

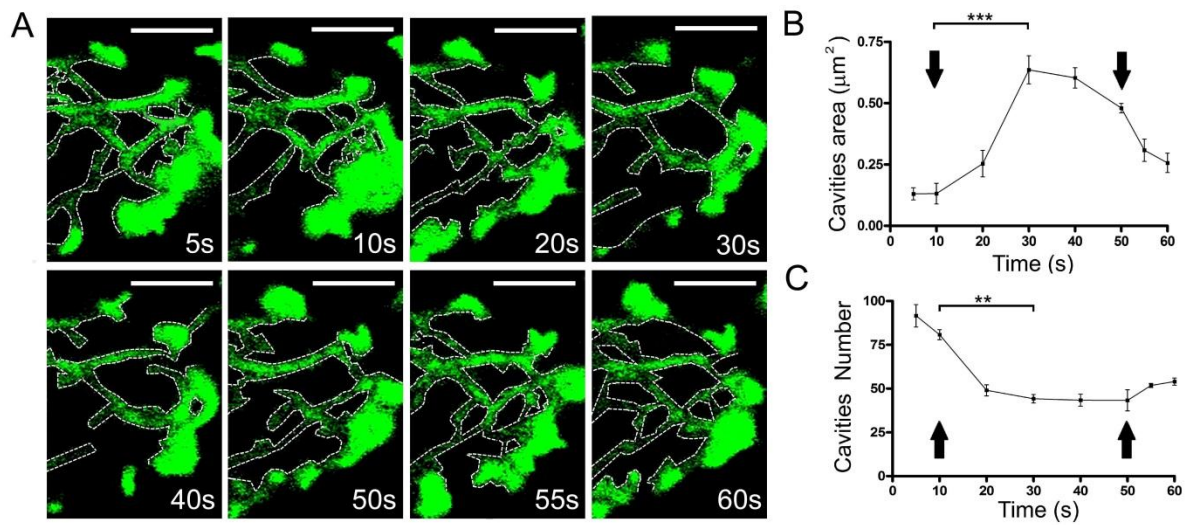
595 **Fig 3. F-actin and myosin II activity controls expansion and retraction.** (A-J)  
 596 Confocal fluorescence images of the F-actin cortical barrier from cultured chromaffin  
 597 cells expressing EGFP-LifeAct in control (A-B) and stimulated cells by KCl  
 598 depolarization (C-J) at maximum development time (30s) for both expansion (A, C, E,  
 599 G and I) and retraction (B, D, F, H and J) events registered at 30°C. (C-J) Stimulated  
 600 cells group includes cells without any pharmacological treatment (C-D) and others  
 601 previously treated with jasplakinolide 1µM for 15 min (E-F), blebbistatin 5 µM for 30  
 602 min (G-H) and taxol 0.1 µM for 30 min (I-J). White lines indicate the initial position (t<sub>0</sub>)  
 603 of F-actin cortical barrier profile for each register. F-actin displacements magnitude  
 604 for expansion and retraction events were measured in terms of the distance variation  
 605 value at 30s linked to F-actin dynamics under each established condition.(K-L) Mean



606 ± SEM of the normalized distance variation value of the F-actin cortical barrier at 30s  
607 for expansions (K) and retractions (L) in control cells (n=10 cells, n=40 sections),  
608 untreated stimulated cells (n=10 cells, n=50 expansions, n=46 retractions) and  
609 stimulated cells previously treated with jasplakinolide (n=10 cells, n=40 zones),  
610 blebbistatin (n=10 cells; n=40 zones) and taxol (n=10 cells, n=45 expansions, n=40  
611 retractions). Statistical significance was assessed by Two way ANOVA: \*\*\* P<0.001;  
612 n.s: non-significant results. Scale bars: 1 µm.  
613



614

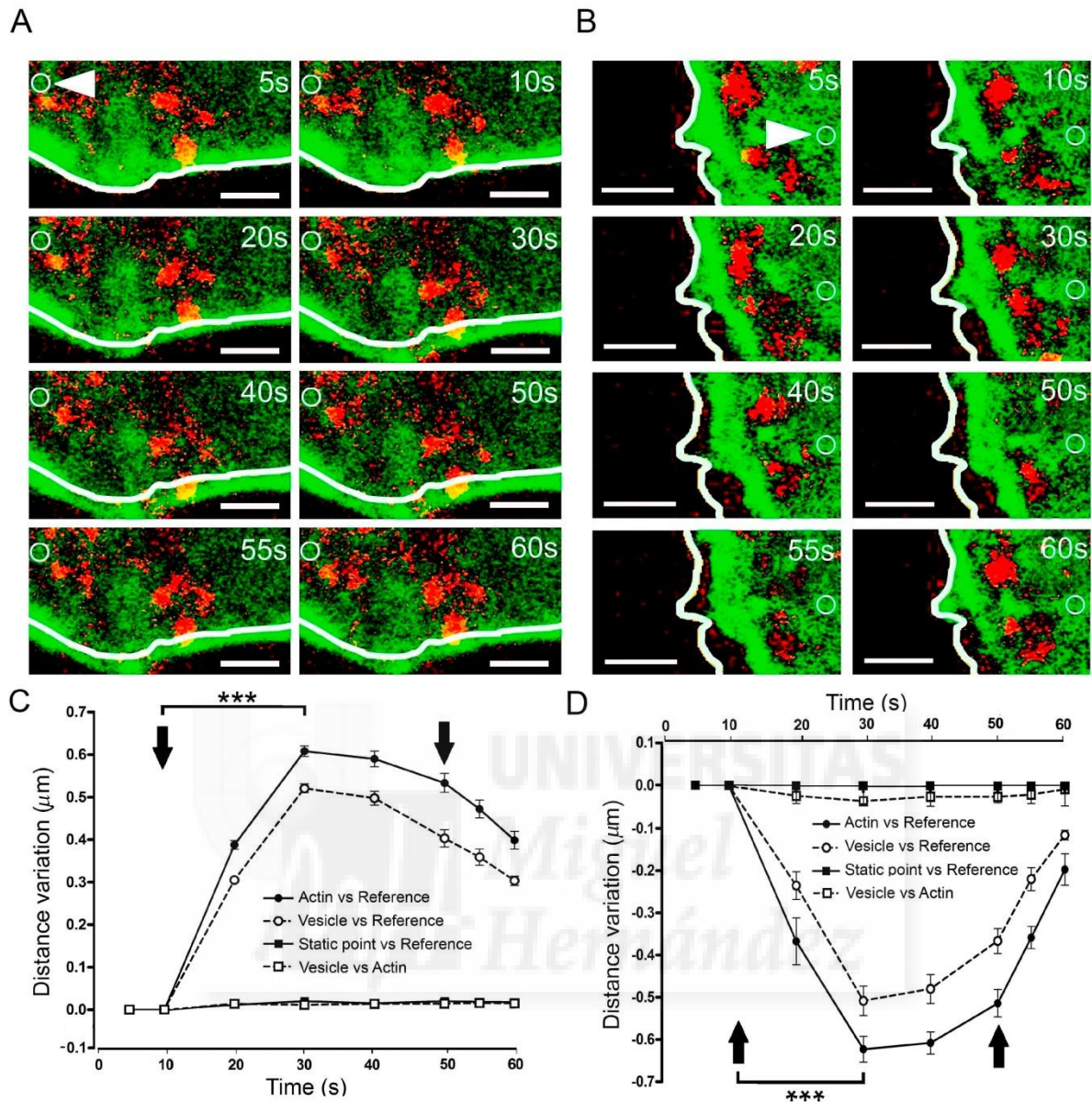


615

616

617 **Fig 4. Change in the size and number of the F-actin cytoskeletal cavities during**  
 618 **stimulation.** A) Time-lapse confocal fluorescence images of a cortical section in the  
 619 equatorial plane from a chromaffin cell expressing EGFP-LifeAct under stimulation  
 620 conditions by KCl depolarization at 30°C. Cytoskeleton cavities was detected by  
 621 threshold and analyzed in terms of area and number at: 5s, 10s, 20s, 30s, 40s,  
 622 55s and 60s. White discontinuous lines show cavities profiles inside the F-actin  
 623 network. (B-C) Mean  $\pm$  SEM values of area (B) and number (C) of cavities in  
 624 stimulated cells (n=10 cells, 35 zones, 306 cavities). Arrows indicate the beginning  
 625 and end of stimulation. Statistical significance was assessed by Two way  
 626 ANOVA:\*\*P<0.01, \*\*\* P<0.001. Scale bars: represent 1  $\mu$ m.

627



628

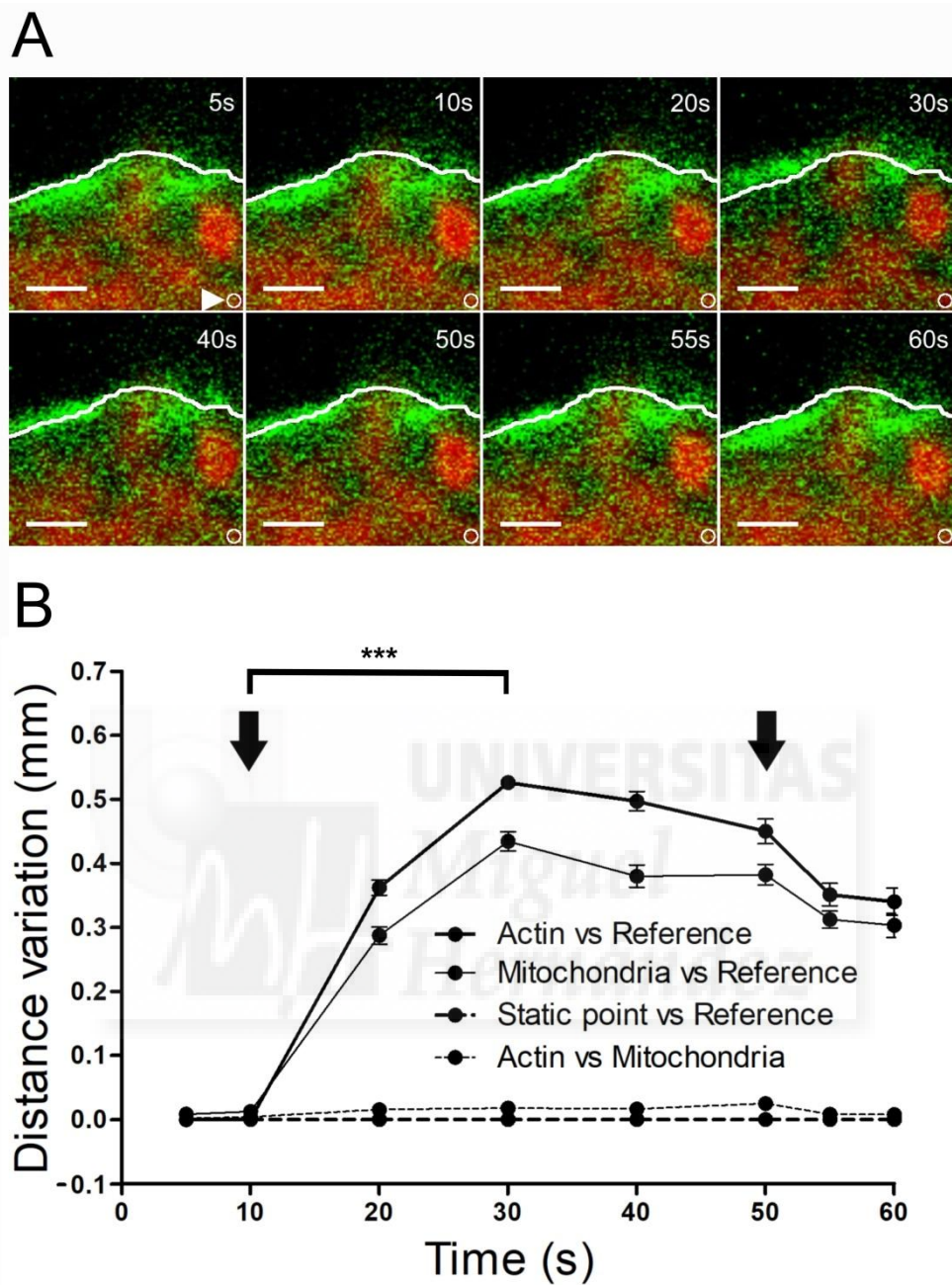
629 **Fig 5. Vesicle displacement during cortical F-actin cytoskeleton retraction and**  
 630 **expansion.** (A-B) Time-lapse confocal fluorescence images of a representative  
 631 expansion (A) and retraction (B) events from stimulated chromaffin cells expressing  
 632 EGFP-LifeAct (green) and RFP-NPY (red) to show F-actin (green) and vesicles (red).  
 633 Cells were stimulated by depolarizing with KCl at 30°C. White lines indicate the initial  
 634 position ( $t_0$ ) of F-actin cortical barrier profile for each register and white arrows show  
 635 an internal static zone as a control for cell movement. Local displacements of F-actin  
 636 fibers and cortical vesicles were measured individually in terms of distance  
 637 variations to study movement magnitude for each one derived from expansion and  
 638 retraction events and also between them in order to detect linked movements during  
 639 F-actin dynamics. (C-D) Mean  $\pm$  SEM values of the distance normalized variation for

640 expansion (C) and retraction (D) events (n=15 cells, n=40 expansions, n=37  
641 retractions, n=278 vesicles) Statistical significance was assessed by Two way  
642 ANOVA: \*\*\*  $P < 0.001$ . Arrows indicate the beginning and end of stimulation. Scale  
643 bars: represent 1  $\mu\text{m}$ .

644



645



646

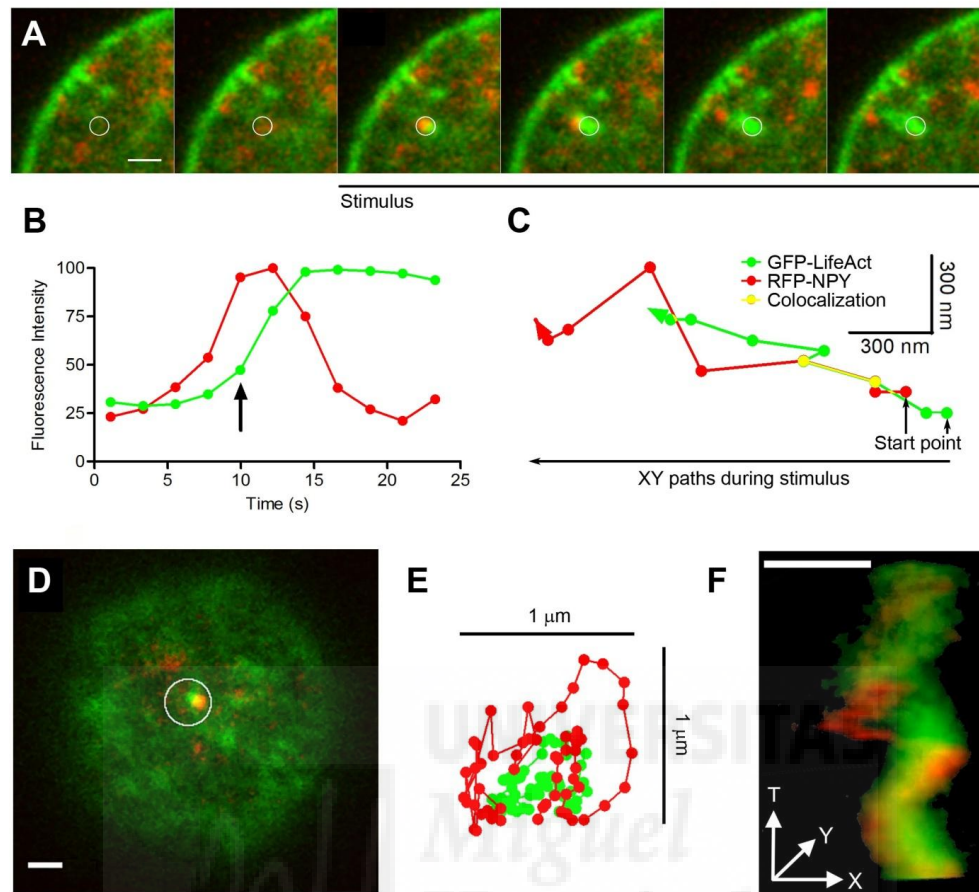
647 **Fig 6. Mitochondrial displacement in association with the F-actin cortex.** (A)  
 648 Time-lapse confocal fluorescence images of a representative expansion zone  
 649 acquired in an equatorial plane of a stimulated chromaffin cell expressing EGFP-  
 650 LifeAct and then incubated with Mitotracker red to show F-actin (green) and  
 651 mitochondria (red). The cell was stimulated by depolarizing with KCl at 30°C. White  
 652 lines indicate the initial position ( $t_0$ ) of F-actin cortical barrier profile for each register  
 653 and white arrows show an internal static zone as a control for cell movement. Local  
 654 displacements of F-actin fibers and cortical mitochondria populations were



655 measured individually in terms of distance variations to study movement magnitude  
656 for each one and also between them in order to detect linked movements derived  
657 from expansions events. (B) Mean  $\pm$  SEM values of distance normalized variation for  
658 expansion events in stimulated cells (n=30 cells, n=30 expansions, n=34  
659 mitochondrial populations). Arrows indicate the beginning and end of stimulation.  
660 Statistical significance was assessed by Two way ANOVA: \*\*\*  $P < 0.001$ . Scale bars:  
661 represent 1  $\mu\text{m}$ .  
662



663



664

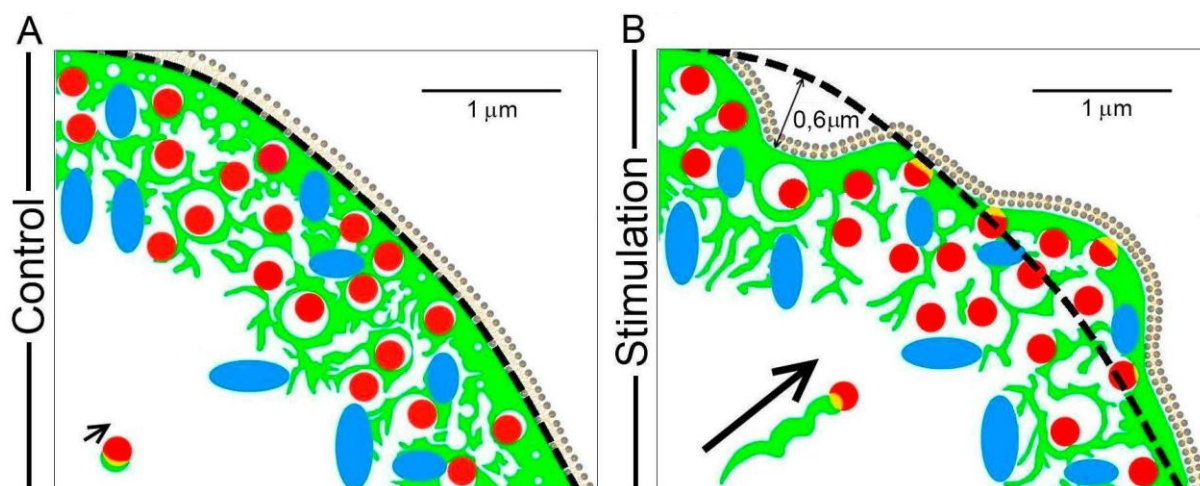
665 **Fig 7. Comets: structure, mobility and vesicle linking.** (A) Time-lapse confocal  
 666 fluorescence images of a cortical section acquired in the equatorial plane from a  
 667 stimulated chromaffin cell expressing EGFP-LifeAct (green) and RFP-NPY (red) to  
 668 show F-actin (green) and vesicles (red). Cells were stimulated by depolarizing with  
 669 KCl at 30°C. White circle indicates the region of interest (ROI) from this confocal  
 670 images composition showing the vesicle arrival linked to a F-actin aggregate with a  
 671 temporal development of a F-actin tail comet (green) propelling the vesicle (red)  
 672 under stimulus. Images were acquired at 4 s intervals. (B) Temporal evolution of the  
 673 red (vesicle) and green (F-actin) integrated fluorescence intensity inside ROI (A). The  
 674 green signal increase informs about F-actin nucleation linked to the comet  
 675 development by stimulus coupled to the red fluorescence decrease explained by  
 676 granule disappearing inside ROI by actin propelling. The arrow indicates the  
 677 beginning of stimulation in the represented time. (C) XY paths for F-actin tail (green)  
 678 and vesicle (red) centroids from ROI (A) by particles spatial tracking analysis during  
 679 cell stimulation. Yellow line shows colocalized paths between both elements during

680 stimulus time. (D) Top polar plane showing other F-actin aggregate (green) and the  
681 nearest vesicle (red) inside ROI before stimulation. (E) XT movements squeme of F-  
682 actin comet (green) and the nearest vesicle (red) from ROI (D) during stimulation. (F)  
683 XYT movement reconstruction of the comet and the nearest vesicle from the ROI (D)  
684 by 3D projection during stimulation. Scale bars: represent 1  $\mu\text{m}$ .  
685





686



687

688

689 **Figure 8. A model of the mechanisms by which F-actin drives organelle**

690 **movement during chromaffin cell secretion.** The different pleiotropic mechanisms

691 utilized by F-actin (green) to transport chromaffin vesicles (red) and mitochondria

692 (blue) during cell stimulation are summarized in the scheme. The resting F-actin

693 cortex in which organelles are embedded has a dense sub-membrane layer (first 0.3-

694 0.5 μm) and a multicage zone (extending 1-1.5 μm). During stimulation, regions of

695 the cell periphery expand and retract, which drives the movement of the embedded

696 organelles over a distance of about 0.5-0.6 μm. At the same time, the cage area

697 increases leaving more space for organelle movement. A small population of vesicles

698 can be transported via F-actin comet tails (see the arrow indicating this type of

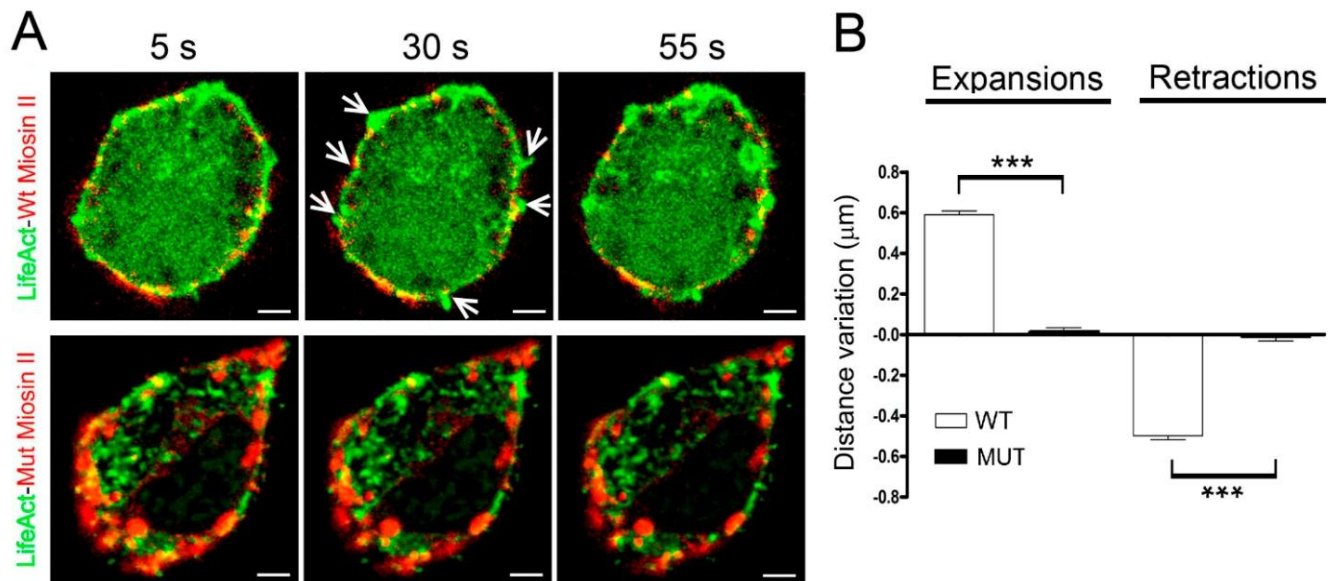
699 displacement). Scale bars: represent 1 μm.

700

701 **ADDITIONAL FIGURES**

702

703



704

705

706 **Additional Figure 1. Myosin II controls local F-actin expansion and retraction**

707 **events.** (A) Confocal fluorescence images of representative stimulated chromaffin

708 cells by KCl depolarization expressing EGFP-LifeAct (green) combined with wild type

709 and mutant version of RFP-Miosin II (red) registered at 30°C for 5 s (before

710 stimulation), 30 s (during stimulation) and 55 s (after stimulation). Arrows indicate

711 local changes location.

712 (B) Mean  $\pm$  SEM values of the normalized variation in

713 distance of the F-actin barrier at 30 s for expansion and retraction events (n=10 cells;

714 n=30 zones). Statistical significance was assessed by Two way ANOVA: \*\*\*

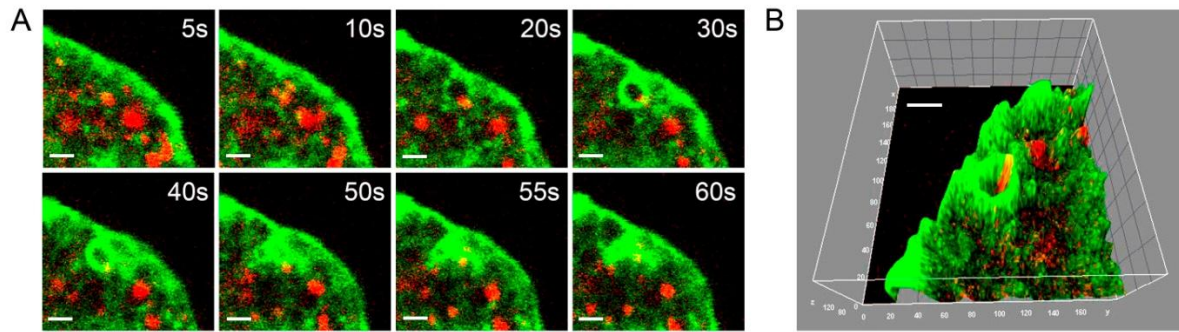
715 P<0.001. Scale bars: 1 µm.

716

717

718

719



719

720

721

722

723

724

725

**Additional Figure 2. Temporal evolution of the formation of peripheral F-actin rings during stimulation.** (A) Confocal fluorescence images of a cortical section in the equatorial plane from a stimulated chromaffin cell expressing EGFP-LifeAct (green) and RFP-NPY (red) showing the temporal evolution of a F-actin ring (green) and the attached vesicle (red). The numbers indicate the acquisition time. (B) Dual channel XYZ projection of the section represented at 30s. Scale bars: 1  $\mu\text{m}$ .

