

# ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS EN CELULAS ADRENOMEDULARES CROMAFINES EN CULTIVO

Dr. José Luis Quintanar Stephano<sup>1</sup>

## INTRODUCCION

¿Por qué cuando estamos sometidos a situaciones de estrés o simplemente recibimos un susto, nuestras condiciones corporales se modifican? La naturaleza nos ha dotado de mecanismos para protegernos ante tales situaciones que el cuerpo interpreta como de peligro. El incremento tanto en la frecuencia cardíaca como en la presión arterial, así como en los niveles de azúcar en la sangre o insensibilidad al dolor, son algunos ejemplos de la reacción del organismo y que tienen la finalidad de favorecer las respuestas como de huida, de lucha, etc., que tienden a preservar nuestra vida<sup>7</sup>.

Uno de los principales sistemas involucrados en la integración de la información para responder contra los estímulos nocivos, es el sistema endocrino. Dicho sistema está constituido por glándulas que sintetizan y secretan hormonas que son vertidas a la sangre y de allí son distribuidas hacia todos los tejidos del cuerpo para realizar su efecto. Tal es el caso de la médula de la glándula suprarrenal quien sintetiza y secreta adrenalina, noradrenalina y dopamina (las llamadas catecolaminas)<sup>7</sup>. Las células responsables de la síntesis y liberación de estas hormonas suprarrenales se les conoce como cromafines, ya que reaccionan con las sales de cromo por oxidación de la adrenalina dando una coloración pardo-amarillenta<sup>3</sup>. El origen embriológico de estas células es nervioso y por tanto su comportamiento es similar al de una neurona, sólo que en lugar de transmitir señales electroquímicas, liberan hormonas<sup>4</sup>.

Las células cromafines secretan las catecolaminas cuando son estimuladas por terminales nerviosas procedentes del nervio esplácnico utilizando una sustancia neurotransmisora llamada acetilcolina. Resumiendo la descripción de un evento en situaciones de estrés sería: Nuestros sentidos nos informan de la existencia de una situación determinada, el sistema nervioso la integra y posteriormente la interpreta como de peligro, entonces envía información a través del nervio esplácnico quien libera acetilcolina, la cual, estimula a las células cromafines para que secreten adrenalina, noradrenalina y dopamina, a continuación estas hormonas se distribuyen por la sangre a músculos, corazón, hígado, etc., para dar la respuesta adecuada.

Ahora bien, ¿qué es lo que ocurre en el interior de la célula cromafin cuando se le da un estímulo fisiológico

como lo es el de la acetilcolina? A grandes rasgos, al llegar la acetilcolina a la célula, ésta es reconocida por receptores específicos localizados en la membrana plasmática y como consecuencia de esta asociación (neurotransmisor-receptor), se producen cambios en la permeabilidad de la membrana que permiten la entrada de iones como el sodio y el calcio por medio de la apertura de canales específicos para estos iones<sup>10</sup>. Así, cuando se abren los canales de calcio, el calcio entra y su incremento intracelular tiene diversos efectos que se traducen finalmente en la fusión de los gránulos que contienen a las catecolaminas (gránulos cromafines) con la membrana plasmática, para liberarlas hacia el exterior. Este proceso se conoce como exocitosis<sup>11</sup>.

Los gránulos cromafines que almacenan a las catecolaminas se encuentran en el citoplasma, pero no de manera libre ni azarosa, sino que están asociados a proteínas estructurales llamadas citoesqueletales; por lo que el transporte de gránulos del sitio de formación (retículo endoplásmico) hacia el lugar de anclaje cerca de la membrana, implica su movilización ordenada.

El grado de exocitosis de catecolaminas puede depender de la velocidad con que los gránulos de secreción se dispongan en las cercanías de la membrana y se disocian de las proteínas del citoesqueleto. Estos cambios de desplazamiento y disociación están fuertemente influidos por cambios morfológicos de los filamentos del citoesqueleto que se dan por el ensamblaje-desensamblaje de los mismos<sup>9</sup>. Este fenómeno ocurre gracias a la acción de enzimas llamadas fosfatasa que incorporan fosfatos a las proteínas (fosforilación) para el ensamblaje. Así mismo, la desincorporación de estos fosfatos mediante enzimas conocidas como quinasas, llamado este proceso defosforilación, provocan el desensamblaje de los filamentos volviéndose a su posición original<sup>8</sup>. Por tanto se puede decir que la secreción de adrenalina, noradrenalina y dopamina por la célula cromafin, es debida en gran medida a procesos de fosforilación-desfosforilación de proteínas citoesqueletales; sin embargo este hecho aún no ha sido plenamente demostrado.

Una manera de abordar el estudio de la participación del proceso fosforilación-desfosforilación en la secreción hor-

<sup>1</sup> Profesor-Investigador. Depto. de Fisiología y Farmacología. Centro Básico.

monal es a través de modificar los niveles de fosforilación producidos por alteraciones en las enzimas fosfatasas o quinasas. Recientemente se ha descubierto una toxina denominada Caliculina-A producida por una esponja marina, la cual actúa como un potente inhibidor de las enzimas fosfatasas<sup>5</sup>; por lo que un bloqueo de estas enzimas permitiría la acción solamente de las quinasas, lo que originaría una hiperfosforilación. Además se ha observado que esta toxina produce cambios morfológicos en diferentes tipos celulares, tales como fibroblastos y neuroglia<sup>6</sup>; implicando posiblemente la alteración de la estructura del citoesqueleto.

**OBJETIVO**

El objetivo fundamental de este trabajo fue el de establecer el efecto de la inhibición de enzimas fosfatasas sobre la secreción de catecolaminas y la distribución de los gránulos secretores en células cromafines de la glándula suprarrenal.

**MATERIAL Y METODOS**

Las células cromafines fueron obtenidas de glándulas suprarrenales de bovino extraídas y dispersadas por digestión con colagenasa y purificadas en gradientes de Percoll. Se mantuvieron en cultivo en monocapas con medio de cultivo

Dulbecco modificado de Eagle y utilizadas al tercer día después de sembradas.

La valoración de la secreción de catecolaminas se realizó a través de la liberación porcentual de noradrenalina tritiada en condiciones basales, de estimulación con agentes despolarizantes como el potasio y en presencia del inhibidor de fosfatasas, caliculina-A. La medición se efectuó en un contador de radiaciones beta empleando como interfase líquido de centelleo.

Para establecer si se producía un cambio en la forma de las células cromafines debido a una hiperfosforilación del citoesqueleto producido por la caliculina-A se incubaron células en presencia de la toxina y se observaron durante 15 minutos a 37°C bajo microscopio de contraste de fase.

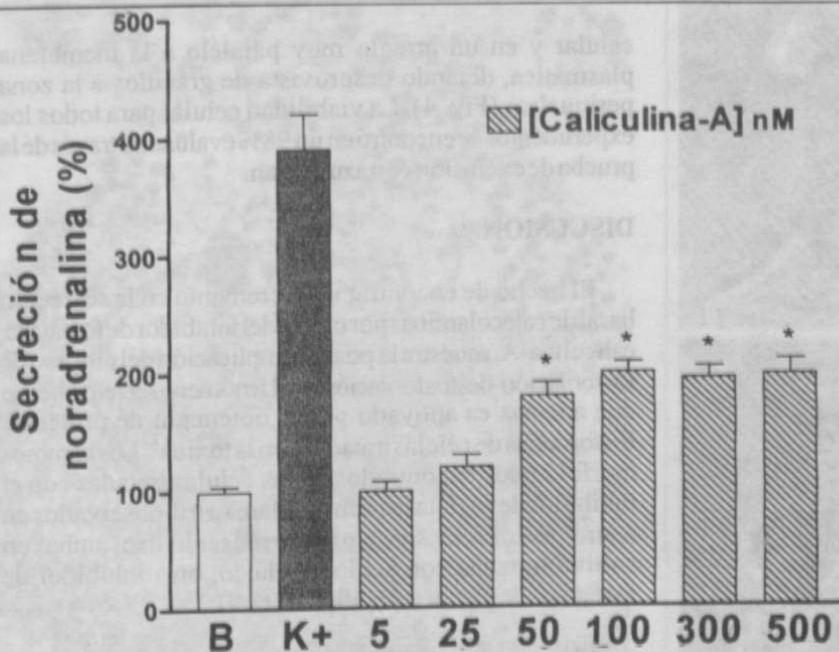
Con el objeto de demostrar la fosforilación de proteínas del citoesqueleto por efecto de la caliculina-A, las células se incubaron con fósforo radioactivo (ortofosfato-<sup>32</sup>P, 1 mCi/ml de medio de incubación). Una hora después las células fueron sometidas a las siguientes condiciones: basales, de estimulación con potasio como referencia durante 1 minuto y con caliculina-A por 5, 15 y 30 minutos. El análisis de la fosforilación de proteínas totales se realizó por electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida y autorradiografía.

Para determinar la distribución intracelular de los gránulos secretores, se incubó a las células durante 15 minutos a 37°C en dos condiciones: basales y en presencia de caliculina-A. Posteriormente se fijaron con una mezcla de glutaraldehído-paraformaldehído-cacodilato y se postfijaron con ácido ósmico. Se realizaron cortes finos con ultramicrotomo y las observaciones fueron hechas con un microscopio electrónico de transmisión.

El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de la t de Student's y los datos fueron expresados como la media ± media del error estándar.

**RESULTADOS**

Los resultados muestran que la incubación de las células cromafines con caliculina-A induce una secreción basal de noradrenalina de una forma dosis-dependiente. El efecto se observó



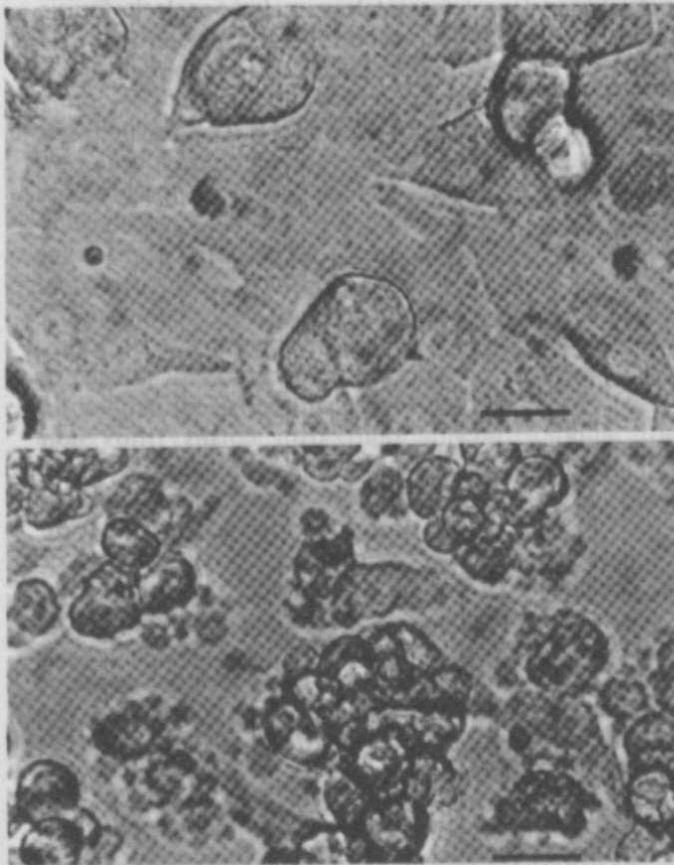
**Figura 1.** - Efecto de la caliculina-A sobre la secreción basal de catecolaminas. Las células cromafines (500,000 células/ensayo) fueron incubadas con [3H] noradrenalina y posteriormente incubadas durante 15 minutos en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de caliculina-A. Se midió la secreción basal (B), la respuesta control con potasio (K+) y el efecto de distintas concentraciones de la toxina. Los datos de experimentos individuales fueron analizados como % de secreción sobre el total del contenido de catecolaminas y normalizados a la respuesta basal control (100%) y expresados como la media ± MES de 5 experimentos por triplicado. La diferencia de significancia se consideró cuando P < 0.02 (\*) al comparar los valores respecto al basal.

a una concentración de 25 nM alcanzándose un máximo a 100 nM, siendo este último efecto aproximadamente dos veces mayor que el control basal y se mantuvo elevado sin cambios a mayores concentraciones (Fig. 1).

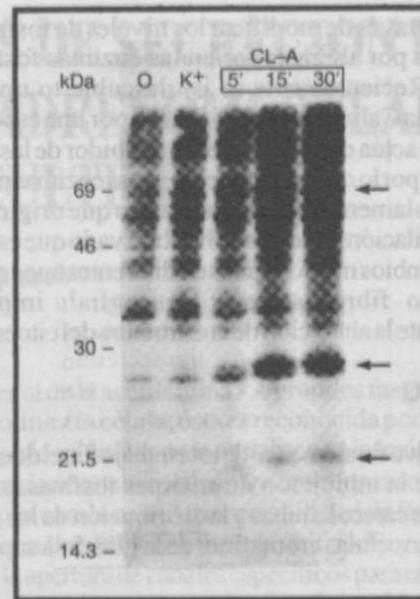
La incubación con caliculina-A durante 15 minutos a 37°C produjo cambios notables en la morfología celular; las células pasaron de una forma plana alargada e irregular a redondeada y esférica (Fig. 2).

Al realizar el análisis electroforético, se encontró un incremento en el nivel de fosforilación de una gran cantidad de proteínas (Fig. 3) entre las que destacan en el rango de bajo peso molecular una de 28 y otra de 20 kilodaltones (kDs) y en el rango de alto peso molecular una de 64 y otra de 57 kDs, que posteriormente fueron identificadas con anticuerpos monoclonales como la enzima Tiroxina hidroxilasa (64 kDs) y vimentina (proteína citoesqueletal) de 57 kDs.

En relación a la distribución de los gránulos secretores de catecolaminas, el estudio por microscopía electrónica reveló que en un 60% de las células tratadas con la caliculina-A, los gránulos cromafines aparecen acumulados en la periferia



**Figura 2.-** Cambios morfológicos de células cromafines expuestas a caliculina-A durante 15 minutos a 37°C y observadas bajo microscopio de contraste de fases. a) Controles y b) Células expuestas a 100 nM de caliculina-A. Las barras equivalen a 20 µm.



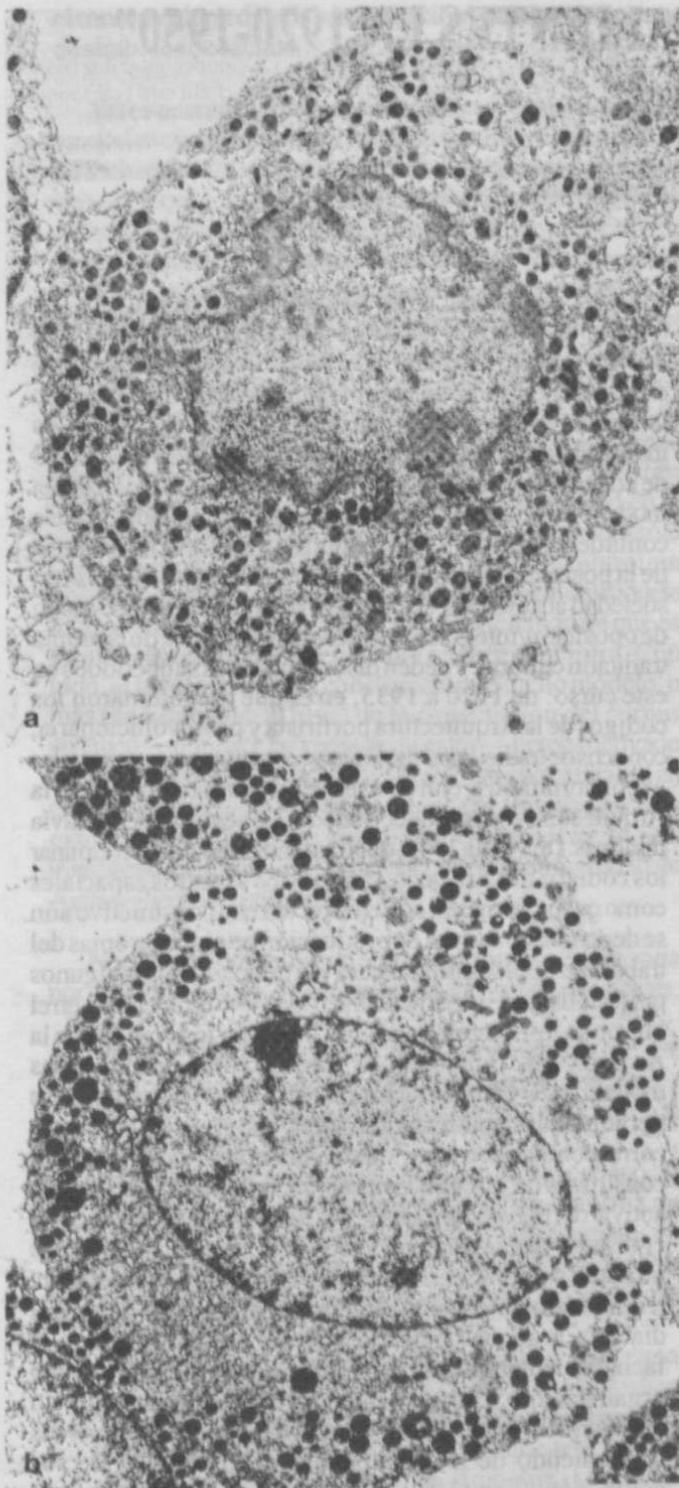
**Figura 3.-** Efecto de la caliculina-A sobre la fosforilación de proteínas. Células cromafines en cultivo (500,000 células/ensayo) fueron incubadas con [<sup>32</sup>P] ortofosfato durante una hora. Durante este período se mantuvieron en condiciones basales (0), con estimulación con potasio (K+) y a diferentes tiempos con 100 nM de caliculina-A. Las proteínas totales fueron estudiadas en gels de poliacrilamida y autorradiografía. Las flechas indican alguna de las proteínas identificadas (tiroxina hidroxilasa).

celular y en un arreglo muy paralelo a la membrana plasmática, dejando desprovista de gránulos a la zona perinuclear (Fig. 4). La viabilidad celular para todos los experimentos se encontró en un 98% evaluada a través de la prueba de exclusión con azul tripan.

## DISCUSION

El hecho de encontrar un incremento en la secreción basal de catecolaminas por efecto del inhibidor de fosfatasa, caliculina-A, muestra la posible implicación del proceso de fosforilación-desfosforilación en el fenómeno secretor, hecho que además es apoyado por la obtención de proteínas fosforiladas de células tratadas con la toxina<sup>6</sup>. Los cambios morfológicos encontrados en las células tratadas con el inhibidor de fosfatasas son similares a los observados en neuronas corticales y células de músculo liso, ambas en cultivo tratadas con ácido okadáico, otro inhibidor de fosfatasas de menor especificidad (2,9).

El incremento en el nivel de fosforilación de proteínas citoesqueletales, concuerda con la idea de la participación de estos filamentos en la regulación de la secreción de catecolaminas en células cromafines<sup>12</sup>. Los efectos de la caliculina-A sobre la distribución de los gránulos cromafines observados con microscopía electrónica, indican que la toxina induce un incremento en la fosforilación de proteínas y su correlación con los movimientos de los gránulos hacia la membrana plasmática y por consiguiente una mayor



**Figura 4.-** Cambios en la distribución de los gránulos cromafines que contienen a las catecolaminas inducidos por la caliculina-A observados con microscopía electrónica. Las células fueron tratadas con medio basal control (a) o con el mismo medio pero conteniendo 100 nM de caliculina-A durante 15 minutos a 37°C (b). Obsérvese la acumulación periférica de los gránulos (esferas negras) (4700 X).

disposición para la exocitosis de las catecolaminas, lo que además explicaría el incremento en la secreción basal de noradrenalina con la sola incubación de la toxina. Quizá la proteína citoesquelética vimentina tenga un papel regulador en el proceso secretor en la célula cromafin, ya que se ha reportado que esta proteína es capaz de desensamblarse cuando es fosforilada en oligodendrocitos incubados con caliculina-A<sup>1</sup>.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a lo anterior se puede concluir que la fosforilación de proteínas inducido por la inhibición de fosfatasas por caliculina-A, produce en la célula cromafin bovina en cultivo, cambios morfológicos, distribución periférica de los gránulos secretores y un incremento en la secreción basal de catecolaminas.

## REFERENCIAS

- 1) Almazan, G. (1993) *Phosphorylation and disruption of intermediate filament protein in oligodendrocyte precursor cultures treated with calyculin-A*. *J. Neurosci. Res.* 36:163-172.
- 2) Arias C., Sharma N., Davies P., Shafit-Zagardo B. (1993). *Okadaic acid induces early changes in microtubule associated protein 2 and phosphorylation prior to neurodegeneration in cultured cortical neurons*. *J. Neurochem.* 61:673-682.
- 3) Bloom M. y Fawcett D.W. (1991). *Glándulas suprarrenales y paraganglios*. pp. 530-540: *Tratado de Histología*. 11va edición. Editorial Interamericana. McGraw-Hill. España.
- 4) Fujita T. (1988). In *"The paraneuron"*. Fujita, T. Kanno, T. and Kobayashi S. (eds.). Springer Verlag, Tokio. 135-144.
- 5) Gutiérrez, L.M. Viniegra S., Quintanar J.L., Reig J.A. and Sala F. (1994). *Calyculin-A blocks bovine chromaffin cell calcium channels independently of phosphatase inhibition*. *Neuroscience Lett.* 178:55-58.
- 6) Gutiérrez L.M., Quintanar J.L., Rueda J., Viniegra S. and Reig J.A. (1995). *The protein phosphatase inhibitor calyculin-A affects catecholamine secretion and granular distribution in cultured adrenomedullary chromaffin cells*. *Euro. J. Cell Biol.* 68:88-95.
- 7) Guyton A.C. (1992) *Sistema Nervioso Autónomo: Médula Suprarrenal*. pp 706-708. *Tratado de Fisiología Médica*. 8va. edición. Editorial Interamericana-McGraw-Hill. México.
- 8) Holtz R.W., Rothwell C.E. and Ueda T. (1980). *Cholinergic agonist-stimulated phosphorylations of two specific proteins in bovine chromaffin cells: correlation with catecholamine secretion*. *Soc. Neurosci. Abs.* 6:177.
- 9) Hosoya N., Mitsui M., Yazama F., Ishihara H., Ozaki H., Karaki H., Hartshorne D.J. and Mohri H. (1993). *Changes in the cytoskeletal structure of cultured smooth muscle cells induced by calyculin-A*. *J. Cell Science.* 105:883-890.
- 10) Perlman R.L., Cossi A.F. and Role L.W. (1980). *Mechanism of ionophore-induced catecholamine secretion*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 213:241-246.
- 11) Trifaró J.M., Rodríguez del Castillo A. and Vitale M. (1992). *Dynamic changes in chromaffin cell cytoskeleton as prelude to exocytosis*. *Mol. Neurobiol.* 6(4): 339-358.
- 12) Trifaró, J.M. and Vitale M.L. (1993). *Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release*. *Trends Neurosci.* 16:466-472.

Los resultados presentados en este trabajo, fueron parte de la tesis doctoral del autor y han sido publicados en la revista: *European Journal of Cell Biology* bajo el título: *The Protein Phosphatase inhibitor calyculin-A affects catecholamine secretion and granular distribution in culture adrenomedullary chromaffin cells*. (1995) 68:88-95 y presentado en el 8th International Symposium on Chromaffin Cell Biology. Edinburgh, Scotland.