Mecanismos moleculares implicados en la secreción de catecolaminas por las glándulas suprarrenales

Ruth Jaén, Manuel Pérez-Morán y Ricardo Borges

Departamento de Medicina Física y Farmacología.
Facultad de Medicina. Universidad de La Laguna. Tenerife.

Introducción

La exocitosis es un proceso que consiste en la fusión de una vesícula citoplasmática con la membrana celular y es el más común de los métodos que utilizan las células para secretar sustancias al exterior y para renovar su membrana. La exocitosis es un proceso celular universal que abarca desde las levaduras hasta las neuronas. La mayor parte de los neurotransmisores son liberados por exocitosis.

Las células cromafines de la médula suprarrenal constituyen un excelente modelo para el estudio de la neurosecreción. Estas células liberan catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) al torrente sanguíneo en respuesta a estímulos estresantes como el frío, el ejercicio, el miedo o las situaciones de hipoglucemia, de hipotensión o de alergia. Las catecolaminas antagonizan gran parte de estas acciones deletéreas inducidas por mediadores como la histamina o la bradicinina y nos protegen en las situaciones de estrés.

En particular, el uso de las células cromafines se ha revelado como un excelente método para el estudio del fenómeno exocitósico.

Los mecanismos moleculares implicados en la respuesta secretora se han ido dilucidando a lo largo de los últimos 35 años y constituyen un hermoso ejemplo de cómo el avance de la ciencia ha ido cambiando nuestra visión de la biología celular. A lo largo de los años sesenta y setenta se fueron estableciendo los requerimientos iónicos necesarios para desencadenar la secreción. Así, se supo que era el calcio el único elemento cuya presencia era necesaria (y suficiente) para que el proceso tuviera lugar. Tal es la dependencia del calcio que se acuñó el término acoplamiento excitación-secreción por la analogía con la contracción muscular[1]. El papel crucial del calcio se vio reforzado cuando se comenzaron los experimentos con células permeabilizadas. A finales de la década de los setenta, Baker y Knight descubrieron que si las células cromafines eran sometidas a descargas eléctricas de alto voltaje en la membrana de éstas se producían unos poros por los que podían difundir iones y pequeñas moléculas[2].

El uso de células permeabilizadas ha venido sirviendo para dilucidar algunos mecanismos moleculares implicados en el funcionamiento de la maquinaria secretora. Así, el concurso de la sinaptobrevina se estableció tras comprobarse que las toxinas botulínica y tetánica inhibían la secreción[3,4]. El papel de las distintas proteincinasas C, A y G se ha ido esclareciendo mediante la comparación entre los efectos sobre células intactas y permeabilizadas[5-7].

La llegada de las técnicas de *patch-clamp* con sus variantes ha servido para el estudio de los canales iónicos y la exocitosis por los métodos de capacitancia. La circunstancia de que la pipeta provoque el rápido dializado del citosol permite la aplicación de sustancias al interior celular y establecer su papel en el fenómeno secretor[8].

Buena parte de nuestro conocimiento, no obstante, está llegando de la mano de la biología molecular y de las técnicas de hibridación in situ[9].

Una característica que ha permitido el espectacular avance reciente sobre el esclarecimiento del fenómeno secretor es su universalidad. Buena parte de las proteínas implicadas en la exocitosis comparten papel en todas las células[10].

Acoplamiento excitación-secreción. La señal del calcio

Dos son los tipos de estímulos que recibe la médula suprarrenal: la descarga de los nervios esplácnicos y las sustancias secretagogas que llegan por vía hemática. La acetilcolina es el principal mediador de los nervios esplácnicos que, actuando sobre receptores nicotínicos,

produce la despolarización de la célula con la apertura de canales voltaje-dependientes para Na^+ y Ca^{2+}. La entrada de este último ion va a poner en marcha el proceso exocitósico.

El receptor nicotínico adrenomedular es del tipo neuronal[11] y su estimulación por fármacos agonistas va seguida de una rápida desensibilización (fig. 1). Las respuestas secretoras mediadas por receptores nicotínicos son enteramente dependientes del Ca^{2+} extracelular.

Diversas sustancias como la histamina[12,13], la bradicinina[12], la muscarina[13] o la angiotensina II[12] estimulan la secreción mediante la movilización adicional de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares. La capacidad de estos reservorios es pequeña si se compara con otras células como las musculares. Dependiendo de su localización, los reservorios intracelulares pueden mantener la secreción celular, durante unas decenas de segundos, en ausencia de calcio extracelular[13-15].

Los receptores para estas sustancias están acoplados a proteínas G y median sus respuestas mediante la movilización de inositoles fosfatos y la translocación de la PKC. Sin embargo, los ésteres de forbol que estimulan directamente la PKC potencian la secreción mediada por estímulos despolarizantes (agonistas nicotínicos o soluciones ricas en potasio), no alteran las mediadas por bradicinina y abolen las respuestas secretoras inducidas por histamina, angiotensina II o muscarina[12]. Estas observaciones ponen de manifiesto importantes diferencias en los mecanismos de transducción aparentemente similares.

La movilización del Ca^{2+} intracelular mediante cafeína o IP_3 ha sido utilizada para dilucidar el papel de estos reservorios. La cafeína provoca la liberación de catecolaminas de manera independiente del Ca^{2+} extracelular[13]. La forma en la que los rerservorios se recargan de Ca^{2+}, corrientes capacitativas, es aún poco conocida porque se desconoce el mediador que la pone en marcha, pero esta recarga ocurre en muy pocos segundos.

El papel fisiológico que los distintos canales de calcio desempeñan en la secreción fue objeto de amplio estudio en un reciente número de estas monografías[16], por lo que no nos parece oportuno volver a ahondar en el tema.

Las concentraciones intracelulares del Ca^{2+} vuelven a sus valores normales utilizando los mismos mecanismos de todas las células eucariotas: recaptación (calciosomas, retículo endoplásmico, mitocondrias y gránulos cromafines), intercambio Na^+-Ca^{2+} y la bomba de Ca^{2+} (ATPasa).

Las técnicas amperométricas nos ofrecen una "visión", a tiempo real, del fenómeno exocitósico

Nosotros hemos utilizado para nuestros estudios primordialmente este tipo de técnicas. La amperometría se basa en la detección electroquímica de los productos liberados. Muchas sustancias se oxidan instantáneamente si se les aplica un potencial eléctrico positivo. En nuestro caso, cada molécula de catecolamina produce dos electrones que son captados por el propio electrodo con el que se aplica el potencial. Los electrodos suelen construirse de carbón y pueden ser de gran tamaño, para estudios de superfusión de células o de glándulas suprarrenales[17-20], o muy finos con los que pueden fabricarse microsensores de muy pocos micrómetros de diámetro. La adquisición de señales se lleva a cabo mediante un potenciostato; éste es un amplificador modificado para mantener constante un potencial sobre el electrodo, lo cual permite ajustar el potencial de oxidación, en este caso, para las catecolaminas[21].

Las catecolaminas se almacenan en altísimas concentraciones, superiores a 500 mM, en el interior de los denominados gránulos cromafines. Unas 10.000 de estas estructuras vesiculares se encuentran distribuidas en el citoplasma de las células, aunque sólo una porción de ellas está lista para liberar su contenido. Las catecolaminas presentes en la médula suprarrenal son suficientes para, de liberarse, provocar la muerte del animal. Es, pues, imprescindible que las células cuenten con precisos mecanismos de control[22].

La secreción puede estimularse aplicando un secretagogo (una sustancia que estimula la secreción: acetilcolina, histamina, bario o soluciones despolarizantes) en la cercanía de la célula. En pocas décimas de segundo pueden observarse, en el osciloscopio, una serie de deflecciones que se corresponden con la oxidación de las catecolaminas liberadas por exocitosis desde los gránulos cromafines. Estas deflecciones, o espigas, poseen una morfología muy variable y es necesario realizar un análisis poblacional de varios cientos de espigas para inferir la concentración de los componentes solubles. De esta forma, se ha estimado la concentración de catecolaminas en torno a 550 mM.

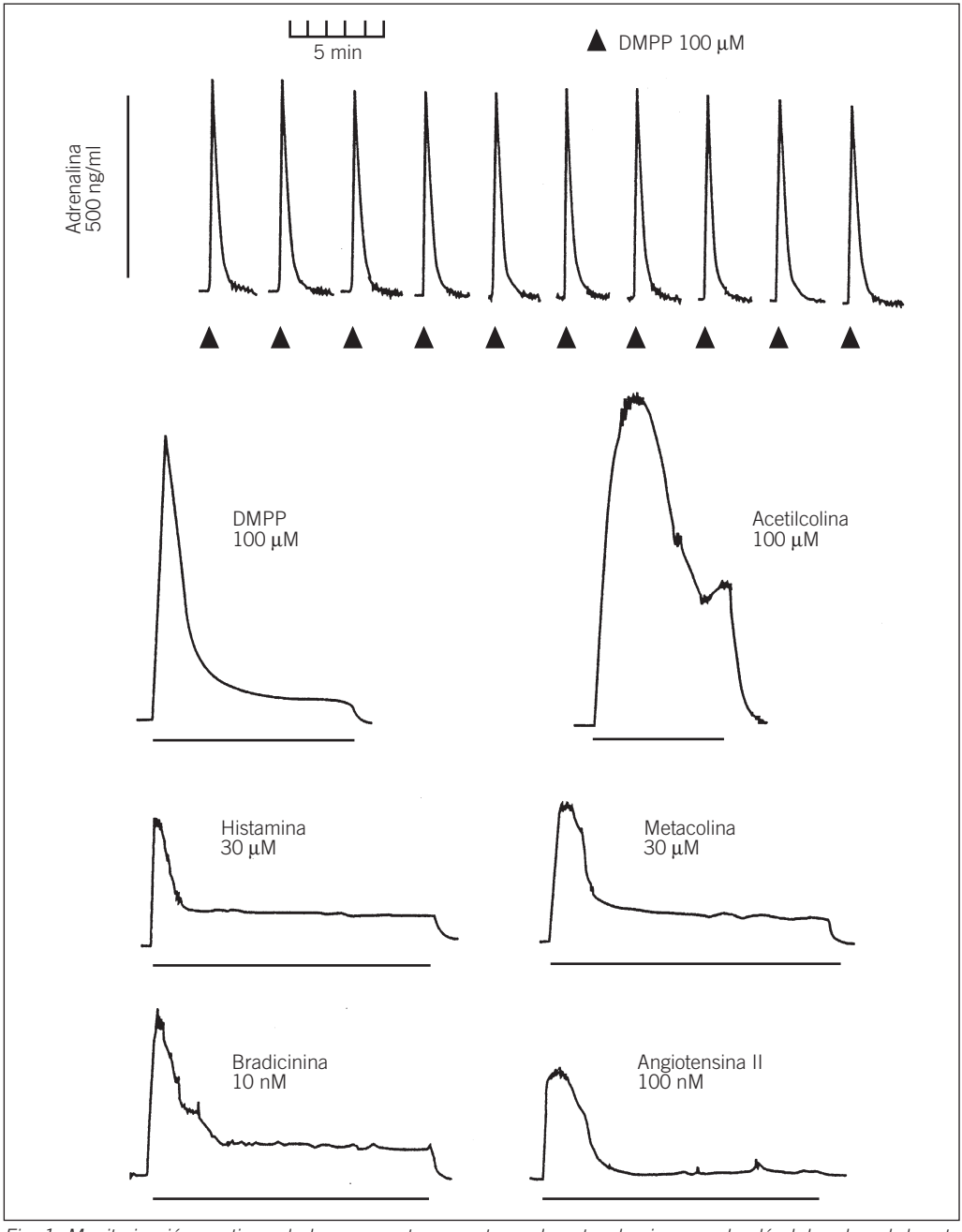

Fig. 1. Monitorización continua de las respuestas secretoras de catecolaminas por la glándula adrenal de rata perfundida. Se exponen algunos registros típicos obtenidos con detección electroquímica. En la parte superior se demuestra la reproducibilidad de las respuestas ante estímulos nicotínicos de corta duración (DMPP, dimetil-fenilpiperazinio) durante 10 s cada 8 min. En los trazos inferiores se observa la respuesta secretora ante diversos agonistas aplicados durante el tiempo señalado con la barra horizontal fina. La barra superior señala el tiempo (5 min) y la vertical la calibración en ng/ml de adrenalina.

Sabemos que el ATP (trifosfato de adenosina) se almacena en una proporción fija cuatro veces inferior, es decir unos 130 mM. Si además consideramos la alta cantidad de calcio (80 mM) y la presencia de proteínas, ascorbato y péptidos, no deja de parecer asombrosa la capacidad de almacenamiento que poseen estas pequeñas organelas[23,24].

Último estadio de la exocitosis. El poro de fusión. Papel de la matriz intragranular

Una vez que el gránulo se ha unido a la membrana puede ocurrir o no la exocitosis, ya que, si bien el proceso de acercamiento requiere de Ca^{2+} y de ATP, este último sólo depende del Ca^{2+}. Estudios con amperometría evidencian la presencia de un "pie" que es observable en un 30-50% de las espigas de secreción[23] (fig. 2). Durante unos 10 ms se forma un poro de fusión que une el espacio extracelular con el lumen granular. Este poro va a permitir la salida de la fracción de catecolaminas no complejadas (44 mM) calculándose que unas 34.000 moléculas pasan por el poro en cada ms. Se ha estimado en un 10% la adrenalina contenida en el gránulo que se encuentra en este estado libre.

El diámetro estimado del poro de fusión es de unos 2 nm, aproximadamente los valores estimados para un canal iónico. La naturaleza química de este poro de fusión, proteica o lipídica, sigue siendo materia de controversia. Se ha demostrado recientemente que la fusión puede ser reversible y que puede no producirse la exocitosis total[24].

El poro de fusión va a permitir la entrada de agua y de otros iones extracelulares al interior provocando el brusco hinchamiento y el ensanche del poro de fusión hasta formar una imagen en Ω, para posteriormente verter el contenido completamente al exterior. Sólo van a permanecer unidas a la membrana algunas fracciones de proteínas como la DBH o las cromograninas.

El gel compuesto por proteínas, ATP y catecolaminas se termina de disociar a continuación. La exocitosis transcurre en unos 10-30 ms y se liberan unas 350.000 moléculas de catecolaminas.

La altísima concentración de solutos intragranulares mencionada anteriormente permite calcular la osmolaridad en unos 800 mOsm. Esta hipertonicidad llevaría al hinchamiento del gránulo y a su rotura. Es plausible la presencia de mecanismos de complejación de los solutos entre sí formando una matriz que es visible a la microscopia electrónica.

Durante los últimos años se ha especulado acerca del papel fisiológico de la matriz intragranular. Su principal componente es la cromogranina A, una proteína acídica (pKa 5,5) que se libera en su práctica totalidad tras la exocitosis. Algunos de sus fragmentos poseen una potente actividad biológica[25], aunque no está demasiado clara la existencia de mecanismos de corte específico operantes. Sin embargo, la presencia de la matriz intragranular es común a muchas células, aunque su naturaleza química sea variable. Así, los mastocitos utilizan un gel de heparán sulfato para formar complejos de histamina y serotonina. El hecho de que ambos tipos celulares, mastocitos y cromafines, se comporten de manera similar ante cambios de temperatura, ambiente iónico[26] o cambios osmóticos[27] hace pensar que las cromograninas desempeñan un papel importante en el almacenamiento de las catecolaminas.

Recientemente se ha postulado que es posible que la matriz intragranular no limite su papel a la asociación pasiva de sus componentes solubles y que pueda ejercer un papel funcional en el equilibrio fracción libre/complejada. En este sentido, se ha descrito la presencia de un receptor para IP_3 en la membrana granular acoplado a la cromogranina A[28]. De ser así, es posible que un mediador celular pudiera alterar el grado de unión de las catecolaminas y el ATP a la matriz proteica. La cantidad de catecolaminas por gránulo no se alteraría, pero sí la velocidad en que éstas serían liberadas al medio externo. En una sinapsis esto se traduciría en un incremento de la concentración con la que el neurotransmisor llega a la neurona postsináptica y, por tanto, un incremento de la eficiencia sináptica.

El ciclo vital de los gránulos cromafines

Debido a que contienen proteínas de gran tamaño, los gránulos cromafines sólo pueden ser fabricados en el trans-Golgi aunque alcanzan su maduración una vez liberados al citoplasma. El proceso de maduración se lleva a cabo de una parte acidificando el contenido granular hasta un pH 5,5 y por otra recargándose de catecoles, purinas, ATP, ascorbato y, probablemente, péptidos. De igual forma, los gránulos constituyen un amplio reservorio de calcio cuyo papel fisiológico está aún por establecer.

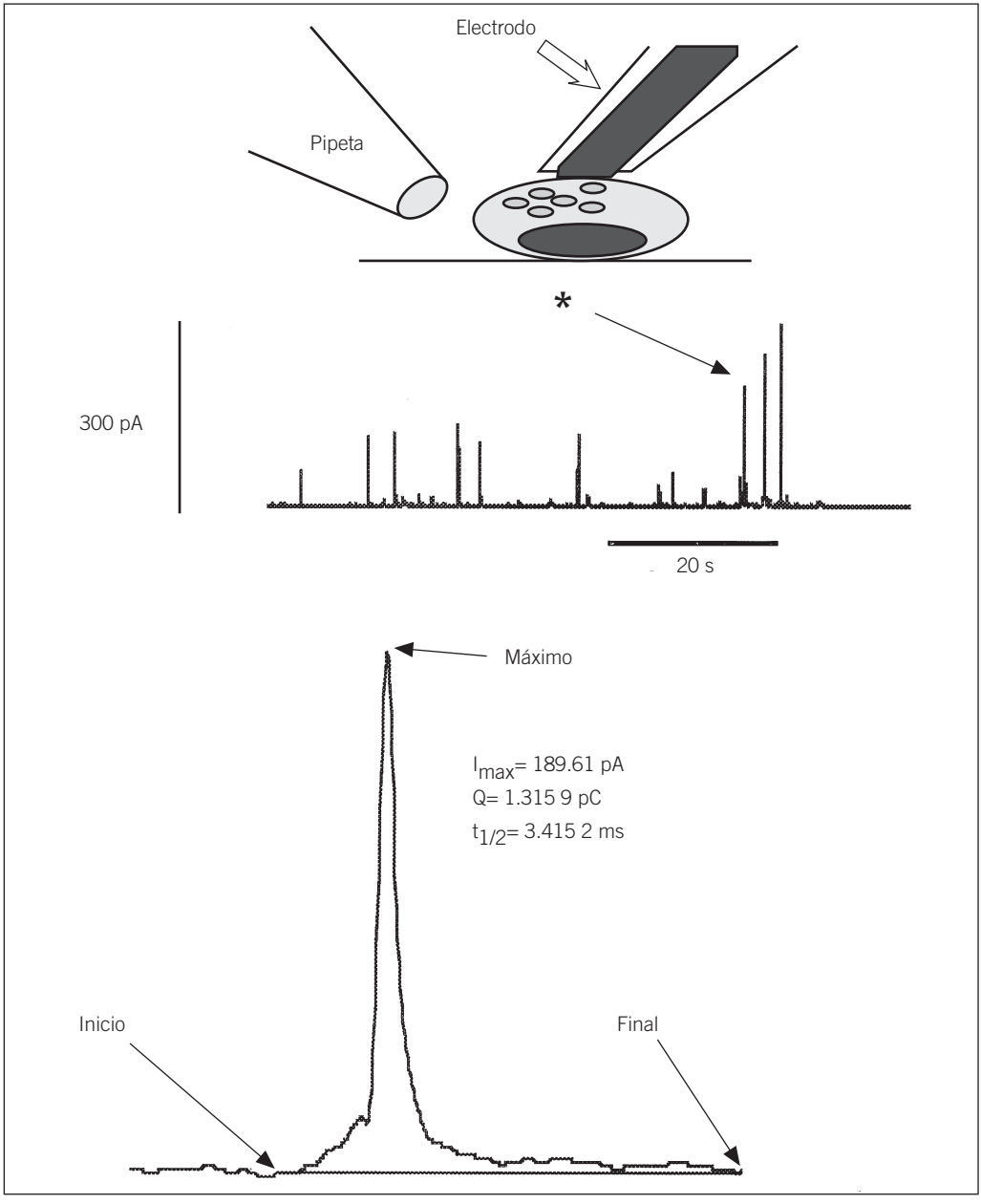

Fig. 2. Registro amperométrico de la respuesta exocitótica de una célula cromafín bovina. En el trazado superior se observa un registro obtenido tras la aplicación de Cl2Ba 5 mM durante 5 s. La secreción se evidencia en forma de espigas cuya morfología nos ofrece información acerca de los mecanismos de almacenamiento y de liberación. En la parte superior se expone la situación del electrodo y en la parte inferior un registro amplificado de la espiga señalada con el asterisco. De cada espiga se obtienen una serie de parámetros básicos: I_{max}, $t_{1/2}$ y Q, que se corresponden con la concentración de catecolaminas liberadas, la velocidad de secreción y la cantidad de aminas presentes en el gránulo. Las barras de calibración indican la corriente de oxidación (en nA) y el tiempo (en ms).

Como mencionábamos anteriormente, una fracción importante de gránulos (aproximadamente el 70%) no son susceptibles de ser liberados. De los restantes se distinguen al menos dos poblaciones en virtud de su capacidad para ser liberados.

Las células cromafines poseen un armazón de citosqueleto formado por fibras de actina que previene el acceso de los gránulos a la membrana plasmática[29]. La presencia de calcio facilita, además de la exocitosis, el movimiento de vesículas desde un compartimiento al otro[30]. El proceso de desensamblaje del armazón de actina, aunque sigue siendo objeto de debate, parece estar mediado por una proteína activada por calcio, la escinderina[9], que corta la actina. Esta reacción está acelerada por la proteincinasa C y el ATP, ya que los ésteres de forbol la favorecen y la ausencia de ATP la impide. De cualquier manera, el desensamblaje de la actina puede ser condición necesaria, pero no suficiente para la secreción.

Estudios llevados a cabo con técnicas amperométricas y de capacitancia permiten distinguir dos[31] o tres[32] diferentes poblaciones de gránulos en virtud de su rapidez para secretar. Un primer grupo de gránulos, estimado en unos 20, puede ser liberado casi de inmediato y podríamos denominarlo de liberación ultrarrápida[32], y un segundo grupo de pocos cientos de gránulos lo hace en pocos segundos[30-32]. La exocitosis de ambos grupos de gránulos sólo requiere de la elevación del calcio. Existe, no obstante, una gran controversia acerca de la concentración de calcio necesaria para producir la exocitosis. Mientras las pruebas bioquímicas apuntan a valores bajos, unos 1-15 μM[2,33], datos recientes parecen evidenciar que el enorme gradiente extra-intracelular unido a la baja difusión del calcio[34] pueden llevar a crear microdominios de alto calcio (varios cientos de μM) en donde se producirían "zonas calientes" de secreción[35,36]. El resto de los gránulos precisa ser transportado hacia la vecindad de la membrana, proceso que requiere Ca^{2+} y ATP, y los gránulos se liberan a lo largo de decenas de segundos[30].

El gránulo, una vez secretado, es retraído hacia el interior celular y sus membranas son recicladas para formar nuevos gránulos. Este proceso, denominado endocitosis, tiene por objeto mantener la superficie de la membrana constante y ahorrar materiales. La endocitosis es, a su vez, un proceso dependiente del calcio. No obstante, el gránulo recuperado retiene gran parte de sus componentes de membrana, puede recaptar catecolaminas e, incluso, volver a secretar si se aplica un estímulo secretagogo lo suficientemente intenso[37]. En su viaje de vuelta al Golgi estas vesículas, recubiertas de clatrina, pueden fundirse con lisosomas formando endosomas, grandes vesículas claras presentes en el citoplasma. Estas grandes vesículas claras se aprecian claramente tras la estimulación intensa de la célula.

En las células cromafines se distingue otra clase de vesículas, las vesículas claras pequeñas. Éstas son muy abundantes en neuronas simpáticas y en la línea de feocromocitoma[38] (un tumor de células cromafines) de rata PC12. El ciclo celular y, sobre todo, la función de estas vesículas, continúan siendo un tema oscuro.

El complejo de fusión

Toda una larga serie de proteínas han sido implicadas en el disparo y regulación de la exocitosis. A lo largo de la última década este rompecabezas parece haber ido acomodando sus piezas. No obstante, estamos muy lejos de conocer cómo funciona realmente. Aunque no existe un consenso sobre dónde ubicar cada una de las proteínas, en la figura 3 se expone un esquema acerca de cómo concebimos el complejo de fusión en la actualidad. Antes de la llegada del gránulo a su "punto de atraque" en la membrana celular, precisa de una proteína dependiente de GTP, la Rab 3A, sita en la membrana del gránulo de la que se disociará antes de la fusión. El NSF (*n-ethylmaleimidesensitive factor*) está íntimamente acoplado a las SNAP (α, β y γ) antes de asociarse al SNARE (receptor para SNAP). El SNARE esta compuesto por una serie de proteínas cuya función continúa aún sin establecerse. Las principales son la sinaptobrevina y la sinaptotagmina presentes en la membrana granular y la SNAP-25 y la sintaxina que lo están en la cara interna de la membrana plasmática[39].

La sinaptobrevina es el sustrato de actuación de las toxinas botulínica y tetánica. La sinaptotagmina parece ser el sensor de calcio que desencadena la exocitosis. En las terminaciones nerviosas simpáticas parece asociarse a los canales de calcio tipo N[40], pero la colocalización no está tan clara en la célula cromafín donde, además, el canal N no parece estar implicado en la secreción de catecolaminas[20].

La sinaptofisina es la más abundante de las proteínas de la membrana granular. Su función, sin embargo, continúa siendo un miste-

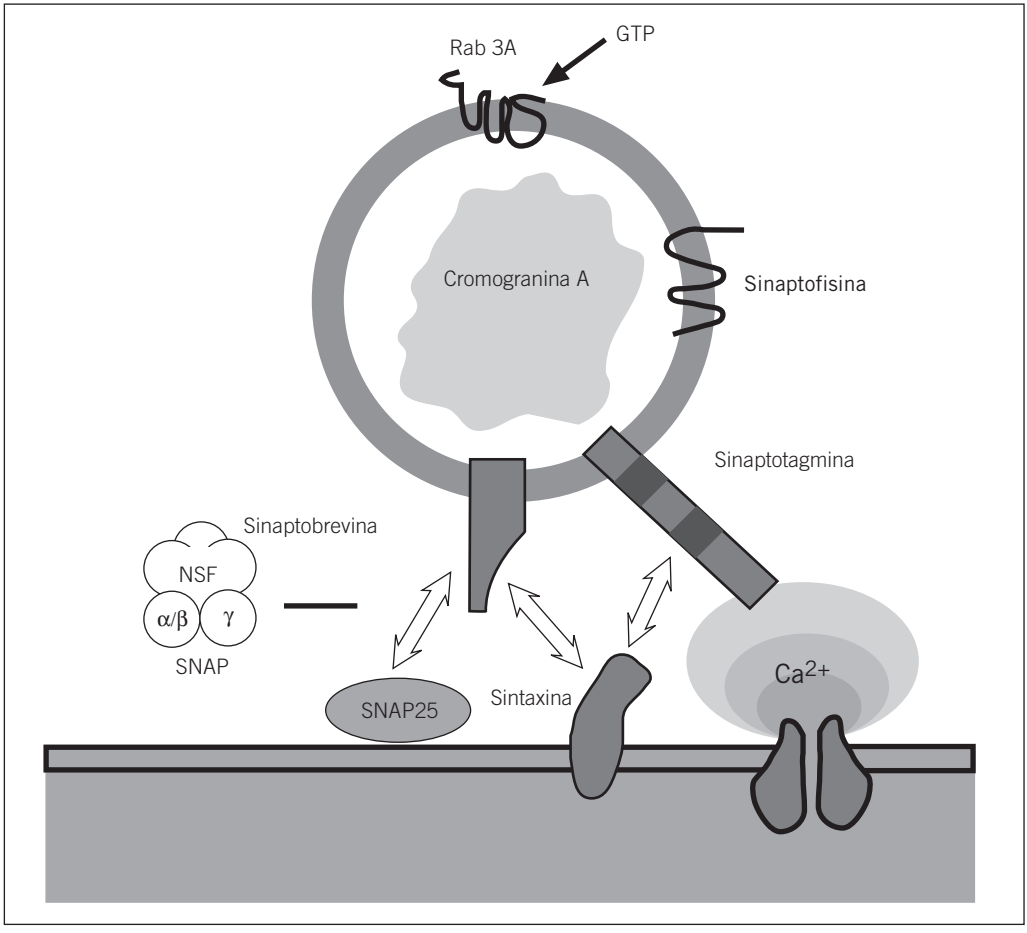

Fig. 3. Complejo de fusión. Se representan algunas de las proteínas putativas que intervienen en el proceso de atraque y fusión del gránulo cromafín. El tipo de canal del calcio y su posible colocalización son objeto de debate.

rio. Su capacidad para formar poros en membranas lipídicas ha hecho postular la hipótesis de que se trata de la iniciadora del poro de fusión. También se ha especulado con su participación en el proceso de endocitosis[39] (fig. 3).

BIBLIOGRAFÍA

1. Douglas WW, Rubin RP. The role of calcium in the secretory response of adrenal medulla to acetylcholine. J Physiol 1961; 159: 40-57.
2. Knight DE, Baker PF. Calcium-dependence of catecholamine release from bovine adrenal medullary cells after exposure to intense electric fields. J Memb Biol 1982; 68: 107-140.
3. Knight DE, Tonge DA, Baker PF. Inibition of exocytosis in bovine adrenal medullary cells by botulinum toxin type D. Nature 1985; 317: 719-721.
4. Penner R, Neher E, Dreyer F. Intracellularly injected tetanus toxin inhibits exocytosis in bovine adrenal chromaffin cells. Nature 1986; 324: 76-78.
5. Knight DE, Baker PF. The phorbol ester TPA increases the affinity of exocytosis for calcium in "leaky" adrenal medullary cells. FEBS Lett 1983; 160: 98-100.
6. Morita K, Dohi T, Kitayama S, Tsujimoto A. Mechanism of cyclic AMP facilitation of stimulation-evoked catecholamine release in adrenal chromaffin cells. 1. Evidence for enhancement of evoked increase in cytosolic free Na+ con-

centration by cyclic AMP elevation. Neurochem Int 1991; 19: 81-85.
7. Burgoyne RD, Handel SE. Activation of exocytosis by GTP analogues in adrenal chromaffin cells revealed by patch-clamp capacitance measurement. FEBS Lett 1994; 344: 139-142.
8. Fenwick EM, Marty A, Neher E. Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. J Physiol 1982; 331: 599-635.
9. Trifaró JM, Vitale ML. Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. Trends Neurosci 1993; 16: 466-472.
10. Ferro-Novick S, Jahn R. Vesicle fusion from yeast to man. Nature 1994; 370: 191-193.
11. Boulter J, O'Shea-Greenfield A, Duvoisin RM, Connally JG, Wada E, Jensen A et al. α3, α5 and β4: three members of the rat neuronal nicotinic acetylcholine receptor-related gene family form a gen cluster. J Biol Chem 1990; 265: 4.472-4.482.
12. Álvarez C, Lorenzo C, Santana F, Borges R. Interaction between G-protein-operating receptors eliciting secretion in rat adrenals. Biochem Pharmacol 1997; 53: 317-325.
13. Finnegan JM, Borges R, Wightman RM. Comparison of cytosolic Ca^{2+} and exocytosis response from single rat and bovine chromaffin cells. Neuroscience 1996; 3: 833-846.
14. Borges R. Ionic mechanisms involved in the secretory effects of histamine in the rat adrenal medulla. Eur J Pharmacol 1993; 241: 194-198.
15. O'Sullivan AJ, Cheek TR, Moreton RB, Berridge MJ, Burgoyne RD. Localization and heterogeneity of agonist-induced changes in cytosolic calcium concentration in single bovine adrenal chromaffin cell from video imagen of fura2. EMBO J 1989; 8: 401-411.
16. García AG, editor. Farmacología de los canales iónicos. Monografías Dr. Antonio Esteve, n.º 17. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve, 1995.
17. Borges R, Sala F, García AG. Continuous monitoring of catecholamine release by cat adrenals. J Neurosci Meth 1986; 16: 289-300.
18. Borges R. Histamine H1 receptor activation mediates the preferential release of adrenaline in the rat adrenal gland. Life Sci 1994; 54: 631-640.
19. Cheek TR, Burgoyne RD. Nicotine-evoked disassembly of cortical actin filaments in adrenal chromaffin cells. FEBS Lett 1986; 207: 110-114.
20. López MG, Albillos A, De la Fuente MT, Borges R, Gandía L, Carbone E et al. Localized L-type calcium channels control exocytosis in cat chromaffin cells. Plügers Arc 1994; 427: 348-354.
21. Wightman RM, Jankowski JA, Kennedy R, Kawakoe KT, Schroeder TJ, Leszczyszyn DJ et al. Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 10.754-10.758.
22. Borges R. The rat adrenal gland in the study of the control of catecholamine secretion. Sem Cell Develop Biol 1997; 8: 113-120.
23. Schroeder TJ, Borges R, Finnegan JM, Pihel K, Amatore C, Wightman RM. Temporary resolved, independent stages of individual exocytotic secretion events. Biophys J 1996; 70: 1.061-1.068.
24. Albillos A, Dernick G, Horstmann H, Almers W, Álvarez de Toledo G, Lindau M. The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. Nature 1997; 389: 509-512.
25. Helle KB, Serck-Hanssen M, Aardal S. Functional aspects of the adrenal medullary chromogranins. Neuro Int 1993; 4: 353-360.
26. Pihel K, Travis ER, Borges R, Wightman RM. Exocytotic release from individual granules exhibits similar properties at mast and chromaffin cells. Biophys J 1996; 71: 1.633-1.640.
27. Borges R, Travis ER, Hoechsttetler SE, Wightman RM. Effects of external osmotic pressure on vesicular secretion from bovine adrenal medullary cells. J Biol Chem 1997; 272: 8.325-8.331.
28. Blondel O, Bell GI, Seino S. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, secretory granules and secretion in endocrine and neuroendocrine cells. Trends Neurosci 1995; 18: 157-161.
29. Martin TFJ. Stages of regulated exocytosis. Trends Cell Biol 1997; 7: 271-276.
30. Neher E, Zucker RS. Multiple calcium-dependent processes related to secretion bovine chromaffin cells. Neuron 1993; 10: 21-30.
31. Parsons TD, Coorssen JR, Horstmann H, Almers W. Docked granules, the exocytic burst and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells. Neuron 1995; 15: 1.085-1.096.
32. Horrigan FT, Bookman RJ. Releasable pools and the kinetics of exocytosis in adrenal chromaffin cells. Neuron 1994; 13: 1.119-1.129.
33. Morgan A, Burgoyne RD. Common mechanisms for regulated exocytosis in the chromaffin cells and the synapse. Sem Cell Develop Biol 1997; 8: 141-149.
34. Sala F, Hernández Cruz A. Ca^{2+} diffusion modeling in spherical neuron: relevance of buffering properties. Biophys J 1990; 57: 313-324.
35. Schroeder JT, Jankowski JA, Senyshyn J, Holz RW, Wightman RM. Zones of exocytosic release on bovine adrenal medullary cells in culture. Biol Chem J 1994; 24: 17.215-17.220.
36. Robinson IM, Finnegan J, Monck J, Wightman RM, Fernández JM. Colocalization of calcium entry and exocytotic release sites in adrenal chromaffin cells. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 2.474-2.478.
37. Von Grafenstein H, Borges R, Knight DE. The effect of botolinium toxin type D on the triggered

and constitutive exocytosis/endocytosis cycles in cultures of bovine adrenal medullary cells. FEBS Lett 1986; 298: 118-122.
38. Nimomiya Y, Kishimoto T, Yamazawa T, Hiroshi I, Miyashita Y, Kasai H. Kinetic diversity in the fusion of exocytotic vesicles. EMBO J 1997; 16: 929-934.
39. LLona I. Synaptic like microvesicles: do they participate in regulated exocytosis? Neurochem Int 1995; 3: 219-226.
40. Sheng ZH, Retting L, Cook T, Catterall WA. Calcium-dependent interaction of N-type calcium channel with the synaptic core complex. Nature 1996; 379: 451-454.

DISCUSIÓN

V. Ceña: Cuando has hablado del efecto de la temperatura, aparte de que a 37 ºC se disocia mucho mejor el complejo granular, hay otra serie de cambios que ocurren en la célula. Por ejemplo, la temperatura de transición de fase de la membrana para la célula cromafín bovina es de 31 ºC, lo que significa que a 37 ºC la membrana es mucho más fluida y se facilitan mucho más los fenómenos de fusión. Existe también la probabilidad de que el sistema SNAP-SNARE, a la hora de facilitar los fenómenos de fusión, funcione mejor a 37 ºC. En primer lugar, ¿qué parte considerarías que es relevante, en cuanto a la disociación del complejo de la matriz del gránulo, una vez que ha sido producida la exocitosis? Y, en segundo lugar, ¿qué valor le darías a una mejoría temperatura-dependiente de los mecanismos moleculares que llevan a la exocitosis?

R. Borges: El incremento del número de espigas secretoras observado tras el cambio de temperatura es probablemente dependiente de modificaciones ejercidas sobre la maquinaria secretora. Estos cambios pueden ser la aceleración del transporte de gránulos hasta la membrana celular e igualmente incrementar la afinidad de los mismos por el complejo de fusión, teoría del SNARE. Sin embargo, nosotros estamos observando un notable incremento en la propia velocidad de expulsión del contenido intragranular. Resulta difícil pensar que estos cambios sean motivados por factores extragranulares como el SNARE. La hipótesis que nos parece más plausible sería la de una interacción directa sobre la constante de disociación de las catecolaminas con la matriz proteica intragranular.

A. Zorzano: ¿Hasta qué punto las proteínas sintaxinas, SNAP-25, etc., son específicas y exclusivas de las vesículas secretoras? ¿Se encuentran también en otros compartimientos endosomales?

R. Borges: El gran número de proteínas que existen hace casi imposible responder de una forma general a esta pregunta. La exocitosis, tanto la constitutiva como la inducible, es dependiente de casi todas las proteínas que se han descrito. Algunas de ellas también participan en la fusión de organelas dentro de la célula, de forma independiente de los mecanismos de exocitosis. Por esta razón, creo que la fusión es un fenómeno lo suficientemente general como para que la totalidad de las proteínas estén implicadas de una forma bastante universal.

A. Zorzano: Has comentado que estas vesículas proceden del aparato de Golgi y no de endosomas. ¿Qué evidencia experimental apoya dicha afirmación?

R. Borges: Los gránulos poseen proteínas grandes y péptidos para los que no existen transportadores en la membrana del gránulo, lo que obliga a pensar que proceden del aparato de Golgi. También en neuronas simpáticas, donde existe transporte axoplásmico, se observa este transporte en vesículas densas o los gránulos, lo que conlleva a pensar que sea tributario a esta vía. Sin embargo, están descritas las *sinaptic-like vesicles,* estas vesículas pequeñas recubiertas inicialmente de clatrina, que probablemente sean producto bien de la endocitosis o bien de endosomas situados cerca de la membrana celular, refiriéndonos a neuronas largas.

V. Sánchez Margalet: ¿Habéis estudiado el posible papel del ATP y de algunos de los péptidos, incluida la proteína de cromogranina, que se hallan a tan alta concentración?

R. Borges: Lo primero que llama la atención es la estequiometría tan fija 1/4, que da la impresión de que, de alguna manera, el ATP, la cromogranina y las catecolaminas están interactuando de una forma bastante estequimétrica también. Mi opinión, que no he podido contrastar, es que este ATP se puede llegar a hidrolizar de forma espontánea, aunque sea en un bajo porcentaje. Cambios bruscos de pH y de la concentración del calcio pueden llegar a hidrolizar el ATP e incrementar estas fuerzas de disociación. Los experimentos de

temperatura, los realizados con angiotensina II, o simplemente aquellos en los que se aumenta la cantidad de IP_3, refuerzan esta hipótesis.

V. Sánchez Margalet: Dado que las células cromafines poseen receptores purinérgicos, mi pregunta se refería concretamente a si existían estudios del posible papel de estas sustancias una vez se han secretado.

R. Borges: Se sabe que la activación de los receptores purinérgicos inhibe la secreción. Sin embargo, el problema radica en la dificultad de depletar los gránulos de ATP sin inducir la muerte de la célula.

J.M. Baeyens: Me consta que habéis trabajado con PKC pero, en cambio, no has hablado de fenómenos de fosforilación y de su implicación sobre la liberación.

R. Borges: Aunque realizamos algunos estudios con proteincinasa C sobre la transducción receptorial, he preferido no abordar este tema por tratarse de una línea de investigación complementaria para nuestro grupo. Sin embargo, me gustaría destacar que resulta curioso, por ejemplo, observar que tras la incubación de células con concentraciones muy bajas de cualquiera de los ésteres de forbol, las respuestas secretoras inducidas por potasio se incrementan. Sin embargo, los ésteres de forbol no afectan a las respuestas secretoras inducidas por bradicinina mientras que estos activadores de la PKC abolen las respuestas a la histamina, a la angiotensina II o a la metacolina. Esto nos llamó mucho la atención, y nos llevó a pensar que probablemente estemos hablando de distintas dianas dentro de la célula. Estos experimentos los realizamos en glándulas perfundidas y es muy difícil hacer bioquímica en estas condiciones.