

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

CARACTERIZACION DE DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE GRANULOS

CROMAFINES EN MEDULA ADRENAL DE BOVINO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O

PRESENTA:
JUAN CARLOS GOMORA MARTINEZ

SEPTIEMBRE DE 1991



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Neuroquímica del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N., bajo la dirección de la Dra. Dalila Martinez de Muñoz.

Durante la realización del trabajo el autor contó con apoyo económico de Beckman Instruments Inc.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Dalila Martínez de Muñoz por la dirección de esta tesis, por el apoyo que siempre me brindó, y sobre todo por la invaluable experiencia que representó realizar este trabajo en su laboratorio.

A el Dr. Alfredo Fería por su valiosa ayuda en el análisis de las micrografías electrónicas de las fracciones granulares.

A la M. en C. Luz Maria Navarro, del Departamento de Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, quien realizó la cuantificación de catecolaminas por el método de HPLC.

Al M. en C. Ricardo Mondragón y la Q.F.B. Sirenia González de la Unidad de Microscopía Electrónica del CINVESTAV por su intervención en el procesamiento de las muestras para la obtención de las micrografías electrónicas

Al Q.F.B. Oscar Chávez por hacerme partícipe de sus conocimientos en el manejo de las diferentes técnicas empleadas en este trabajo, así como por sus valiosos consejos y gran amistad.

A la Biol. Aurora Candelario Martínez por sus consejos y gran apoyo para mi formación como estudiante de ciencia.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Javier Soriano, José Luis Fernández y José Carlos Guadarrama, con quienes compartí momentos agradables y que de alguna manera contribuyeron al desarrollo de éste trabajo.

De manera muy especial a Rosa Maria García por su amistad y paciencia en la transcripción de éste escrito.

Muchas gracias.

DEDICO ESTA TESIS

Especialmente a mis padres: Juan Gómora e Isabel Martínez por ser mi más grande estímulo en esta vida y de quienes he recibido siempre su apoyo para alcanzar aquellas empresas que he decidido emprender.

A mis hermanos: José, Enrique, Luz, Angela, Jesús, Jaime y Guadalupe con quienes he compartido buenos y malos momentos sin dejar de apoyarnos mutuamente.

A todas aquellas personas que de alguna manera me han alentado siempre a seguir adelante.

INDICE

A. INTRODUCCION.....	1
1. LA GLANDULA ADRENAL.....	1
2. CELULAS CROMAFINES.....	1
2.1. LAS CELULAS CROMAFINES COMO UN MODELO EXPERIMENTAL.....	2
2.2. CELULAS CROMAFINES Y ESTRES.....	3
3. COMPOSICION DE LOS GRANULOS CROMAFINES.....	3
3.1. CATECOLAMINAS.....	5
3.2. CROMOGRANINAS.....	6
3.3. DOPAMINA β -HIDROXILASA Y Mg^{++} ATPASA.....	6
3.4. ACETILCOLINESTERASA.....	7
3.5. FUNCION FISIOLÓGICA DE LA ACETILCOLINESTERASA.....	8
4. SUBPOBLACIONES DE GRANULOS CROMAFINES.....	8

B. OBJETIVO.....	10
C. METODOLOGIA.....	11
1. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR.....	11
1.1. PURIFICACION DE GRANULOS CROMAFINES EN AUTOGRADIENTE DE PERCOLL.....	13
1.2. SEPARACION DE GRANULOS CROMAFINES EN GRADIENTE DISCONTINUO DE PERCOLL.....	13
2. CARACTERIZACION DE LAS FRACCIONES GRANULARES.....	14
2.1. CARACTERIZACION MORFOLOGICA.....	14
2.2. CARACTERIZACION BIOQUIMICA.....	15
2.2.1. CUANTIFICACION DE CATECOLAMINAS.....	15
2.2.2. DETECCION DE PROTEINAS Y ENZIMAS.....	16
3. APARATOS, SOLUCIONES Y REACTIVOS.....	17

D. RESULTADOS.....	18
1. PURIFICACION DE GRANULOS CROMAFINES EN AUTOGRADIENTE DE PERCOLL.....	18
2. SEPARACION DE GRANULOS CROMAFINES EN GRADIENTE DISCONTINUO DE PERCOLL.....	19
2.1. CORRELACION DE LA MORFOLOGIA Y EL CONTENIDO DE CATECOLAMINAS DE LAS FRACCIONES GRANULARES.....	19
2.2. CARACTERIZACION BIOQUIMICA.....	24
E. DISCUSION.....	40
1. PURIFICACION DE GRANULOS CROMAFINES EN AUTOGRADIENTE DE PERCOLL Y SEPARACION EN GRADIENTE DISCONTINUO DE PERCOLL.....	40
F. CONCLUSIONES.....	47
G. BIBLIOGRAFIA.....	49

A. INTRODUCCION.

1. LA GLANDULA ADRENAL.

La glándula adrenal produce múltiples productos hormonales con actividades biológicas que varían desde efectos sobre la presión sanguínea hasta el control del metabolismo intermediario. La regulación de tales procesos involucra mecanismos locales, centrales y periféricos (James, 1979).

La glándula adrenal se localiza sobre los riñones y está formada por la corteza y la médula. La primera es responsable de la síntesis de hormonas esteroides como los glucocorticoides, mineralocorticoides y hormonas sexuales (Brooks, 1979). La segunda se especializa en la síntesis, almacenaje y secreción de catecolaminas y neuropéptidos (Winkler, et al., 1986).

2. CELULAS CROMAFINES.

Las células cromafines son los elementos tisulares principales de la médula adrenal y debido a sus similitudes con las neuronas simpáticas del sistema nervioso autónomo (origen neural y secreción) son denominadas *paraneuronas*. Por ello gran parte de lo que es conocido acerca de la producción y secreción de neurotransmisores y hormonas se ha elucidado inicialmente en células cromafines (Carmichael, 1986).

En la médula adrenal existen dos tipos de células cromafines: las que contienen gránulos de adrenalina (células A) y las que presentan gránulos de noradrenalina (células B) (Coupland y Hopwood, 1966a). Por microscopía electrónica se pueden diferenciar fácilmente ambos tipos de células, cuando se fijan con glutaraldehído y tetróxido de osmio: las noradrenérgicas muestran gránulos más electrodensos debido a que la noradrenalina reacciona más fuertemente con los fijadores y en consecuencia las células adrenérgicas se identifican fácilmente por contener gránulos más claros (Bader, 1982).

2.1. LAS CELULAS CROMAFINES COMO UN MODELO EXPERIMENTAL.

Las células cromafines adrenales son consideradas un modelo experimental para los estudios de neurosecreción por varias razones, ellas se obtienen fácilmente y en cultivo se han utilizado ampliamente para caracterizar varios aspectos de este proceso: biosíntesis de los gránulos cromafines, transporte, fusión con la membrana plasmática, exocitosis y endocitosis. Asimismo, se han empleado para investigar el efecto de factores tróficos como el factor de crecimiento nervioso (Levi Moltancini, 1987) y neuropéptidos: sustancia P y encefalinas (Livett, et al., 1981). Además, estas células participan en algunos procesos fisiológicos relevantes como el estrés (Carmichael y Winkler, 1985). Así, se ha propuesto que péptidos provenientes de la hidrólisis de las cromograninas A inhiben la secreción colinérgica por lo que han sido considerados como péptidos anti estrés (Simon, et al 1988).

2.2 CELULAS CROMAFINES Y ESTRES.

Durante el estrés la estimulación por acetilcolina provoca que las células cromafines viertan su contenido intragranular al torrente sanguíneo. En consecuencia, la concentración normal de adrenalina en la sangre se incrementa 300 veces, lo que permite su interacción con receptores específicos de varias células y órganos, incluyendo el cerebro. Además la secreción de la glándula adrenal produce incremento de la frecuencia respiratoria, de la presión sanguínea así como aumento de la liberación de glucosa en el hígado para la actividad muscular. Estas reacciones constituyen la respuesta denominada *de pelea o escape* que permiten al organismo combatir al agresor ó huir del peligro (Carmichael y Winkler, 1985).

3. COMPOSICION DE LOS GRANULOS CROMAFINES.

Los almacenes de las células cromafines son pequeñas vesículas, denominadas gránulos cromafines cuyo tamaño varia de 200 a 800 μm de diámetro (Coupland, 1968 y Eagles, et al 1977) y una sola célula contiene de 30 a 34 mil vesículas (Phillips, 1982). Se ha estudiado intensamente la composición del contenido intragranular de estos orgánulos y se ha calculado la concentración molar de los constituyentes de un gránulo cromafín, la cual se muestra en la Tabla 1.

TABLA 1

CONTENIDO RELATIVO DE MOLECULAS EN UN GRANULO CROMAFIN*

Constituyente	Membrana	Contenido soluble
Catecolaminas		3'000,000
Nucleótidos		930,000
Calcio		90,000
Acido Ascórbico		120,000
Cromogranina A		5,000
Cromogranina B		80
Péptidos que contienen encefalinas:		
equivalentes de Leu y Met encefalinas.		4,000
Péptidos de 18.2 kilodaltones		150
Péptidos de 8.3 kilodaltones		430
Péptidos de 5.3 kilodaltones		660
Encefalinas libres		
(hexa-hepta y octapéptidos)		260
Neuropéptido Y		428
Dinorfina		9
Neurotensina		0.8
Substancia P		0.4
Dopamina β -hidroxilasa	210	140
Citocromo b ₅₆₁	1750	

*Winkler, et al., 1986.

3.1. CATECOLAMINAS

Las catecolaminas: adrenalina, noradrenalina y dopamina son los principales constituyentes moleculares de los gránulos cromafines y por ello son marcadores específicos de tales estructuras. La concentración de catecolaminas dentro de los gránulos es extremadamente alta, del orden de 600 mM (Bader, 1982) lo que equivale a la concentración específica de $2.5 \mu\text{mol/mg}$ de proteína. Además, se ha demostrado que el calcio es el catión más abundante de la matriz granular (Phillips, et al 1977). Por resonancia magnética nuclear (Granot, 1978) se puso en evidencia la formación de complejos entre catecolaminas, ATP y calcio *in vitro*, en proporción de 33:4.5:1, respectivamente.

Actualmente, se acepta que la presencia de gránulos adrenérgicos y noradrenérgicos en las células cromafines varían en función de su localización y de la edad del animal. En los mamíferos, la cantidad de gránulos adrenérgicos es menor en la infancia y aumenta hasta la edad adulta (Stanton y Woo, 1978). La concentración de dopamina dentro de los gránulos cromafines es mínima, y excepto que es el precursor de la noradrenalina, no se le ha asignado una función fisiológica precisa (Dalmaz y Peyrin, 1978).

3.2 CROMOGRANINAS.

La cromogranina A es la proteína más concentrada de la matriz gránular (Winkler, 1976; Hogue-Angeletti, 1977) y representa el 40% de las proteínas solubles por lo que se considera también un marcador específico (Winkler, et al, 1974). En los gránulos cromafines existe además la cromogranina B, sin embargo esta se presenta en pequeñas cantidades. Se ha sugerido que la función de las cromograninas es regular la presión osmótica intragranular (Helle, et al., 1985).

3.3. DOPAMINA β -HIDROXILASA Y Mg^{++} ATPasa.

Los gránulos contienen numerosas enzimas localizadas en la membrana o en el contenido granular. La dopamina β -hidroxilasa (DBHD) es la enzima que cataliza la β -hidroxilación de la dopamina, el último paso en la biosíntesis de la noradrenalina (Kaufman y Friedman, 1965) y es considerada marcador específico granular porque se encuentra tanto en el contenido soluble como en la membrana granular (Winkler, 1986). Otra enzima presente en la membrana granular es la ATPasa dependiente de Mg^{++} , responsable del gradiente transmembranal de pH y del potencial de membrana (Kirschner, 1975 y Phillips, 1982).

3.4. ACETILCOLINESTERASA.

Gratzl y colaboradores (1981 y 1984) han demostrado que los gránulos cromafines contienen actividad de acetilcolinesterasa (AChE), la cual puede ser liberada junto con adrenalina bajo diferentes condiciones *in vitro*. La presencia de esta enzima en los gránulos cromafines ha sido difícil de demostrar, debido a que se encuentra más concentrada en otros compartimientos de las células cromafines (en membrana plasmática y retículo endoplásmico) que podrían contaminar la fracción granular durante su aislamiento (Winkler, 1986). Posteriormente, Burgun y colaboradores (1985) prepararon gránulos cromafines en presencia de ecotiopate, un inhibidor de AChE impermeable a membranas biológicas (Brimijoin, 1983) y se inhibió 15-20% de la actividad de la enzima respecto a la cuantificada en ausencia del inhibidor, lo que indica que el resto de la AChE es inaccesible al inhibidor porque es intragranular. Por otro lado, gránulos cromafines purificados por dos métodos se lisaron y se demostró que la liberación de catecolaminas y dopamina β -hidroxilasa soluble varió ligeramente respecto a la de acetilcolinesterasa. Para explicar este hallazgo se propuso la existencia de subpoblaciones de gránulos cromafines con AChE y otros carentes de ella (Burgun, 1990).

3.5. FUNCION FISIOLÓGICA DE LA ACETILCOLINESTERASA.

La función fisiológica de la AChE no es muy clara, se acepta que esa enzima hidroliza rápidamente la acetilcolina a colina y acetato y de esta manera termina la transmisión colinérgica (Bon, et al., 1990). Sin embargo, también se ha postulado que la AChE podría tener otro tipo de funciones. Se ha comunicado que la AChE posee actividad proteásica parecida a la de la tripsina y a la de la carboxipeptidasa- β (Chubb, et al., 1980 y Small, et al., 1987). Se ha encontrado que la AChE puede hidrolizar la cromogranina A de los gránulos cromafines (Small, et al., 1986) con la producción de péptidos potencialmente activos (Simón, et al., 1988). La AChE podría ejercer otras funciones que involucran su estructura química en vez de su actividad catalítica, por ejemplo durante la morfogénesis (Layer, et al., 1988) o al actuar directamente como un modulador de la actividad neuronal (Greenfield, 1985).

4. SUBPOBLACIONES DE GRANULOS CROMAFINES.

La presencia de subpoblaciones de gránulos cromafines con diferente contenido se ha propuesto anteriormente. Los primeros estudios inmunohistoquímicos demostraron que las encefalinas están asociadas a células adrenales que contienen noradrenalina (Schultzberg, et al, 1978). Posteriormente, por inmunohistoquímica y subsecuente confirmación por estudios bioquímicos, basados en el análisis de extractos y productos de

secreción de la médula adrenal, se concluyó que las encefalinas están localizadas exclusivamente dentro de las células que sintetizan adrenalina (Livett et al., 1982; Peltó-Huikko, et al., 1982, y Lang, et al., 1983). Sin embargo, estudios realizados por Wilson y colaboradores (1982) demostraron que la secreción de opiáceos es proporcional a las catecolaminas totales secretadas y no a un tipo especial de ellas, por lo cual se concluyó que el contenido de los gránulos de secreción no es heterogéneo, al menos respecto a estos componentes.

Aun así, persiste la incompatibilidad de ideas sobre la coexistencia de ciertos péptidos con algún tipo específico de catecolaminas en los gránulos cromafines, debido a que dependiendo del tipo de estímulo las células cromafines en cultivo secretan diferente proporción de tales componentes (Livett, et al, 1984 y Mizobe et al, 1984).

En consecuencia, se han descrito métodos para preparar gránulos cromafines en condiciones hipertónicas (Smith y Winkler, 1967) e isotónicas (Gratzl, 1981) para tratar de separar subpoblaciones granulares enriquecidas en algún compuesto bioactivo. Por el interés de contar con una preparación de gránulos cromafines morfológica y químicamente bien preservada se decidió implementar un método para obtener gránulos cromafines puros y separar subpoblaciones de composición determinada.

B. OBJETIVO.

El objetivo principal de esta tesis es obtener diferentes subpoblaciones de gránulos cromafines adrenales y caracterizarlos bioquímica y morfológicamente, además de determinar si existen subpoblaciones de gránulos carentes de AChE.

Para lograr tal objetivo, se obtendrá una fracción granular pura por el método de Gratzl y colaboradores (1981) en un gradiente isotónico de Percoll al 45%, La cual se aplicará a un gradiente discontinuo de Percoll para obtener subpoblaciones granulares más homogéneas en tamaño y densidad. La integridad de los gránulos y la presencia de posibles contaminantes se comprobará por el análisis morfológico y con la determinación de marcadores bioquímicos positivos y negativos.

C. METODOLOGIA.

1. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

Las glándulas suprarrenales de bovino se obtienen del rastro y se transportan al laboratorio en solución HSE (consultar sección 3) cuya osmolaridad final aproximada es de 420 mosmol/kg (condiciones isotónicas).

Las médulas se separan por disección, se fraccionan finamente con bisturí y se homogenizan en solución HSE en proporción 1:5 p/v. En general, en cada experimento se procesan 20 glándulas, las cuales proporcionan de 40 a 50 g de tejido medular.

El homogenado se centrifuga a 2,200x g, durante 10 min. (Fig. 1). Todo el procedimiento se realiza en frío (4°C). El precipitado (P₁), que contiene células completas, parcialmente destruidas y núcleos, se descarta y el sobrenadante (S₁) se filtra en gasa para eliminar las partículas grandes o agregados. El filtrado se centrifuga a 12,000x g durante 20 min. El sobrenadante que contiene el retículo endoplásmico se elimina y la pastilla (P₂) que contiene principalmente mitocondrias y gránulos cromafines, se resuspende cuidadosamente en 18 ml de solución HSE.

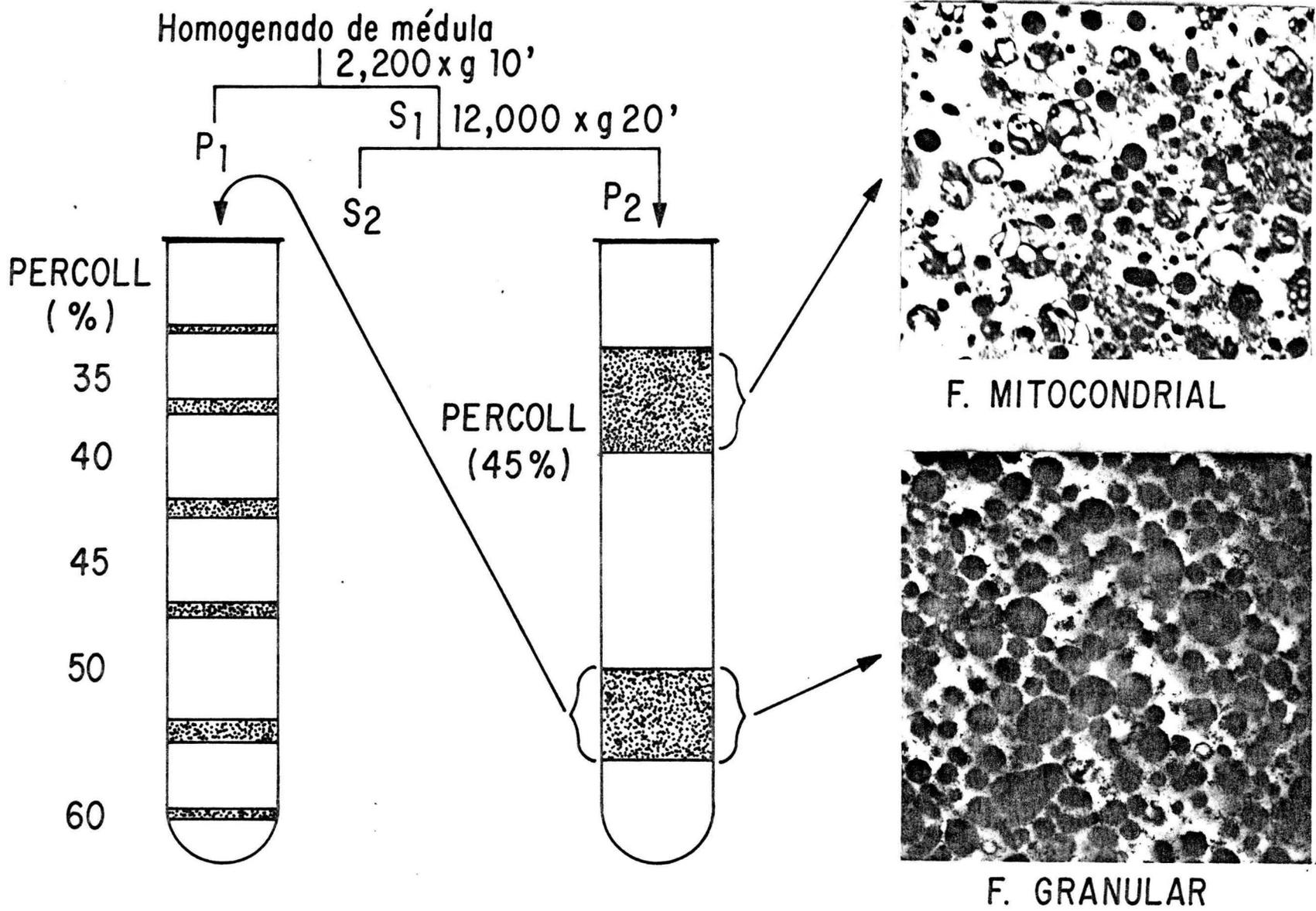


FIG. 1. Separación de subpoblaciones de gránulos cromafines en un autogradiante (45%) y en gradiente discontinuo de Percoll.

1.1. PURIFICACION DE GRANULOS CROMAFINES EN UN AUTOGRADIENTE DE PERCOLL.

Los gránulos obtenidos en la etapa anterior se separan en un autogradiante de Percoll al 45% por el método de Gratzl para ello los 18 ml de suspensión se mezclan con 72 ml de Percoll al 50% y se centrifugan a 35,000x g, durante 30 min. Esta maniobra permite separar dos fracciones principales, debido a que los gránulos cromafines son ligeramente más densos se equilibran en la parte inferior, mientras que las mitocondrias, menos densas, se concentran en la parte superior, ambas fracciones se recuperan por succión. Los gránulos purificados se resuspenden en solución HSE en proporción 1:10 v/v para eliminar el Percoll y se recuperan por centrifugación a 16,000x g 20 min. El contenido de la pastilla se resuspende en 13 ml de solución HSE y una alícuota de un mililitro se fija con glutaraldehído al 2% para su caracterización morfológica, el resto se utiliza para su ulterior separación en el gradiente discontinuo de Percoll.

1.2. SEPARACION DE GRANULOS CROMAFINES EN GRADIENTE DISCONTINUO DE PERCOLL.

En tubos del rotor SW 40 TI (Beckman) se prepara el gradiente con 2 ml de las siguientes concentraciones de Percoll: 60, 50, 45, 40 y 35% y se mantiene en frío 30 min. Sobre la superficie del gradiente se colocan 2 ml de la suspensión de gránulos purificados obtenidos como se indica en la sección 1.1 y se centrifuga 30 min. a 19,000 rpm

Las fracciones separadas se colectan por succión y se reúnen las de densidad similar, el volumen total de cada una se mide y se divide en tres partes (no iguales) para caracterizar las fracciones granulares en base a los siguientes criterios.

2. CARACTERIZACION DE LAS FRACCIONES GRANULARES.

2. 1. CARACTERIZACION MORFOLOGICA.

Para la caracterización estructural de los componentes de las fracciones obtenidas, 1 ml de cada una de ellas se fija en una solución de glutaraldehído al 2% diluido en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M, pH 7.2 durante 1 hr. a 4°C (Sabatini, et al 1963). Después del lavado con amortiguador de cacodilato de sodio, cada muestra se postfija en tetróxido de osmio al 1% diluido en amortiguador de cacodilato de sodio y las muestras se deshidratan en concentraciones crecientes de etanol y se incluyen en Araldita (Palade, 1952 y Luft, 1961). Se obtienen cortes finos de color gris plateado en el espectro de reflexión de la luz incidente, los cuales se recogieron en rejillas de cobre y se contrastaron con citrato de plomo y acetato de uranilo (Peachy, 1958, Venable y Coggeshall, 1965 y Stempak y Ward, 1964) para ser examinados en un microscopio electrónico de transmisión modelo Jeol 2000EX, en el cual se obtuvieron negativos que se ampliaron fotográficamente para imprimir las micrografías electrónicas en papel. En éstas se contaron los elementos que componían a cada fracción estudiada con el empleo de un contador granulométrico

automático Zeiss modelo TGZ-3. Así se hizo una caracterización estructural de los elementos subcelulares y una cuenta absoluta y porcentual de las poblaciones de gránulos en cada fracción, de acuerdo a su tamaño.

2. 2. CARACTERIZACION BIOQUIMICA.

2. 2. 1. CUANTIFICACION DE CATECOLAMINAS.

Una alícuota de los gránulos en suspensión se mezcla en proporción 1:1 con ácido perclórico 2N, se centrifuga a 2,200x g, 10 min. y se recupera el sobrenadante, el cual se utiliza para la determinación de catecolaminas totales que se realiza por fluorescencia directa (longitud de excitación 280 nm y de emisión 320 nm) según la comunicación de Steffen, et al (1974). La curva de calibración se realiza con adrenalina de 0 a 100 nmoles, intervalo en el que es lineal. En tal sobrenadante se realiza la cuantificación diferencial de adrenalina y noradrenalina por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Para ello se utiliza una columna Novapack C-18. La fase móvil se compone de amortiguador de fosfatos de sodio 0.02 M pH 4.0, EDTA 0.01 M, octil sulfato de sodio 1.3 mM, dodecil sulfato de sodio (SDS) 0.1 mM y metanol al 20%. El volumen de elución es de 1.3 ml/min. La detección individual de las catecolaminas es electroquímica con una diferencia de potencial de 0.44 volts contra H^2H^+ .

2.2.2. DETECCION DE PROTEINAS Y ENZIMAS.

Otra parte de los gránulos purificados se solubiliza con 0.1% de tritón X-100 y la suspensión se agita durante toda la noche. Los residuos no solubilizados se separan por centrifugación y el sobrenadante se utiliza para :

- a) La cuantificación de proteínas por el método de Bradford (1978) reacción con la cual no interfieren las catecolaminas. Se utiliza como standar albumina bovina (0-25 μg) y la medición espectrofotométrica es a 595 nm.
- b) La medición de la enzima DBH se realiza con tiramina como sustrato y el p-hidroxibenzaldehido formado se determina espectrofotométricamente a 333 nm y la curva de calibración se hace con octopamina (0-100 μmoles) (Aunis, et al 1973)
- c) La actividad de la AChE se determina por el método de Ellman, et al (1961) con el empleo de yoduro de acetiltiocolina como sustrato. La detección es espectrofotométrica a 416 nm. Una unidad de actividad enzimática degrada 1 μmol de sustrato por minuto a 30 °C.
- d) La determinación de la actividad de la enzima ATPasa dependiente de Mg^{++} se lleva a cabo por el método de Krivánek (1986). La curva de calibración se hace con fosfato de potasio dibasico de 0 a 100 nmoles y el fosfato inorgánico producido por la actividad de la enzima se cuantifica en un espectrofotómetro a 800 nm de longitud de onda. La actividad de la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ se inhibe con ouabaina.
- e) La fosfatasa ácida se determina con p-nitrofenilfosfato como sustrato que se transforma en p-nitrofenol, el cual se cuantifica espectrofotométricamente a 410 nm (Método obtenido de Sigma Technical Bulletin, 104, 10-74, 1981).

3. APARATOS, SOLUCIONES Y REACTIVOS.

La Solución HSE contiene:

Hepes 10 mM pH 7.2

EDTA 10 mM

Sacarosa 340 mM

Percoll

Cien mililitros de Percoll (densidad 1.132 g/ml) se dializan contra un litro de solución HSE durante 7 hr. El Percoll dializado (62-65 ml aproximadamente) se afora a 100 ml con solución HSE y se considera al 100 %.

Los materiales utilizados fueron de alta pureza y se adquirieron de Sigma Chemical Co., Baker y Merck. Los reactivos para HPLC fueron de grado HPLC. Las mediciones espectrofotométricas se hicieron en un espectrofotómetro DU-6 Beckman.

En el fraccionamiento subcelular se emplearon una ultracentrífuga L8-M (Beckman) y una centrífuga RC5C (Sorvall), y para las mediciones de pH se utilizó un potenciómetro I 71 (Beckman).

D. RESULTADOS.

1. PURIFICACION DE GRANULOS CROMAFINES EN AUTOGRADIENTE DE PERCOLL.

De la fracción granular cruda (P2), los gránulos se separaron de mitocondrias y contaminantes como membranas celulares y microsomas con el empleo de un gradiente isotónico de Percoll al 45% (autogradiente de Percoll). Por este método se obtienen dos bandas (fig. 1) que se aprecian bien separadas a simple vista: La banda superior es más ancha, de color café y contiene principalmente mitocondrias y algunos gránulos pequeños, como se aprecia en la micrografía correspondiente, en tanto que la banda inferior, es más compacta, rosada y enriquecida en gránulos cromafines.

La caracterización bioquímica de ambas cintas comprobó los resultados comunicados por Gratzl y colaboradores (1981) y por ello no serán discutidos en esta tesis.

Una vez que la banda inferior del autogradiente de Percoll se recupera y se lava con solución HSE para eliminar el Percoll y algunas impurezas, se obtiene una fracción compuesta por gránulos electrodensos de diferentes tamaños, bien conservados y en su mayoría de forma esférica, como se observa en la micrografía inferior de la figura 1. En ella se aprecia que tales gránulos están libres de contaminación por mitocondrias y otros orgánulos, en cambio la fracción superior contiene mitocondrias y otras

entidades subcelulares. No obstante ambas fracciones contienen residuos membranales vesiculados de varias formas y tamaños, y retículo edoplásmico, que son más abundantes en la fracción mitocondrial.

2. SEPARACION DE GRANULOS CROMAFINES EN GRADIENTE DISCONTINUO DE PERCOLL.

El aspecto del gradiente despues de la centrifugación se ilustra en la fig. 2, se notan claramente 6 bandas o cintas las cuales se equilibran en las interfases del gradiente, a excepción de la banda 6 que se forma en la parte media del Percoll al 60% y la banda 1 que corresponde al sitio de aplicación de la fracción gránular. Entre cada cinta hay fracciones de gránulos cromafines dispersos, que por ser muy heterogéneos en densidad y tamaño inicialmente se recuperaron y se caracterizaron, pero en esta tesis el estudio se enfocará solamente a los gránulos concentrados en las bandas, las cuales se designan de menor a mayor densidad como: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 (fig. 2).

2.1. CORRELACION DE LA MORFOLOGIA Y EL CONTENIDO DE CATECOLAMINAS DE LAS FRACCIONES GRANULARES.

La recuperación de catecolaminas totales en cada banda y las micrografías correspondientes se ilustran en la fig. 2. La cantidad de catecolaminas, marcadores específicos de gránulos,

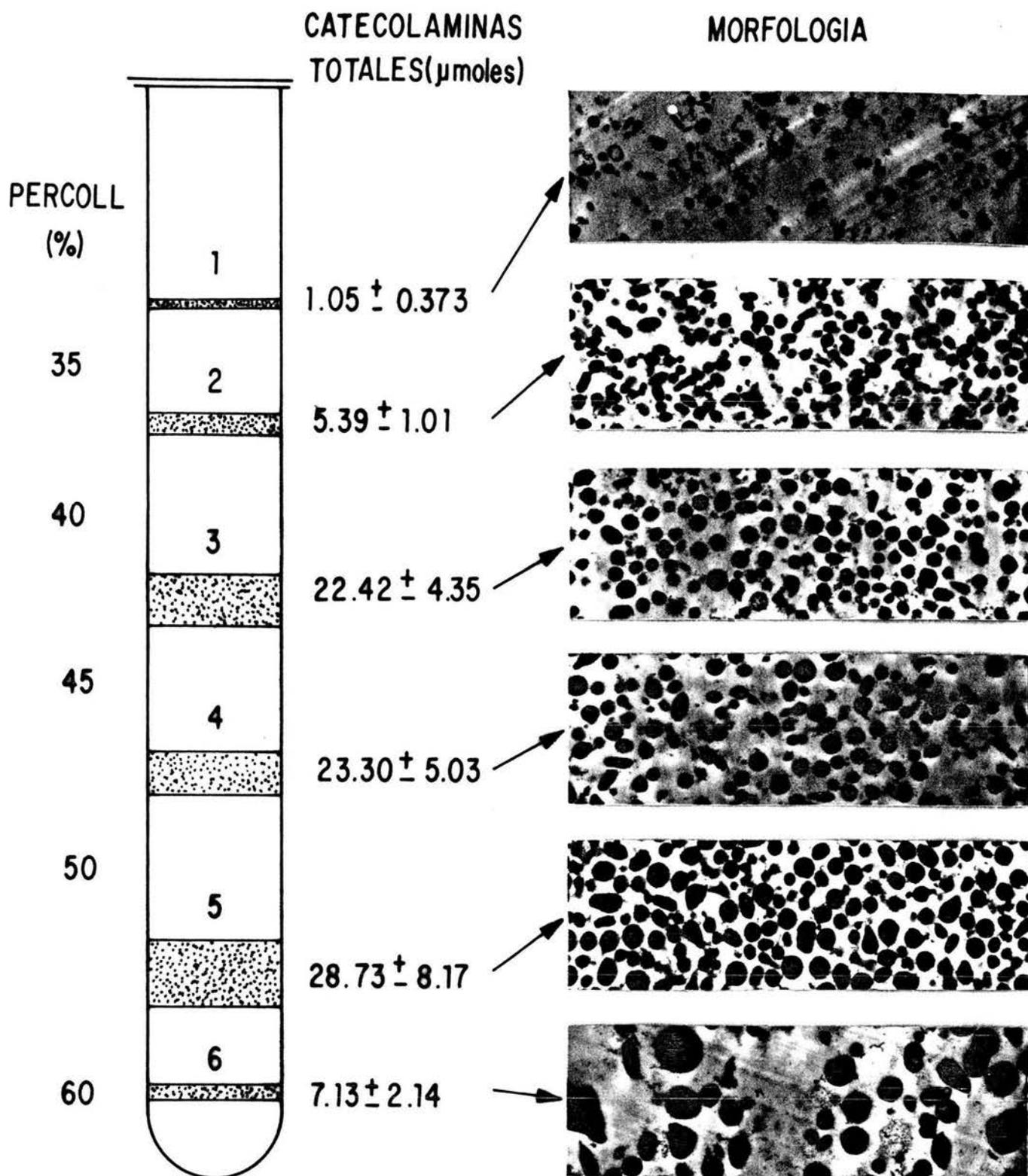


FIG. 2. Separación de gránulos cromafines en gradiente discontinuo de Percoll. Recuperación de catecolaminas y aspecto morfológico de cada fracción.

y la morfología de las micrografías son congruentes con el espesor de las bandas del gradiente ilustrado. La mayor concentración de catecolaminas totales se encuentra en la banda 5, que es la más ancha y la más espesa de las seis y como se observa en la micrografía correspondiente contiene la mayor cantidad de gránulos. Estos tienen aspecto normal: su contenido eletrodensito es homogéneo su membrana está íntegra y en consecuencia están bien preservados. La gran mayoría de ellos son esféricos y algunos son de forma ovoidea. En general, esta fracción está libre de contaminación y su aspecto es de una población pura. En cuanto al tamaño de los gránulos, el 60% de ellos son medianos (0.30 a 0.35 μm) que son los más esféricos; los ovoides son gránulos grandes (0.42 a 0.48 μm) y contribuyen con el 35%, los más pequeños (0.20 a 0.25 μm) solo representan el 5% de los elementos de esa fracción (Tabla 2). La banda 4 es menos ancha que la 5, y es la más homogénea porque en ella se encuentra la máxima proporción de gránulos medianos, ellos representan aproximadamente el 80% de todos los elementos formes. Además, los gránulos grandes constituyen solo el 15% de esta banda y se presentan escasos gránulos pequeños (5%). La cantidad de catecolaminas en esta fracción es 25% inferior respecto a la encontrada en la 5, lo que indica que contiene menos gránulos o estos son considerablemente más pequeños.

La fracción 3 se caracteriza por contener gránulos esféricos bien conservados de los cuales 60% son medianos, 25% pequeños y 10% grandes. Esta cinta gránular es más ancha que la fracción 4 y contiene una mayor densidad de gránulos, sin embargo su contenido de catecolaminas no es significativamente diferente

T A B L A 2

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE GRANULOS CROMAFINES
SEGUN SU TAMAÑO

TAMAÑO (μm)	F R A C C I O N					
	1	2	3	4	5	6
0.20-0.25	50	35	25	5	5	10
0.30-0.35	20	40	60	80	60	10
0.42-0.48	20	20	10	15	35	10
0.55-1.00	-	-	-	-	-	70
OTROS ELEMENTOS	10	5	5	-	0	-
ELEMENTOS CONTADOS	1449	1317	1425	1551	1218	642

Los valores representan el % de gránulos respecto al número total de elementos contados por fracción.

respecto a esta última. Ello podría deberse a que los orgánulos de la fracción 3 son más pequeños pero más abundantes que los de la 4. En la banda 2 existe una mezcla de gránulos pequeños y medianos en proporción 1:1 aproximadamente y la presencia de gránulos grandes es escasa (20%). Lo anterior aunado a la estrechez de la banda, se correlaciona bien con la baja cantidad de catecolaminas totales cuantificadas respecto a las bandas descritas.

La banda 1, obtenida en el punto de aplicación de la muestra, es la más tenue de todas y contiene escasos gránulos de tamaño mediano y pequeño que son menos electrodensos que los de otras fracciones. Este aspecto corresponde a gránulos parcialmente vacíos y por su baja densidad no penetran al gradiente. Además, se observan estructuras membranales con aspecto de mitocondrias hinchadas, retículo endoplásmico y restos membranales; el aspecto morfológico de estas estructuras es congruente con el escaso contenido de catecolaminas, las que probablemente provienen de los gránulos destruidos.

Finalmente, la banda 6 que es angosta y compacta, presenta una cantidad considerable de gránulos muy grandes, los cuales se observan bien preservados y electrodensos; no obstante, algunos son irregulares, ovoides y miden de 0.55 a 1.0 μm de diámetro y representan cerca del 70%, el resto son gránulos medianos y grandes. Algunas de estas estructuras por su gran tamaño y su aspecto morfológico existe la posibilidad de que sean lisosomas. A pesar de la baja cantidad de gránulos en esta banda la

concentración de catecolaminas cuantificadas es similar a la de la banda 2, lo que significa que los gránulos ahí presentes poseen un alto contenido de catecolaminas.

Es notorio que con el método utilizado se logra separar cuatro fracciones que contienen subpoblaciones de gránulos cromafines de tamaño y densidad diferentes y más homogéneas que la fracción original (P₂). La banda 6 parece contener gránulos cromafines muy grandes y algunos lisosomas.

2.2. CARACTERIZACION BIOQUIMICA

La distribución de proteínas, catecolaminas y enzimas en las cintas granulares obtenidas del gradiente discontinuo de Percoll se presentan en la Tabla 3. Las actividades específicas de tales enzimas y las concentraciones específicas de las catecolaminas se muestran en la Tabla 4.

La concentración de proteínas totales en cada una de las fracciones del gradiente discontinuo es acorde al grosor de cada banda: así en la 5, la más ancha, se localiza la mayor concentración (19.90 ± 3.72 mg) y en la 1, la más estrecha, la concentración más baja (3.78 ± 1.15 mg). A pesar de que las proteínas no son marcadores específicos de gránulos cromafines, este comportamiento se debe a que son buenos indicadores ya que tales estructuras tienen un alto contenido intragranular de proteínas (cromograninas). Por ello, su determinación es

T A B L A 3

COMPOSICION BIOQUIMICA DE LAS FRACCIONES GRANULARES

ACTIVIDADES Y CONCENTRACIONES RELATIVAS

Fracción	Proteínas totales (mg)	Catecolaminas totales (μ moles)	Adrenalina (μ moles)	Noradrenalina (μ moles)	AChE ^a (Unidades)	Mg ⁺⁺ ATPasa ^b (μ moles)	D B H ^b (μ moles)
1	3.78 [±] 1.15	1.05 [±] 0.37	0.83 [±] 0.23	0.53 [±] 0.14	901 [±] 345	0.94 [±] 0.02	3.71 [±] 0.26
2	8.09 [±] 1.50	5.39 [±] 1.01	3.66 [±] 0.64	1.47 [±] 0.29	2326 [±] 814	1.41 [±] 0.48	15.34 [±] 5.26
3	16.82 [±] 3.39	22.42 [±] 4.35	14.37 [±] 3.10	4.20 [±] 0.72	4738 [±] 1251	1.94 [±] 0.21	28.19 [±] 4.91
4	13.80 [±] 2.18	23.30 [±] 5.03	18.21 [±] 4.38	5.34 [±] 1.12	4123 [±] 310	1.98 [±] 0.66	28.89 [±] 5.10
5	19.90 [±] 3.72	28.73 [±] 8.17	23.24 [±] 6.11	8.55 [±] 1.96	5913 [±] 1242	1.91 [±] 0.03	39.46 [±] 8.20
6	6.25 [±] 1.11	7.13 [±] 2.14	2.91 [±] 0.56	4.02 [±] 0.93	1233 [±] 216	0.68 [±] 0.10	11.26 [±] 2.73

Resultados promedios de cinco experimentos y error estandar.

^a Una unidad de actividad enzimática hidroliza 1 μ mol de acetiltiocolina a colina y acetato por minuto a pH 8.0 a 30°C.

^b Los valores son μ moles de producto formado por minuto.

T A B L A 4

COMPOSICION BIOQUIMICA DE LAS FRACCIONES GRANULARES

ACTIVIDADES Y CONCENTRACIONES ESPECIFICAS

Fracción	Catecolaminas	Adrenalina	Noradrenalina	AChE	Mg ⁺⁺ ATPasa	D B H
1	0.35 [±] 0.06	0.21 [±] 0.02	0.14 [±] 0.02	360 [±] 87	0.18 [±] 0.02	2.87 [±] 1.13
2	0.67 [±] 0.07	0.44 [±] 0.05	0.17 [±] 0.02	323 [±] 71	0.14 [±] 0.03	2.49 [±] 0.77
3	1.33 [±] 0.12	0.79 [±] 0.06	0.25 [±] 0.02	339 [±] 49	0.10 [±] 0.02	2.70 [±] 0.86
4	1.47 [±] 0.23	1.08 [±] 0.20	0.32 [±] 0.04	355 [±] 46	0.10 [±] 0.02	2.54 [±] 0.59
5	1.28 [±] 0.24	1.02 [±] 0.18	0.40 [±] 0.06	358 [±] 41	0.09 [±] 0.01	2.38 [±] 0.41
6	1.02 [±] 0.24	0.40 [±] 0.05	0.61 [±] 0.09	261 [±] 57	0.09 [±] 0.01	2.28 [±] 0.46

Resultados promedios de cinco experimentos y error estandar.

Los valores de adrenalina, noradrenalina y catecolaminas totales son dados en μ moles/mg de proteína. Los de Mg⁺⁺ATPasa y DBH como μ moles de productos formado/minuto por mg de proteína y los de AChE como unidades de actividad enzimática por mg de proteína.

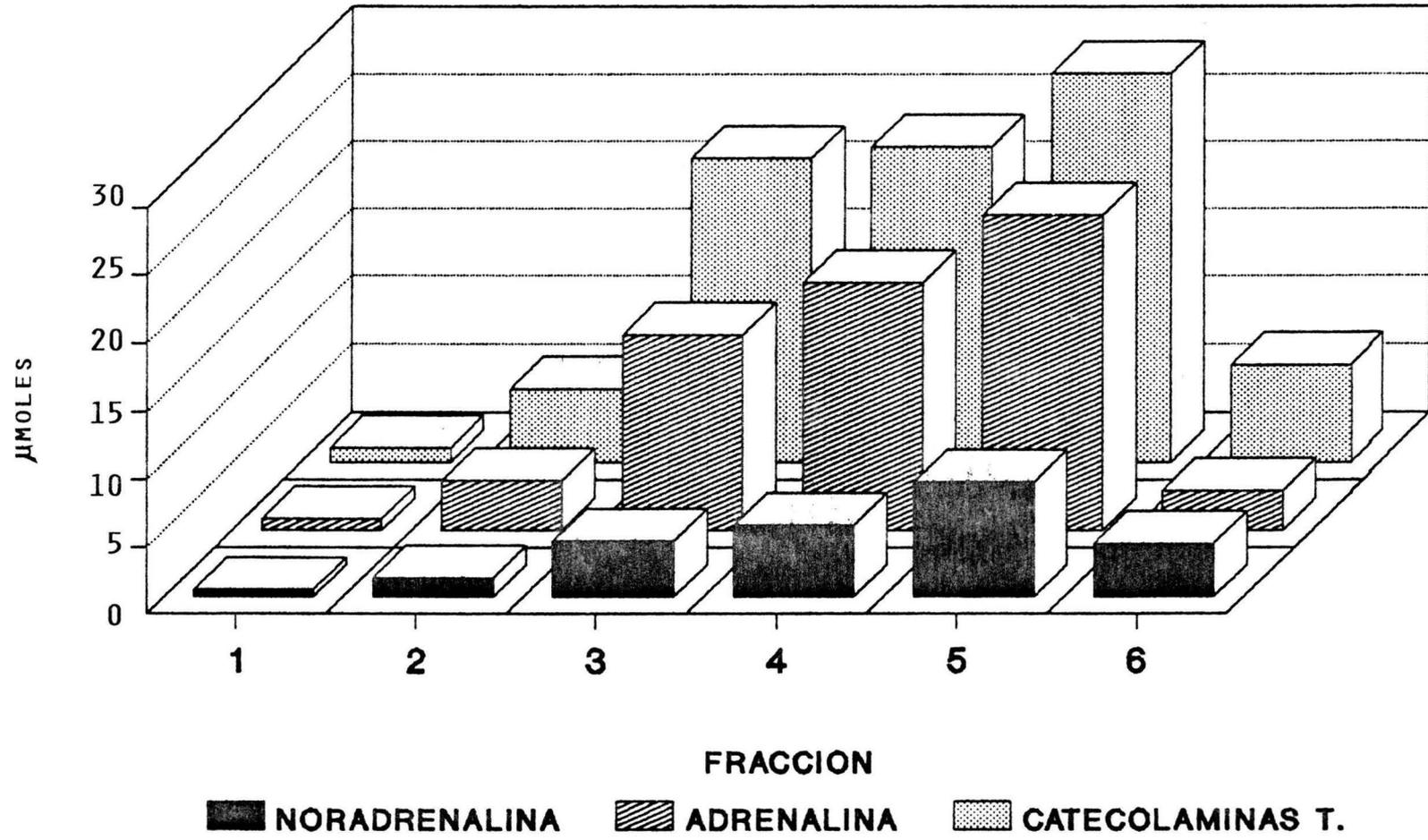
importante para tener índices del contenido proteínico en general y de las enzimas en particular, al expresarlas como actividad específica.

La cantidad de catecolaminas totales en cada fracción ya se ha analizado anteriormente. En lo que concierne a la cantidad de adrenalina y noradrenalina determinadas por HPLC, éstas presentan una distribución semejante a las catecolaminas totales (fig. 3). La fracción 5 ejemplifica esta observación, ella presenta las concentraciones mayores en: catecolaminas totales, adrenalina ($23.24 \pm 6.11 \mu\text{moles}$) y noradrenalina ($8.55 \pm 1.96 \mu\text{moles}$). Considerando únicamente los valores promedios, siguen en orden decreciente la fracción 4 y luego la 3, aunque las diferencias no son significativas.

La fracción 6 (gránulos gigantes) presenta mayor cantidad de catecolaminas que la 2, no obstante que ésta última se muestra como una banda más ancha, pero que contiene gránulos pequeños. Además, la proporción de adrenalina a noradrenalina en estas fracciones es inversa: en la 2 predomina la adrenalina en tanto que en la 6 sobresale la noradrenalina. La menos concentrada en catecolaminas es la fracción 1, lo que corrobora la escasa o nula presencia de gránulos cromafines en esa fracción.

Los valores totales de adrenalina en todas las fracciones gránulares son dos a tres veces más grandes que los valores de noradrenalina (Tabla 3), lo que sugiere que en general los gránulos son más ricos en adrenalina a excepción de los

FIGURA 3
 COMPARACION DEL CONTENIDO DE CATECOLAMINAS TOTALES
 (FLUORESCENCIA DIRECTA) Y ADRENALINA Y NORADRENALINA
 (HPLC) EN SUBPOBLACIONES GRANULARES.



encontrados en la fracción 6, que tienen noradrenalina 1.5 veces más concentrada que adrenalina. Esa diferencia se aprecia mejor si se calculan las relaciones de adrenalina con respecto a noradrenalina o viceversa. En la figura 4 se ilustra esta relación y se observa claramente que en la fracción 6 la catecolamina predominante es la noradrenalina, mientras que la adrenalina prevalece notoriamente en las fracciones restantes, aún en la fracción 1, donde hay escasos gránulos, lo que significa que ellos son predominantemente adrenérgicos. Debe hacerse notar que la fracción 4 presenta la mayor proporción de adrenalina respecto a la noradrenalina. La diferencia de tal relación en las fracciones 2 a 5 se debe principalmente a la adrenalina porque la concentración de noradrenalina se mantiene casi constante en ellas.

La dopamina β -hidroxilasa se localiza tanto en la membrana como en el contenido intragranular, por lo que es un marcador específico de ambas subfracciones granulares. En la figura 5 se muestra su distribución junto con la ATPasa dependiente de Mg^{++} que se localiza en la membrana granular. Se nota que la mayor actividad de la DBH se encuentra en la fracción 5 (Tabla 3), sin embargo no hay diferencia significativa respecto a la actividad de las fracciones 4 y 3, a pesar de que las fracciones 5 y 3 presentan poblaciones más densas de gránulos que la 4. Sin embargo la menor concentración de DBH se encuentra en la banda 6 que contiene menor cantidad de gránulos. La actividad específica de la DBH en todas las fracciones granulares es similar (Tabla 4) lo que

FIGURA 4
CONCENTRACIONES DE ADRENALINA (A) RESPECTO A NORADRENALINA
(NA) Y VICEVERSA. LA RELACION SE MUESTRA SOBRE LAS BARRAS.

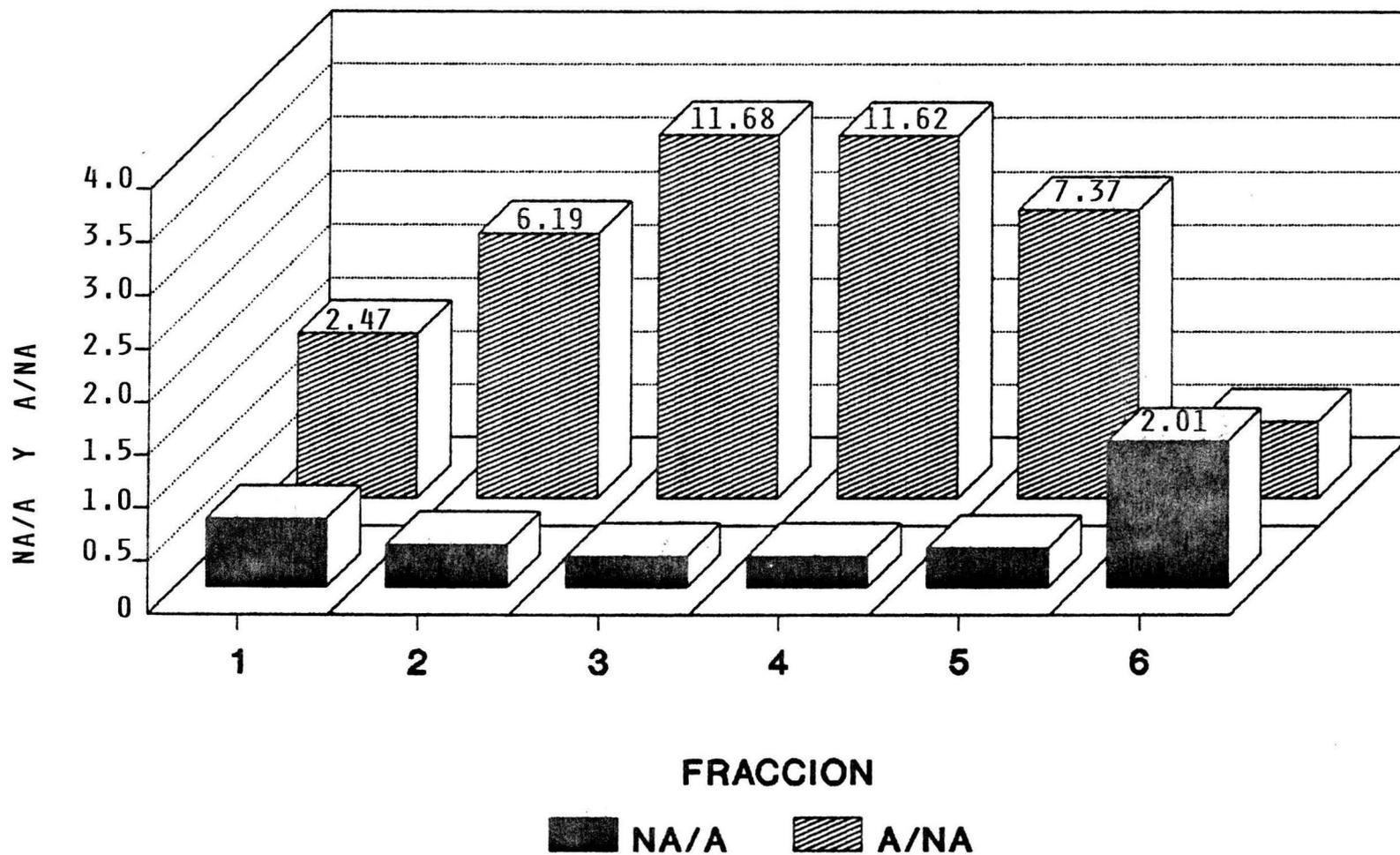
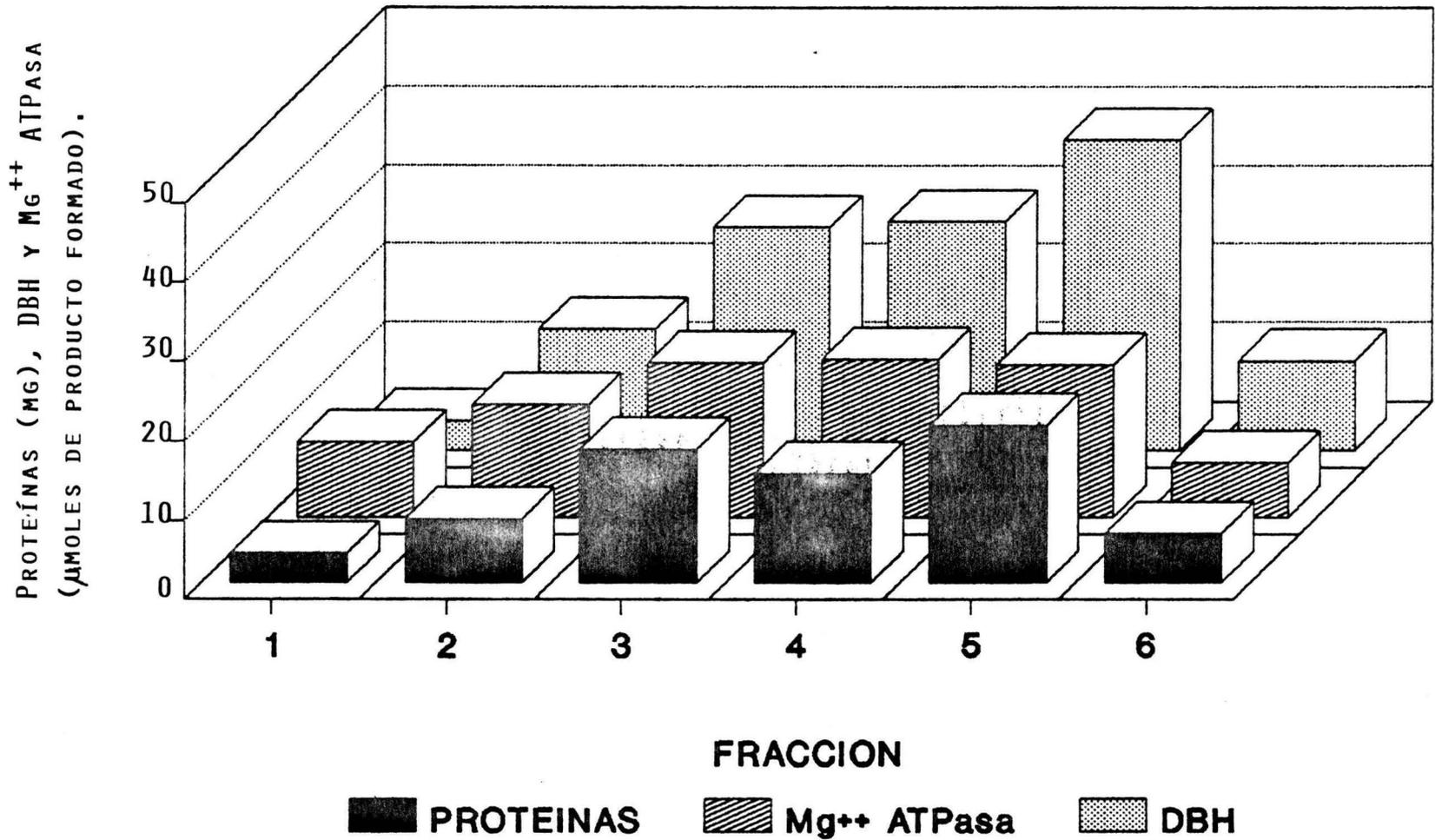


FIGURA 5

CONTENIDO GRANULAR: PROTEINAS TOTALES, Mg^{++} ATPasa
Y DBH.



apoya la pureza de tales poblaciones y reafirma la validez de esta enzima como marcador granular.

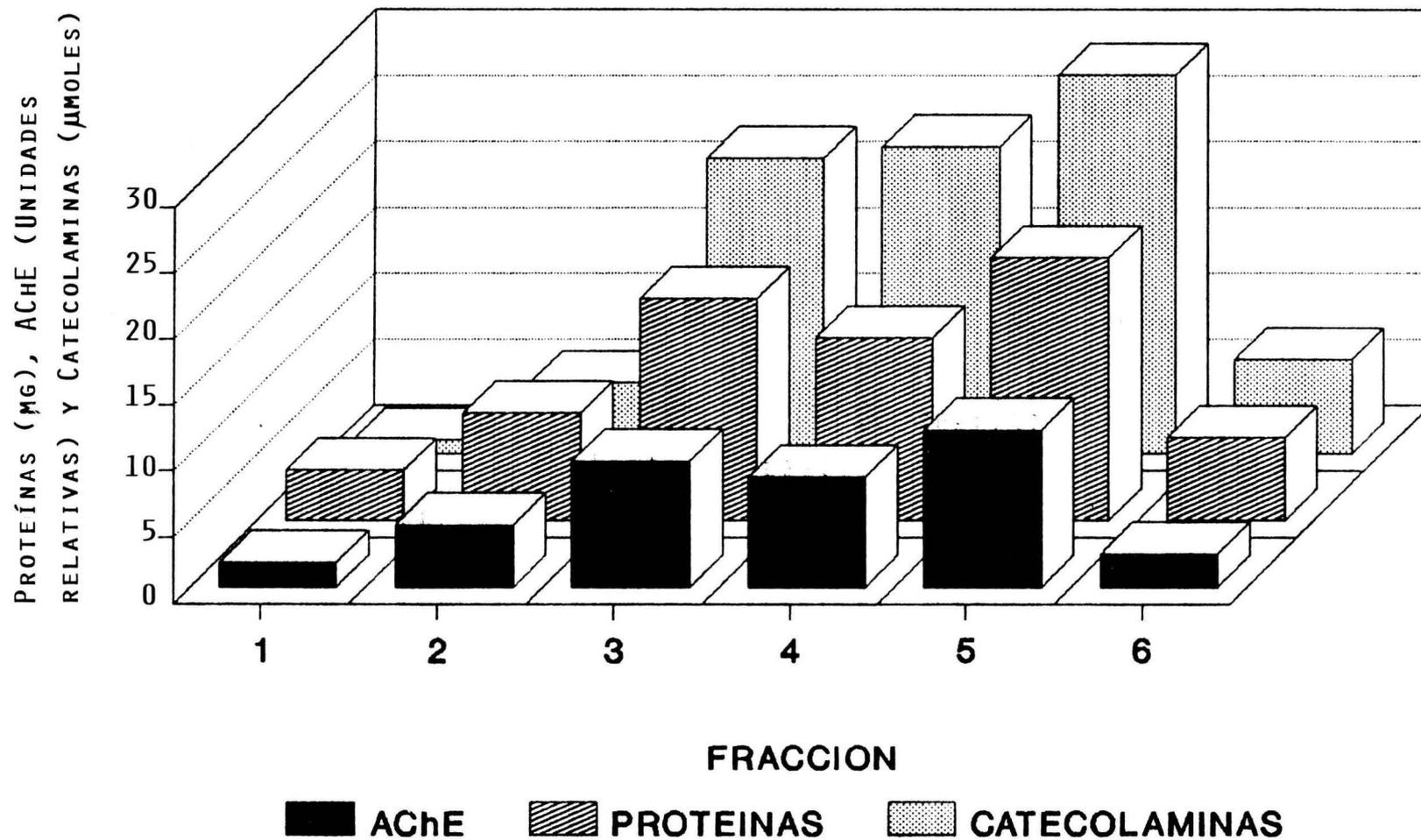
La enzima ATPasa dependiente de Mg^{++} presenta actividades relativas iguales en las fracciones 3, 4 y 5 y esta menos concentrada en las fracciones 2 y 6. Sin embargo la actividad relativa de la ATPasa en la fracción 1 tiene un valor intermedio y su actividad específica es la más elevada. Las actividades específicas de esta enzima son similares en las fracciones granulares 3 a 6 y más alta en la fracción 2 debido a que ella contiene gránulos más pequeños y por lo tanto mayor superficie membranal.

Las actividades específicas de la Mg^{++} ATPasa y DBH en la fracción 1 son mayores que en el resto de las fracciones, esto se debe a que en tal fracción se encuentra gran cantidad de membranas provenientes de gránulos cromafines. Además, la cantidad de proteínas en esta fracción es la más baja de todas.

La AChE que se localiza en la membrana y en el contenido intragranular, presenta en el gradiente el mismo perfil de distribución que las proteínas totales y las catecolaminas totales, aunque sus variaciones no son en la misma proporción (fig. 6). En la fracción 1 se detecta la menor actividad relativa de esta enzima, hecho importante porque indica escasa contaminación con membranas plasmáticas o retículo endoplásmico, fuentes de gran actividad enzimática de la AChE (Chubb y Smith, 1975). En la siguiente fracción la AChE se incrementa

FIGURA 6

CONTENIDO GRANULAR: CATECOLAMINAS TOTALES, PROTEINAS Y AChE.



aproximadamente al triple y coincide con la presencia de gran cantidad de gránulos cromafines de tamaño pequeño. La AChE aumenta considerablemente (al doble) en las fracciones 3 y 4, hasta alcanzar en la 5, la mayor actividad como sucede con las cantidades de catecolaminas y de proteínas totales. Se observa también que en la fracción 6 la actividad de la AChE disminuye a la quinta parte de la cuantificada en la fracción 5 y es parecida a la que se presenta en la fracción 1.

Las actividades específicas de la AChE (Tabla 4) presentan valores casi idénticos en las fracciones que reúnen la mayor cantidad de gránulos cromafines: 3, 4 y 5 y el valor más bajo se obtiene en la fracción 6. Cabe señalar que ninguna de las enzimas o catecolaminas cuantificadas muestra una disminución de actividad o concentración específica tan marcada en la fracción 6 respecto a la 5 como lo hace la AChE. Lo anterior sugiere que los gránulos de la banda 6 son poco enriquecidos en AChE respecto a los de las demás fracciones o que contiene otras estructuras sin AChE como lisosomas.

El porcentaje recuperado de los componentes bioquímicos (proteínas totales, catecolaminas totales, adrenalina, noradrenalina, AChE, DBH y Mg^{++} ATPasa) en cada una de las fracciones del gradiente se presenta en la Tabla 5 y el promedio de tales valores se muestra en la última columna. Es notorio que la recuperación promedio de los componentes granulares es similar en cada fracción, aunque la menos homogénea es la primera, cuyo promedio presenta el error estandar más alto.

T A B L A 5

COMPOSICION BIOQUIMICA DE LAS FRACCIONES GRANULARES

PORCENTAJES DE RECUPERACION

Fracción	Proteínas totales	Catecolaminas totales	Adrenalina	Noradrenalina	AChE	D B H	Mg ⁺⁺ ATPasa	\bar{X}
1	2.99	0.88	0.96	1.59	3.23	1.94	3.59	2.17 [±] 0.39
2	7.80	4.50	4.26	4.40	8.35	8.02	12.70	7.15 [±] 1.07
3	15.31	18.70	16.73	12.56	17.00	14.74	16.53	15.94 [±] 0.68
4	13.00	19.43	21.20	15.97	14.79	15.11	11.64	15.88 [±] 1.19
5	18.63	23.95	27.05	25.58	21.21	20.59	11.78	21.26 [±] 1.79
6	5.93	5.95	3.39	12.04	4.42	5.89	6.80	6.35 [±] 0.96
							<u>T O T A L</u>	68.75

Porcentaje de recuperación de cada componente respecto al total (100%) en cada banda granular y el promedio porcentual de cada una de ellas.

Del total de los componentes promediados el 68.75% se recupera en las bandas estudiadas (1 a 6). Este porcentaje es aceptable ya que dos terceras partes del contenido total se logra compactar en las bandas obtenidas en el gradiente discontinuo y una tercera parte permanece dispersa en las fracciones localizadas entre una y otra banda, cuyo volumen es mayor. Es importante resaltar que la quinta parte de los componentes bioquímicos normalizados respecto del total, se concentra en la fracción 5, la cual presenta la banda más espesa y la más ancha de gránulos cromafines. Además, si se analiza la recuperación individual de las diferentes sustancias y enzimas cuantificadas, en esta fracción se obtienen los valores más altos.

En orden decreciente siguen las fracciones 3 y 4, y cada una de ellas aporta el 15% del contenido total. A pesar de que las diferencias no son significativas, la fracción 3 contiene concentraciones mayores de proteínas totales, AChE y Mg^{++} ATPasa que la fracción 4 y ésta es más rica en adrenalina, noradrenalina y DBH que aquella (Tabla 3), ello se debe a la diferente proporción de gránulos grandes y pequeños. Al analizar el contenido porcentual de la fracción 6 se nota que los dos valores más dispersos respecto a la media son el de adrenalina (3.39%) y el de noradrenalina (12.04%). En esta forma se acentúa la evidencia de que en la fracción 6 la catecolamina que predomina es la noradrenalina.

Para probar si la fracción 6 además de gránulos contenía otro tipo de estructuras, se determinó la actividad de la enzima fosfatasa ácida, marcador específico de lisosomas. En la Tabla 6 se muestra que la mayor concentración (33.20%) de tal enzima se recupera en esta fracción, tal diferencia se acentua cuando se expresa como actividad específica (Fig. 7). Las observaciones anteriores indican que la fracción 6 contiene tanto gránulos cromafines gigantes como algunos lisosomas, lo que está de acuerdo con la morfología comprobada por microscopía electrónica.

T A B L A 6

DISTRIBUCION DE FOSFATASA ACIDA
EN LAS BANDAS GRANULARES

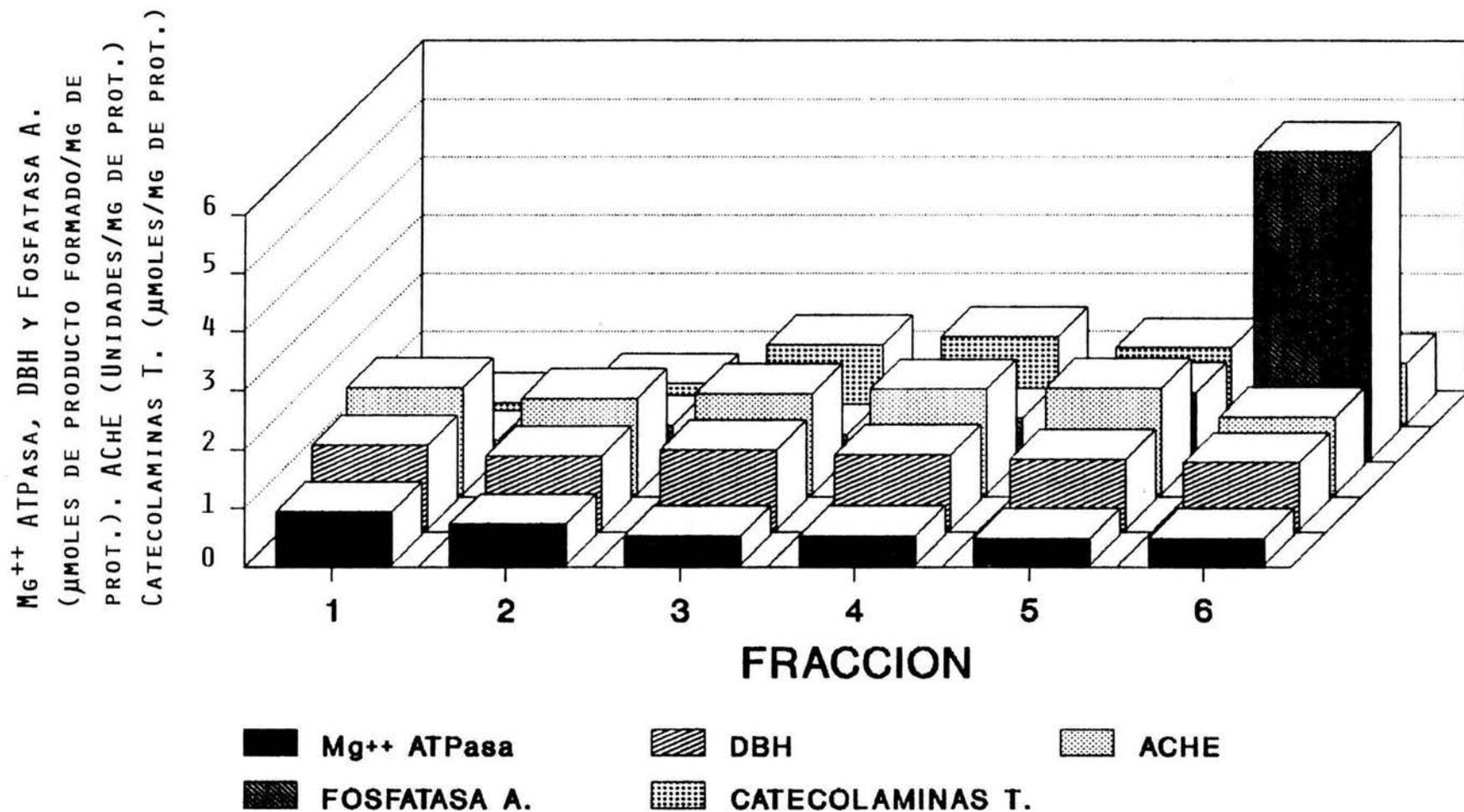
Fracción	Actividad ^a relativa	Actividad ^b específica	% de ^c recuperación
1	0.10 [±] 0.02	0.032 [±] 0.004	0.84
2	0.21 [±] 0.03	0.057 [±] 0.005	1.77
3	0.82 [±] 0.06	0.042 [±] 0.002	6.95
4	1.16 [±] 0.09	0.069 [±] 0.005	9.85
5	2.25 [±] 0.42	0.112 [±] 0.037	19.04
6	3.92 [±] 0.12	0.525 [±] 0.014	33.20

^a μmoles de producto formado/30 min.

^b μmoles de producto formado/mg de proteína/30 min.

^c Porcentaje de actividad relativa respecto a la fracción granular total.

FIGURA 7
 MARCADORES GRANULARES: ACTIVIDADES ESPECIFICAS.



E. DISCUSION.

1. PURIFICACION DE GRANULOS CROMAFINES EN AUTOGRADIENTE DE PERCOLL Y SEPARACION EN GRADIENTE DISCONTINUO DE PERCOLL.

Generalmente los gránulos cromafines se purifican en gradientes discontinuos de sacarosa (Smith y Winkler, 1967, Viveros, et al., 1971), que producen mayor rendimiento de gránulos cromafines de tamaño y densidad heterogéneos. Sin embargo, tal método tiene la desventaja de someter los gránulos a condiciones de hipertonicidad con la consecuente alteración de su función membranal y de su capacidad de respuesta como osmómetro (Creutz y Pollar, 1980 y Gratzl, et al., 1981). Por esta razón se han implementado y descrito varios métodos de obtención de gránulos cromafines en condiciones isotónicas, con los que se obtiene menor rendimiento, pero mayor pureza y preservación de la estructura granular (Trifaro y Dworkind, 1970; Morris y Schovanka, 1977, Carty, et al., 1980 y Gratzl, et al., 1981).

En la primera parte de esta tesis se comprobó que con el autogradiante de Percoll se obtiene una fracción gránular casi libre de los contaminantes más comunes: mitocondrias y retículo endoplásmico. Morfológicamente los gránulos se observan bien conservados, íntegros, electrodensos, la mayoría de ellos de forma esférica y algunos ovoides, de tamaño heterogéneo (0.20 a 1.0 μm de diámetro) y no se aprecia abundante contaminación.

La determinación bioquímica de marcadores específicos de gránulos cromafines como: catecolaminas (totales, adrenalina y noradrenalina) y la DBH corroboran la presencia y preservación de tal fracción gránular total.

La fracción granular obtenida del autogradiante de Percoll se separó y repurificó en un gradiente discontinuo de Percoll. La ventaja de este tipo de gradiente es que proporciona una separación de organelos concentrados en bandas visibles macroscópicamente, lo que facilita su localización y su recuperación.

El análisis morfológico por microscopía electrónica de los elementos constitutivos de las seis fracciones permitió establecer una estrecha correlación entre las cifras de actividad de las enzimas, determinada por métodos bioquímicos, con el tipo y tamaño de los gránulos de cada una de las fracciones obtenidas. De esta manera se demostró que 4 fracciones (de la 2 a la 5) corresponden claramente a gránulos cromafines puros, de aspecto normal y de tamaño y densidad diferente (Fig. 2 y Tabla 2). La fracción 6 (Percoll al 60%) contiene vesículas muy electrodensas de gran tamaño, de aspecto esférico que parecen gránulos cromafines muy grandes y algunas estructuras con aspecto de lisosomas. En el punto de aplicación de la muestra se recuperan restos de organelos de baja densidad como: membranas plasmáticas, mitocondrias hinchadas, retículo endoplásmico, vesículas membranales y algunos gránulos pequeños de aspecto variado con escaso contenido intravesicular.

Con el procedimiento empleado se logró purificar adecuadamente varios tipos de gránulos cromafines que fueron caracterizados morfológica y bioquímicamente. El análisis morfológico demostró la existencia de cuatro subpoblaciones de gránulos cromafines en base a su tamaño: pequeños, medianos, grandes y gigantes. Los más abundantes son los de tamaño mediano, le siguen en cantidades semejantes los pequeños y los grandes y los más escasos son los gigantes (Tabla 2). La heterogeneidad en el tamaño de los gránulos cromafines se ha demostrado anteriormente. Eagles (1977) y colaboradores, determinaron por criofractura que los gránulos cromafines de adrenales de bovino miden de 0.2 a 0.5 μm de diámetro. A excepción de los gránulos presentes en la banda 6 todos los demás corresponden a este intervalo y este criterio excluye que los orgánulos más grandes de la fracción 6 sean gránulos. No obstante, en 1968, Coupland en secciones de tejido medular adrenal de bovino encontró gránulos cromafines con diámetros hasta de 800 μm .

Se demostró que la cuantificación de catecolaminas totales por fluorescencia directa, un método sencillo pero de baja sensibilidad y especificidad, es un método válido porque las cantidades específicas de catecolaminas totales encontradas en las fracciones que reúnen la mayor cantidad de gránulos cromafines (3, 4 y 5, Tabla 4) son muy cercanas del intervalo (1.8 a 2.7 $\mu\text{moles/mg}$ de proteína) publicado por varios autores (Serck-Hanssen y Christiansen, 1973; Winkler, 1976 y Daprada, et al 1972a).

Por otro lado la cuantificación individual de adrenalina y noradrenalina se realizó por HPLC un método cromatográfico más sensible y con mayor reproducibilidad. Es notorio que los resultados obtenidos por este método corroboran los valores que se obtuvieron por fluorescencia directa, cuya variación equivale al 10%.

Las actividades específicas de adrenalina y noradrenalina son ligeramente menores de las reportadas por autores como Bastiansen, et al (1988) y Rodriguez del Castillo (1988), lo anterior puede atribuirse en parte a la cuantificación de proteínas, la cual pudo ser sobreestimada por una ligera interferencia del Percoll durante la determinación, sin embargo, lo más importante es la reproducibilidad en los resultados obtenidos por este método en los cinco experimentos realizados.

La subpoblación de gránulos chicos íntegros, se localiza principalmente en la fracción 2, aunque en la 3 también existen algunos (Tabla 2). La fracción 2 solo contribuye con el 7.15% de los marcadores granulares determinados, lo que está de acuerdo con el tamaño de tales estructuras. Cuando se comparan las micrografías de la Fig. 2, se pone en evidencia la presencia más numerosa de gránulos cromafines de mayor tamaño y mejor preservados en la fracción 2 que en la 1. En esta se observan variadas estructuras membranales vesiculares pero escasos gránulos íntegros, lo que se refuerza por la cuantificación de catecolaminas totales, adrenalina y noradrenalina (Tabla 3). Sin embargo, cuando se analizan las actividades específicas de las

enzimas (Tabla 4) estas son mayores en la fracción 1 debido a su constitución predominante en estructuras membranales con escaso contenido proteínico. Además, se observa que los marcadores granulares membranales están presentes en mayor grado y no así los intragranulares, como es el caso de las catecolaminas.

En las fracciones 3 a 5 se localiza la subpoblación de gránulos medianos, la mayor proporción de ellos se concentra en la fracción 4 (80%). No obstante que la fracción 5 es la más rica en gránulos, la proporción de gránulos de tamaño mediano es menor que en la fracción 4 y similar a la tercera (Tabla 2). Los gránulos grandes presentan en la fracción 5 su mayor proporción, equivalente al 35% de los elementos. Esto explica la mayor concentración de: proteínas totales, AChE y noradrenalina y menos significativo de catecolaminas totales, DBH y adrenalina, lo que en promedio es equivalente al $21.26 \pm 1.79\%$ del total de estos componentes (Tabla 5) un 5% más del recuperado en cada una de las fracciones 3 y 4.

Respecto al contenido individual de catecolaminas, las fracciones 2 a 5 son más ricas en adrenalina, la mayor concentración relativa se encuentra en las fracciones 4 y 5 (Tabla 3), así como la concentración específica (Tabla 4). A pesar de que la banda 5 es la más densa en población gránular, contiene la misma cantidad de adrenalina que la 4 e incluso, la actividad específica es mayor en esta fracción lo cual probablemente se deba a que posee mayor porcentaje de gránulos medianos respecto a la 4 y estos sean más ricos en adrenalina.

Por otro lado, el porcentaje de gránulos grandes se ve acrecentado en la banda 5, así como la cantidad de noradrenalina. Este suceso manifiesta que cuanto más grandes sean los gránulos, estos contendrán más noradrenalina que adrenalina. De esta forma cuando se analiza la relación del contenido de adrenalina respecto al de noradrenalina se comprueba que las fracciones 3 y 4 presentan las más altas (11 veces cada una de ellas) en tanto que la fracción 6 es predominantemente noradrenérgica. Esto explica que en la fracción 5 la diferencia de adrenalina respecto a noradrenalina no sea tan marcada como en la 4. Aún más, las concentraciones específicas de adrenalina son similares en las fracciones 4 y 5, en cambio las de noradrenalina son más elevadas en la 5 que en la 4. En la fracción 6, donde se localiza la subpoblación de gránulos gigantes, no obstante que la noradrenalina solo alcanza la mitad de la cantidad cuantificada en la 5, ésta se encuentra en una proporción 2:1 respecto a la adrenalina (Fig. 4), su actividad específica toma su valor más alto (Tabla 4) y el de adrenalina disminuye a un poco más de la mitad al presentado en la fracción anterior. Estas evidencias sugieren que entre los gránulos gigantes y los grandes se encuentran muy numerosos gránulos noradrenérgicos.

Aunque existen discrepancias respecto al tipo de gránulos donde se almacenan las encefalinas y neuropeptidos (Bastiansen, et al., 1988 y Steiner, et al., 1989), los resultados de este trabajo demuestran la existencia de subpoblaciones homogéneas de gránulos cromafines que almacenan adrenalina y otros que contienen noradrenalina, predominantemente. Además, contrario a

lo reportado inicialmente por Coupland y Hopwood (1966b), los gránulos noradrenergicos son los más grandes de la población total.

Sin embargo, el gran tamaño y el aspecto morfológico de algunos gránulos de la fracción 6 sobre todo aquellos muy ovalados, deformes y con membrana plasmática irregular se asemejan más a lisosomas lo que se corrobora por altas concentraciones de la enzima fosfatasa ácida encontrada en esta fracción (Tabla 5). Previamente (Gratzl, et al 1981 y Carty, et al 1980) se detectaron también marcadores lisosomales en la fracción granular total obtenida en gradiente continuo de Percoll.

Con la combinación de los métodos empleados (autogradiante y gradiente discontinuo de Percoll) se logró separar cinco fracciones de gránulos cromafines íntegros, de tamaño y densidad más homogéneas y caracterizadas por su composición bioquímica.

F. CONCLUSIONES.

1. Se implementó un método para repurificar y separar subpoblaciones de gránulos cromafines en condiciones isotónicas con el empleo de un gradiente discontinuo de Percoll. Las fracciones granulares obtenidas mostraron mayor homogeneidad en tamaño y densidad que la fracción granular original obtenida por el método de Gratzl y colaboradores (1981).

2. El procedimiento descrito es reproducible, ya que en los cinco experimentos realizados los porcentajes de recuperación de los componentes granulares son similares, con errores estandar aceptables para cada subpoblación. Además, se recuperan más de dos tercios del contenido total de componentes bioquímicos (68.75%) en las fracciones granulares.

3. En base a su tamaño se pueden distinguir cuatro subpoblaciones de gránulos cromafines: chicos, medianos, grandes y gigantes. Bioquímicamente los gránulos chicos no presentan un marcador bioquímico característico, probablemente corresponden a una etapa en la diferenciación de los gránulos.

La subpoblación de gránulos medianos es la más numerosa y se caracteriza por una mayor concentración de adrenalina, DBH y AChE, lo que indica que ellos son gránulos adrenérgicos. Los gránulos grandes y los gigantes son menos numerosos y se correlacionan con la localización de noradrenalina más concentrada (gránulos noradrenérgicos) y con la menor actividad de AChE.

4. Se confirma la presencia de la AChE en todas las fracciones granulares, cuya actividad se correlaciona con el contenido de proteínas y su mayor actividad específica se encuentra en los gránulos medianos. La ausencia de contaminación por retículo endoplásmico o membranas plasmáticas comprobada en las micrografías electrónicas y por marcadores negativos, permite concluir que la AChE cuantificada en las diferentes subpoblaciones granulares es endógena.

La fracción 6 que contiene los gránulos cromafines gigantes (noradrenérgicos) presenta actividad enzimática de fosfatasa ácida, marcador positivo de lisosomas, lo que corrobora la presencia de algunas de estas estructuras observadas en las micrografías electrónicas correspondientes.

5. El método descrito en esta tesis para obtener subpoblaciones de gránulos cromafines homogéneas y puras es una herramienta útil para estudios posteriores como aquellos que pretendan confirmar el almacenaje de las encefalinas y neuropeptidos en determinado tipo de gránulos (adrenérgicos o noradrenérgicos), y para trabajos que tiendan a explicar los aspectos bioquímicos del transporte de la membrana en el ciclo exocitosis-endocitosis y cómo los procesos metabólicos que ocurren dentro del lumen de los gránulos son regulados a través de su membrana limitante.

G. BIBLIOGRAFIA.

Aunis, D., Miras-Portugal, M. T. y Mandel, P. Inhibition of adrenal dopamine β -hidroxilase by 6-hydroxy dopamine. *Biochem. Pharmacol.* 22: 2581-2589, 1973.

Bader, Marie-France, *Protéines contractiles et microtubules dans les cellules chromaffines: rôle au cours de la sécrétion.* Tesis de Doctorado. Universidad Luis Pasteur. Francia. 154 pp.

Bastiansen, E., De Block, J. y De Potter, P. Neuropeptide Y is localized together with enkephalins in adrenergic granules of bovine adrenal medulla. *Neuroscience.* 25: 679-686, 1988.

Bon, S., Bader, M. F., Aunis, D, Massoulie, J. y Henry, J. P. Subcellular distribution of acetylcholinesterase forms in chromaffin cells: Do chromaffin granules contain a specific secretory acetylcholinesterase?. *Eur. J. Biochem.* 190: 221-232, 1990.

Bradford, M. M., A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254. 1976.

Brimijoin, S., Molecular forms of acetylcholinesterase in brain, nerve and muscle: nature, localization and dynamics. *Progress in Neurobiol.* 21: 291-322. 1983.

Brooks, R. V. Biosynthesis and metabolism of adrenocortical steroids, en: The adrenal gland. Raven Press, USA. pp. 67-92, 1979.

Burgun, C. Redistribution de composants synaptiques au cours de l'activite nerveuse. Tesis de Doctorado. Universidad Luis Pasteur, Francia. 98 pp., 1990.

Burgun, C., Martínez de Muñoz, D. y Aunis, D. Osmotic fragility of chromaffin granules prepared under isoosmotic or hiperosmotic conditions and localization of acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta.* 839: 219-227, 1985.

Carmichael, S. W. y Winkler, H. The adrenal chromaffin cell. *Scientific American.* 253: 40-49, 1985.

Carmichael, S. W. The adrenal medulla. Cambridge University Press, USA, Vol. 4, 259 pp. 1986.

Carty, S. E., Johnson, R. G. y Scarpa, A. The isolation of intact adrenal chromaffin granules using isotonic Percoll density gradients. *Anal. Biochem.* 106: 438-445, 1980.

Chubb, I. W., Hodgson, A. J. y White, G. H. Acetylcholinesterase hydrolyses substance P. *Neuroscience.* 5: 2065-2072, 1980.

Chubb, I. W. y Smith, A. D. Release of acetylcholinesterase into the perfusate from de ox adrenal gland. *Proc. R. Soc. Lond. B191:* 263-269, 1975.

Coupland, R. E. Determining sizes and distribution of sizes of spherical bodies such as chromaffin granules in tissue sections. Nature: 217: 384-388, 1968.

Coupland, R. E. y Hopwood, D. The metabolism of a histochemical reaction differentiating between adrenaline and noradrenaline storing cells in the electron microscope. Nature. 209: 590-591, 1966a.

Coupland, R. E. y Hopwood, D. The mechanism of the differential staining reaction for adrenaline and noradrenaline storing granules in tissues fixed in glutaraldehyde. J. Anat. 100: 227-243, 1966b.

Creutz, C. E. y Pollard, H. B., A biophysical model of the chromaffin granule: accurate description of the kinetics of ATP and Cl^- dependent granule lysis. Biophys. J. 31: 255-269. 1980.

Dalmaz, Y. y Peyrin L. Occurrence of dopamine in the chromaffin tissue of the cartilaginous selachian fish: *Scyliorhinus canicula* Comp. Biochem. Pysiol. 59C: 135-143, 1978.

Da Prada, M., Berlepesch, K. y Pletscher, A., Storage of biogenic amines in blood platelets and adrenal medulla. Lack of evidence for direct involvement of glycosaminoglycans. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Path. Pharmacol. 275: 315-322. 1972.

Eagles, P.A.M., Johnson, L. M. y Van Horn, C. Freeze-fracture of adrenal chromaffin granules. *Neuroscience*. 2: 153-158, 1977.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. Jr. y Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95, 1961.

Granot, J. NMR Studies of catecholamines. Interactions with adenine nucleotides by ^{31}P magnetic resonance. *FEBS Lett.* 88: 283-286, 1978.

Gratzl, M. 1984. Distribution of chromaffin secretory vesicles, acetylcholinesterase and lysosomal enzymes in sucrose and Percoll gradients. *Anal. Biochem.* 142: 148-154, 1984.

Gratzl, M., Krieger-Braver, H. y Ekerdt, R. Latent acetylcholinesterase in secretory vesicles from adrenal medulla. *Biochem. Biophys. Acta.* 649: 355-366, 1981.

Greenfield, S. A. The significance of dendritic release of transmitter and protein in the substantia nigra. *Neurochem. Int.* 7(6): 887-901, 1985.

Helle, K. B., Reed, R. K., Pihl, K. E. y Serck-Hanssen, G. Osmotic properties of the chromogranins and relation to osmotic pressure in catecholamine storage granules. *Acta Physiol. Scand.* 123: 21-33, 1985.

Hogue-Angeletti, R. A. Nonidentity of chromogranin A and dopamine β -mono-oxygenase. Arch. Biochem. Biophys. 184: 364-372, 1977.

James, V. H. T., The adrenal gland. Raven Press, USA, Pag. V., 1979.

Kaufman, S. y Friedman, S. Dopamine β -hydroxylase. Pharmacol. Rev. 17: 71-99, 1965.

Kirshner, N. Functional organization of adrenal chromaffin vesicles en: Advances in biochemical psychopharmacology and behavior, (Mandell, A. J. Ed). Raven Press, USA. Vol. 13. pp. 95-107, 1975.

Krivanek, J. What is the correct value for Na^+ , K^+ -ATPase activity in homogenates of cerebral cortex? J. of neurobiology. 17: 103-112, 1986.

Lang, R. E., Taugner, G., Gaida, W., Ganter, O., Kraft, Unger, T. H. y Wunderlich, I. Evidence against co-storage of enkephalins with noradrenaline in bovine adrenal medullary granules. Eur. J. of Pharmacol. 86: 117-120, 1983.

Layer, P. G., Alber, R. y Rothjorn, F. G. Sequential activation of butyrylcholinesterase in rostral half somites and acetylcholinesterase in motoneurons and myotomes preceding growth of motor axons. Development. 102: 387-396, 1988.

Levi-Montalcini, R. The nerve growth factor 35 years later. Science. 237: 1154-1162, 1987.

Livett, B. G., Dean, D. M., Whelan, L. G., Underfriend, S. y Rossier, J. Co-release of enkephalin and catecholamines from cultured adrenal chromaffin cells. Nature. 289: 317-319, 1981.

Livett, B. G., Day, R., Elde, R. P. y Howe, P. R. C., Co-storage of encephalins and adrenaline in the bovine adrenal medulla. Neuroscience. 7: 1323-1332. 1982.

Livett, B. G., Adrenal medulla chromaffin cells *in vitro*. Physiol. Rev. 64: 1103-1161. 1984.

Luft, H. H., Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9: 409-414, 1961.

Mizobe, F., Iwamoto, M. y Livett, B. G. Parallel but separate release of catecholamines and acetylcholinesterase from stimulated adrenal chromaffin cells in culture. J. Neurochem. 42: 1433-1438, 1984.

Morris, S. J. y Schovanka, I. Some physical properties of adrenal medulla chromaffin granules isolated by a new continuous iso-osmotic density gradient method. Biochem. Biophys. Acta. 464: 53-64, 1977.

Palade, G.E., A study of fixation for electron microscopy. J. Exp. Med. 98: 285-298, 1952.

Peachy, L.D., Thin sections. I. A study of section thickness and physical distortion produced during microtomy. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4: 233-242, 1958.

Pelto-Huikko, M., Salminen, T. y Hernoven, A. Enkephalin like immunoreactivity is restricted to the adrenalin cells in the hamster adrenal medulla. Histochemistry. 73: 493, 1982.

Phillips, J. H. Dynamic aspects of chromaffin granule structure. Neuroscience. 7: 1595-1609, 1982.

Phillips, J. H., Allison, Y. P. y Morris, S. J. The distribution of calcium, magnesium, copper and iron in the bovine adrenal medulla. Neurociencia, 2: 147-152, 1977.

Rodríguez del Castillo, A., Torres, M., Delicado, E. G. y Miras-Portugal M. T. Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates- Ap_4A y Ap_5A - in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules. J. of Neurochem. 51: 1696-1703, 1988.

Sabatini, D.D., Bensch, K. y Barnett, R. J., Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. J. Cell. Bio. 17: 19-58, 1963.

Schultzberg, M., Lundberg, J. M., Hökfelt, T., Terenius, L., Brandt, J., Elde, R. P. y Golstein, M. Enkephalin-like immunoreactivity in gland cells and nerve terminals of the adrenal medulla. *Neuroscience*. 3: 1169, 1978.

Serck-Hanssen, G. y Christiansen, E. N. Uptake of calcium in chromaffin granules of bovine adrenal medulla stimulate *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta*. 307: 404-414, 1973.

Simon, J. P., Bader, M. F. y Aunis, D. Secretion from chromaffin cells is controlled by chromogranin A-derived peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 1712-1716, 1988.

Small, D. H., Ismael, Z. y Chubb, W. Acetylcholinesterase exhibits trypsin-like and metallo exopeptidase-like activity in cleaving a model peptide. *Neuroscience*. 21: 991-995, 1987.

Small, D. H., Ismael, Z. y Chubb, W. I. Acetylcholinesterase hydrolyses chromogranin A to yield low molecular weight peptides. *Neuroscience*. 19: 289-295, 1986.

Smith, A. D. y Winkler, H. A simple method for the isolation of adrenal chromaffin granules on a large scale. *Biochem. J.* 103: 480-482, 1967.

Stanton, H. C. y Woo, S. K. Development of adrenal medullary function in swine. *Am. J. Physiol.* 234: E137-E145, 1978.

Steffen, H., Da Prada, M. y Pletscher, A. Fluorescence properties of catecholamines in isolated storage organelles of adrenal medulla. *Biochim. Biophys. Acta.* 338:561-571, 1974.

Steiner, H. J., Schmid, K. W., Fischer-Colbrie, R. y Winkler, H. Co-localization of chromogranin A and B, secretogranin II and neuropeptide Y in chromogranin granules of rat adrenal medulla studied by electron microscopic immunocytochemistry. *Histochemistry.* 91: 473-477, 1989.

Stempak, J. G. y Ward, R. T., An improved staining method for electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 22: 697-701, 1964.

Trifaro, J. M. y Dworkind, J. A new and simple method for isolation of adrenal chromaffin granules by means of an isotonic density gradient. *Anal. Biochem.* 34: 403-412, 1970.

Venable, J. H. y Coggeshall, R. E., A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 25: 407-408, 1965.

Viveros, O. H., Arqueros, I. y Kirshner, N. Mechanism of secretion from the adrenal medulla. VI. Effect of reserpine on the dopamine β -hidroxilase and catecholamine content and on the buoyant density of adrenal storage vesicles. *Mol. Pharmacol.* 7: 434-443, 1971.

Wilson, S. P., Chang, K. J. y Viveros, H. Proportional secretion of opioid peptides and catecholamines from adrenal chromaffin cells in culture. *J. Neuroscience*. 2: 1150-1156, 1982.

Winkler, H., Schneider, F. H., Rufener, C., Nakane, P. K. y Hortnagl, H., Membranes of adrenal medulla: Their role in exocytosis. En: *Cytopharmacology of secretion. Advances in Cytopharmacology* (eds. Ceccarelli, B., Clementi, F. y Meldolesi, J.) Vol. 2. pp 127-139. Plenum Press. New York. 1974.

Winkler, H. The composition of adrenal chromaffin granules: an assessment of controversial results. *Neuroscience*. 1: 65-80. 1976.

Winkler, H., Apps, D. K. y Fischer-Colbrie, R. The molecular function of adrenal chromaffin granules: established facts and unresolved topics. *Neuroscience*. 18: 261-290, 1982.

Winkler, H. y Carmichael, S. W. *The chromaffin granule* En: *The secretory granule* (Poisner, A. M. y Trifaro, J. M., Eds). Elsevier Biochemical Press, USA. pp. 3-79, 1982.