

## ESTUDIO DE LA EXOCITOSIS EN CÉLULA ÚNICA POR AMPEROMETRÍA CON MICROELECTRODOS.

**Bonifas I.<sup>2</sup>, Amatore C.<sup>1</sup>, Arbault S.<sup>1</sup>, Bouret Y.<sup>1</sup> and Erard M.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Ecole Normale Supérieure, Département de Chimie,  
24 rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05, France.

<sup>2</sup>Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C., Camino a la Presa San José 2055 Lomas 4<sup>a</sup> c.p. 78216 San Luis Potosí, S.L.P., México  
Tel. (444) 8342000 Fax. (444) 8342010 e-mail: imelda@ipicyt.edu.mx

La base de la comunicación en el sistema nervioso se fundamenta en la liberación de neurotransmisores desde terminales sinápticos de neuronas. Los microelectrodos han sido empleados por más de una década para medir la liberación de neurotransmisores por células secretoras (neuronas, células adrenales, células pancreáticas...).<sup>[1]</sup> Actualmente la resolución del tiempo y la corriente de los registros amperométricos ofrece la posibilidad de caracterizar la dinámica y el papel de los parámetros fisicoquímicos que gobiernan la liberación por exocitosis.

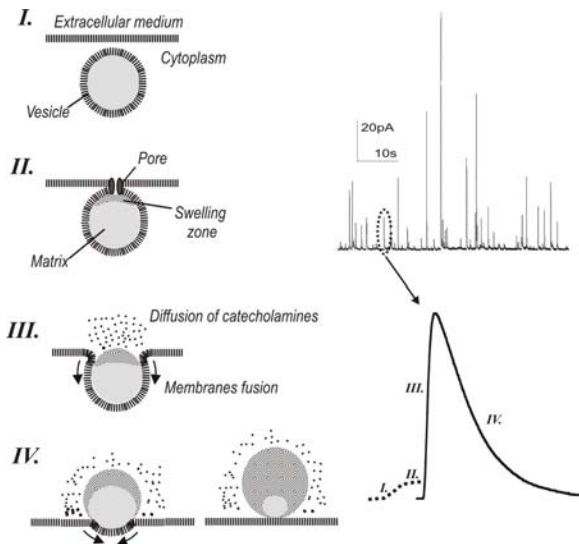
La exocitosis de adrenalina en células cromafines ocurre a través del proceso en el que involucra la aproximación y fusión de una vesícula secretora a la membrana citoplasmática de la célula. La fusión procede en dos estados principales. El primero lleva a la creación de un poro de fusión estable (ver figura) entre las dos membranas y el cual da una liberación constante del flujo del neurotransmisor (estado de liberación del poro). Después de pocos milisegundos, el estado inicial del poro pasa a una inmediata expansión, es decir, hacia la incorporación de la membrana vesicular en la membrana de la célula (estado de fusión total) y una exposición total de la matriz vesicular al medio extracelular donde el microelectrodo se localiza.<sup>[2]</sup>

La precisión de resolución del tiempo en la dinámica de la liberación del neurotransmisor y de la incorporación de la membrana vesicular durante la fusión total puede obtenerse con una precisión nunca antes lograda por circunvolución de corrientes amperométricas experimentales para cada evento de secreción exocitótica.<sup>[2, 3]</sup>

Hemos demostrado que los eventos de fusión total son generados por la expansión de la matriz polielectrolita de la vesícula. Sin embargo, estos son cinéticamente regulados por difusión de la matriz y por la dinámica de la fusión de membranas. Hemos desarrollado un modelo fisicoquímico basado en la dinámica del poro de fusión para analizar la dinámica de exocitosis. Esto provee una nueva interpretación de la inmediata transición entre los estados de liberación a través del poro de fusión y la fusión total. Esta transición ocurre cuando se incrementa la energía de tensión de la membrana debido a la presión interna de la expansión o hinchamiento de la vesícula que sobrepasa la energía de barrera del poro, y así el poro de fusión inicial es inestable y se rompe. Este nuevo punto de vista predice que pequeñas vesículas (menos de 25nm de radio) pueden liberar el neurotransmisor a través del poro al mismo tiempo que vesículas grandes pueden lograr la fusión total si es que no ocurre el cierre del poro antes de la fusión.<sup>[4]</sup>

Hemos diseñado experimentos para probar selectivamente cada hipótesis del modelo. Primero, se usaron cationes trivalentes como el Lantano ( $\text{La}^{3+}$ ) para modificar el intercambio de cationes de adrenalina con cationes externos. La entrada de  $\text{La}^{3+}$  en la vesicular antes

de la fusión disminuye la velocidad ó detiene el hinchamiento de la matriz y genera la supresión de eventos excitóticos. Segundo, variamos la tensión mecánica ó viscosidad de la membrana celular la cual fué inducida por la exposición transitoria de las células a un medio hipo- ó hiperosmótico ó por el incremento del contenido de colesterol en la membrana celular. Nuestros resultados han coincidido con las predicciones de nuestro modelo y proveen nuevos panoramas dentro de la complejidad de este importante fenómeno biológico el cual es la exocitosis. Estos estudios redundan en el conocimiento básico de la fisiología neuronal, apoyo esencial para poder encontrar nuevos puntos centrales terapéuticos frente a enfermedades del sistema nervioso.



**Figura.** En la izquierda, están representadas las diferentes etapas de la exocitosis de una vesícula secretora como se describe en nuestro modelo. En la derecha, está representado un registro amperométrico con un microelectrodo de fibra de carbono durante la liberación de adrenalina en una célula cromafín. Del registro superior se aisló un evento para mostrar las diferentes etapas en función del tiempo.

## Referencias

- [1] Wightman, R. M.; Jankowski, J. A.; Kennedy, R. T.; Kawagoe, K. T.; Schroeder, T. J.; Leszczyszyn, D. J.; Near, J. A.; Diliberto, E. J.; Viveros, O. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:10754-10758;1991.
- [2] Amatore, C.; Bouret, Y.; Midrier, L. *Chem.-Eur. J.* **5**:2151-2162;1999.
- [3] Amatore, C.; Bouret, Y.; Travis, E. R.; Wightman, R. M. Adrenaline release by chromaffin cells: Constrained swelling of the vesicle matrix leads to full fusion. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **39**:1952-1955;2000.
- [4] Amatore, C.; Bouret, Y.; Travis, E. R.; Wightman, R. M. Interplay between membrane dynamics, diffusion and swelling pressure governs individual vesicular exocytotic events during release of adrenaline by chromaffin cells. *Biochimie* **82**:481-496;2000.