

## ARTÍCULO DIVULGATIVO

## El cóctel intravesicular (o el camarote de los Hermanos Marx)

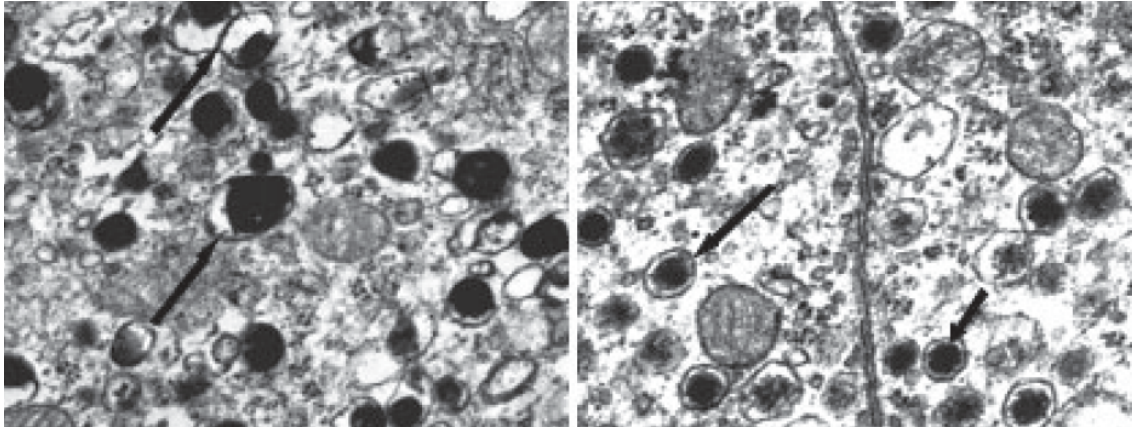
**Marta Rodríguez Pardo, José D. Machado y Ricardo Borges**

*Unidad de Farmacología, Facultad de Medicina e Instituto Universitario de Bio-  
Orgánica "Antonio González" Universidad de La Laguna. Tenerife.*

Pocas cosas nos resultan más intrigantes que la notable capacidad de las vesículas secretoras para concentrar solutos, a unas concentraciones sencillamente increíbles, a la espera de ser liberados. Casi todo lo que vamos a contarte está extraído de nuestra experiencia, y la de muchos colegas, con las células cromafines de la médula suprarrenal. Unas doce mil pequeñas estructuras denominadas -gránulos cromafines- se apiñan en el citoplasma de estas células del sistema simpático que vierten a la sangre catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) y muchos otros productos más. Ello ocurre a baja frecuencia cuando dormimos o vegetamos y abruptamente si precisamos hacer frente a alguna situación digamos estresante.

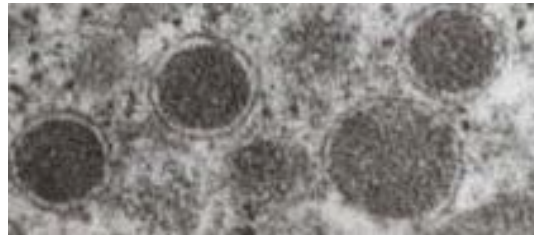
Contamos pues con doce mil gránulos en cada una de nuestras cromafines, gránulos repletos de catecolaminas; una sustancia más que peligrosa. El contenido en adrenalina de una glándula suprarrenal da para matarnos unas cuantas veces y aun sobraría para algún vecino. Probablemente por ello la naturaleza ha previsto algunos sistemas de control que garantice al propietario de las suprarrenales un funcionamiento con ciertas garantías de seguridad. La adrenalina, ya lo sabemos, nos redistribuye la sangre, acelera nuestro corazón, nos relaja los bronquios, pone glucosa en la sangre y nos paraliza el intestino. Es probable que también nos aclare las ideas o al menos le busca una solución rápida al problema de afrontar una solución comprometida o a salir por piernas. Los británicos los llamaron fight or flight.

Pero volvamos a los gránulos cromafines. Estas vesículas secretoras son en todo similares a las denominadas grandes de núcleo denso "*large Dense Core Vesicles (LDCV)*" para los que les guste el inglés. Podemos encontrarlas en las células enterocromafines del intestino (donde liberan serotonina) y en muchas neuronas del sistema nervioso simpático y del sistema nervioso central.



**Figura 1. Ultraestructura de células cromafines de rata.** A la izquierda vesículas noradrenérgicas y a la derecha adrenérgicas. Tomadas de la referencia (2).

En la figura 1 te mostramos algunas de estas estructuras subcelulares vistas a 14.000 aumentos con microscopía electrónica, hemos señalado algunas con flechas. La figura de la izquierda nos muestra unos gránulos con una matriz muy densa y excéntrica, contienen noradrenalina. A la derecha mostramos una célula liberadora de adrenalina (las más abundantes en la mayoría de los mamíferos); estos gránulos son algo más pequeños, su matriz menos densa y de localización central. A pesar de los años que hace que se descubrió esta diferencia, la razón por la cual lucen así unos y otros sigue siendo desconocida. Tampoco sabemos por qué unos gránulos son más densos que otros u otros cambios morfológicos, aunque existe la sospecha de que mucho de lo observado se debe a artefactos resultantes de la preparación de las muestras para la microscopía electrónica. Como ejemplo te mostramos la figura 2, son gránulos adrenérgicos.



**Figura 2. distintos grados de marcado de los gránulos cromafines.**

Dentro de los gránulos no sólo hay catecolaminas. Hace treinta años Hans Winkler y Ed Westhead (1) publicaron una cuantificación de lo que albergan estas pequeñas estructuras de 200 nm de diámetro. Claro que en 1980 sólo se podían hacer cuantificaciones trabajando con gramos de tejido y luego dividiendo por el número de células y de gránulos por cada una. Con todo, esos números nos pueden servir para tratar de explicarte lo fascinante que pueden ser los gránulos cromafines o las LDCV según más te guste.

Todo ello empaquetado en un volumen de tan sólo 4 aL (cuatro atto litros) y a una osmolaridad teórica que puede alcanzar los 1,5-2 Osm (osmoles), recordemos en este punto que la isoosmolaridad está alrededor de 310 mOsm. Es decir la tenue membrana lipoproteica de un gránulo separa el citosol de un gránulo que contiene solutos suficientes como para quintuplicar la fuerza osmótica del medio celular. Las leyes de la física nos dicen que el gránulo debería captar agua y expandirse hasta igualar la presión a ambos lados, ello conduciría a su lisis, pero por fortuna tal cosa no ocurre ¿Por qué?

Hagamos un poco de historia. En Oxford a mediados de los sesenta un grupo de Bioquímicos al mando de Hermann Blaschko descubrieron una proteína en el

líquido con el que habían perfundido glándulas suprarrenales de vaca (3). Esta proteína ácida era co-secretada junto a la adrenalina cuando se estimulaba el tejido; ello daba dos pistas, la proteína provenía de la médula y no de la corteza y no podía ser liberada de la célula más que por exocitosis. En realidad fue la primera evidencia bioquímica de la exocitosis. La proteína en cuestión se bautizó como cromogranina y hoy la conocemos como cromogranina A. Pronto la familia se amplió y hoy son varias las graninas (cromograninas y secretograninas) descritas en varios tejidos. También ahora sabemos que las graninas son pro-hormonas que dan origen a una pléyade de péptidos bioactivos y que intervienen en multitud de procesos como la formación de vesículas secretoras. Pero la primera función que Blaschko les asignó es la que hoy nos ocupa: mantener el cóctel de solutos en isotonicidad con el citosol. Eso lo vino a demostrar Karen Helle en su laboratorio de Bergen en Noruega allá por 1985. Helle encontró que la unión de cromograninas a las catecolaminas reduce su fuerza osmótica, probablemente por uniones tipo Gibbs-Donnan de baja afinidad pero de muy alta capacidad (4).

Al margen de las cromograninas, de las que volveremos a hablar más adelante, el coctel intravesicular se complementa con unas concentraciones altísimas de ATP. Sabemos que esta purina es un neurotransmisor pero también presenta unas cualidades físico-químicas muy interesantes. Ed Westhead en Amherst (Massachusetts) realizó un simple experimento "de cocinilla", utilizando un simple osmómetro, adrenalina y ATP encontró que este último reducía enormemente la fuerza osmótica de la adrenalina comportándose la mezcla de forma no-ideal (5). Como media, hay una molécula de ATP por cada cuatro de catecolaminas. Hace veinte años un grupo español, encabezado por María Teresa Miras-Portugal, descubrió la presencia de nucleótidos polifosfato en los gránulos cromafines, se sumaron así a otros nucleótidos cuyas funciones fisiológicas se desconocen (6).

Hay una notable cantidad de ascorbato presente en las vesículas. Si este ingrediente del coctel interviene o no en la estabilidad de los componentes de las vesículas secretoras continúa siendo un misterio. El ascorbato es un cofactor en la síntesis de catecolaminas y también un excelente conservante al prevenir su oxidación espontánea, puede ser eso un aditivo preservante.

Por último tenemos el calcio. Los biólogos celulares tenemos la visión de que el gran reservorio activo del calcio intracelular es el retículo endoplásmico. Ello dimana de que los primeros estudios acerca del metabolismo de los fosfatos de inositol se realizaron en células no excitables que, como sabemos, tienen poco de neuronas. Si bien esta visión puede mantenerse, con matices, en muchos tipos celulares, el panorama es muy distinto en las células puramente secretoras; particularmente en las poseedores de gránulos densos (LDCV).

Aunque la mayor parte de los 40-80 mmol/L del calcio vesicular se encuentra asociado (quelado) a la matriz, los gránulos mantienen una fracción libre que alcanza los 40  $\mu$ M. Si multiplicásemos esta cantidad por el volumen que ocupan los gránulos dentro de una célula cromafín ( $\approx$ 20%) veríamos que ese calcio es casi dos órdenes de magnitud superior a lo que maneja el retículo endoplásmico. A ello hay que añadir que el calcio es el principal segundo mensajero de todas las células excitables, hay que sumar que al otro lado de la membrana vesicular están todas las proteínas implicadas en sus movimientos por el citosol un proceso muy

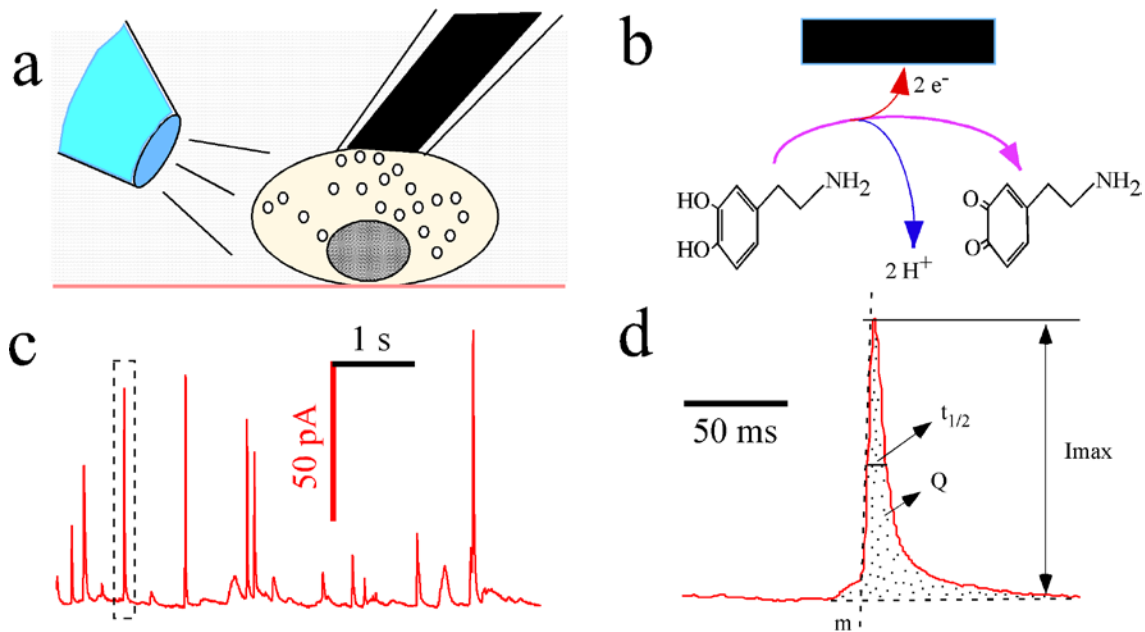
acelerado por el calcio y, como no, recordar que la exocitosis es un proceso enteramente calcio-dependiente.

### ***Estudiando el coctel... y la coctelera***

Parece claro que tamaña concentración de solutos descritos sólo puede ser mantenida dentro de una organela subcelular si se produce una multiagregación que logre burlar el gradiente osmótico. Se crea así una suerte de modelo bi-compartimental en donde el noventa y tanto por ciento de los componentes solubles se encuentra asociado a la matriz intravesicular, constituyendo una suerte de "hueso" del gránulo. La fracción restante de compuestos estaría en forma libre o parcialmente asociados entre sí. A ello contribuye, sin duda, el pH ácido del gránulo (5'5) que coincide con el punto de máxima estabilidad de las cromograninas. El tamaño del halo que se observa alrededor de la matriz de los gránulos observado en las micrografías electrónicas (figura 2) coincide aproximadamente con el montante de la fracción libre de los solutos.

Hace veinte años Mark Wightman (Universidad de Carolina del Norte) logró lo que muchos perseguíamos hacía tiempo, registrar la liberación de adrenalina de una sólo célula cromafín. Para ello colocó un electrodo de carbono de unas pocas micras sobre la célula y la estimuló con acetilcolina. Él esperaba encontrar una elevación transitoria de la basal que durase unos pocos segundos, lo que el osciloscopio mostró fueron unas deflexiones positivas de unos 50-100 milisegundos de duración a las que llamó espigas. Poco después identificó que cada espiga era originada por la oxidación de las catecolaminas liberadas por un sólo gránulo. Cuando se las pudo cuantificar con precisión se confirmó que, efectivamente, la concentración de aminos vesiculares era enorme. Otra observación acompañante demostró la variabilidad en la cantidad de adrenalina de un gránulo a otro aún proviniendo de la misma célula (7). En la figura 3 les mostramos algunos detalles de esta técnica de Wightman -la amperometría-.

La reacción de oxidación de las catecolaminas, prácticamente toda la señal que proviene del electrodo, ocurre en microsegundos; sin embargo, las espigas registradas son unas mil veces más lentas de lo que predicen las leyes de la difusión de solutos en medio acuoso. Se resucitaron entonces los estudios de Karen Helle y del papel de la matriz como condensadora del material soluble vesicular. La especial característica de la amperometría es que se comporta como una sinapsis artificial, es decir "ve directamente" cómo se liberan las catecolaminas.



**Figura 3. La amperometría para estudiar la liberación de catecolaminas desde una célula cromafín.** **a)** Un electrodo de carbono aislado y con su punta pulida se coloca suavemente sobre una célula. La estimulación química de la célula se realiza desde una pipeta situada a unos 40 micrómetros. **b)** Lo que ocurre en la punta es una reacción redox por la cual las catecolaminas se oxidan dando origen a sus ortoquinonas correspondientes (la superficie del electrodo mantiene un potencial fijo de  $\approx 700$  mV suficiente para oxidar las catecolaminas). De la reacción se desprenden dos protones y dos electrones, estos últimos generan una corriente eléctrica proporcional a la concentración de catecolaminas. **c)** Un registro amperométrico genera una serie de deflexiones (espigas) de morfología muy variable que se corresponden con liberaciones cuánticas de catecolaminas. **d)** de una sola espiga podemos extraer varios parámetros que nos hablan de la cantidad de catecolaminas que fueron liberadas, de la concentración máxima alcanzada y en general de la velocidad con la que la exocitosis ocurrió.

Si ese "algo" que retiene a las catecolaminas en el interior vesicular ralentizando su liberación es la matriz vesicular, y esa matriz tiene un alto contenido proteico, son las cromograninas las principales candidatas que la célula utiliza para permitir acumular los solutos en las vesículas. Ellas ayudarían a condensar los solutos y a burlar el gradiente osmótico. En términos absolutos sólo hay cantidades apreciables de cromograninas A y B que podemos considerar importantes para esta labor.

La hipótesis de Karen Helle sólo pudo resolverse en parte cuando pudimos hacer experimentos con ratones sin cromogranina A (8), sin cromogranina B (9) y sin ambas (10). Por hacer corta la historia la naturaleza ha encontrado la forma de compensar, al menos parcialmente, la carencia una cromogranina: incrementando la expresión de la otra. Aun así vimos que cuando desaparece la cromogranina A (y se incrementa la B) se reduce la cantidad de catecolaminas en las vesículas -un 30%- y se acelera su liberación. Cuando la que desaparece es la cromogranina B (y se incrementa la A) también cae el contenido cuántico -otro 30%- pero ahora la secreción es más lenta. Es decir ambas graninas contribuyen a captar catecolaminas pero su diferente afinidad por los solutos altera la cinética con la que las catecolaminas se liberan.

Hace un par de años celebramos la boda de los ratones sin cromogranina A con los sin B. El resultado fue un ratón sin ambas con el que hemos estado trabajando

estos años. Los gránulos sólo contienen la mitad de las catecolaminas y parecen grandes y deformes a la microscopía electrónica, según nos contó el Dr. Rafael Luján. Es decir, las cromograninas son esenciales para mantener a las catecolaminas concentradas en los gránulos. Sin ellas los gránulos no son capaces de captar más catecoles, sin ellas el coctel intravesicular pierde uno de sus ingredientes principales.

### ***¿Cuál es la trascendencia de la cinética de la exocitosis?***

Cuando nosotros comenzamos a estudiar la exocitosis, utilizando técnicas amperométricas, partíamos de la asunción de que la única forma de alterar la respuesta trans-sináptica era incrementar el número de vesículas secretoras a liberar. Este concepto estaba muy extendido y suponía una mala conclusión de la teoría de la liberación cuántica de Bernard Katz. Sin embargo, en el año 2000 presentamos las primeras pruebas que probaban que pequeños cambios en la concentración de óxido nítrico en el medio que rodea a las células cromafines aisladas alteraba drásticamente la velocidad con la que se produce la exocitosis y, por ende, la concentración con la que las catecolaminas arriban a la célula postsináptica, un mecanismo mediado por GMPc (11). Estos estudios fueron extendiéndose a otros segundos mensajeros y a fármacos (12, 13). La diana del GMPc y del AMPc, o de hormonas como los estrógenos parece ser el control sobre el gradiente de pH existente a ambos lados de la membrana vesicular. Los protones, otro componente del coctel (14, 15).

Poco después demostramos que muchos fármacos, generalmente bases débiles con cierta liposolubilidad, eran capaces de acumularse en las vesículas secretoras y liberarse conjuntamente con las catecolaminas (y probablemente con otros neurotransmisores). Esta idea de "falso neurotransmisor" aplicado a fármacos cuyo mecanismo descrito no es este ( $\beta$ -bloqueantes, hidralacina, anfetaminas) (16-17) abre la puerta a una incipiente farmacología vesicular.

Si volvemos al título de esta breve reseña "*El coctel intravesicular o el camarote de los Hermanos Marx*" podemos concluir que nos encontramos con una organela maravillosa, la seña de identidad de todas las células secretoras. Nos fascina la forma en la que concentra solutos, en la medida que es dinámicamente capaz de retenerlos, en cómo esos solutos (catecolaminas, calcio, ATP y protones) se abrazan entre sí a la manera de los cuatro famosos cómicos. Nos fascina y nos mantendrá ocupados unos cuantos años más.

## La receta de un cóctel

Catecolaminas  $\approx 0,5-1$  M  
Falsos transmisores (al gusto)  
ATP  $\approx 120-250$  mM  
 $Ca^{2+} \approx 40\mu M$  40-80 mM  
Ascorbato  
Opioides  
Otros nucleótidos  
Enzimas  
Cromograninas  
Protones c.s.p pH = 5.5



Osmolaridad teórica  $\approx 1.500$  mOsm

Figura 4. Receta para empaquetar solutos en una organela de 200 nm de diámetro.

### Para leer más....

1. Winkler, H., and Westhead, EW. (1980) The molecular organization of adrenal chromaffin granules. *Neuroscience* **5**, 1803-1823.
2. Díaz-Flores, L. et al (2008) Histogenesis and morphofunctional characteristics of chromaffin cells. *Acta Physiol* **192**, 173-184.
3. Blaschko H, et al (1967) Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation. *Nature* **215**, 58-59
4. Helle, KB. et al (1985) Osmotic properties of the chromogranins and relation to osmotic pressure in catecholamine storage granules. *Acta Physiol Scand* **123**, 21-33
5. Kopell, WN. and Westhead, EW. (1982) Osmotic pressures of solutions of ATP and catecholamines relating to storage in chromaffin granules. *J Biol Chem.* **257**, 5707-5710.
6. Rodríguez del Castillo, A. et al (1988) Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules. *J Neurochem* **51**, 1696-703.
7. Leszczyszyn, DJ. (1990) Nicotinic Receptor-Mediated Catecholamine Secretion from Individual Chromaffin Cells - Chemical Evidence for Exocytosis. *J Biol Chem* **265**, 14736-14737

8. Montesinos, MS. et al (2008) The crucial role of chromogranins in storage and exocytosis revealed using chromaffin cells from chromogranin A null mouse. *J Neurosci* **28**, 3350-3358.
9. Díaz-Vera, J. et al (2010) Chromogranin B gene ablation reduces the catecholamine cargo and decelerates exocytosis in chromaffin secretory vesicles. *J Neurosci* **30**, 950-957.
10. Díaz-Vera, J. et al (2011) Chromogranins A and B are key proteins in amine accumulation but the catecholamine secretory pathway is conserved without them. *FASEB J* (en revisión).
11. Machado, JD. et al (2000) Nitric oxide modulates a late step of exocytosis. *J Biol Chem* **275**, 20274-20279.
12. Machado, JD. et al (2001) cAMP modulates the exocytotic kinetics and increases the quantal size in chromaffin cells. *Mol. Pharmacol.* **60**, 514-520.
13. Machado, JD. et al (2002) Non-genomic Regulation of the Kinetics of Exocytosis by Estrogens. *J Pharmacol Exp Ther* **301**, 631-637.
14. Camacho, M. et al (2006) Intragranular pH Rapidly Modulates Exocytosis in Adrenal Chromaffin Cells. *J Neurochem* **96**, 324-334.
15. Camacho, M. et al (2008) Intravesicular calcium release mediates the motion and exocytosis of secretory organelles: A study with adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem* **283**, 22383-22389.
16. Machado, JD. et al (2002) Hydralazine reduces the quantal size of secretory events by displacement of catecholamines from adrenomedullary chromaffin secretory vesicles. *Cir Res* **91**, 830-836.
17. Montesinos, MS. et al (2010) The quantal secretion of catecholamines is impaired by the accumulation of  $\beta$ -blockers into sympathetic secretory vesicles. *Br J Pharmacol* **159**, 1548-1556