

Análisis de liberación de catecolaminas en células cromafines de ratón mediante Amperometría

J. Palma-Espinosa
Laboratorio de Neurociencia Computacional - CNScLAB
Universidad Valparaíso. Valparaíso, Chile
javier.palma@cinv.cl

Abstract

En un organismo pluricelular, las células deben interpretar las numerosas señales que reciben desde otras células. Durante este proceso de señalización, la célula que porta el mensaje, libera moléculas mensajeras al medio extracelular, en un proceso llamado exocitosis. Para estudiar la exocitosis, se suelen emplear cultivos de líneas celulares, siendo uno de los más utilizados las células cromafinas de la glándula adrenal. Empleando amperometría, se midieron los eventos de exocitosis y se analizaron las variables que podrían estar mediando en este proceso, mostrando que la exocitosis se provoca mediante dos vías diferentes. Keywords: Amperometría, célula cromafin, exocitosis, pyhon

1 Introducción

En un organismo pluricelular, las células deben interpretar las numerosas señales que reciben desde otras células (Alberts and Bray, 2006). Estas señales, generan respuestas químicas que permiten coordinar no sólo su propio comportamiento, sino también generar respuestas a una escala superior, que permita la supervivencia de dicho organismo (Jarukanont et al., 2015). Esta cadena de interpretación y generación de señales suele realizarse por vías químicas, mediante la exocitosis regulada de moléculas bioquímicas (Aspinwall et al., 1999, Evanko, 2005), tales como catecolaminas, serotonina y péptidos (Mosharov and Sulzer, 2005), que desencadenarán la respuesta deseada en la célula blanco, en particular. Durante este proceso, la célula que porta el mensaje, libera moléculas mensajeras al medio extracelular, en un proceso llamado exocitosis (González-Jamett et al., 2010), el cual se produce cuando vesículas portadoras de las moléculas señalizadoras, generan un poro de fusión entre las membranas de la vesícula y la célula (Amatore et al., 2009, Oleinick et al., 2013), generando un flujo de tales

moléculas hacia el medio extracelular, o espacio sináptico en el caso de neuronas.

Modelos de Exocitosis.

Actualmente, se conocen tres modelos por los cuales se produce la exocitosis de moléculas mensajeras: Colapso-fusión completa, kiss and run y exocitosis compuesta. El modelo de *exocitosis de fusión completa* propone que la vesícula transportadora comienza a fusionarse con la membrana celular, generando un espacio, de forma tal que esta fusión provoca una liberación de las moléculas señalizadoras hacia el medio extracelular, mientras que el modelo de *exocitosis compuesta* establece que la fusión a la membrana celular se realiza por complejos vesícula-vesícula fusionados previamente (Wu et al., 2014). El modelo de *kiss and run* se plantea como una fusión no convencional entre las vesículas secretoras y los espacios de membrana que liberarán su contenido intravesicular. Su característica principal es que la vesícula mantiene, en términos generales, su forma, realizando sólo una pequeña integración a la membrana celular, para luego de liberar una pequeña cantidad de componentes señalizadores, es capaz de retirarse de la membrana y volver a lumen celular (Alabi and Tsien, 2013).

Células cromafinas como modelo de estudio de exocitosis.

Para estudiar la exocitosis, se suelen emplear cultivos de líneas celulares (O'Neill, 1994), tales como células cromafinas de la glándula adrenal (Bader et al., 2002, Wightman et al., 1991), o mastocitos para el estudio de serotonina (Reynier-Rebuffel et al., 1997). Para el estudio de liberación de catecolaminas se utilizan cultivos de células adrenales cromafinas, ya sean bovinas o de roedores. El origen en el neuroectodermo, junto con sus similitudes con las neuronas del sistema simpático, permiten que las células cromafinas sean un buen modelo para la exocitosis de catecolaminas. Adicionalmente, debido a su estabilidad en el cultivo, preservando las propiedades de la glándula *in vivo* este tipo de células se ha convertido en el modelo más

utilizado(Bader et al., 2002, Leszczyszyn et al., 1991, Wightman et al., 1991).

Amperometría y mediciones de liberación de neurotransmisores.

El grupo de Wightman(Leszczyszyn et al., 1990, 1991, Mosharov and Sulzer, 2005), mostraron que la utilización de electrodos de fibra de carbono para la detección de la secreción de catecolaminas liberadas por células cromafinas, es farmacológicamente indistinto de las encontradas en múltiples preparaciones celulares, reportadas previamente por varios laboratorios(Phillips et al., 1983, Viveros et al., 1969). En esta técnica, denominada amperometría, se detecta la secreción de catecolaminas a través de dicho electrodo, mediante una corriente electroquímica, medida al colocar el electrodo en la superficie de la célula secretora y registrando la actividad exocitótica debido a la oxidación de los neurotransmisores liberados en el medio extracelular. Esta actividad se observa a través de *spikes* o espigas electroquímicas de corriente, generadas por una estimulación externa a la célula en estudio.

2 Materiales y Métodos

Cultivo celular. Células cromafines de las glándulas adrenales se aislaron y extrajeron según protocolos previamente descritos(Colliver et al., 2000, Domínguez et al., 2012, González-Jamett et al., 2010). En resumen, las glándulas adrenales se colocaron directamente en medio de disección células previamente enfriado. El exceso de grasa de cada glándula fue removido, mientras que los fragmentos medulares se aislaron del tejido cortical en presencia de medio de disección enfriado, con la ayuda de un microscopio de disección. Todos los fragmentos medulares se combinaron y almacenaron en hielo, previo a la digestión enzimática. Posteriormente, se eliminó el medio de disección mediante centrifugación y los fragmentos medulares se resuspendieron en una solución salina que contenía collagenasa y DNasa como enzimas degradante, durante una hora, a temperatura de 37°C. Treinta minutos después de la digestión, se añadió tripsina con EDTA. Durante el transcurso de la digestión, los fragmentos medulares se trituraron aproximadamente cada 15 minutos. Al final de la digestión, se eliminaron las enzimas y las células se resuspendieron en medio de cultivo caliente, suplementado con suero bovino fetal. Luego de la digestión, las células se plaquearon con 4 ml de medio de cultivo sobre placas de cultivo revestidas con poli-D-lisina (Becton Dickinson, Bedford, MA, EE. UU.) y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Las células se usaron para experimentos 24 - 48 h después

de la siembra.

Detección amperométrica de la exocitosis.La liberación de catecolaminas se detectó mediante amperometría, como lo muestran estudios previos(Evanko, 2005, González-Jamett et al., 2010, Leszczyszyn et al., 1991, Wightman et al., 1991).Se crearon electrodos de registro utilizando fibra de carbono(5µm de diámetro), insertándolos dentro de capilares de borosilicato(1.5-1.8x100 mm, Kimble Products KIMAX-51^o) para posteriormente estirarlos (máx 25µm diam) y cortarlos. Luego del proceso de corte, se prepara resina epoxi(1:1 resina:solvente) para sellar la punta de los capilares, calentando la mezcla a 90°C. Con la mezcla caliente, se sumerge la punta de los capilares durante 40 segundos y se retira cuidando de no generar burbujas en la resina. Finalmente, se endurece la resina mediante un protocolo de calentamiento(120 min@200°C y luego 240min@250°C). Los registros electroquímicos se realizaron usando un amplificador de *patch clamp*,Axopatch 1C modificado para este fin de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Molecular Devices). Las células se colocaron en una cámara de perfusión colocada en la platina de un microscopio invertido y se lavaron en solución amortiguadora Krebs-HEPES (en mM: 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 10 HEPES-NaOH y 10 glucosa, pH 7.4) La liberación de catecolamina se estimuló mediante una eyección a presión de 10 s de una solución de K⁺ 100 mM desde una micropipeta situada a 10-15 µm de la célula. Los registros amperometricos fueron entregados pre-procesados. La frecuencia de adquisición fue inferida mediante el ratio de duración del registro versus cantidad de puntos del registro, obteniendose una frecuencia de adquisición de 2.5 kHz.

Análisis de Datos. Se analizó el registro entregado en formato IGOR (Wavemetrics) mediante un script realizado en Python 3.6. Previo al análisis, los datos fueron prefiltrados empleando un filtro tipo media móvil, sin embargo, para los análisis posteriores se utilizó el registro sin filtrar. Este script permitió identificar automáticamente las espigas, iniciación y término de los picos, área bajo la curva y $t_{1/2}$ para cada una de las espigas. Posteriores análisis y gráficos se realizaron empleando un script en jupyter notebook con Python 3.6. Los scripts utilizados pueden ser descargados en <https://github.com/jpalma-espinosa/Amperometria-UV>. Los peaks con corrientes $I_{peak} < 10pA$, o aquellos que tuviesen un $t_{1/2} < 3ms$ fueron excluidos del análisis. Los análisis del pie se restringieron a aquellos que tuviesen una corriente $I_{foot} > 3p$, medidos en el punto de máxima amplitud del pie, o aquellos que tuviesen una duración $t_{foot} > 3ms$.

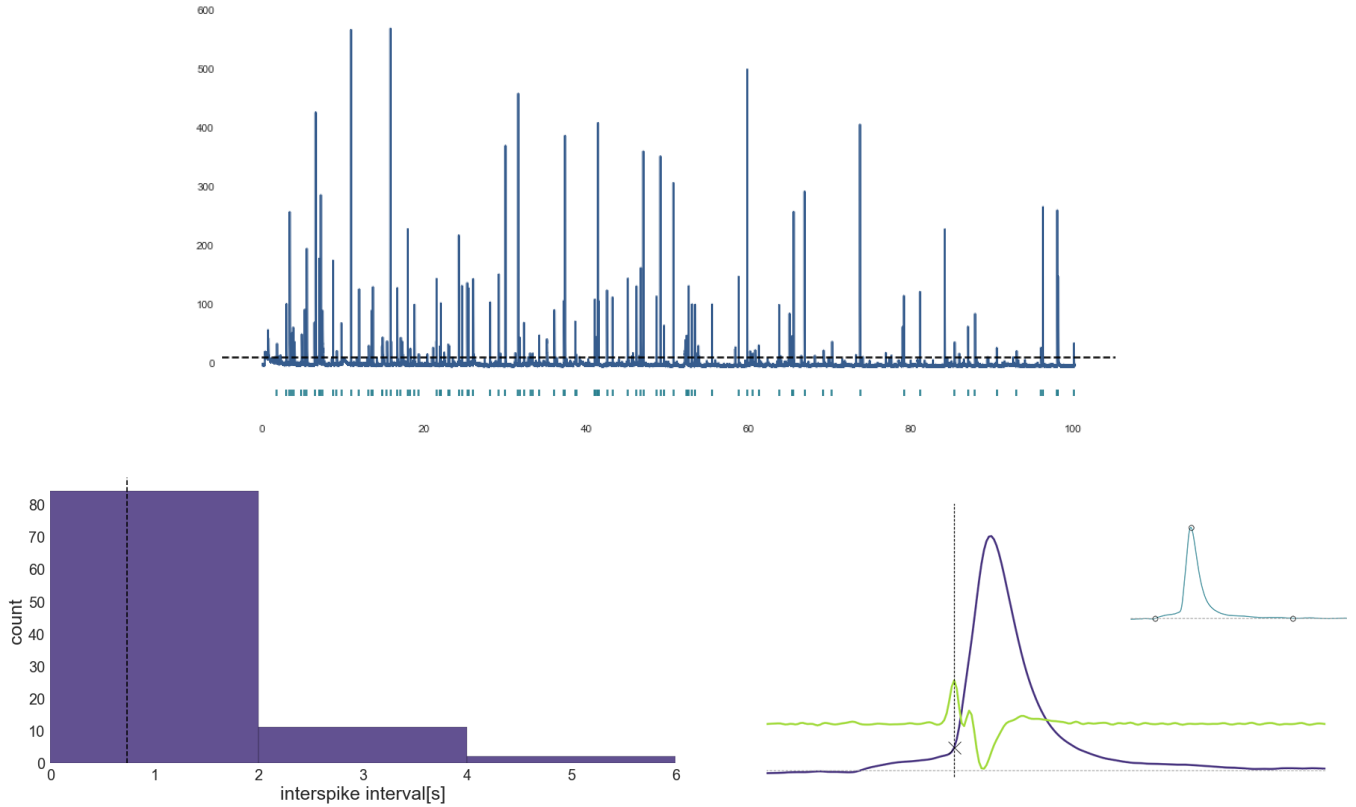


Figure 1: **Escalas temporales de la liberación de neurotransmisores.** (arriba) Registro completo del experimento. Durante los 100 segundos de duración del experimento, se obtuvieron diversos eventos de liberación de neurotransmisores. La línea muestra el umbral sobre el cual se considerarán los eventos. Al pie del gráfico, se muestran los eventos que fueron considerados para el análisis ($I_{max} > 3pA$; $t_{1/2} > 3ms$). (abajo-izquierda) Histograma del ISI. La línea negra marca la media de la distribución. (abajo-derecha) Un evento característico. En lila se muestra el evento, en verde se muestra su segunda derivada. Se observa que el valor de inicio de la espiga (y que fue tomado también como tiempo de término del pie) coincide con el valor máximo de la segunda derivada del evento, marcado por la línea vertical negra. La línea gris claro muestra la línea de base. (inset) Mismo evento mostrado a una escala menor. Se marcaron los puntos de inicio t_{ie} , peak $t_{I_{max}}$ y de término del evento t_{fe} . La línea gris marca la línea base de la medición.

3 Resultados

Una única célula libera gran cantidad de neurotransmisores. Para medir la cantidad de catecolaminas liberadas durante el experimento, se calculó el área bajo la curva desde el punto de inicio, t_{ie} al punto de término de un evento t_{fe} , entendiendo por evento al fenómeno de pie seguido de una espiga. Se definió el punto t_{ie} como aquel punto donde, en aquellas espigas que superasen los umbrales seleccionados, se obtenía la mínima amplitud que superase el valor basal. Análogamente, se definió t_{fe} , como aquél punto inmediatamente anterior al nivel basal. El término del pie e inicio de la espiga t_{fp} , se definió como el valor donde la segunda derivada tenía su máximo

valor (Evanko, 2005). Para el caso de eventos sin pie, $t_{fp} = t_{ie}$. La tasa de liberación de catecolaminas se calculó midiendo la diferencia entre los tiempos de I_{max} consecutivos. De esta manera, pudo obtenerse el *inter spike interval (ISI)* de la célula en cuestión (fig. 1). El ISI medio para la célula en estudio fue de 1.014s. Es interesante notar que existe una tasa de liberación constante. Estos resultados concuerdan en parte con lo reportado por otros autores (Jarukanont et al., 2015). Además de calcular la tasa de liberación de catecolaminas, se calculó la cantidad total de neurotransmisores liberados durante el experimento. Para esto, se calculó la cantidad liberada, utilizando $N = \frac{Q}{n \cdot F}$, donde N es la cantidad de moléculas liberadas, Q es el área bajo la curva, medido entre t_{ie} y t_{fe} , n es el número de

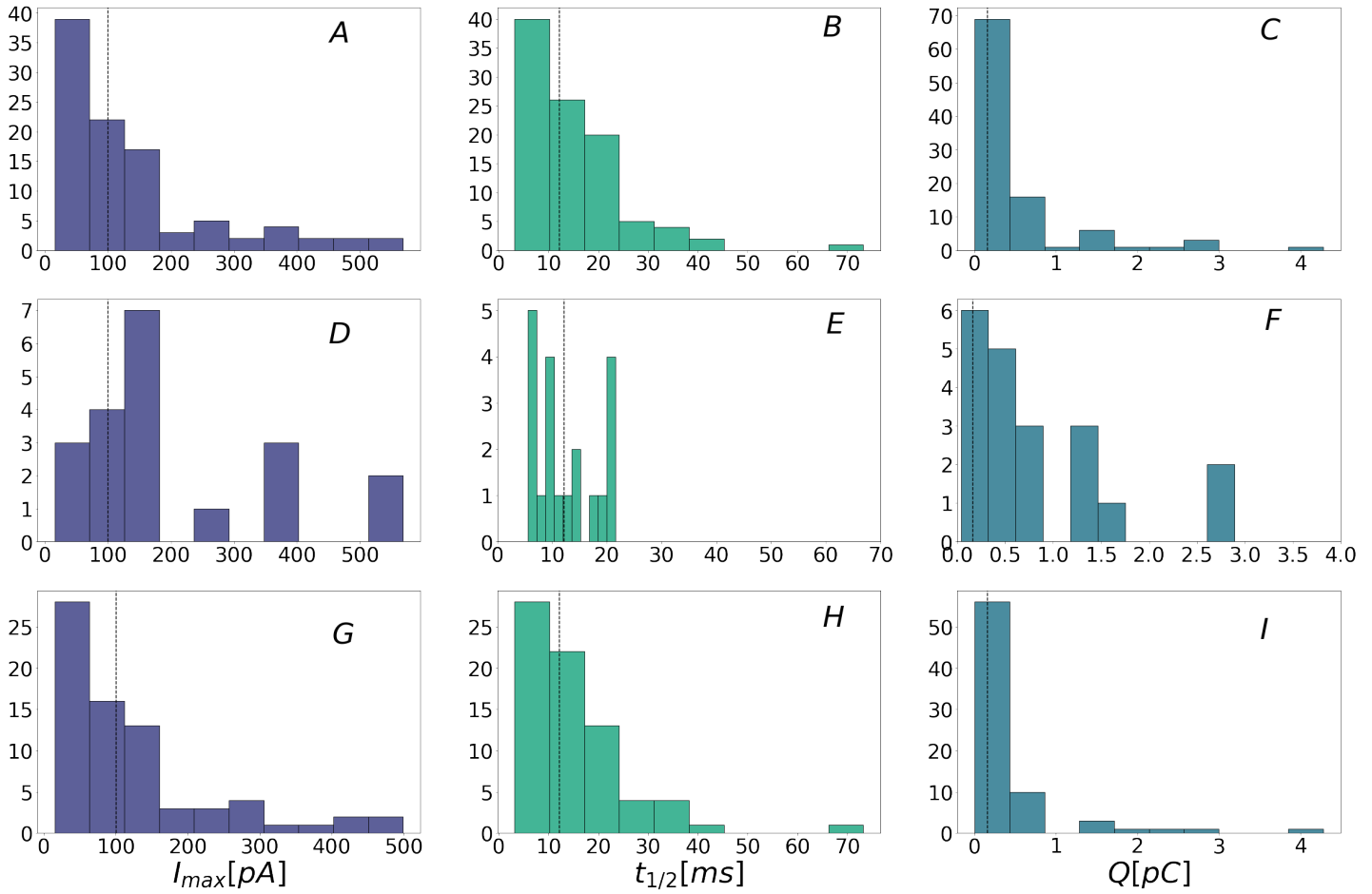


Figure 2: Histogramas de I_{max} , $t_{1/2}$ y Q para los eventos totales (A,B,C), eventos con pie(D,E,F) y eventos sin pie (G,H,I)

electrones donados por cada molécula oxidada, que para el caso de las catecolaminas es 2, y finalmente F corresponde a la constante de Faraday (Evanko, 2005).

La liberación de neurotransmisores se produce a través de eventos diferentes.. Para el análisis de liberación de catecolaminas por evento, se separó a los eventos en dos poblaciones: con y sin pie. Del total de eventos encontrados (N=98), aproximadamente el 75% de ellos no presentaba el pie previo al spike (N=73). Este resultado es similar a los resultados obtenidos en otros laboratorios Amatore et al. (2005, 2009) Estos eventos sin pie fueron además, separados en aquellos cuya amplitud era superior a 3 [pA] (N=20) e inferior (N=5).

Para medir la contribución de liberación de neurotransmisores al medio extracelular, se calcularon las corrientes máximas del peak, la duración del peak y la cantidad de catecolaminas liberadas, representada

mediante el área bajo la curva entre t_{ie} y t_{fe} . Los resultados muestran que si bien los fenómenos con pie presentan una mediana menor de corriente I_{peak} en comparación con aquellos sin pie, un 35% de ellos presentaron amplitudes de corrientes mayores. Adicionalmente, los eventos que presentan pie no muestran una distribución distinguible en la duración del peak ($t_{1/2}$) o en la cantidad de catecolaminas liberadas. Por el contrario, los eventos sin pie presentan una marcada ley de potencias en sus histogramas, destacando su mayor corriente de peak media y su menor $t_{1/2}$ (1 A, D y G).

Una rápida depleción de las vesículas es el mecanismo principal de liberación de catecolaminas Con los datos obtenidos previamente, se observa que la distribución de los fenómenos que no presentan

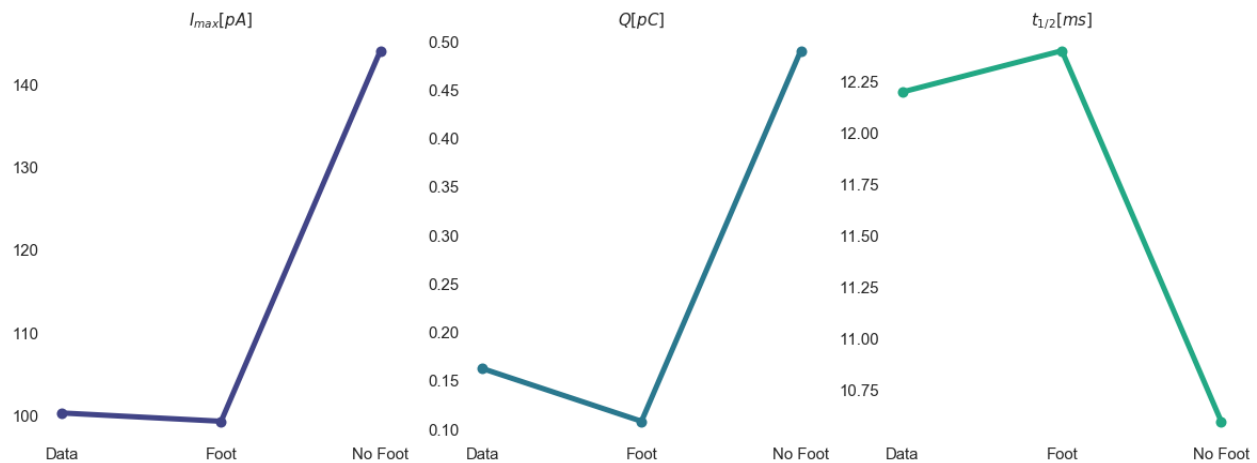


Figure 3: Medianas de I_{max} , Q y $t_{1/2}$ para los eventos totales(data) eventos con pie(foot) y eventos sin pie (no foot)

pie es similar a la distribución de la población. En particular, las distribuciones de $t_{1/2}$ y Q son similares para la población completa y la población de espigas sin pie. Es interesante notar que la mediana de $t_{1/2}$ es menor en el caso de fenómenos sin pie, en contraste con los fenómenos con pie. Adicionalmente, la mediana de Q es mayor en los fenómenos que presentan pie. Esto ya ha sido reportado previamente Amatore et al. (2009), en donde señalan que mientras que el pie se relaciona con el poro de fusión, la espiga está asociada con la fusión de membrana y la exposición del contenido vesicular hacia el medio extracelular.

4 Discusión

Los datos analizados permiten estudiar los fenómenos de exocitosis en células cromafines de la glándula adrenal. Estos fenómenos pueden ser separados en fenómenos con y sin pie, previo a la iniciación de la espiga de liberación (Amatore et al., 2005). En los datos, se observa que un 25,55% de los eventos corresponden a eventos que presentan un pie previo a la espiga de liberación, lo que concuerda con resultados reportados previamente (Amatore et al., 2005, 2009). Una explicación para esto es que el tamaño cuantitativo muestra dos poblaciones de vesículas dentro de una célula (Grabner et al., 2005). Adicionalmente, se propone que estas dos poblaciones obedecen a dinámicas diferentes de fusión de vesícula, lo que permite inferir que estas poblaciones son diferentes debido a las dinámicas de fusión de vesículas con la membrana celular (Amatore et al., 2009, Martens and McMahon, 2008).

En resumen, el análisis mediante técnicas de amper-

ometría permite analizar la dinámica de liberación, cantidad de neurotransmisor liberado y establecer principios que podrían explicar el fenómeno de exocitosis.

References

- AbdulRasheed A Alabi and Richard W Tsien. Perspectives on kiss-and-run: role in exocytosis, endocytosis, and neurotransmission. *Annual review of physiology*, 75:393–422, 2013.
- Bruce Alberts and Dennis Bray. *Introducción a la biología celular*. Ed. Médica Panamericana, 2006.
- Christian Amatore, Stéphane Arbault, Imelda Bonifas, Yann Bouret, Marie Erard, Andy G Ewing, and Leslie A Sombers. Correlation between vesicle quantal size and fusion pore release in chromaffin cell exocytosis. *Biophysical journal*, 88(6):4411–4420, 2005.
- Christian Amatore, Stéphane Arbault, Imelda Bonifas, and Manon Guille. Quantitative investigations of amperometric spike feet suggest different controlling factors of the fusion pore in exocytosis at chromaffin cells. *Biophysical chemistry*, 143(3):124–131, 2009.
- Craig A Aspinwall, Lan Huang, Jonathan RT Lakey, and Robert T Kennedy. Comparison of amperometric methods for detection of exocytosis from single pancreatic β -cells of different species. *Analytical chemistry*, 71(24):5551–5556, 1999.
- Marie Bader, Ronald W Holz, Konosuke Kumakura, and Nicolas Vitale. Exocytosis: the chromaffin cell as a

- model system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 971(1):178–183, 2002.
- Thomas L Colliver, Ellen J Hess, Emmanuel N Pothos, David Sulzer, and Andrew G Ewing. Quantitative and statistical analysis of the shape of amperometric spikes recorded from two populations of cells. *Journal of neurochemistry*, 74(3):1086–1097, 2000.
- Natalia Domínguez, Miriam Rodríguez, J David Machado, and Ricardo Borges. Preparation and culture of adrenal chromaffin cells. In *Neurotrophic Factors*, pages 223–234. Springer, 2012.
- Daniel Evanko. Primer: spying on exocytosis with amperometry. *Nature methods*, 2(9):650, 2005.
- Arlek M González-Jamett, Ximena Báez-Matus, Montserrat A Hevia, María José Guerra, María José Olivares, Agustín D Martínez, Alan Neely, and Ana M Cárdenas. The association of dynamin with synaptophysin regulates quantal size and duration of exocytotic events in chromaffin cells. *Journal of Neuroscience*, 30(32):10683–10691, 2010.
- Chad P Grabner, Steven D Price, Anna Lysakowski, and Aaron P Fox. Mouse chromaffin cells have two populations of dense core vesicles. *Journal of neurophysiology*, 94(3):2093–2104, 2005.
- Daungruthai Jarukanont, Imelda Bonifas Arredondo, Ricardo Femat, and Martin E Garcia. Vesicle motion during sustained exocytosis in chromaffin cells: numerical model based on amperometric measurements. *PloS one*, 10(12):e0144045, 2015.
- David J Leszczyszyn, Jeffrey A Jankowski, O Humberto Viveros, Emanuel J Diliberto, Joseph A Near, and R Mark Wightman. Nicotinic receptor-mediated catecholamine secretion from individual chromaffin cells. chemical evidence for exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 265(25):14736–14737, 1990.
- David J Leszczyszyn, Jeffrey A Jankowski, O Humberto Viveros, Emanuel J Diliberto, Joseph A Near, and R Mark Wightman. Secretion of catecholamines from individual adrenal medullary chromaffin cells. *Journal of neurochemistry*, 56(6):1855–1863, 1991.
- Sascha Martens and Harvey T McMahon. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(7):543, 2008.
- Eugene V Mosharov and David Sulzer. Analysis of exocytotic events recorded by amperometry. *Nature methods*, 2(9):651, 2005.
- Alexander Oleinick, Frédéric Lemaître, Manon Guille Collignon, Irina Svir, and Christian Amatore. Vesicular release of neurotransmitters: converting amperometric measurements into size, dynamics and energetics of initial fusion pores. *Faraday discussions*, 164:33–55, 2013.
- Robert D. O'Neill. Microvoltammetric techniques and sensors for monitoring neurochemical dynamics in vivo. a review. *The Analyst (Royal Society of Chemistry)*, 119, 1994. doi: 10.1039/AN9941900767.
- John H Phillips, Keith Burridge, Steven P Wilson, and Norman Kirshner. Visualization of the exocytosis/endocytosis secretory cycle in cultured adrenal chromaffin cells. *The Journal of cell biology*, 97(6):1906–1917, 1983.
- Anne-Marie Reynier-Rebuffel, Jacques Callebort, Jean-Marie Launay, Jacques Seylaz, and Pierre Aubineau. Ne inhibits cerebrovascular mast cell exocytosis induced by cholinergic and peptidergic agonists. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 273(3):R845–R850, 1997.
- OH Viveros, L Arqueros, and N Kirshner. Quantal secretion from adrenal medulla: all-or-none release of storage vesicle content. *Science*, 165(3896):911–913, 1969.
- RM Wightman, JA Jankowski, RT Kennedy, KT Kawagoe, TJ Schroeder, DJ Leszczyszyn, JA Near, EJ Diliberto, and OH Viveros. Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(23):10754–10758, 1991.
- Ling-Gang Wu, Edaeni Hamid, Wonchul Shin, and Hsueh-Cheng Chiang. Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms. *Annual review of physiology*, 76:301–331, 2014.