



Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**POTENCIACIÓN DE LA RESPUESTA SECRETORA
DE CATECOLAMINAS POR CONCENTRACIONES
UMBRAL DE NICOTINA EN CÉLULAS
CROMAFINES BOVINAS**

**TESIS DOCTORAL
LAURA TAPIA LÓPEZ**

Madrid, Mayo de 2007



Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**POTENCIACIÓN DE LA RESPUESTA SECRETORA
DE CATECOLAMINAS POR CONCENTRACIONES
UMBRAL DE NICOTINA EN CÉLULAS
CROMAFINES BOVINAS**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por

LAURA TAPIA LÓPEZ

Directores:

**LUIS GANDÍA JUAN
ANTONIO GARCÍA GARCÍA**

Madrid, Mayo de 2007

LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

α-bgt	Alfa-bungarotoxina
ABC	Área bajo la curva
ACh	Acetilcolina
AM	Acetoxi-metil éster
ARNc	Ácido ribonucleico copia
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
α-SNAP	Proteína soluble de unión a NSF (de " <i>soluble NSF attachment protein</i> ")
BAPTA	Ácido 1,2-bis (2-aminofenoxi) etano-N, N, N', N'-tetraacético
BK	Canales de K^+ Ca^{2+} -dependientes de alta conductancia
Caf	Cafeína
$[Ca^{2+}]_c$	Concentración de calcio citosólica
$[Ca^{2+}]_M$	Concentración de calcio en la matriz mitocondrial
$[Ca^{2+}]_{RE}$	Concentración de calcio en el retículo endoplásmico
CCB	Células cromafines bovinas
CCDV	Canales de calcio dependientes de voltaje
CICR	Liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (de " <i>Calcium-Induced Calcium Release</i> ")
Cho	Colina
DBH	Dopamina- β -hidroxilasa
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMPP	1,1-dimetil-4-fenil-piperazinio
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC₅₀	Concentración efectiva 50
EGTA	Ácido etilenglicol-bis- (β -aminoetil éter)-N, N, N', N'-tetraacético
FRET	Fluorescencia por transferencia de energía resonante
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GFP	Proteína fluorescente en verde
HEPES	Ácido (N-[2-hidroxiethyl]-piperacino-N'-[2-etanosulfónico])
HP	Potencial de fijación
5-HT	5-hidroxitriptamina
HVA	CCDV de alto umbral de activación (de " <i>high-voltage activated</i> ")
I_{ACh}	Corrientes en respuesta a ACh

I_{CRAC}	Corriente capacitativa de calcio (de “ <i>calcium release activated calcium current</i> ”)
IRP	Depósito de vesículas inmediatamente liberables (de “ <i>immediately releasable pool</i> ”)
K_d	Constante de disociación
KH	Medio Krebs-HEPES
λ	Longitud de onda
LDCV	Vesículas grandes de núcleo denso, o cromafines (de “ <i>Large dense core vesicles</i> ”)
LVA	CCDV de bajo umbral de activación (de “ <i>low-voltage activated</i> ”)
MARCKS	Proteínas sustrato de PKC ricas en alanina-miristoilada
Mec	Mecamilamina
MLA	Metilicaconitina
nAChR	Receptor nicotínico para la ACh de tipo neuronal
NCX	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺
Nic	Nicotina ditartrato
NSF	Factor sensible a N-etilmaleimida
Oxo	Oxotremorina M
PKC	Proteína quinasa C
PNMT	Feniletanolamina N-metiltransferasa
RE	Retículo endoplásmico
RIP₃	Receptores de inositol 1,4,5-trifosfato
Ry	Rianodina
RyR	Receptores de rianodina
RP	Depósito de vesículas de reserva (de “ <i>reserve pool</i> ”)
RRP	Depósito de vesículas rápidamente liberables (de “ <i>rapidly o readily releasable pool</i> ”)
SERCA	Ca ²⁺ -ATPasa del RE (de “ <i>Sarcoplasmic and Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase</i> ”)
SIF	Células cromafines de vesículas pequeñas (de “ <i>small intensely fluorescent cells</i> ”)
SK	Canales de K ⁺ Ca ²⁺ -dependientes de pequeña conductancia
SNAP-25	Proteína de 25 kDa asociada a sinaptosomas (de “ <i>synaptosome-associated protein 25</i> ”)

SNARE	Receptor de SNAP (de " <i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i> ")
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SRP	Depósito de vesículas lentamente liberables (de " <i>slowly releasable pool</i> ")
Thap	Tapsigargina
TIRFM	Microscopía de fluorescencia por reflexión total interna (o microscopía de onda o campo evanescente)
UPP	Depósito de vesículas inmaduras (de " <i>unprimed pool</i> ")
VAMP	Sinaptobrevina o proteína asociada a vesículas (de " <i>vesicle-associated membrane protein</i> ")
Vm	Potencial de membrana de la célula

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. MARCO EN EL QUE SE DESARROLLA ESTA TESIS3
2. LA CÉLULA CROMAFÍN COMO MODELO NEUROSECRETOR3
2.1. La glándula adrenal3
2.2. La célula cromafín y otras células de la médula adrenal5
2.3. Funciones fisiológicas de la célula cromafín7
2.4. Similitud entre células cromafines y neuronas: el término <i>paraneurona</i>8
3. CANALES IÓNICOS EN LA CÉLULA CROMAFÍN9
3.1. Ciclo de actividad de una célula cromafín	10
3.2. Canales iónicos regulados por voltaje en la célula cromafín	12
3.3. Canales de calcio dependientes de voltaje en la célula cromafín	13
3.4. Canales iónicos activados por ligando en la célula cromafín	15
3.5. Canales iónicos operados por depósitos intracelulares.....	15
4. HOMEOSTASIA CELULAR DEL CALCIO	16
4.1. Retículo endoplásmico (RE)	19
4.2. Mitocondria	21
4.3. Mecanismos de salida de calcio citosólico al exterior celular	22
5. EL RECEPTOR NICOTÍNICO DE TIPO NEURONAL (nAChR)	23
5.1. Estructura y composición de los nAChRs.....	23
5.2. Subunidades de los nAChRs.....	25
5.3. Aspectos funcionales de los nAChRs: Desensibilización	26
5.4. nAChRs en la célula cromafín bovina.....	29
5.5. Importancia fisiopatológica de los nAChRs	30
6. ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-SECRECIÓN	32
6.1. La vesícula cromafín.....	32
6.2. El complejo SNARE y el proceso exocitótico.....	33
6.3. Poblaciones funcionales de vesículas secretoras	36
6.4. El citoesqueleto en la célula cromafín	40
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	43

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo primario de células cromafines bovinas	51
2. Detección amperométrica en tiempo real de la liberación de catecolaminas por poblaciones de células cromafines bovinas.....	52
3. Registro de corrientes nicotínicas en célula cromafín bovina aislada mediante la técnica de <i>patch-clamp</i> en modo fijación de voltaje y configuración de parche perforado.....	56
4. Apunte sobre el sistema de perfusión empleado para el registro de I_{ACh}	61
5. Medición de los cambios del potencial de membrana en célula cromafín bovina aislada mediante <i>patch-clamp</i> en modo fijación de corriente y configuración de parche perforado.....	62
6. Determinación de cambios en la $[Ca^{2+}]_c$ en célula cromafín bovina aislada mediante la sonda fluorescente fura-2 acetoxi-metil éster (AM).....	63
7. Fuentes de materiales y reactivos.....	67
8. Estadística.....	68

RESULTADOS

1. POTENCIACIÓN DE LA SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS EN POBLACIONES DE CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS EN PRESENCIA DE BAJAS CONCENTRACIONES DE NICOTINA	71
1.1. Respuesta control de la secreción de catecolaminas en poblaciones de células cromafines bovinas.....	71
1.2. Potenciación de la secreción de catecolaminas evocada por pulsos de 100ACh ó 100K ⁺ en presencia continua de una concentración umbral de nicotina en poblaciones de células cromafines bovinas (Protocolo #1).....	74
2. CARACTERÍSTICAS DE LA POTENCIACIÓN DE LA RESPUESTA SECRETORA DE CATECOLAMINAS EN POBLACIONES DE CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS EN PRESENCIA DE BAJAS CONCENTRACIONES DE NICOTINA	80
2.1. La potenciación de la respuesta secretora de catecolaminas por nicotina es dosis-dependiente.....	80
2.2. La potenciación de la respuesta secretora de catecolaminas por nicotina es tiempo-dependiente.....	85

2.3. La potenciación de la respuesta secretora de catecolaminas por nicotina es reversible	89
2.4. La potenciación de la respuesta secretora de catecolaminas por nicotina es un fenómeno reproducible tras un período de reposo adecuado	91
3. IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS EN LA POTENCIACIÓN DE LA SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS EN POBLACIONES DE CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS POR CONCENTRACIONES UMBRAL DE NICOTINA	93
3.1. Efectos de mecamilamina, un antagonista nicotínico	93
3.2. Efecto de otros agonistas nicotínicos	95
3.3. Efectos de un agente despolarizante (K^+ 17 mM)	97
3.4. Efectos de agonistas muscarínicos	100
4. PATRÓN DE DESPOLARIZACIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS AISLADAS EN RESPUESTA A LA PERFUSIÓN CONTINUADA DE NICOTINA 3 μM Ó DE SOLUCIONES DESPOLARIZANTES CON ALTO K^+	102
5. DESENSIBILIZACIÓN DEL RECEPTOR NICOTÍNICO NEURONAL POR NICOTINA UMBRAL	104
5.1. Desensibilización de I_{ACh} en presencia continua de una concentración umbral de nicotina en células cromafines bovinas aisladas	105
6. EFECTO DE NICOTINA UMBRAL SOBRE LA SEÑAL DE CALCIO CITOSÓLICO EN CÉLULA CROMAFÍN BOVINA	109
DISCUSIÓN	111
CONCLUSIONES	127
BIBLIOGRAFÍA	131

INTRODUCCIÓN

1. MARCO EN EL QUE SE DESARROLLA ESTA TESIS

El trabajo de esta tesis se enmarca en el área de las señales intracelulares de calcio y de la exocitosis en células neuroendocrinas.

Antes de pasar a enumerar los objetivos fundamentales de este trabajo se describen las características principales del modelo celular empleado en ella, la célula cromafín, uno de los modelos de paraneurona más utilizado y que más ha contribuido en neurociencia a esclarecer fenómenos tales como:

- 1) receptores y canales que intervienen en la excitabilidad celular
- 2) almacenamiento y dinámica de vesículas neurosecretoras
- 3) mecanismos implicados en la exocitosis de neurotransmisores
- 4) movimientos y homeostasia del calcio intracelular

2. LA CÉLULA CROMAFÍN COMO MODELO NEUROSECRETOR

2.1.- La glándula adrenal

La célula cromafín se ubica en la médula de la glándula adrenal (o suprarrenal), que está considerada como un ganglio simpático modificado cuyas neuronas postsinápticas han perdido sus axones y se han convertido en células secretoras; en lugar de inervar un tejido y liberar neurotransmisores localmente en éste, vierten sus productos de secreción al torrente sanguíneo tras recibir un estímulo adecuado, por lo que sus neurotransmisores (catecolaminas, péptidos o purinas) se comportan conceptualmente como hormonas. En los mamíferos se sitúa una glándula encima de cada riñón (**figura 1**).

En la glándula adrenal de mamífero se diferencian dos zonas, tanto desde el punto de vista histológico como desde el funcional: corteza y médula (Carmichael y Stoddard, 1993). Ambas están recubiertas por una gruesa cápsula de tejido conectivo que se extiende hacia el interior formando conductos por los que transcurrirán los vasos y nervios que sustentan la glándula. La **corteza** se origina a partir del mesodermo y representa el 70-90% del peso de la glándula. Contiene células distribuidas en tres capas o estratos, denominados, desde el exterior hacia el interior, zonas glomerular, fasciculada y reticular. Son las encargadas de la síntesis y secreción de hormonas de naturaleza esteroidea: glucocorticoides (relacionados con el metabolismo energético y la

inmunosupresión), mineralcorticoides (responsables del volumen circulante y la presión arterial) y hormonas sexuales (relacionadas con la aparición de algunos caracteres sexuales secundarios).

En la parte central de la glándula se sitúa la **médula**, de origen neuroectodérmico. El tipo celular mayoritario en la médula es la célula cromafín, que se distribuye en acinos en torno a los vasos sanguíneos y es responsable de la síntesis, almacenamiento y secreción de **catecolaminas** (dopamina, adrenalina y noradrenalina), que ejercen una gran variedad de efectos en el organismo:

- 1) actúan sobre el metabolismo de los glúcidos (estimulan la glucogenolisis, aumentando los niveles de glucosa en sangre)
- 2) actúan sobre el metabolismo de los lípidos (favorecen la movilización de ácidos grasos libres desde el tejido adiposo)
- 3) redistribuyen el volumen sanguíneo circulante (dilatan los vasos que irrigan los músculos esquelético y cardíaco mientras que contraen los que irrigan piel o intestino)
- 4) aumentan la presión arterial, la frecuencia cardíaca, el volumen minuto cardíaco y la frecuencia y profundidad de la respiración
- 5) en el sistema nervioso central incrementan la atención y la vigilia

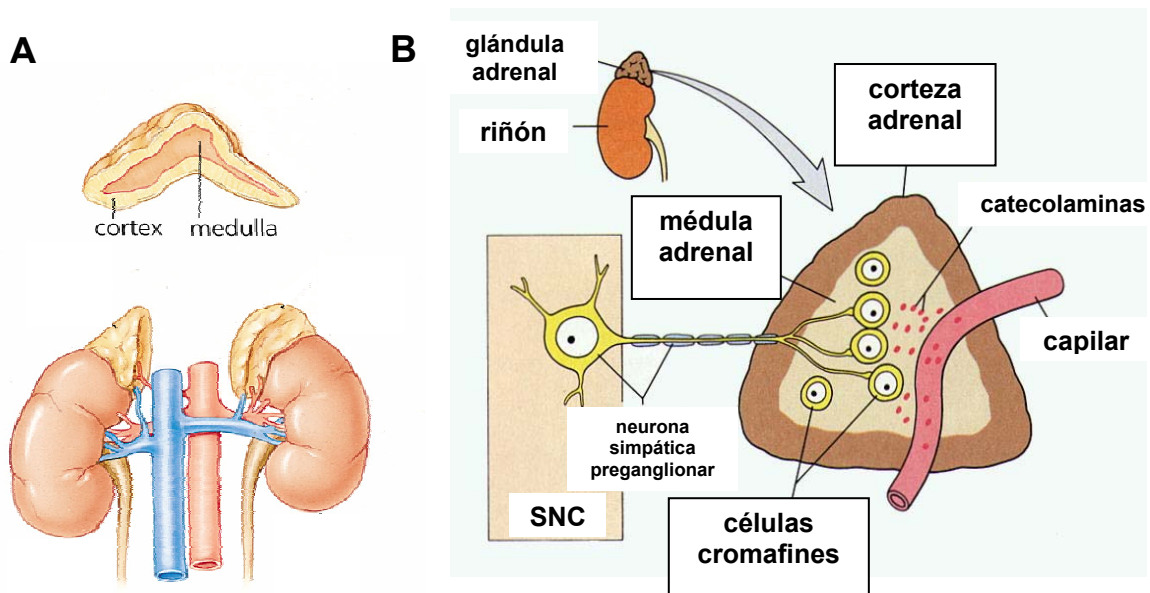


Figura 1. La glándula adrenal. **A)** Localización, vascularización y estructura de las glándulas adrenales en el organismo humano. **B)** Esquema representativo de la inervación de las células cromafines en el interior de la médula adrenal y de cómo sus productos de secreción (catecolaminas) son vertidos al torrente sanguíneo.

La médula adrenal está **inervada** por fibras preganglionares simpáticas, la mayoría procedentes del nervio esplácnico mayor (de 1 a 4 botones presinápticos por célula en el caso de la rata, Kajiwara y col., 1997), otras procedentes de los nervios esplácnicos menores o de los ganglios celíacos lumbares (Holets y Elde, 1982; Appel y Elde, 1988). El espacio sináptico esplácnico-cromafín es de unos 30 nm. La mayoría de estas fibras son amielínicas (Coupland, 1965), aunque también se pueden observar células de Schwann. Su naturaleza química es principalmente colinérgica, aunque algunas secretan también encefalina (Pelto-Huikko y col., 1985), péptido intestinal vasoactivo o sustancia P (Linnoila y col., 1980). La corteza adrenal, a diferencia de la médula, carece de inervación y es controlada por la hormona adrenocorticotropa (ACTH) liberada por la adenohipófisis.

Las glándulas adrenales reciben su **irrigación** de las arterias aorta, renal y subfrénica. Por el contrario, son drenadas por una sola vena, la adrenolumbar o medular central, que también drena parte del peritoneo. La vena adrenolumbar derecha desemboca en la cava inferior mientras que la izquierda lo hace en la vena renal izquierda. La circulación intraadrenal es bastante compleja: corteza y médula reciben una irrigación independiente, esto es, existe una separación total de la circulación sanguínea entre ambos tipos de tejidos. Sin embargo, el drenaje venoso de la corteza circula a través de la médula en un sistema porta que permite a los glucocorticoides sintetizados en la corteza llegar directamente a la médula y ejercer en ella ciertas acciones; el cortisol, por ejemplo, regula la síntesis de algunos péptidos y de la adrenalina, en concreto regula la actividad de la enzima PNMT (feniletanolamina N-metiltransferasa). En la cápsula y en el tejido conectivo que rodea a los vasos sanguíneos grandes de la glándula hay vasos linfáticos, que sin embargo no se encuentran en las regiones secretoras de la misma.

2.2.- La célula cromafín y otras células de la médula adrenal

Desde el punto de vista estructural y funcional las células cromafines constituyen el tipo celular más importante de la médula adrenal. Derivan del neuroectodermo y deben su nombre a la alta afinidad que tienen sus vesículas secretoras para teñirse -de color pardo-amarillento- con sales de cromo como el cromato potásico (Coupland, 1965). En los mamíferos se han descrito hasta tres tipos de células cromafines: las adrenérgicas, las noradrenérgicas y las de vesículas pequeñas (o SIF, de "*small intensely fluorescent cells*", Kanno, 1998). La principal diferencia bioquímica entre las células adrenérgicas y noradrenérgicas estriba en la presencia en las adrenérgicas de una enzima adicional, la

PNMT, que metila la noradrenalina y la convierte en adrenalina (Goldstein y col., 1971). A nivel de microscopía electrónica, las células adrenérgicas poseen vesículas secretoras de mayor tamaño y de contenido más homogéneo y menos electrodensito que las noradrenérgicas. Las SIF, que en el ratón constituyen menos del 4%, poseen un fenotipo intermedio entre células noradrenérgicas y neuronas (Aunis y Langley, 1999). En cultivos primarios de células cromafines bovinas, la proporción de células noradrenérgicas a adrenérgicas es de 1:5 a 1:10 (Núñez y col., 1995).

Sin embargo, en el tejido adrenomedular existen otros tipos de células, como las sustentaculares, las endoteliales y los fibroblastos, además de las terminaciones nerviosas espláncnicas. Las células sustentaculares son pequeñas e irregulares, se intercalan entre las cromafines y contienen el marcador glial S-100 (Cocchia y Michetti, 1981); se consideran componentes neurogliales de la médula adrenal. Los fibroblastos forman un estroma de fibras reticulares que rodean a los acinos de células secretoras (Coupland, 1965).

La morfología de las células cromafines adrenérgicas y noradrenérgicas en el tejido es poligonal y bastante homogénea. Estudios morfológicos han sugerido un fenotipo polarizado, con el núcleo desplazado hacia un polo de la célula y las vesículas cromafines acumuladas en el resto del citosol. La sinapsis se ubicaría en el polo neural y la exocitosis tendría lugar preferentemente en el polo capilar (Carmichael y col., 1989). En cultivo, sin embargo, las células cromafines pierden toda polaridad y se vuelven esféricas (**figura 2**), con un diámetro aproximado de 15-20 μm (Kajiwara y col., 1997; Barbara y col., 1998).

Algunos autores han demostrado la comunicación entre células cromafines, fundamentalmente dentro del mismo acino, mediante nexos o uniones estrechas (*gap junctions*). Estas estructuras, similares a un canal iónico, son permeables a compuestos de bajo peso molecular y permiten el acoplamiento metabólico entre células sin necesidad de que los "mensajes" pasen por el espacio extracelular. Se ha observado que la conductancia entre las células cromafines es muy baja (Moser, 1998), por lo que se las ha llamado también *uniones de baja conductancia*. Algunos autores opinan que estas uniones tienen un papel importante en la transmisión de impulsos (Nassar-Gentina y col., 1988) y, por tanto, en la secreción de catecolaminas (Martin y col., 2001 y 2003).

Por último, no se debe olvidar que tradicionalmente se han considerado células cromafines a aquellas derivadas del neuroectodermo, inervadas por fibras preganglionares simpáticas y capaces de sintetizar y secretar catecolaminas. Esto

incluiría no sólo a las células cromafines de la médula adrenal (su localización principal), sino también a las de los denominados paraganglios, que se encuentran en el interior de la corteza adrenal y en corpúsculos extraadrenales ampliamente diseminados por el tejido retroperitoneal. Son pequeños grupos de células que dan una reacción cromafín y que contienen gránulos electroopacos con catecolaminas (Fawcett y col., 2002).

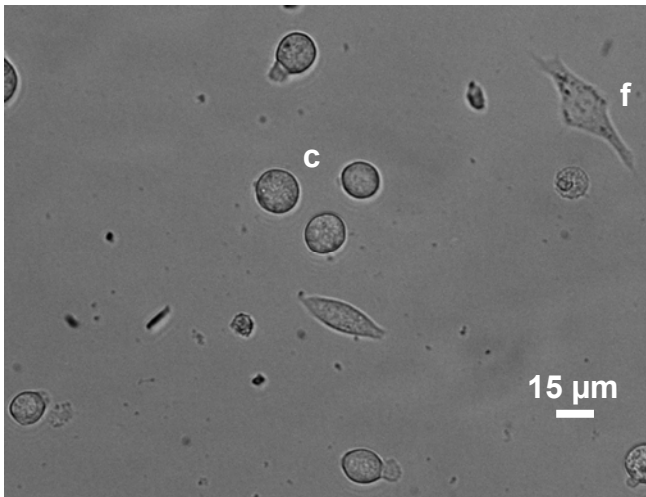


Figura 2. Células cromafines bovinas en cultivo (c). Obsérvese su aspecto esférico (pérdida del supuesto fenotipo polarizado que tendrían en el tejido intacto) así como la presencia de un pequeño porcentaje de otros tipos de células también procedentes de la glándula adrenal (en la foto, probablemente un fibroblasto, f).

2.3.- Funciones fisiológicas de la célula cromafín

Las células cromafines secretan catecolaminas al torrente circulatorio en respuesta a dos tipos de **estímulos secretagogos**: a un incremento de la actividad de los nervios espláncnicos, que liberarán el neurotransmisor fisiológico acetilcolina (ACh), o a estímulos químicos que llegan a la médula adrenal por vía hemática. Entre los primeros figuran las situaciones de estrés físico (hipoxia, hipoglucemia o hipotermia) o emocional (miedo, ansiedad, alerta). Por vía hemática pueden llegar sustancias como la histamina, la bradicinina o la angiotensina II, liberadas en situaciones como la alergia o la hipotensión.

Una vez liberadas, las catecolaminas actuarán en diferentes tejidos diana (véase apartado 2.1 de *Introducción*), asegurando el flujo sanguíneo adecuado de los órganos vitales para que el animal pueda combatir situaciones de estrés, en lo que ha venido a denominarse situaciones de **“lucha o huida”**. Así, la liberación basal de catecolaminas es muy baja, del orden de nanogramos por minuto; sin embargo, frente a situaciones de estrés, se produce un masivo vertido de adrenalina (70%) y noradrenalina (30%) al torrente sanguíneo, incrementándose su concentración plasmática hasta 60 veces

(Wakade, 1981). Por tanto, en la cadena de reacciones mediante las cuales el cerebro coordina la respuesta al estrés, el sistema nervioso simpático y la médula adrenal tienen un papel predominante. De manera que la médula adrenal no es esencial para la vida (a diferencia de la corteza adrenal, a menos que se mantenga un aporte externo de esteroides), pero ayuda al control de las situaciones de estrés.

Junto con las catecolaminas se co-liberan otras sustancias igualmente almacenadas en las vesículas cromafines: ATP, péptidos opiáceos (dinorfinas y encefalinas), otros péptidos (factor natriurético atrial, péptido intestinal vasoactivo, neuropéptido Y, sustancia P...), ascorbatos o cromograninas y sus derivados. Su presencia y funciones en la célula cromafín no están del todo esclarecidas: hay quien piensa que son meros vestigios de la estirpe neural de estas células, pero se ha demostrado que muchas de ellas pueden modular la secreción adrenal de forma autocrina y paracrina (Gandía y col., 1993b; Albillos y col., 1996 a y b; Winkler y Fischer-Colbrie, 1998) e incluso se postula que algunas ejerzan un papel hormonal, esto es, acciones a distancia. Por ejemplo el ATP y sus derivados, que pueden actuar localmente sobre las células endoteliales, provocando la liberación de NO, agente vasodilatador que producirá un incremento del flujo sanguíneo, facilitando así la rápida liberación de catecolaminas al torrente sanguíneo (Moro y col., 1993).

2.4.- Similitud entre células cromafines y neuronas: el término *paraneurona*

Las células cromafines de los mamíferos presentan un gran parentesco con las neuronas simpáticas postganglionares, tanto por su origen embrionario (ambos tipos de células derivan de la cresta neural) como por su principal función (liberan catecolaminas en respuesta a la estimulación por ACh liberada por nervios originados en la médula espinal). Ambos tipos de células comparten además otras características funcionales: así, las células cromafines poseen receptores nicotínicos (Wilson y Kirshner, 1977) y muscarínicos (Douglas y Poisner, 1965) sobre los que actúa la ACh; disparan potenciales de acción (Biales y col., 1976; Brandt y col., 1976; Kidokoro y Ritchie, 1980); poseen canales sensibles a voltaje de Na⁺, Ca²⁺ y K⁺ (Fenwick y col., 1982; Artalejo y col., 1993; García y col., 2006); o exhiben facilitación de corrientes de calcio por prepulsos despolarizantes repetidos (Ikeda, 1991; Artalejo y col., 1992b; Gandía y col., 1993b; Albillos y col., 1996b). Las células cromafines también presentan similitudes morfológicas con las neuronas postganglionares simpáticas: emiten prolongaciones al co-cultivarlas

con astrogliia (Uceda y col., 1995) o al exponerlas al factor de crecimiento nervioso (Unsicker y col., 1980).

Fujita y col. (1988) acuñaron el término **paraneurona** para denominar a las células neuroendocrinas con propiedades similares a las neuronas y a las células nerviosas con características endocrinas. Las células cromafines podrían considerarse paraneuronas, ya que cumplen los siguientes requisitos:

- 1) sintetizar neurotransmisores o productos relacionados con éstos (adrenalina, noradrenalina, dopamina, histamina y serotonina)
- 2) poseer vesículas sinápticas y/o de secreción (las vesículas donde almacenan los neurotransmisores sintetizados)
- 3) secretar el contenido de las vesículas por un mecanismo excitotóxico Ca^{2+} -dependiente tras un estímulo adecuado (principalmente ACh liberada por el nervio esplácnico, pero también en respuesta a estimulación eléctrica, altas concentraciones de K^+ extracelular, veratridina o inhibidores de la ATPasa dependiente de Na^+/K^+ (Feldberg y col., 1934; Douglas y Rubin, 1961; Douglas, 1968; Fujita y col., 1976; Kobayashi, 1977; Fujita y col., 1988)

Por todo lo expuesto anteriormente, y porque se pueden aislar y mantener en cultivos primarios con facilidad (Livett, 1984), las células cromafines se han empleado ampliamente como modelo neurosecretor, y mucho de lo que se conoce sobre la producción y secreción de neurotransmisores cerebrales se lo debemos a ellas. Además, son esféricas y sin dendritas, accesibles a análisis bioquímicos y su conexión con el nervio esplácnico es sencilla.

3. CANALES IÓNICOS EN LA CÉLULA CROMAFÍN

Los canales iónicos involucrados en la excitabilidad de las células cromafines han podido estudiarse gracias al desarrollo de las técnicas de *patch-clamp* y de biología molecular y a la aparición de herramientas farmacológicas, fundamentalmente toxinas (procedentes de caracoles marinos, arañas, abejas, alacranes, serpientes, ranas, plantas, etc) o moléculas orgánicas de síntesis que son capaces de reconocer selectivamente los diversos tipos de canales iónicos presentes en la membrana celular.

Así, en la célula cromafín se han identificado más de 15 tipos distintos de canales iónicos (revisado en Artalejo, 1995), que pueden dividirse en **tres grandes grupos** en función del mecanismo que induce o favorece su apertura:

- 1) canales regulados por voltaje
- 2) canales activados por ligando
- 3) canales operados por depósitos intracelulares

3.1.- Ciclo de actividad de una célula cromafín

Ya en 1934 se sugirió que la ACh es el principal agonista fisiológico de las células cromafines (Feldberg y col., 1934). Ésta es liberada por las fibras esplácnicas, que en condiciones de reposo se estima que disparan de forma asincrónica con una frecuencia de 0,1 Hz (Brandt y col., 1976); en situaciones de estrés, sin embargo, su frecuencia de descarga se incrementa hasta tres veces y puede llegar a sincronizarse, lo cual se traduce en la liberación de gran cantidad de ACh al espacio sináptico esplácnico-cromafín. La ACh acelerará el disparo de los potenciales de acción que de forma espontánea se producen en las células cromafines (Biales y col., 1976; Brandt y col., 1976). En 1980, Kidokoro y Ritchie describen que el grado de liberación de catecolaminas por la célula cromafín se incrementa de forma dosis-dependiente con la frecuencia de disparo de potenciales de acción inducidos en ésta por la ACh; fue la primera evidencia clara del acoplamiento entre el comportamiento eléctrico de la célula cromafín y su función secretora.

La ACh activará receptores nicotínicos y/o muscarínicos presentes en la membrana de la célula cromafín; aunque el porcentaje de uno y otro colinoceptor varía entre especies animales y se altera en situaciones de estrés crónico, en los mamíferos predomina la acción de la ACh sobre los receptores nicotínicos (O'Sullivan y Burgoyne, 1989). La activación del receptor nicotínico implica la apertura de este canal iónico, que en condiciones fisiológicas posibilita la entrada de Na^+ y, en menor medida, de Ca^{2+} , al interior celular. La entrada de Na^+ produce una ligera despolarización de la membrana, que permitirá la apertura de canales de sodio voltaje-dependientes y la entrada masiva de iones Na^+ , que a su vez favorecerán una mayor despolarización celular y la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV), por los que se producirá la entrada masiva de Ca^{2+} desde el espacio extracelular, que disparará la exocitosis rápida de catecolaminas (García y col., 1984). Paralelamente, la ACh activará receptores muscarínicos, cuyos efectos en la excitabilidad de la célula y en la secreción de

catecolaminas van a ser muy variables entre especies. En la que nos ocupa, la bovina, tras la estimulación muscarínica apenas se detecta secreción (Schneider y col., 1977; Wilson y Kirshner, 1977; Augustine y Neher, 1992), aunque sí ligeros incrementos del calcio citosólico (del orden de 50-100 nM, Kao y Schneider, 1985) debidos a la liberación de calcio desde depósitos (Cheek y Burgoyne, 1985).

Durante todo este proceso la mitocondria y el retículo endoplásmico estarán también activos (ver apartado 4 de *Introducción*), ejerciendo un riguroso control de los transientes de $[Ca^{2+}]$ que se alcanzan en diferentes zonas del citosol, y especialmente de los microdominios del calcio que se alcanzan en las regiones subplasmalemales. La **finalización del ciclo de actividad de la célula cromafín** se produce por varios mecanismos:

- 1) desensibilización de los receptores nicotínicos por exposición continuada a ACh (ver apartado 5.3 de *Introducción*)
- 2) activación de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , que favorecen la repolarización de la membrana plasmática, disminuyendo la excitabilidad celular
- 3) inactivación de los CCDV por el propio Ca^{2+} y por el voltaje
- 4) inhibición de los CCDV por productos de secreción (ATP y opioides, ver apartado 3.2 de esta *Introducción*)
- 5) hidrólisis de la ACh –a colina y acetato- en el espacio sináptico por parte de la enzima acetilcolinesterasa

Respecto a este último punto, convendría destacar que la visión simplista de la **colina** (Cho) como un mero precursor y metabolito de la ACh ha cambiado en los últimos tiempos. Así, se han descrito para la colina: 1) efectos muscarínicos en neuronas corticales de gato (Krnjevic y Reinhardt, 1979); 2) capacidad para estimular la secreción de catecolaminas a través de la activación de receptores nicotínicos en células cromafines bovinas (Holz y Senter, 1981); 3) capacidad para regular la excitabilidad de la membrana en células cromafines bovinas (Fuentealba y col., 2004); 4) generación de corrientes de entrada en neuronas de hipocampo de rata a través de receptores nicotínicos de tipo $\alpha 7$ (Alkondon y col., 1997); ó 5) generación de incrementos de $[Ca^{2+}]_i$ en neuronas de ganglio simpático de rata a través de receptores nicotínicos no- $\alpha 7$ (Seddik y col., 2003). De hecho, hoy en día la colina se considera en la literatura como un reputado agonista $\alpha 7$ -selectivo y como un agonista parcial y débil de otros subtipos de receptores nicotínicos neuronales (Mandelzys y col., 1995; Papke y col., 1996; Alkondon

y col., 1997); en nuestro grupo se ha descrito también como un bloqueante (probablemente de canal abierto) de los receptores nicotínicos de subtipo $\alpha 3\beta 4$ bovinos expresados heterológicamente en ovocitos de *Xenopus* (González-Rubio y col., 2006). En la célula cromafín bovina, aunque aún no se ha esclarecido qué subtipos de receptores nicotínicos se expresan (ver sección 5.4 de esta *Introducción*), sí se han identificado los ARNm de las subunidades $\alpha 3$, $\beta 4$ y $\alpha 7$, por lo que no se puede descartar un posible papel modulador de la colina en todo este ciclo de actividad fisiológica de la célula.

3.2.- Canales iónicos regulados por voltaje en la célula cromafín

En la superfamilia de canales dependientes de voltaje presentes en la célula cromafín se incluyen los canales de Na^+ , los de K^+ dependientes de voltaje, los de K^+ dependientes de Ca^{2+} y voltaje y los CCDV.

Los **canales de Na^+** , en condiciones de bajas concentraciones de ACh o de baja densidad de receptores nicotínicos, se comportan como amplificadores de la señal nicotínica, promoviendo una mayor despolarización de la membrana, que acabará reclutando a los CCDV. En el resto de situaciones, la despolarización producida por la activación de los receptores nicotínicos *per se* es capaz de reclutar CCDV, sin que sea necesaria la intervención de los canales de Na^+ . Probablemente éstos desempeñen también un papel en el acoplamiento eléctrico entre células cromafines, sincronizándolas para aunar la respuesta secretora.

Los **canales de K^+** descritos en la célula cromafín contribuyen a la hiperpolarización/repolarización de ésta durante los potenciales de acción, regulando su patrón de disparo y la exocitosis (González-García y col., 1993; Lara y col., 1995; Montiel y col., 1995). Se han descrito principalmente tres tipos: el canal de K^+ rectificador retrasado, sensible a voltaje, y otros dos activados no sólo por voltaje sino principalmente por calcio intracelular, los canales BK (de "*big conductance*") (Marty, 1981) y los canales SK (de "*small conductance*") (Artalejo y col., 1993). Los canales BK son activados por Ca^{2+} intracelular, pero a bajas concentraciones de éste son también dependientes de voltaje. Los canales SK, en cambio, son muy poco dependientes de voltaje, se activan casi exclusivamente por Ca^{2+} intracelular; de manera que cuando el potencial de membrana está en reposo pero se producen elevaciones sostenidas del Ca^{2+} intracelular son muy efectivos en hiperpolarizar a la célula. La estimulación muscarínica (y la consecuente liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares) es capaz de activar los canales de K^+ de tipo SK en la rata (Kubo y Kidokoro, 1989; Neely y Lingle, 1992), en el

gato (Uceda y col., 1994) o en bovino (Artalejo y col., 1993), así como de inactivar los canales de K^+ de tipo BK en la rata (Neely y Lingle, 1992), afectando al patrón de disparo de potenciales de acción y a la respuesta secretora de las células cromafines.

Los **CCDV** son la principal vía de entrada de calcio extracelular en la célula cromafín. Su apertura permite la entrada en la célula de grandes cantidades de Ca^{2+} debido al gran gradiente electroquímico existente para el Ca^{2+} a uno y otro lado de la membrana plasmática. Sus principales características se comentan a continuación.

3.3.- Canales de calcio dependientes de voltaje en la célula cromafín

Se trata de canales presentes en todas las células excitables del reino animal, así como en protozoos y algunas plantas. Desde el punto de vista biofísico pueden dividirse en dos grandes grupos (Carbone y Lux, 1984a y b; Nowycky y col., 1985; Fox y col., 1987) en función del voltaje requerido para su apertura: los canales de bajo umbral de activación (LVA, de "*low voltage-activated*"), que se abren a potenciales por encima de -50 mV, y los canales de alto umbral de activación (HVA, de "*high voltage-activated*"), que requieren una fuerte despolarización de la membrana para abrirse (por encima de -30 mV).

Los **canales LVA** o de tipo T (de *tiny* o *transient*) se caracterizan por activarse tras ligeras despolarizaciones de la célula y por una rápida cinética de inactivación. Han sido identificados en una gran variedad de células excitables como son neuronas centrales y periféricas, células musculares cardíacas y en algunas células secretoras; su principal función es la de generar una actividad eléctrica rítmica en las células, así como facilitar la entrada de calcio a potenciales de membrana más hiperpolarizados (Bean, 1985). En cuanto a las células cromafines, se han descrito en las de rata adulta (Hollins e Ikeda, 1996) y en las de rata embrionaria (Bournaud y col., 2001), donde se postula que serían reemplazados por CCDV HVA paralelamente a la maduración del tejido y de la maquinaria excitotónica.

En cuanto a los **canales HVA**, se han descrito hasta cinco subtipos, que se diferencian entre sí por sus propiedades biofísicas y farmacológicas: los subtipos L, N, P/Q y R. En la célula cromafín se expresan todos ellos: los L (Hoshi y Smith, 1987; Bossu y col., 1991a y b; Albillos y col., 1994), los N (Hans y col., 1990; Bossu y col., 1991a y b; Artalejo y col., 1992a; Albillos y col., 1994), los P (Albillos y col., 1993; Gandía y col., 1993a; Artalejo y col., 1994) y los Q (López y col., 1994; Albillos y col., 1996c). Respecto

al canal R, se sabe que la célula cromafín bovina expresa ARNm para la subunidad α_{1E} (García-Palomero y col., 2000), implicada en la formación del poro iónico de este subtipo de canal, y que tanto las células cromafines bovinas como las de ratón presentan una fracción de la corriente de Ca^{2+} total que no se bloquea por ninguno de los bloqueantes selectivos para el resto de subtipos de canales de calcio, la cual se atribuye a canales R. El aislamiento de esta corriente de tipo R es posible cuando se usa la técnica de *patch-clamp* en la configuración de parche perforado, pero no en la de célula entera (Albillos y col., 2000; García-Palomero y col., 2000), por lo que se especula que este subtipo de canal requiera de un factor citosólico soluble para mantener su actividad en la célula cromafín.

Los diferentes subtipos de canales HVA en la célula cromafín presentan una densidad relativa muy diferente entre especies (García y col., 2000 y 2006). Así, los de subtipo P/Q predominan en la humana y bovina, especies en las que los de subtipo L están muy poco representados; los canales L son los más abundantes en rata, ratón y gato y los de subtipo N abundan en células cromafines de cerdo. También difiere entre especies el grado en que cada uno de estos subtipos de canales HVA contribuye a la secreción de catecolaminas. En células cromafines bovinas los de tipo L y Q parecen ser los principales implicados (López y col., 1994), e incluso se ha sugerido que los de tipo Q estarían más directamente acoplados a la maquinaria exocitótica que los L (Lara y col., 1998).

En la década de los 90 se demostró y caracterizó la existencia de una **modulación autocrina/paracrina** de la actividad de los canales HVA en la célula cromafín bovina (Sontag y col., 1990; Gandía y col., 1993b; Albillos y col., 1996a y b; Hernández-Guijo y col., 1998). Esta modulación, de carácter inhibitorio, se caracteriza por una disminución del tamaño de la corriente y un enlentecimiento de su cinética de activación; se debe principalmente a ATP, dopamina y opioides (met-enkefalina y leu-enkefalina) co-almacenados y co-liberados junto con las catecolaminas durante el proceso exocitótico, que actúan sobre autorreceptores de membrana, y es mediada por proteínas G sensibles a toxina *pertussis*. La modulación parece realizarse a través de dos mecanismos diferentes: así, mientras los canales L se modulan mediante un mecanismo voltaje-independiente, los canales no-L se modulan de forma voltaje-dependiente. En este segundo caso la inhibición se puede revertir mediante la aplicación de pre-pulsos fuertemente despolarizantes, que recuperan el tamaño y la cinética iniciales de la corriente. Así, en condiciones de ausencia de perfusión, los propios materiales

secretados por las células cromafines se acumulan en la vecindad de sus membranas plasmáticas y provocan una inhibición de tipo tónico de los canales no-L. Inhibición que desaparece en condiciones de perfusión celular o tras la aplicación de pre-pulsos fuertemente despolarizantes. Posteriormente se ha demostrado que la modulación por ATP de los CCDV en células cromafines bovinas se traduce efectivamente en una modulación (inhibición) de la exocitosis medida por técnicas de capacitancia (Powell y col., 2000; Ulate y col., 2000).

3.4.- Canales iónicos activados por ligando en la célula cromafín

Este tipo de canales se abre tras reconocer a una sustancia química específica (su ligando), que puede ser un neurotransmisor o una hormona. En la célula cromafín se han descrito el receptor para la ACh de tipo nicotínico neuronal, no selectivo para cationes, y el receptor de GABA de tipo GABA_A, permeable a Cl⁻.

Entre las fibras esplácnicas que inervan a la célula cromafín las hay de tipo gabaérgico. Los **receptores de GABA_A** presentes en la célula cromafín ejercen un efecto dual sobre ésta: cuando la célula está en reposo contribuyen a la despolarización de membrana, incrementando la frecuencia de disparo de potenciales de acción y la liberación espontánea de catecolaminas; por otra parte, por un antagonismo funcional, reducen la amplitud de la despolarización inducida por ACh, suprimiendo los potenciales de acción que la acompañarían (Kataoka y col., 1986; Peters y col., 1989).

Por la importancia del **receptor nicotínico** en este trabajo, sus principales características se comentarán en un apartado propio (apartado 5 de *Introducción*).

3.5.- Canales iónicos operados por depósitos intracelulares

Estos canales constituyen la principal vía de entrada de calcio en las células eucariotas no excitables. Se activan por el vaciado de depósitos intracelulares de calcio (aunque el mecanismo exacto que los activa no está claramente dilucidado) generando una "entrada capacitativa de Ca²⁺" o "entrada de Ca²⁺ operada por depósitos" destinada a rellenar tales depósitos (se puede consultar una revisión en Parekh y Putney, 2005). La corriente mejor caracterizada de este tipo es la denominada I_{CRAC} (de "*calcium release activated calcium current*"), una corriente de calcio no activada por voltaje y con rectificación de entrada; se ha descrito en numerosos tipos de células, principalmente de origen hematopoyético. En neuronas y células cromafines bovinas existen evidencias de

que se produce entrada de calcio operada por depósitos, aunque no del tipo I_{CRAC} (Fomina y Nowycky, 1999; Putney, 2003).

Aunque el rellenado de los depósitos de Ca^{2+} pueda parecer la principal misión de estos canales, en realidad juegan un papel fundamental en fenómenos tan variados como los de oscilaciones del calcio citosólico, regulación de la actividad de algunas enzimas y de la transcripción de algunos genes, reacción acrosómica o exocitosis en células no excitables como mastocitos. En células cromafines bovinas, el grupo de Nowycky (Fomina y Nowycky, 1999) demostró que estas corrientes de entrada de Ca^{2+} son capaces de estimular la exocitosis a potenciales negativos (cuando los CCDV están inactivos) así como de potenciar las respuestas secretoras tras la activación de los CCDV. Se especula que tras un tren de potenciales de acción que deplete de forma considerable la población de vesículas listas para ser secretadas, la entrada de calcio operada por depósitos podría contribuir a la recuperación del tamaño de dicha población (ya que, como se sabe, el movimiento de vesículas desde la población de reserva hasta la de las listas para ser secretadas es dependiente de Ca^{2+} citosólico (ver apartado 6.3 de *Introducción*).

4. HOMEOSTASIA CELULAR DEL CALCIO

El Ca^{2+} puede considerarse un **mensajero intracelular universal** que interviene en procesos tan variados como la fecundación del oocito por el espermatozoide, el desarrollo embrionario, la contracción de los músculos, la coagulación de la sangre, la excitabilidad neuronal, el transporte axoplásmico, la secreción de hormonas o la liberación de neurotransmisores; por otra parte, también está implicado en los procesos de envejecimiento y muerte neuronal (revisado en Berridge y col., 1998).

La concentración de Ca^{2+} citosólico ($[Ca^{2+}]_c$) en la célula en reposo es bajísima (del orden de 50-200 nM, unas 10.000 veces menor que la concentración extracelular), lo que da lugar a que incrementos relativamente pequeños de Ca^{2+} puedan generar una elevada relación $[Ca^{2+}]_c/[Ca^{2+}]_{c \text{ reposo}}$ y servir de señal que dispara esta gran variedad de fenómenos fisiológicos. Además, el calcio se une con avidez a muchas proteínas, lo que le confiere especial eficacia como segundo mensajero. Por otra parte, este catión se diferencia de otros segundos mensajeros en que no puede sintetizarse *de novo* ni degradarse; las señales intracelulares de Ca^{2+} son el resultado de una regulación rápida y

dinámica entre el Ca^{2+} que entra a través de los CCDV, el Ca^{2+} tamponado, la salida o bombeo de Ca^{2+} desde el citosol hacia el exterior celular y el secuestro/liberación de Ca^{2+} por las organelas intracelulares, regulación que definirá la magnitud, distribución espacio-temporal y frecuencia de la señal citosólica de Ca^{2+} ; y que posibilita generar incrementos locales de $[\text{Ca}^{2+}]_c$, y por tanto respuestas locales, sin que se produzcan elevaciones globales del $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en la célula, que implicarían un mayor gasto energético para restaurar los niveles basales de Ca^{2+} .

Una característica del Ca^{2+} como segundo mensajero es su lenta difusión en el citosol, como consecuencia del tamponamiento que sufre al introducirse en la célula. En células endocrinas se estima que sólo uno de cada 30-100 iones de Ca^{2+} se encuentra en estado libre; el resto permanecen reversiblemente unidos a ciertas proteínas que unen Ca^{2+} , como la parvalbúmina, la calbindina o la calmodulina (Neher y Augustine, 1992). Estas proteínas actúan como primer mecanismo de tamponamiento tras la entrada masiva de Ca^{2+} , pero la célula cromafín presenta además otros mecanismos que evitarán su sobrecarga con Ca^{2+} y le permitirán recuperar los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ basales:

- 1) las bombas e intercambiadores de la membrana plasmática, que expulsarán Ca^{2+} hacia el exterior celular
- 2) las organelas intracelulares dinámicas, como el retículo endoplásmico y la mitocondria, que lo secuestrarán o lo liberarán en función de su estado de relleno y de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$
- 3) las organelas estáticas como las vesículas cromafines, que lo quelarán en su interior

A continuación se describirán someramente los mecanismos de salida (bombas e intercambiadores de Ca^{2+}) y de secuestro/liberación de Ca^{2+} (en retículo endoplásmico y mitocondria) que contribuyen en la célula cromafín a la homeostasia del mismo, esquematizados en la **figura 3** (para una revisión más extensa se puede consultar Berridge y col., 2003).

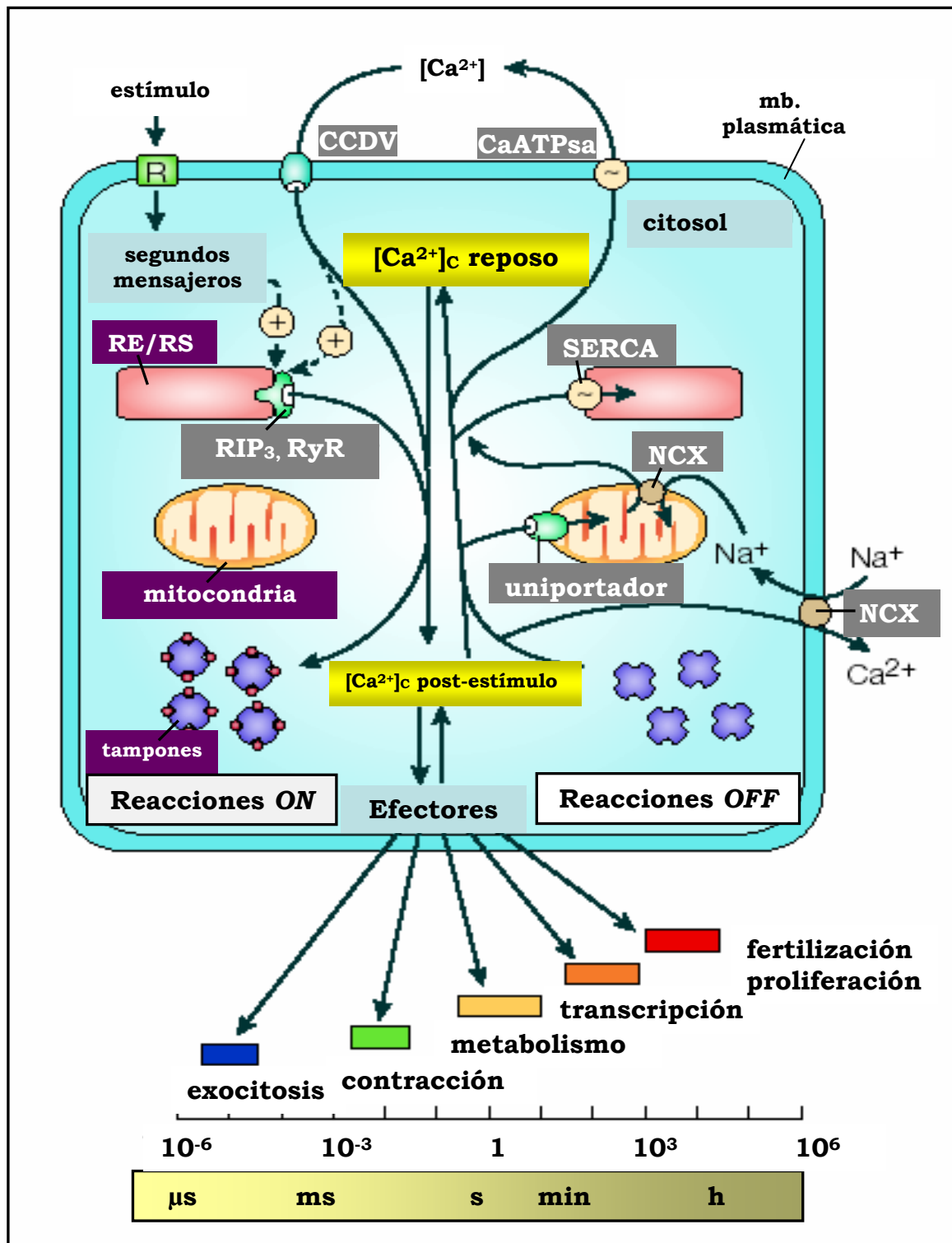


Figura 3. Resumen de los principales mecanismos de señalización y de homeostasia del calcio en una célula modelo (adaptado de Berridge y col., 2003).

4.1.- Retículo endoplásmico (RE)

El RE es una organela con alta capacidad para almacenar Ca^{2+} y para intercambiarlo rápidamente con el citosol. La $[\text{Ca}^{2+}]$ en el interior del RE ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$) se ha estimado en unos 5-10 mM. Pero la mayoría de este Ca^{2+} está unido a calreticulina y a otras proteínas que unen Ca^{2+} , de modo que los valores de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ en forma libre se estiman en un rango que va desde μM hasta 3 mM, según las técnicas empleadas (Meldolesi y Pozzan, 1998).

En la membrana del RE de la célula cromafín se encuentran tres estructuras que participan en la homeostasia del calcio:

- a) una bomba de Ca^{2+} que es una ATPasa (la SERCA, de “*Sarcoplasmic and Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase*”)
- b) los receptores de rianodina (RyR)
- c) los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (RIP_3)

a. SERCA: Toma Ca^{2+} del citosol y lo acumula en el lumen del RE en contra del gradiente electroquímico, con gasto de ATP (Pozzan y col., 1994; Meldolesi y Pozzan, 1998). Posee una baja capacidad pero una alta afinidad por el Ca^{2+} (0,1-1 μM), por lo que su función principal es la de controlar la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en condiciones de reposo o ausencia de estímulo.

Uno de los fármacos más empleados en investigación para depletar el RE de Ca^{2+} es la **tapsigargina**, un inhibidor irreversible de la SERCA (Thastrup y col., 1990).

b. Receptores de rianodina: Se encuentran presentes en casi todos los tipos celulares de mamíferos. En condiciones fisiológicas se activan sólo por Ca^{2+} (Zucchi y Ronca-Testoni, 1997).

La función de los RyR donde se encuentra mejor descrita es en las células del músculo cardíaco, en las que median el denominado **CICR** (“*Calcium-Induced Calcium Release*”), un fenómeno de amplificación de la señal de Ca^{2+} caracterizado por primera vez por Fabiato (Fabiato, 1983): el Ca^{2+} que entra por los CCDV (de tipo L) activa la salida de Ca^{2+} del RE a través de los RyR, amplificando y propagando la señal de calcio por el citosol. La liberación de Ca^{2+} por CICR responde a una curva en campana. Al comienzo, la liberación se incrementa por un mecanismo de retroalimentación positiva;

pero al alcanzarse elevadas $[Ca^{2+}]_c$ la liberación de Ca^{2+} se inhibe (con una CI_{50} de 120-150 μM) (Meissner y col., 1986).

La **rianodina**, compuesto que da nombre a los RyR, modifica la actividad de éstos de diferentes maneras en función de su concentración. Así, en el rango nanomolar los activa; en el rango de decenas de micromolar los deja, de forma uso-dependiente, en un estado de semiconductancia caracterizado por un tiempo medio de apertura de hasta 20 veces mayor y por insensibilidad a la activación por Ca^{2+} ; finalmente, a concentraciones por encima de 200 μM , bloquea RyR de forma irreversible (Buck y col., 1992; Zucchi y Ronca-Testoni, 1997).

Otro de los compuestos capaz de liberar Ca^{2+} del RE a través de RyR es la **cafeína** (Cheek y col., 1993), hasta el punto de que en ausencia de calcio extracelular puede provocar la secreción de catecolaminas en muchas especies animales. La actividad de este compuesto sobre RyR es dependiente de la $[Ca^{2+}]_{RE}$, de modo que a concentraciones submaximales la cafeína no puede vaciar por completo el RE de Ca^{2+} , sólo puede liberar Ca^{2+} del RE de forma cuantal, hasta que se alcanzan ciertos niveles de $[Ca^{2+}]_{RE}$ (Alonso y col., 1999).

En células cromafines bovinas, mediante el uso de ecurinas dirigidas a RE, que permiten monitorizar directamente los cambios en la $[Ca^{2+}]_{RE}$, se pudo demostrar la presencia del fenómeno de CICR en respuesta a pulsos de cafeína, de alto K^+ (70 mM) o del agonista nicotínico DMPP (Alonso y col., 1999). Previamente se contaba sólo con evidencias indirectas del fenómeno: la secreción de catecolaminas en respuesta a estímulos de alto K^+ se veía disminuida tras depletar el RE con cafeína, mientras que se recuperaba conforme se lavaba la cafeína y se rellenaba el RE con pulsos sucesivos de $K^+ + Ca^{2+}$ (Lara y col., 1997). En este trabajo se sugería la hipótesis de que el RE, en función de su estado de relleno, podía actuar como una fuente (si está lleno) o un sumidero (si está vacío) de Ca^{2+} citosólico, modulando de este modo la señal de $[Ca^{2+}]_c$ y la secreción de catecolaminas inducidas por la apertura de CCDV.

c. Receptores de IP_3 : Se encuentran en todos los tipos celulares. En la cascada de señalización intracelular de determinados agonistas se activa la fosfolipasa C, que hidroliza el fosfatidil inositol 4,5-difosfato (PIP_2) de la membrana a diacilglicerol e IP_3 . El IP_3 se liberará al citosol, donde activará la salida de Ca^{2+} del RE a través de los RIP_3 .

En células cromafines bovinas los agonistas del receptor de ACh de tipo muscarínico, la bradicinina y la histamina activan este tipo de respuesta (Forsberg y col.,

1986; Augustine y Neher, 1992; Alonso y col., 1999), que es capaz de desencadenar exocitosis (Augustine y Neher, 1992). Por tanto, en condiciones fisiológicas, el RE de las células cromafines puede actuar como un reservorio de Ca^{2+} tanto vía RyR como vía RIP_3 .

La capacidad de RIP_3 para liberar Ca^{2+} del RE es sensible a las concentraciones de calcio intraluminal y citosólico, de modo que, al igual que RyR, su actividad es también dependiente de Ca^{2+} (y no sólo de la presencia de IP_3). Esta dependencia del Ca^{2+} se ejerce como una modulación del estado de afinidad del receptor por su agonista IP_3 , lo que permite a este receptor estar dinámicamente acoplado a las condiciones del medio citosólico y al estado de relleno del RE para activarse o inhibirse (Taylor, 1998; Miyakawa y col., 2001; Taylor y Laude, 2002; Berridge y col., 2003). Esta habilidad del Ca^{2+} para regular la actividad de RIP_3 explica la generación de oscilaciones intracelulares de Ca^{2+} en células cromafines de rata (Malgaroli y Meldolesi, 1991; Inoue y col., 2004).

4.2.- Mitocondria

La visión clásica de que la principal función de la mitocondria en la célula es la de producir energía mediante la síntesis de ATP cambió radicalmente en la década de los 90, cuando se evidenció que esta organela es además esencial en el control de la señal intracelular del Ca^{2+} , tanto en neuronas (Werth y Thayer, 1994; White y Reynolds, 1997; Pivovarova y col., 1999) como en células cromafines (Herrington y col., 1996; Babcock y col., 1997; Montero y col., 2000). En estas células la mitocondria puede actuar como un depósito rápido y reversible de Ca^{2+} que tampona y modula los incrementos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que se producen tras una despolarización. En células cromafines bovinas ello se traduce en que la mitocondria es capaz de modular procesos como el de la secreción de neurotransmisores (Montero y col., 2000; Montero y col., 2001; Villalobos y col., 2002), la inactivación de CCDV por Ca^{2+} (Hernández-Guijo y col., 2001) o el desensamblaje de los filamentos de F-actina mediado por PKC, que a su vez regula la magnitud de la respuesta secretora (ver apartado 6.4 de *Introducción*) (Cuchillo-Ibáñez y col., 2004).

Las principales estructuras que contribuyen a ello son:

- a) el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial
- b) los intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) y de $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$

a. Uniportador de Ca^{2+} mitocondrial: Ubicado en la membrana interna de la mitocondria, actúa gracias al gradiente electroquímico generado por la baja concentración

de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial ($[\text{Ca}^{2+}]_M$), similar a la del citosol, del orden de 100-200 nM (Rizzuto y col., 1993), así como por el potencial de la membrana interna mitocondrial, de entre -150 y -180 mV (Duchen, 1999). El uniportador de Ca^{2+} en las células cromafines presenta una baja afinidad y una alta capacidad para unir Ca^{2+} , activándose en un rango de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ de 500 nM a 2 μM sin llegar a la saturación. Esto se traduce en que, tras un estímulo, la mitocondria puede captar Ca^{2+} rápidamente, hasta alcanzarse $[\text{Ca}^{2+}]_M$ cercanas al rango de milimolar (Herrington y col., 1996; Montero y col., 2000).

Una vez captado el calcio por la mitocondria, el gradiente electroquímico de este catión se invierte y el Ca^{2+} comenzará a salir lentamente de ésta hasta recuperarse los niveles basales de $[\text{Ca}^{2+}]_M$ en 1-2 min, gracias a los:

b. Intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y de $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondriales: Son los dos mecanismos involucrados en la salida del Ca^{2+} mitocondrial tras un estímulo. El NCX introduce en el lumen mitocondrial 3 iones Na^+ por cada ion Ca^{2+} que saca al citosol (Reeves y Hale, 1984); posee baja afinidad y alta capacidad para movilizar Ca^{2+} y es reversible: funciona a favor de gradiente iónico y según la magnitud y polaridad de los potenciales electroquímicos. El intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ introduce 2 H^+ por cada Ca^{2+} que saca al citosol y se ha caracterizado principalmente en hígado y riñón (Gunter y col., 2000).

4.3.- Mecanismos de salida de calcio citosólico al exterior celular

En la membrana celular se hallan dos sistemas implicados en la salida del calcio al exterior celular:

- a) el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
- b) la bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP

a. Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$: Es un transportador capaz de extraer grandes cantidades de Ca^{2+} de la célula a cambio de la entrada de Na^+ . Posee una baja afinidad por el Ca^{2+} , de hecho su actividad comienza a ser notable a partir de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ de unos 250 nM, y permanece activo cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ha llegado a 2 μM . Por tanto, participa de manera considerable en la expulsión de calcio del citosol tras un estímulo (Tang y col., 2000). Puede actuar en modo reverso, esto es, bombeando Ca^{2+} hacia el interior celular, en función del gradiente electroquímico de Na^+ (Blaustein y Lederer, 1999).

b. Ca²⁺ ATPasa de membrana: Es una ATPasa Ca²⁺/H⁺-dependiente muy semejante a la SERCA, es decir, posee una baja capacidad para transportar Ca²⁺ pero una elevada afinidad por éste (0,1-1,0 µM), de manera que se satura fácilmente. Esto indica que puede responder a modestas elevaciones de [Ca²⁺]_c y que por tanto es útil para mantener bajos los niveles de [Ca²⁺]_c en condiciones de reposo.

5. EL RECEPTOR NICOTÍNICO DE TIPO NEURONAL (nAChR)

5.1.- Estructura y composición de los nAChRs

El receptor nicotínico de tipo neuronal para la acetilcolina (nAChR) es un canal iónico activado por ligando que pertenece a la **superfamilia de los receptores cys-loop**, en la que se incluyen a los AChRs de tipo neuronal y muscular, los receptores de GABA_A y GABA_C, los receptores de 5-HT₃ y los receptores de glicina. Los nAChRs están ampliamente distribuidos en localizaciones pre y post-sinápticas tanto del SNC como del SNP de vertebrados (McGehee y Role, 1995), y cuentan con receptores análogos en invertebrados (Millar, 2003; Lester y col., 2004).

Gran parte de lo que se conoce de su estructura se ha extrapolado a partir de los estudios de microscopía electrónica realizados en los AChRs post-sinápticos del órgano eléctrico del pez *Torpedo* (Unwin, 1993, 1995 y 2005; Miyazawa y col., 1999 y 2003) así como de los estudios estructurales de alta resolución de la *Acetylcholine binding protein* (AChBP, Brejc y col., 2001). Esta última es una proteína soluble homopentamérica que las células gliales del caracol *Lymnaea* secretan en las sinapsis colinérgicas, en las que modula la transmisión sináptica mediante su unión a la ACh; su hallazgo ha permitido avanzar enormemente en el conocimiento de la estructura extracelular de los receptores nicotínicos, en particular de su lugar de unión al agonista.

Así, se acepta ampliamente el modelo que postula que el nAChR es una **glicoproteína transmembrana constituida por 5 subunidades** que se insertan en la membrana celular de forma simétrica, a modo de barril en torno a un poro central (**figura 4**). Cada una de estas subunidades presenta a su vez 4 segmentos transmembrana de carácter lipofílico denominados M1, M2, M3 y M4, formados fundamentalmente por hélices α (Blanton y Cohen, 1992 y 1994; Corbin y col., 1998). Existen en el receptor tres partes bien definidas: un dominio extracelular, un dominio transmembrana en torno al

poro estrecho y un dominio citoplasmático. El **poro** estaría formado por los segmentos transmembrana M2 y por parte del extremo N-terminal del segmento transmembrana M1 de cada una de las subunidades que forman el receptor (Zhang y Karlin, 1997). Los extremos N- y C-terminal de las subunidades son extracelulares; en el extremo N-terminal reside el **lugar de unión para el agonista**; tras el segmento M3 se distingue un largo **dominio citoplasmático**, donde se sitúan sitios de fosforilación del receptor, que condicionan la modulación de éste. Esta es la región más variable entre los diferentes tipos de receptor nicotínico, aunque todas las subunidades que componen los nAChRs presentan secuencias homólogas (Sargent, 1993; Lindstrom y col., 1995).

La unión del ligando al receptor provoca una serie de cambios conformacionales en éste que conducen a la rotación de las subunidades y concluyen en la apertura del poro y el paso de cationes a su través (Miyazawa y col., 2003).

Los nAChRs se han estudiado tradicionalmente en tejido nervioso, pero se expresan en una amplia variedad de tejidos: epitelio intestinal, epitelio y endotelio pulmonar, tejido adiposo, sistema inmune, piel o epitelio oral (Gahring y Rogers, 2005).

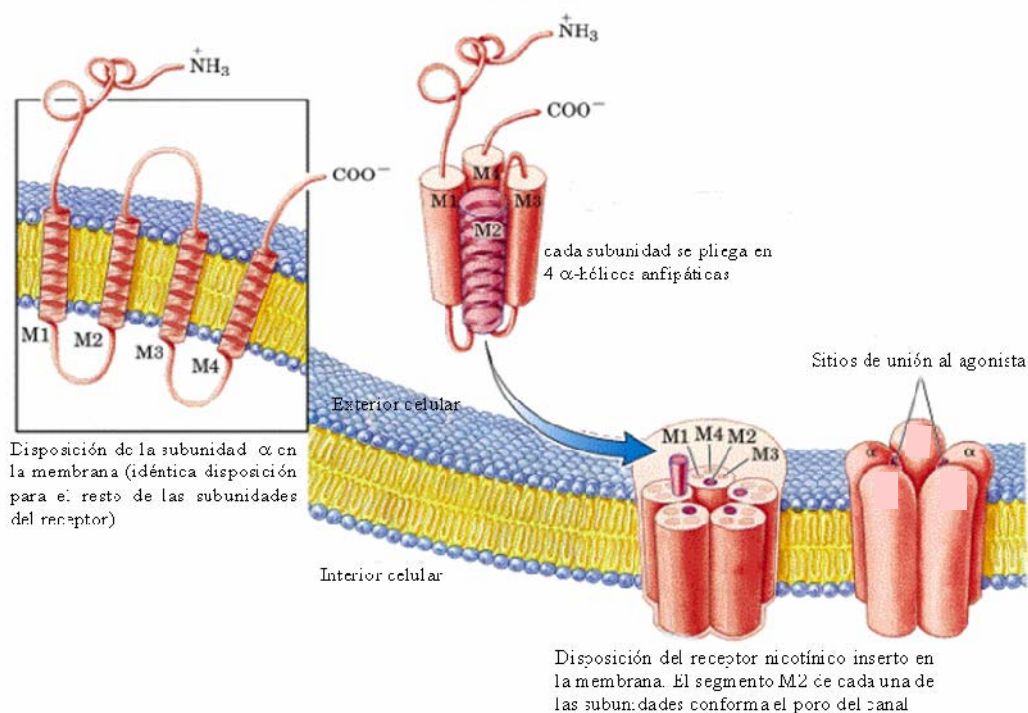


Figura 4. Plegamiento del receptor nicotínico inserto en la membrana. La glicoproteína está formada por 5 subunidades homólogas, cada una de las cuales presenta 4 segmentos hidrofóbicos (M1-M4) que se disponen atravesando la membrana. Los extremos N- y C- terminal de la proteína son extracelulares.

Las diferentes subunidades que forman parte de un nAChR se pueden clasificar en dos grandes grupos según su función:

a. Subunidades de unión al agonista o subunidades α : cuentan con dos residuos de cisteínas contiguos en el extremo N-terminal, análogos a los de las posiciones 192 y 193 de la subunidad α_1 del AChR de tipo muscular. El agonista se une a 2 subunidades α o en lugares cercanos a la interfase entre éstas y otras subunidades.

b. Subunidades estructurales o no- α : también denominadas subunidades β . No presentan las dos cisteínas adyacentes características de las subunidades α , y su función principal es estructural, si bien en los últimos años se les está otorgando un papel importante en el proceso de unión del agonista (Pedersen y Cohen, 1990; Czajkowski y col., 1993; Sine, 1993) y en la funcionalidad y sensibilidad farmacológica del receptor (Duvoisin y col., 1989; Cachelin y Jaggi, 1991; Luetje y Patrick, 1991; Papke y Heinemann, 1991; Harvey y Luetje, 1996). En este apartado podría incluirse a la subunidad α_5 , que se designó como subunidad α por la presencia de las dos cisteínas contiguas en el extremo N-terminal pero que sin embargo no presenta en su secuencia determinados aminoácidos característicos conservados en todas las otras subunidades α , y a la que se han atribuido funciones tanto estructurales como modificadoras de las características biofísicas y farmacológicas del receptor (Ramírez-Latorre y col., 1996; Wang y col., 1996).

Los nAChRs se forman como resultado de la agrupación o bien de subunidades α (y si son todas del mismo tipo se denominan **homoméricos**), o bien de la combinación de como mínimo dos subunidades α con subunidades β (en ese caso se les denomina **heteroméricos**).

5.2.- Subunidades de los nAChRs

Hasta la fecha se han identificado 12 genes distintos que codifican otras tantas subunidades nicotínicas neuronales, las cuales se han dividido en dos grandes grupos en función de su secuencia aminoacídica. Secuencia que, a su vez, va a determinar su capacidad para ensamblarse con unas u otras subunidades para formar receptores funcionales y el que éstos sean bloqueados o no por la toxina α -bungarotoxina (α -bgt, aislada a partir del veneno de la serpiente “búngaro” o “krait” multibandeado, *Bungarus multicinctus*) (Millar, 2003).

Así, se habla de:

a. nAChRs que unen α -bgt: estarían formados por las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$ (sólo identificada en pollo) ó $\alpha 9$, capaces de formar receptores funcionales homoméricos, lo cual no excluye que puedan formar parte también de receptores heteroméricos. En este grupo cabría mencionar a la subunidad $\alpha 10$, que hasta la fecha sólo se ha detectado expresándose heterológamente junto con la $\alpha 9$.

b. nAChRs incapaces de unir α -bgt: estarían formados tanto por subunidades de tipo α ($\alpha 2$ – $\alpha 6$) como por subunidades de tipo β ($\beta 2$ – $\beta 4$), que por sí mismas son incapaces de formar receptores funcionales. Estas subunidades se asocian entre sí con una estequiometría en la que como mínimo habrá dos subunidades de tipo α . Por lo que se sabe hasta la fecha, estos receptores expresan un único tipo de subunidad α , con la excepción de las subunidades $\alpha 5$ y $\alpha 6$, que son capaces de expresarse junto a otras subunidades de tipo α y β para dar receptores heteroméricos del tipo $\alpha 3\alpha 5\beta 4$, $\alpha 4\alpha 5\beta 2$, $\alpha 3\alpha 5\beta 2$, $\alpha 5\alpha 6\beta 2$ ó $\alpha 3\alpha 6\beta 4$.

La composición en subunidades de los nAChRs determina sus propiedades biofísicas (rapidez y tiempo medio de apertura, conductancia, desensibilización, permeabilidad al calcio, etc) y farmacológicas, y por tanto, sus implicaciones fisiológicas y patológicas, de ahí la importancia de su caracterización.

5.3.- Aspectos funcionales de los nAChRs: Desensibilización

Los nAChRs son canales iónicos activados por ligando **selectivos al paso de cationes** (Na^+ en mayor medida, Ca^{2+} y K^+) con una fuerte **rectificación de entrada** y con una característica “intrigante” aún no bien caracterizada: la **desensibilización**, esto es, la pérdida de respuesta funcional aún en presencia continuada del agonista, de la que se habla más detalladamente a continuación.

La desensibilización de los receptores nicotínicos fue caracterizada por primera vez en los de tipo muscular ya en 1957 (Katz y Thesleff, 1957). Se trata de una propiedad intrínseca del canal (Ochoa y col., 1989), aunque en condiciones fisiológicas es modulada por procesos celulares como la fosforilación (Huganir y col., 1986) o por la presencia de compuestos como la sustancia P, co-liberada junto con las catecolaminas (Role, 1984; Zhou y Livett, 1990). Algunas de sus características más importantes son: 1) se desarrolla de forma tiempo-dependiente y dosis-dependiente con respecto a la exposición

al agonista; 2) la rapidez con que un nAChR se recupera de la desensibilización varía en función del agonista (Paradiso y Steinbach, 2003); 3) potencialmente, pero no necesariamente (sobre todo tras una exposición crónica al agonista), es completamente reversible; 4) la composición en subunidades del nAChR influye en sus características de desensibilización (p. ej: los nAChRs que contienen $\alpha 7$ son los que más rápidamente se desensibilizan, en ms, frente a los nAChRs que no contienen $\alpha 7$, que lo hacen en s) (Giniatullin y col., 2005).

¿Qué mecanismos subyacen a la desensibilización de los receptores nicotínicos? Katz y Thesleff propusieron su primer modelo cíclico en 1957; desde entonces se han ido aportando nuevas hipótesis hasta llegar al modelo cíclico completo propuesto por el grupo de Changeux (Monod y col., 1965; Changeux, 1990) (**figura 5**). Pero en definitiva, todos apuestan por un **modelo alostérico de transición entre estados de una proteína**, según el cual el receptor se distribuye, en ausencia de ligando, entre un número discreto de conformaciones, a saber: estado de reposo, estado abierto del canal y diferentes estados desensibilizados. Las relativas afinidades de cada conformación por el agonista/ligando determinarán que éste establezca una u otra conformación con mayor probabilidad.

En el modelo de Katz y Thesleff (Katz y Thesleff, 1957) el AChR puede existir en 2 estados (**ver figura 5**): **R** (reposo o activable) y **D** (desensibilizado). La conformación R tiene baja afinidad (K_0) por el agonista (**A**), de modo que requiere de altas concentraciones de éste para unirse a él y abrirse (**AR**). El estado D, sin embargo, tiene una alta afinidad por el agonista (K_1), de modo que la incubación con bajas dosis de agonista estabiliza en la conformación desensibilizada (**AD**) a los receptores que en ausencia de ligando estuvieran ya en estado D. La incubación crónica con el agonista también desplazaría el equilibrio entre los estados R y D, determinado por la constante alostérica **L**, de modo que se produciría una progresiva pérdida de receptores en estado R.

Un modelo posterior (Feltz y Trautmann, 1982) incluyó dos uniones secuenciales al agonista y dos estados desensibilizados, el de afinidad intermedia (I) o alta (D) por el agonista, para reflejar el curso biexponencial que tienen tanto el establecimiento de la desensibilización como la recuperación de la misma. Según este modelo, las exposiciones breves al agonista (de rápida recuperación) reflejarían un acúmulo de receptores en el estado I, de afinidad intermedia.

El modelo cíclico completo de Changeux (Changeux y col., 1984) propone la existencia de al menos 4 estados intercambiables del canal: estado estacionario o de reposo (**R**), estado activado (**A**), con muy baja afinidad para los ligandos nicotínicos (se calcula una K_0 entre 10 μM y 1 mM) y caracterizado por presentar abierto el poro iónico, y los estados desensibilizados (**I**) y (**D**), que presentan una muy alta afinidad por el ligando (K_1 de 10 nM a 1 μM). También se ha propuesto una escala temporal para la transición de un estado a otro; así, para la transición del estado R a A se propone un tiempo de μs a ms, la transición al estado I sería más lenta (1-100 ms) y por último, la transición al estado D del receptor ocurriría en cuestión de minutos. Todos estos estados se encontrarían en equilibrio en ausencia de ligando; en presencia de un ligando, éste se unirá preferentemente a uno de los estados conformacionales del canal, estabilizándolo.

En cuanto a las implicaciones fisiológicas o patológicas de la desensibilización de los nAChRs, se conocen algunas de ellas, pero quedan aún muchas por esclarecer. Un ejemplo: la desensibilización persistente de los nAChRs presinápticos en las terminales GABAérgicas aumenta la excitación de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral, lo que probablemente contribuya a los mecanismos de recompensa de la nicotina (Mansvelder y col., 2002). Otro ejemplo: mutaciones tanto en la subunidad $\alpha 4$ (S248F) como en la $\beta 2$ (V287L) del nAChR son causa de epilepsia cortical de tipo ADNFLE (*Autosomal Dominant Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy*). Pero curiosamente ambas mutaciones tienen efectos contrapuestos sobre los nAChRs $\alpha 4\beta 2$: la mutación en $\alpha 4$ acelera su desensibilización y enlentece la recuperación de la misma, mientras que la mutación en $\beta 2$ disminuye la desensibilización. Se pueden consultar revisiones sobre estas y otras implicaciones en Quick y Lester (2002) y Giniatullin y col., (2005).

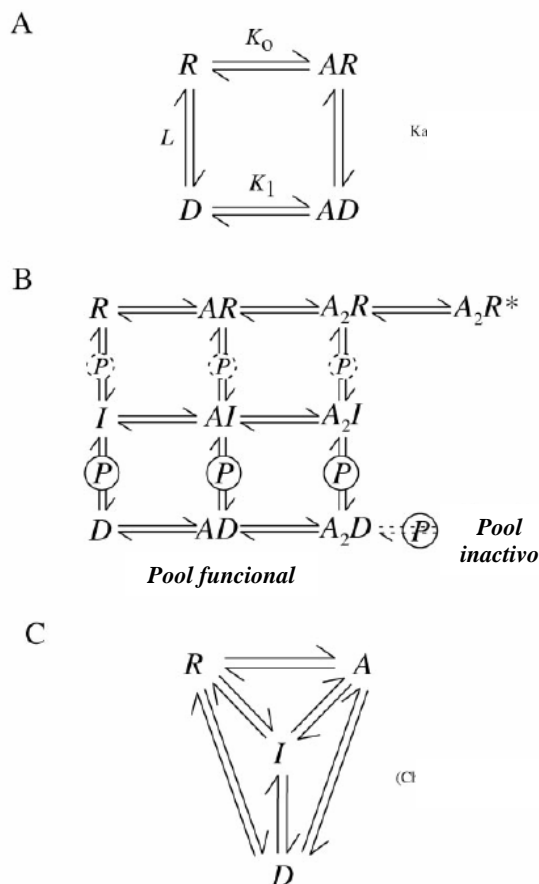


Figura 5. Modelos de desensibilización de los receptores nicotínicos. **A)** Modelo cíclico clásico propuesto por Katz y Thesleff en 1957 para los receptores nicotínicos de tipo muscular, donde $K_0 \gg K_1$. **B)** Modelo ampliado del anterior (Feltz y Trautmann, 1982) para incluir dos uniones secuenciales al agonista y dos estados desensibilizados, el de afinidad intermedia (I) o alta (D) por el agonista. P muestra las transiciones que pueden ser moduladas por fosforilaciones, que incluso podrían inducir a un estado "inactivo" del receptor. A_2R^* simboliza el estado abierto del canal (una vez que se le han unido dos moléculas de agonista). **C)** Modelo cíclico completo (Changeux y col., 1984), equivalente al anterior pero en el cual todas las transiciones son posibles. Aunque no se muestra, cada uno de los 4 estados podría unir una o dos moléculas de agonista. Tomado de Quick y Lester (2002).

5.4.- nAChRs en la célula cromafín bovina

Wilson y Kirshner (en 1977) describieron por primera vez la presencia de sitios de unión para α -bgt en células cromafines bovinas (CCB). Casi dos décadas después, la subunidad $\alpha 7$ del nAChR fue clonada en CCB, y la inyección de su ARNc en ovocitos de *Xenopus laevis* produjo sitios de unión para α -bgt y corrientes nicotínicas que eran bloqueadas por α -bgt (García-Guzmán y col., 1995). Más tarde también se caracterizaron y clonaron, en CCB, las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$ y $\beta 4$ del nAChR (Campos-Caro y col., 1997), que formaban receptores nicotínicos funcionales $\alpha 3\beta 4$ al expresarse heterológamente en ovocitos de *Xenopus*.

Por todo ello se supuso la existencia de dos subtipos de nAChRs en CCB, $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$, ambos presuntamente implicados en el control de la secreción de catecolaminas. Sin embargo, los intentos por bloquear con α -bgt la secreción de catecolaminas provocada por diferentes agonistas del nAChR produjeron resultados negativos (Wilson y Kirshner,

1977; Kumakura y col., 1980; Trifaró y Lee, 1980; Kilpatrick y col., 1981) o datos conflictivos (Kageyama y Guidotti, 1984), lo que llevó a pensar que el proceso secretor era iniciado exclusivamente por los nAChRs no sensibles a α -bgt, esto es, los α 3 β 4.

Más recientemente, usando nuevos protocolos (cortas aplicaciones de ACh para prevenir la desensibilización de un putativo nAChR α 7) y nuevas herramientas farmacológicas (bloqueantes selectivos del subtipo de receptor nicotínico α 7, como α -conotoxina lml y metilicacónitina), López y colaboradores obtuvieron en 1998 (López y col., 1998) datos que sugerían que los receptores de subtipo α 7 contribuían a la liberación de catecolaminas en respuesta a la aplicación de ACh en CCB.

Sin embargo, con los datos disponibles hasta el día de hoy (Maneu y col., 2002; otros datos no publicados del grupo), aún no está claro qué subtipos de nAChRs presentan las células cromafines bovinas: por un lado todavía no se han podido registrar respuestas nicotínicas α 7 típicas, y por otro lado los datos de bloqueo de las respuestas nicotínicas con antagonistas selectivos α 7 son conflictivos, puesto que en ellos hay que emplear concentraciones tan elevadas de antagonistas que éstos pierden su selectividad por este tipo de subunidad.

5.5.- Importancia fisiopatológica de los nAChRs

Neuronas y células cromafines son capaces de expresar en su membrana de forma muy selectiva gran diversidad de nAChRs. Sin duda la localización subcelular de estos receptores (entre otras cosas, si es pre- o post-sináptica), así como su composición en subunidades, condicionarán los patrones de incrementos de $[Ca^{2+}]_c$ que generen y su posible función dentro de la célula (Dani, 2001; Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004). Todavía queda mucho por esclarecer sobre las funciones fisiológicas e implicaciones patológicas de tal variedad de nAChRs, debido fundamentalmente a la carencia de ligandos específicos para disecar cada subtipo de nAChR y a la dificultad añadida que implica el estudio de algunos subtipos de receptores, como los α 7, por la rapidez con la que se desensibilizan.

A pesar de ello, en los últimos años se han identificado claramente algunas de las implicaciones fisiológicas y/o patológicas de los nAChRs, las cuales se expondrán brevemente a continuación.

En el individuo adulto se ha descrito la implicación de los nAChRs en multitud de **funciones del sistema nervioso**: aprendizaje y memoria, atención, control de la

actividad motora, percepción sensorial y del dolor o regulación corporal de la temperatura. Generalmente estos efectos son debidos a la existencia de receptores nicotínicos que contienen la subunidad $\alpha 7$ en la terminal presináptica, que actúan modulando la secreción de neurotransmisores (Wonnacott, 1997). Sin embargo, no hay que olvidar el papel de estos receptores a nivel postsináptico, en el control de la transmisión en ganglios periféricos, hipocampo y corteza sensorial (Jones y col., 1999).

También se ha descrito la existencia de transcripción de diversas subunidades del receptor nicotínico a lo largo del **desarrollo embrionario**, lo que les conferiría un papel más o menos influyente en la proliferación y diferenciación celular.

Una implicación cuyo estudio está en auge en los últimos años es la **acción neuroprotectora** ejercida por estos receptores, en concreto por los de tipo $\alpha 7$, al inducir la síntesis de factores de crecimiento nervioso o reducir la citotoxicidad mediada por glutamato (Shimohama y col., 1996; Kaneko y col., 1997).

Los nAChRs también están implicados en **procesos de dependencia**, a la nicotina o a otras drogas. En este caso la diana de acción son los receptores presinápticos $\alpha 4\beta 2$ que modulan la neurotransmisión de dopamina en el sistema mesolímbico (Picciotto y col., 1998; Marubio y col., 2003; Tapper y col., 2004).

Por último, también se postula la implicación de estos receptores en una gran variedad de **patologías neuronales**: enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, Parkinson o demencia por cuerpos de Lewy (Zanardi y col., 2002), disfunciones cerebrales como el autismo o la esquizofrenia (Freedman y col., 2000) o epilepsias como la hereditaria de tipo ADNFLE (Combi y col., 2004).

6. ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-SECRECIÓN

Hace ya más de 40 años que Douglas y Rubin (1961) acuñaron la expresión “*acoplamiento excitación-secreción*” para resaltar la importancia de la entrada de Ca^{2+} extracelular en el desencadenamiento de la secreción de catecolaminas en la célula cromafín de la glándula adrenal de gato. Estudiaron cómo influía la composición iónica del medio en la respuesta secretora y establecieron que el mecanismo de liberación era un proceso Ca^{2+} -dependiente. Posteriormente otros autores han validado este concepto. Baker y Knight (en 1978) hicieron experimentos con células cromafines permeabilizadas y corroboraron que la exocitosis era controlada principalmente por Ca^{2+} y también por ATP intracelular. En 1981, Wakade demostró que la secreción de catecolaminas en la adrenal de rata se abolía en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Knight y Kesteven (en 1983) determinaron que es el Ca^{2+} en estado libre y ionizado el responsable de la secreción.

6.1.- La vesícula cromafín

Las células cromafines almacenan sus productos de secreción en organelas especiales: las vesículas secretoras. Aunque en células cromafines bovinas se han llegado a identificar hasta cinco tipos diferentes de estas vesículas, según su tamaño y forma al microscopio electrónico (Koval y col., 2001), las más abundantes son las denominadas **vesículas cromafines** o **vesículas grandes de núcleo denso** (LDCV, de “*Large Dense Core Vesicles*”, ya que contienen solutos a una altísima concentración, en estado casi sólido y denso a los electrones). En la célula cromafín bovina, mediante estudios de microscopía electrónica, su cantidad se ha estimado en 30.000 (Phillips, 1982), 17.000 en células adrenérgicas y 7.000 en noradrenérgicas (Vitale y col., 1995) o en 26.000 (Plattner y col., 1997); su diámetro, entre 250 y 450 nm (Ornberg y col., 1995; Parsons y col., 1995; Plattner y col., 1997).

La formación de las LDCV comienza en el entramado trans-Golgi, donde se ensamblan algunos componentes proteicos (transportadores de membrana y proteínas intravesiculares); posteriormente se produce la maduración de la vesícula, acidificándose el medio intravesicular hasta un pH de 5,5 e incorporándose ácido ascórbico, nucleótidos (principalmente ATP), Ca^{2+} y catecolaminas en su interior (Winkler, 1993).

Además de adrenalina y noradrenalina, que constituyen el 20% de su contenido, en las vesículas cromafines se almacenan también otras aminas como la dopamina, histamina o serotonina, todas ellas asociadas a las **cromograninas**. Estas últimas son

unas proteínas de naturaleza acídica que permiten, con la ayuda de ATP, Ca^{2+} y Mg^{2+} , el empaquetamiento de las catecolaminas en una matriz o gel que reduce enormemente el gradiente osmótico de la vesícula (Winkler, 1976).

En las vesículas cromafines también se almacenan enzimas como la dopamina- β -hidroxilasa (o DBH, fundamental para la síntesis de noradrenalina, junto con su cofactor el ácido ascórbico), opioides y otros péptidos como la sustancia P, somatostatina, neurotensina, encefalinas, helodermina, neuropéptido Y, péptido intestinal vasoactivo o factor natriurético atrial (algunos de ellos se almacenan de forma diferencial en células adrenérgicas o noradrenérgicas). Curiosamente la PNMT, la enzima que transforma noradrenalina en adrenalina, no se almacena en las vesículas sino en el citosol, por lo que en las células cromafines adrenérgicas la noradrenalina tendrá que salir fuera de la vesícula para, una vez transformada en adrenalina, volver a entrar en ella. Por último, un 22% del contenido vesicular lo constituyen lípidos como la lisolecitina, que favorece la fusión de membranas.

En cuanto al Ca^{2+} intravesicular (casi un 60% del total del Ca^{2+} contenido en la célula, aunque sólo un 0,03% del Ca^{2+} intravesicular esté libre y el resto esté asociado a cromograninas, Haigh y col., 1989), se ha especulado con la posibilidad de que pueda estar involucrado tanto en la homeostasia celular del calcio (pues algunas vesículas presentan receptores de IP_3 en su membrana y responden a IP_3 -Gerasimenko y col., 1996-, aunque estas respuestas podrían ser contaminantes procedentes del RE) como en la exocitosis (Mundorf y col., 2000).

6.2.- El complejo SNARE y el proceso exocitótico

La fusión de vesículas secretoras con la membrana plasmática ocurre en todas las células en la forma de **exocitosis constitutiva**, necesaria para reciclar la membrana plasmática y para secretar ciertas moléculas (anticuerpos, proteínas plasmáticas o componentes de la matriz extracelular). Pero en las células secretoras, entre ellas las neuronas y paraneuronas, se produce además la **exocitosis regulada**, que permite liberar de forma controlada ciertas moléculas en respuesta a una señal fisiológica.

La fusión de la membrana vesicular con la plasmática es una reacción que requiere de proteínas específicas que empujen a las membranas a mantenerse juntas, ya que la repulsión entre ambas membranas y el entorno acuoso no favorecería su fusión espontánea (Sudhof, 1995). Algunas de estas proteínas, muy conservadas en la

evolución y en los diferentes tipos de neuronas y células neuroendocrinas, constituyen el denominado **complejo SNARE** (del inglés “*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*”), y se localizan o bien en la membrana de las vesículas secretoras (v-SNAREs) o bien en la membrana plasmática (t-SNAREs). Se han identificado principalmente de tres tipos (Sollner y col., 1993; Roth y Burgoyne, 1994):

- 1) sinaptobrevinas o **VAMPs** : son v-SNAREs cortas, diana de las toxinas tetánica y botulínicas B, D, F y G
- 2) **sintaxinas**: son t-SNAREs diana de la toxina botulínica C1
- 3) **SNAP-25**: también t-SNARE, y diana de las toxinas botulínicas A y E

Estas tres proteínas son suficientes para que se produzca el proceso de fusión *in vitro* (Weber y col., 1998), pero *in vivo* son necesarias muchas otras proteínas reguladoras, como la α -**SNAP** o el **NSF**. Así, para formar el complejo SNARE, en un primer paso se asocian en paralelo (aproximando las membranas entre sí), en una estructura tipo “cremallera”, cuatro α -hélices: dos procedentes de la proteína SNAP-25, otra de la sintaxina y otra de la sinaptobrevina (Sutton y col., 1998) (**figura 6**). Según la hipótesis propuesta por el grupo de Sollner, una vez constituido, el complejo sirve de receptor para la proteína α -SNAP, que a su vez servirá de receptor para el NSF, una ATP-asa que tras la hidrólisis de ATP provocará la disrupción del complejo y permitirá la exocitosis (Sollner y col., 1993; Morgan y Burgoyne, 1995), aunque el proceso por el cual las membranas lipídicas finalmente se reorganizan y fusionan es todavía muy controvertido.

Otras dos de las muchas proteínas reguladoras del complejo SNARE son: (1) la sinaptotagmina, proteína vesicular que se ha propuesto como último sensor de Ca^{2+} en la exocitosis (Voets y col., 2001); compite con la α -SNAP por unirse al complejo SNARE, de tal modo que cuando aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, la sinaptotagmina se disocia del complejo SNARE y permite la unión de la α -SNAP; (2) la Munc-18, que se asocia con la forma “cerrada” de sintaxina evitando que ésta participe en la formación del complejo SNARE, hasta que otra proteína (tal vez la Munc-13, en respuesta a Ca^{2+} , Brose y col., 2000) sea capaz de “abrir” a la sintaxina, permitiendo la formación del complejo SNARE.

Este complejo entramado de proteínas constituye lo que ha dado en llamarse la “**maquinaria de la exocitosis**”. Desentrañar qué papel juega cada una de ellas o su Ca^{2+} -dependencia en el proceso excitotico es tarea ardua e inacabada. Para ello han sido de gran ayuda técnicas de biología molecular (ratones transgénicos, sobreexpresión

de proteínas mutantes, expresión de proteínas unidas a GFP, etc), las toxinas botulínicas y tetánica (endoproteasas sumamente selectivas de determinadas proteínas del complejo SNARE) y, más recientemente, las técnicas microscópicas de FRET (fluorescencia por transferencia de energía resonante), que permiten estudiar interacciones proteína-proteína (ver ejemplo en figura 6).

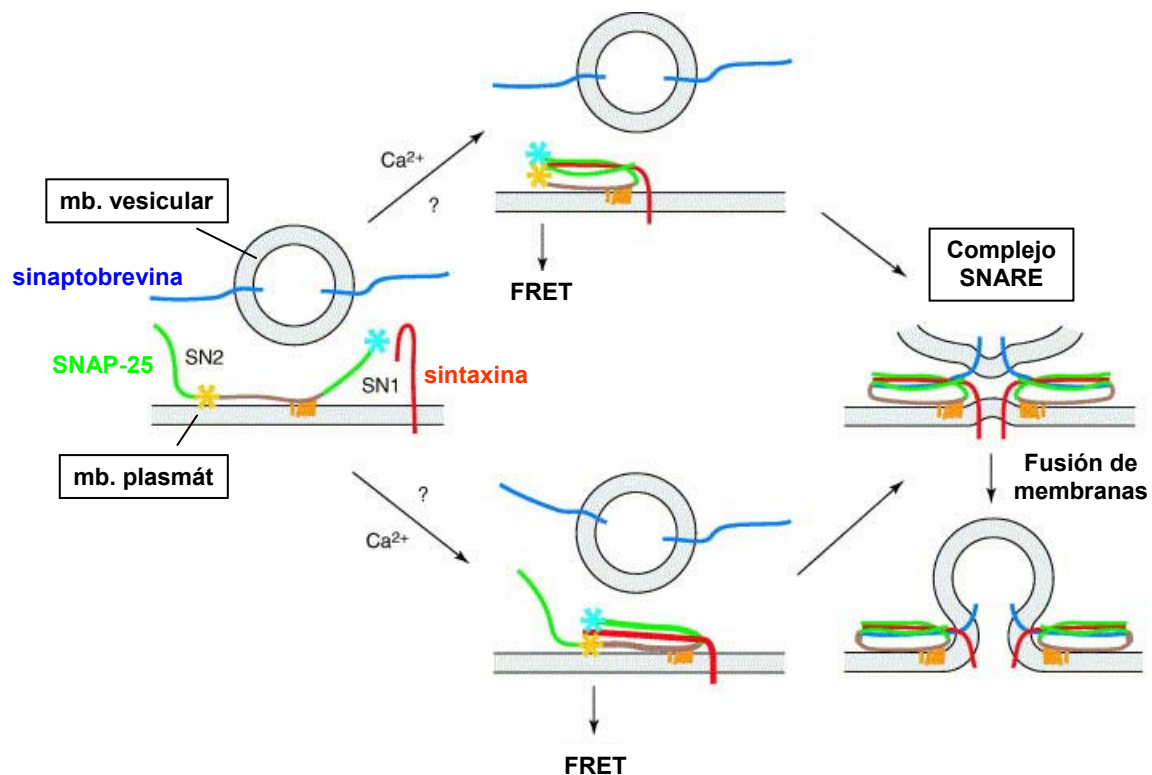


Figura 6. Formación del complejo SNARE de forma calcio-dependiente por dos hipótesis alternativas que producirían FRET. La syntaxina (en rojo) y la sinaptobrevina (en azul oscuro) están ancladas a las membranas plasmática y vesicular respectivamente mediante dominios transmembrana. La SNAP-25 (en verde) contiene dos dominios de unión al SNARE, SN1 y SN2, unidos por un dominio flexible (en marrón) que los ancla a la membrana plasmática. Los asteriscos indican las posiciones en las que An y Almers (2004) incorporaron un donador (azul claro) y un aceptor (amarillo) de FRET en la SNAP-25. Estos autores sugirieron que el complejo SNARE empezaría a formarse tras el establecimiento de una doble hélice entre SN1 y syntaxina (panel inferior). El panel superior muestra una hipótesis alternativa que implicaría la formación de una triple hélice en la que participarían tanto SN1 como SN2 y syntaxina. En cualquier caso, con la participación adicional de la sinaptobrevina, se acabaría formando el complejo SNARE y produciéndose la fusión de membranas (adaptado de Sorensen, 2005).

El ejemplo más claro de la controversia que genera el estudio de la maquinaria exocitótica es determinar cuál es el **último sensor/es de Ca²⁺** en la exocitosis, aunque hasta la fecha el candidato más claro ha sido la sinaptotagmina I, proteína vesicular que se une de forma Ca²⁺-dependiente tanto a componentes del complejo SNARE (syntaxina y SNAP-25) como a fosfolípidos de membrana (Sorensen, 2004).

Respecto a los **requerimientos de Ca²⁺** para que se produzca exocitosis, hay trabajos que indican que el sensor de Ca²⁺ para la fusión de membranas en células neuroendocrinas tiene una afinidad por Ca²⁺ un orden de magnitud mayor que en células neuronales; así, en células cromafines la CE₅₀ de Ca²⁺ para la exocitosis es de 10-20 μM (Heinemann y col., 1994) y la exocitosis se podría disparar a partir de [Ca²⁺]_c de unos 5 μM, mientras que en células neuronales es de unos 190 μM (Heidelberger y col., 1994). No obstante, la relación entre calcio y exocitosis en ambos tipos de células es muy controvertida en la literatura, con trabajos que postulan una relación lineal entre ellos y otros que postulan la cooperatividad entre iones calcio durante el proceso de exocitosis, lo que probablemente implicaría la unión del calcio a varios sitios de unión, de una o más proteínas (Augustine y col., 1991; Meir y col., 1999; Carabelli y col., 2003).

6.3.- Poblaciones funcionales de vesículas secretoras

No todas las vesículas secretoras presentes en una célula cromafín están listas para la exocitosis. Una razón fisiológica para ello sería que una sola médula adrenal contiene varias dosis letales de catecolaminas; excluir a los gránulos de las zonas de exocitosis constituye un mecanismo para prevenir una liberación masiva y mortal de catecolaminas. Así, las vesículas cargadas de transmisor tienen que migrar (**migración**) y anclarse a zonas específicas de la membrana plasmática (**anclaje, atraque o “docking”**), donde aproximadamente sólo un 10% (las que hayan experimentado el proceso de **maduración o “priming”**) (Parsons y col., 1995; Steyer y col., 1997) serán aptas para experimentar exocitosis cuando “vean” incrementarse el Ca²⁺ hasta los niveles adecuados en sus inmediaciones (Becherer y col., 2003) (**figura 7**).

Desde la década de los 90, varios grupos vienen estudiando las moléculas y mecanismos implicados en estas últimas fases de la neurotransmisión (merece especial mención el grupo de Neher y colaboradores). Para ello han aplicado diferentes metodologías, más o menos avanzadas, combinando casi siempre las mediciones simultáneas de corrientes de calcio, [Ca²⁺]_c y exocitosis. En los trabajos iniciales se medía la secreción por técnicas de capacitancia o bioquímicas (liberación de catecolaminas

marcadas radiactivamente), tras elevar las $[Ca^{2+}]_c$ mediante permeabilización/diálisis de las células con soluciones de diferente composición (en cuyo caso la elevación del calcio citosólico era lenta) o mediante la aplicación de pulsos despolarizantes o de sustancias capaces de liberar calcio desde depósitos como la cafeína, histamina o bradicinina (en cuyo caso la elevación del calcio citosólico podía ser muy rápida cerca de la fuente de Ca^{2+} pero no uniforme por todo el citosol) (Bittner y Holz, 1992; Augustine y Neher, 1992; von Ruden y Neher, 1993; Heinemann y col., 1993). En los trabajos más recientes se combina la fotoliberación de Ca^{2+} enjaulado (que permite elevar las $[Ca^{2+}]_c$ de forma rápida y uniforme por todo el citosol) con mediciones simultáneas de la secreción por capacitancia o amperometría, por lo que la resolución temporal es mucho mayor (Neher y Zucker, 1993; Heinemann y col., 1994; Gillis y col., 1996; Voets y col., 1999; Voets, 2000).

A continuación se expondrán brevemente sus principales hallazgos o hipótesis; aunque se hayan extraído de células neuroendocrinas como las cromafines probablemente también sean aplicables, con ligeras modificaciones, a neuronas (revisiones en Kits y Mansvelder, 2000; Sorensen, 2004).

Analizando la cinética de la secreción tras un incremento rápido y homogéneo de la $[Ca^{2+}]_c$, se ha podido distinguir una **primera fase de “estallido” rápido de la secreción que va seguida de una fase de secreción “sostenida”**. La fase de estallido rápido, que puede resolverse a su vez en dos componentes cinéticos (Voets y col., 1999; Voets, 2000), representaría la fusión de dos subpoblaciones de vesículas listas para experimentar exocitosis, mientras que la fase sostenida procedería de vesículas que en el momento de producirse el estímulo secretor todavía tienen que experimentar anclaje a la membrana y maduración, y que se movilizarían de una forma lenta y uso-dependiente.

Se desconoce el mecanismo por el cual las vesículas **se anclan** a la membrana, aunque se sabe que es un proceso guiado, pues se anclan a zonas concretas de ésta. En cuanto al proceso de **maduración** (que requiere de unos 30 s en células cromafines), el inicio de la formación del complejo SNARE es su base molecular. En los últimos años algunos trabajos han postulado incluso que las proteínas del complejo SNARE, como SNAP-25 (Sorensen y col., 2003), junto con sus proteínas reguladoras, como Munc-13, (Ashery y col., 2000; Brose y col., 2000), participarían en la maduración pero no en la fusión final de las vesículas con la membrana plasmática.

A la luz de todos estos resultados se han establecido hasta cuatro tipos de **depósitos (o poblaciones) de vesículas secretoras**, en función de su estadio de madurez para experimentar exocitosis. A continuación se describen estas poblaciones, de nomenclatura algo confusa en la literatura (en parte debido a las diversas resoluciones temporales de las técnicas experimentales empleadas); cada una de ellas nutriría a la siguiente, mediante mecanismos en los que está implicado, entre otros, el Ca^{2+} (de gran importancia en este trabajo) (**figura 7**):

1) el **RP (de “reserve pool”)**: la población mayoritaria de vesículas secretoras (más del 95% del total), el conjunto de vesículas más alejadas de la membrana plasmática. Su migración hacia ésta es lenta (tarda unos 6 min, Steyer y col., 1997) y requiere de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en el rango de submicromolar (que pueden alcanzarse con estímulos que actúen vía IP_3) y de mecanismos moleculares como el desensamblaje de la actina filamentosa subplasmalemal, que constituye una barrera para el movimiento de las vesículas situadas más internamente en el citosol (Trifaró y Vitale, 1993; Vitale y col., 1995; Aunis, 1998) (ver sección 6.4 de esta *Introducción*).

2) el **UPP (de “unprimed pool”)**: grupo de vesículas que ya están atracadas a la membrana pero que todavía no ha experimentado la maduración o “*priming*”, y por tanto todavía no son competentes para la fusión, ya que carecen del complejo SNARE (Ashery y col., 2000). Requieren de MgATP para pasar -en ~decenas de segundos- al siguiente depósito, el de las vesículas maduras o “*primed*”, proceso que puede verse potenciado por Ca^{2+} a bajas concentraciones (de 0,3 a 2,0 μM) (Bittner y Holz, 1992; von Ruden y Neher, 1993). Parte de esta Ca^{2+} -dependencia se debe a la activación de la PKC (Gillis y col., 1996; Smith y col., 1998).

La siguiente población de vesículas, la de las **maduras o “primed”**, a su vez se divide en dos subpoblaciones: SRP y RRP. Ambas pueden experimentar exocitosis en cuanto se incrementan los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ hasta el rango de decenas de μM , pero con velocidades diferentes:

3) el **SRP (de “slowly releasable pool”)**: experimentarían una exocitosis lenta (en unos 300 ms). Está formado por el grupo de vesículas en las que ya ha empezado pero no se ha completado la maduración (esto es, que constan de un complejo SNARE laxo).

4) el **RRP (de “rapidly o readily releasable pool”)**: experimentarían exocitosis de forma casi inmediata (en unos 30 ms), ya que constan de un complejo SNARE fuerte.

La transición del SRP al RRP se produce en unos pocos segundos (10 s) y es reversible e independiente de Ca^{2+} (Voets y col., 1999; Voets, 2000). Algunas de las proteínas accesorias del complejo SNARE como snapina o complexinas, que estabilizan el complejo SNARE o incrementan la afinidad de la sinaptotagmina por éste, facilitan la transición desde el SRP al RRP (Reim y col., 2001; Chheda y col., 2001).

Dentro del RRP se ha llegado a establecer una subpoblación de vesículas (~25%), el IRP (de "*immediately releasable pool*"), formado por las vesículas más próximas a los CCDV, que al "ver" mayores $[\text{Ca}^{2+}]_c$ durante la despolarización de la célula serían las primeras en experimentar exocitosis (Moser y Neher, 1997; Voets, 1999).

Tras la depleción del RRP y el SRP, la recuperación de estos depósitos de vesículas se produce en ~1 min (von Ruden y Neher, 1993; Smith y col., 1998).

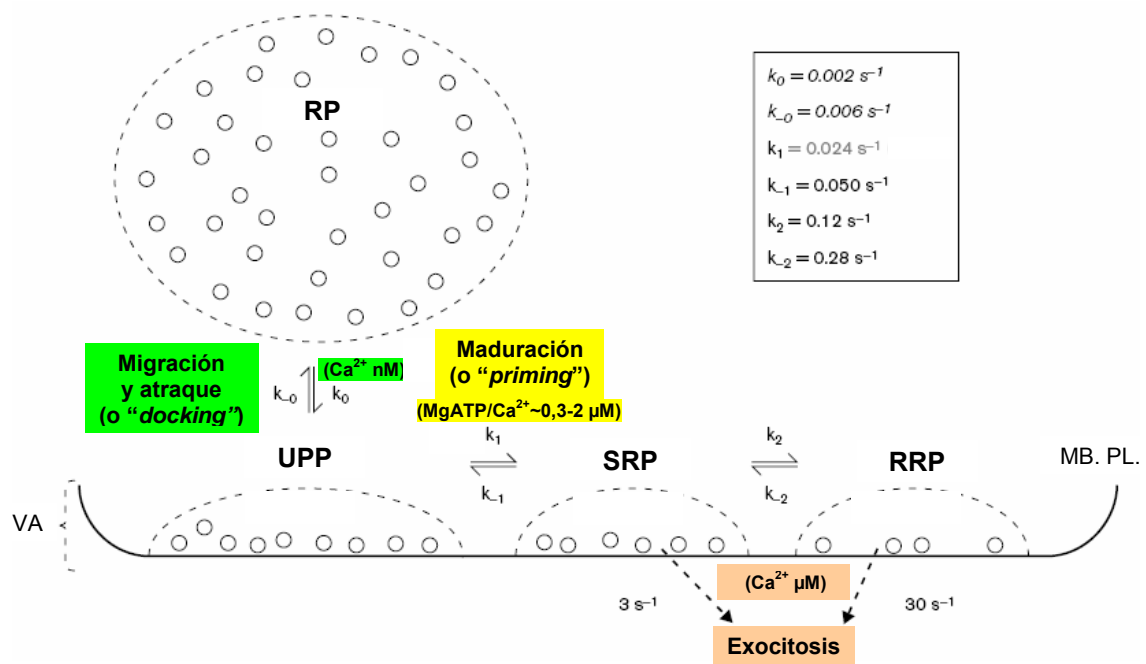


Figura 7. Regulación por Ca^{2+} o ATP de las transiciones entre poblaciones de vesículas secretoras. Nótese la reversibilidad de los procesos de transición entre RP, UPP, SRP y RRP (aunque no necesariamente con las mismas constantes de tiempo en uno y otro sentido) así como la irreversibilidad de los procesos de exocitosis desde el SRP y desde el RRP. MB.PL: membrana plasmática; VA: vesículas atracadas (adaptado de Brose y col., 2000).

Mediante la técnica de amperometría en parche se ha podido observar en el proceso de exocitosis un estadio inicial, el de la formación del **poro de fusión** (Albillos y col., 1997), que une el espacio extracelular con el lumen vesicular durante unos 10 ms. El poro de fusión, de unos 2 nm de diámetro, se comporta como un canal iónico: por una parte permite la salida del contenido intravesicular soluble (catecolaminas no acoplejadas, aproximadamente un 10% del total) y por otra parte permite la entrada de agua y iones, de tal modo que se hincha y se expande y acaba por verter casi todo el contenido intravesicular al exterior (solamente algunas fracciones de proteínas como la DBH o las cromograninas van a permanecer unidas a la membrana). Sin embargo, en ciertas ocasiones el poro se cierra bruscamente, en el denominado “**kiss and run**”, y no se produce la exocitosis completa (Albillos y col., 1997; Alés y col., 1999). En ese caso, la vesícula puede ser reciclada y servir nuevamente para la secreción.

6.4.- El citoesqueleto en la célula cromafín

Como ya se ha comentado en la sección anterior, se desconoce el mecanismo por el cual las vesículas cromafines *migran* y se *anclan* a la membrana plasmática, aunque se sabe que es un proceso guiado, reversible y Ca^{2+} -dependiente. La Ca^{2+} -dependencia del proceso se explica por lo menos en parte por la Ca^{2+} -dependencia de las interacciones entre las vesículas secretoras, la membrana plasmática y la barrera de actina de estas células.

En efecto, el citoesqueleto de las células cromafines en reposo, en la zona subplasmalemal, está constituido principalmente por **actina filamentosa** (F-actina) (Lee y Trifaró, 1981; Cheek y Burgoyne, 1986). Estos filamentos, de unos 6-7 nm de diámetro, discurren paralelos a la membrana plasmática formando un anillo continuo que supone una barrera para el movimiento de las vesículas situadas más internamente en el citosol (Perrin y Aunis, 1985; Burgoyne y Cheek, 1987; Gil y col., 2000). Tras la estimulación de las células, la barrera de actina se desensambla de forma Ca^{2+} -dependiente y reversible y va seguida de la secreción de catecolaminas, lo cual sugiere que este desensamblaje es necesario para desencadenar la exocitosis (Burgoyne y Cheek, 1987; Vitale y col., 1991 y 1995). En apoyo de esta hipótesis, mediante microscopía de fluorescencia, se pudo comprobar que las zonas subplasmalemales donde se desensamblaba la F-actina coincidían con las zonas donde las vesículas cromafines interactuaban con la membrana plasmática (Vitale y col., 1991).

Pero en este proceso participarían **muchas otras proteínas del citoesqueleto** como las miosinas, scinderina, α -actinina, MARCKS, caldesmon o fodrina, que de forma Ca^{2+} - dependiente, algunas moduladas a su vez por segundos mensajeros como la PKC, desensamblan o reorganizan la barrera de actina (Perrin y Aunis, 1985; Perrin y col., 1987; Vitale y col., 1991 y 1995; Trifaró y Vitale, 1993; Trifaró y col., 2000; Neco y col., 2002 y 2004).

Esta hipótesis del papel más bien “pasivo” del citoesqueleto durante la exocitosis, sin embargo, está cambiando con los trabajos más recientes, que con la técnica de TIRFM (microscopía de fluorescencia por reflexión total interna, también denominada microscopía de onda o campo evanescente) han podido visualizar las vesículas submembranales y su evolución durante la exocitosis. Dichos trabajos han sugerido un **papel activo del sistema actina-miosina** en el transporte de las vesículas secretoras hacia zonas submembranales durante la exocitosis (Steyer y Almers, 1999; Johns y col., 2001).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La comunicación entre neuronas se basa en alternar señales eléctricas - potenciales de acción- con señales químicas -liberación de neurotransmisores en las sinapsis-. Por eso la modulación de la liberación de neurotransmisores en las sinapsis ha sido objeto de estudio durante décadas, pues de ella depende la eficacia de la transmisión sináptica, esto es, la eficacia de la comunicación interneuronal.

La **modulación de la liberación de neurotransmisores** se puede ejercer en diferentes niveles, como la modulación: 1) de canales iónicos (Meir y col., 1999), particularmente de los CCDV de tipo HVA, principal fuente de Ca^{2+} para la maquinaria exocitótica (Olivera y col., 1994; Baldelli y col., 2004; García y col., 2006), y de los canales de K^+ Ca^{2+} -dependientes, que determinan el patrón de disparo de potenciales de acción (Yarom y col., 1985); 2) de los receptores pre y post-sinápticos acoplados a canales iónicos o a rutas de señalización intracelular (Meir y col., 1999; Baldelli y col., 2004); 3) del ritmo de suministro de vesículas secretoras desde los diferentes depósitos hasta el de las vesículas listas para ser secretadas (Neher, 1998; Sorensen, 2004).

Este último punto ha sido objeto de extenso estudio, ya desde que en 1973 Glowinski propusiera que en las terminaciones nerviosas centrales las catecolaminas se almacenaban en dos compartimentos diferentes: uno pequeño “funcional”, que contenía principalmente las catecolaminas recién sintetizadas e importante durante el proceso secretor, y uno grande “de reserva”, al que se recurría durante las situaciones de emergencia. Esquemáticamente se sugirió que en las varicosidades podían coexistir dos poblaciones de vesículas, diferentes en su morfología, distribución geográfica y propiedades bioquímicas.

En el estudio de las subpoblaciones de vesículas secretoras y de su regulación se han empleado también las **células cromafines de la médula adrenal en cultivo** o sus emparentadas de la línea de feocromocitoma de rata PC12, amén de otros modelos celulares como las células beta pancreáticas (Gromada y col., 1999; Rorsman y col., 2000) o las melanotróficas de la pituitaria (Thomas y col., 1993). Así, desde que Douglas y Rubin describieran en 1961 que en células cromafines el Ca^{2+} estaba acoplado a la liberación de catecolaminas mucho se ha avanzado en el estudio de la dinámica de vesículas secretoras, hasta llegar a la conclusión de que las elevaciones del $[Ca^{2+}]_i$ participan no sólo en los últimos eventos de la exocitosis (en el rango de micromolar) sino también (y en el rango de nanomolar) en el tráfico y maduración entre los diferentes depósitos de vesículas (ampliamente comentado en la *Introducción*, apartado 6.3). Es más, combinando técnicas de microscopía confocal y de ecorinas posicionadas en

compartimentos celulares específicos, se ha visto que las células cromafines son capaces de generar diferentes transientes de $[Ca^{2+}]_c$ en subdominios celulares. De hecho, se sabe que tanto el fenómeno de CICR desde RE (Alonso y col., 1999) como la captación y liberación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria (Montero y col., 2000) son capaces de redistribuir el Ca^{2+} que entra en la célula cromafín tras su estimulación hacia diferentes compartimentos (Villalobos y col., 2002), generando las diferentes $[Ca^{2+}]_c$ requeridas en la traslocación/maduración de vesículas o en los pasos finales de la exocitosis.

Aunque los experimentos arriba referidos, empleando técnicas de *patch-clamp*, han proporcionado una alta resolución temporal (del orden de ms), no han proporcionado información de cómo el ritmo de suministro de vesículas secretoras desde los diferentes depósitos hasta el de las vesículas listas para ser secretadas podía estar sucediendo en condiciones más fisiológicas. No hay que olvidar que estas técnicas son agresivas para las células, y que los protocolos experimentales empleados hasta la fecha aplicaban pulsos secretagogos no fisiológicos del tipo pulsos cuadrados despolarizantes, soluciones despolarizantes de alto K^+ o sustancias como la cafeína, histamina o bradicinina.

Por todo ello este trabajo se planteó estudiar el patrón de secreción de catecolaminas en **poblaciones de células cromafines bovinas en condiciones más cercanas a la fisiología de las células**, esto es, empleando: 1) la técnica de detección amperométrica en tiempo real de secreción de catecolaminas, poco agresiva para las células tanto desde el punto de vista mecánico como desde el punto de vista eléctrico (el potencial de membrana de las células, V_m , fluctúa libremente), y que además no perturba la composición intracelular de las mismas; 2) protocolos de estimulación más fisiológicos, es decir, estimulación con ACh a altas concentraciones (100 μM) en presencia continuada de bajas concentraciones de agonistas nicotínicos como la ACh o la Cho (de eventual presencia en la sinapsis esplácnico-cromafín tras la descarga repetida del nervio esplácnico) o como la nicotina (Nic). Paralelamente, se intentó correlacionar estos resultados con los obtenidos, en **ccb aisladas**, y en presencia de bajas concentraciones de Nic, sobre: 1) las corrientes nicotínicas de entrada en respuesta a breves pulsos de 100 μM ACh (medidas mediante la técnica de *patch-clamp* en su configuración de fijación de voltaje); 2) los transientes de la señal de calcio citosólico experimentados tras la estimulación con pulsos de ACh 100 μM .

Para esclarecer algunos de los datos obtenidos se recurrió a protocolos menos fisiológicos como la estimulación con 100 mM K^+ , la aplicación continuada de una

solución despolarizante de 17 mM K⁺ o la depleción de Ca²⁺ del RE mediante incubación de las células en una mezcla depletora, así como a la técnica de *patch-clamp* en su configuración de fijación de corriente.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Cultivo primario de células cromafines bovinas

Las células cromafines de la médula adrenal se aislaron a partir de glándulas adrenales de terneros, extraídas de los animales en un matadero local y transportadas hasta el laboratorio en una solución de Locke sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} compuesta por (en mM): 154 NaCl, 5,6 KCl, 3,6 NaHCO_3 , 5,6 glucosa, 5 HEPES, pH 7,2, además de antibióticos (50 $\text{UI}\cdot\text{ml}^{-1}$ de penicilina y 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de estreptomycin).

El protocolo de cultivo que se siguió fue el de digestión de la médula adrenal con colagenasa descrito por **Livett** en 1984 (Livett, 1984) con las modificaciones introducidas por **Moro** (Moro y col., 1990). Se realiza en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar.

Una vez en la unidad de cultivos, se retira el tejido graso periadrenal y se lava la glándula inyectándole Locke con una jeringa a través de la vena adrenolumbar (o medular central). El lavado se repite varias veces y sirve para eliminar los eritrocitos del sistema vascular de la glándula. A continuación se inyectan, también a través de la vena adrenolumbar, unos 3,5 ml de solución enzimática de colagenasa (colagenasa al 0,25% + albúmina sérica bovina al 0,5%, disueltas en Locke) y se incuba la glándula a 37°C para que la colagenasa actúe en condiciones óptimas. La inyección de colagenasa se repite hasta un total de 3 veces, a intervalos de 20 min.

Finalizada la digestión enzimática, se secciona la glándula longitudinalmente y se extrae la médula ya digerida, que se lava de colagenasa mediante la adición de grandes volúmenes de Locke. La suspensión así obtenida se filtra a través de una malla de nylon con un tamaño de poro de 217 μm , que permite eliminar fragmentos de médula no digeridos. La suspensión filtrada se centrifuga (120xg, 10 min, T^a amb) para sedimentar las células. Se elimina el sobrenadante y el precipitado se resuspende en Locke, tras lo cual se obtiene una nueva suspensión celular que se filtra a través de una malla de nylon con un tamaño de poro menor, de 82 μm , que permite la eliminación de grasa y de fibras.

A continuación se separan y purifican las células mediante un **gradiente de Percoll**, para lo cual se añade Percoll estéril a la suspensión celular y se centrifuga (20.000xg, 20 min, 20-25°C). Tras esta centrifugación se observan varias bandas en el gradiente, entre las que destacan una superior con una mezcla de células cromafines adrenérgicas y noradrenérgicas y una inferior de cromafines principalmente adrenérgicas. Se recogen las células contenidas en estas dos capas y se realiza un primer lavado del Percoll, añadiendo grandes cantidades de Locke y centrifugando (120xg, 10 min, T^a

amb). Se elimina el sobrenadante y se resuspende el precipitado en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (se realiza así un segundo lavado del Percoll). Finalmente, la suspensión celular se centrifuga de nuevo (120xg, 10 min, T^a amb) y el precipitado resultante de esta última centrifugación se resuspende en un DMEM al que se le han añadido: 5% de suero bovino fetal, inhibidores de fibroblastos (10 μ M de citosina-arabinósido y 10 μ M de fluorodeoxiuridina) y antibióticos (50 UI·ml⁻¹ de penicilina y 50 μ g·ml⁻¹ de estreptomina).

Para los experimentos de *patch-clamp* y de microscopía de fluorescencia en célula única las células se **sembraron** en cubreobjetos de vidrio de 1 cm de diámetro (previamente tratados con polilisina para facilitar la adhesión de las células) a una densidad de 5x10⁴·ml⁻¹; para los experimentos de detección de catecolaminas por amperometría en poblaciones celulares la siembra se realizó en placas de Petri de poliestireno de 5 cm de diámetro a una densidad de 1x10⁶·ml⁻¹ (5 ml por placa).

Las células se **mantuvieron** a 37°C en un incubador con atmósfera saturada de agua y 5% de CO₂. El medio de cultivo se reemplazó por un DMEM libre de suero 24 h después de la siembra. Las células se emplearon 24-48 h tras la siembra para los experimentos de *patch-clamp* y de fluorescencia y 48-96 h tras la siembra para los de secreción en poblaciones.

2.- Detección amperométrica en tiempo real de la liberación de catecolaminas por poblaciones de células cromafines bovinas

La liberación de catecolaminas por parte de una población de células cromafines bovinas tras su estimulación o bien con el agonista fisiológico acetilcolina (ACh, 100 μ M) o bien con una solución despolarizante de 100 mM de KCl se midió en tiempo real mediante la **técnica amperométrica** (Green y Perlman, 1981; Herrera y col., 1985; Borges y col., 1986).

La amperometría es un método electroquímico basado en la oxidación o reducción de sustancias. Muchos productos de secreción, entre ellos las catecolaminas, contienen en su molécula grupos químicos con capacidad para ceder (oxidarse) o captar (reducirse) electrones. La amperometría aprovecha estos fenómenos de óxido-reducción para detectar los productos de secreción por la oxidación de los mismos. Es una técnica de fácil manejo y no invasiva para las células (a diferencia de las técnicas de *patch-clamp* de

medición de la capacitancia de membrana); sin embargo, no permite identificar qué sustancias han sido oxidadas (para ello debería emplearse otro método electroquímico, la voltametría).

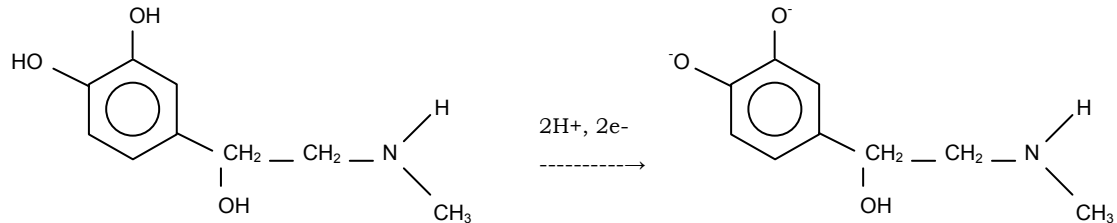


Figura 8. Oxidación de catecolaminas. Esquema de la oxidación de una molécula de adrenalina (obsérvese cómo lo que se oxida es el anillo catecol de la molécula).

Como ya se comentó en la introducción (pág. 32), la vesícula cromafín almacena multitud de moléculas además de las catecolaminas. Algunas de ellas son también oxidables, como la encefalina o la somatostatina (Crespi, 1991), ya que son proteínas con aminoácidos Tyr, Trp y/o Cys; pero la escasa cantidad secretada de estas sustancias, así como su lenta difusión, dificulta enormemente su detección amperométrica. Algunos derivados de las catecolaminas como el NO (Malinski y Taha, 1992), el ácido ascórbico y el ácido úrico serían también oxidables.

La detección por oxidación de los productos secretados se consigue mediante un detector adecuado. En este caso el detector fue un **electrodo de carbono**; cuando las sustancias oxidables difunden hacia su superficie, los electrones generados en la reacción de oxidación (en el caso de las catecolaminas, 2 e⁻ por cada molécula oxidada, ver **figura 8**) serán transferidos a él y se produce un flujo de corriente a su través que será directamente proporcional a la concentración de sustancias oxidadas. Cada compuesto de óxido-reducción presenta un estado de equilibrio en el que la mitad de las moléculas se encuentran en estado oxidado y la otra mitad en estado reducido. Dicho estado de equilibrio es consecuencia de un potencial, característico de cada especie química, que recibe el nombre de potencial redox. Para favorecer la oxidación de todas las moléculas secretadas debe aplicarse un voltaje que exceda al potencial redox en al menos +200 mV, ya que la aplicación de uno menor disminuiría drásticamente la velocidad de oxidación y por tanto la detección de señales amperométricas (Bruns y Jahn, 1995). En el caso de las catecolaminas el potencial utilizado suele ser de +650-800 mV (**+650 mV** en este trabajo).

En la **figura 9** se muestra un esquema del dispositivo que se empleó para llevar a cabo este tipo de experimentos.

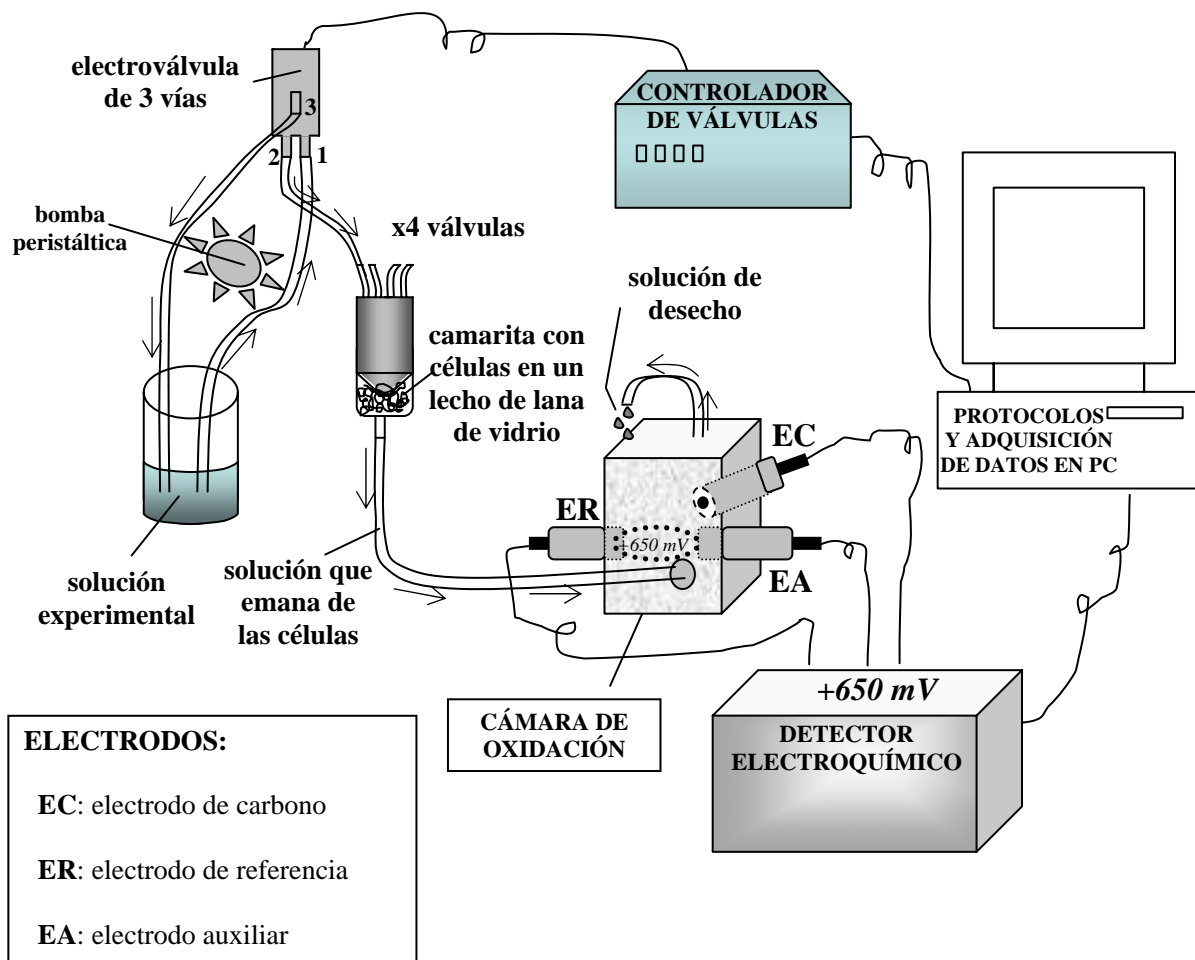


Figura 9. Secreción en poblaciones. Esquema del dispositivo empleado para la detección amperométrica en tiempo real de la secreción de catecolaminas en poblaciones celulares. Las flechas indican el sentido en el que circulan las soluciones a lo largo de un experimento.

Las células, depositadas en una camarita, se superfunden continuamente con una solución de Krebs-Hepes (KH) a una velocidad de $2,5-3,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Mediante un sistema de electroválvulas de tres vías se puede controlar el medio que superfundirá a las células en todo momento, así como la duración y frecuencia de la superfusión (por ejemplo para aplicar los estímulos secretagogos). La solución que emana de las células (que acaba de bañar a las mismas) se conduce rápidamente a una cámara de oxidación, en la que se

verá sometida a un voltaje de +650 mV gracias a un sistema de dos electrodos (uno de referencia y otro auxiliar) conectados a un detector electroquímico (Metrohm AG Herisau, 641-VA, Suiza). En la cámara de oxidación confluye un tercer electrodo, el de carbono, que detectará los electrones liberados tras la oxidación de las catecolaminas y conducirá esta señal al detector, conectado a su vez a un ordenador PC, que mediante un programa informático desarrollado en lenguaje BASIC permite adquirir la señal (con una frecuencia de muestreo de 2 Hz) así como aplicar los diferentes protocolos experimentales (apertura electrónica de las válvulas) y el análisis de los resultados.

Para llevar a cabo los experimentos las células se despegan de la placa de Petri mediante un suave raspado con una espátula de plástico y se centrifugan (120xg, 10 min). Una vez sedimentadas, se desecha el sobrenadante y se resuspenden en 200 μ l del mismo KH que se empleará durante el experimento, compuesto por (en mM): 144 NaCl, 5,9 KCl, 1,2 MgCl₂, 11 glucosa, 10 HEPES, 2 CaCl₂, pH 7,4, y se vierten en la camarita, que tiene un volumen aproximado de 100 μ l y que previamente se ha rellenado con lana de vidrio para facilitar la retención de las células.

Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (24 \pm 2°C). Los estímulos secretagogos aplicados fueron de KH con ACh 100 μ M o de KH con KCl 100 mM (en este segundo caso, con la correspondiente reducción en la concentración de NaCl para mantener la osmolaridad), de 3 s de duración cada 5 min (excepto que se indique otro patrón de estimulación).

En algunos experimentos las células se trataron previamente con una mezcla para depletar de calcio el RE, compuesta por un KH "0 Ca²⁺ nominal" (esto es, sin la adición de CaCl₂) y: 20 mM de cafeína (Caf), 10 μ M de rianodina (Ry) y 1 μ M de tapsigargina (Thap). El tratamiento consistió en incubar las células en dicha solución durante 10 min a 37°C (en el incubador) y lavarlas luego, antes de utilizarlas en el experimento.

Los registros representativos de algunos experimentos que se muestran en esta tesis se obtuvieron importando los datos, obtenidos en formato ASCII, al programa Origin 5.0 ó 7.0 (Microcal).

3.- Registro de corrientes nicotínicas en célula cromafín bovina aislada mediante la técnica de *patch-clamp* en modo fijación de voltaje y configuración de parche perforado

Todas las células, por el hecho de estar vivas, poseen una diferencia de potencial (ΔV) entre ambos lados de su membrana plasmática (**potencial de membrana, V_m**). Esta diferencia de potencial está producida por la distribución asimétrica de iones a ambos lados de la membrana, siendo las responsables de esto último las propiedades intrínsecas de la membrana plasmática, fundamentalmente su permeabilidad selectiva a determinados iones así como las bombas iónicas de membrana. Esta asimetría iónica va a ser la responsable, en última instancia, de la interacción entre la célula y el medio que la rodea, permitiendo que la célula intercambie materia y energía con el medio, manteniéndose de esta manera “viva”. Las llamadas “células excitables” (células musculares, células nerviosas y células endocrinas) pueden además variar su V_m en respuesta a determinados estímulos, lo que constituye la base de la transmisión del impulso nervioso y de la neurotransmisión, que juegan un papel fundamental en la comunicación y control de los organismos pluricelulares.

El desarrollo de la **electrofisiología**, con la aparición de las técnicas de registro intracelular y de fijación de voltaje, contribuyó al avance en el conocimiento de los mecanismos de membrana que permiten la comunicación neuronal y la transducción de señales. Pero fue la aparición de la electrofisiología “moderna”, con el desarrollo de la denominada técnica de *patch-clamp*, lo que revolucionó este campo de estudio, hasta el punto de permitir estudiar las proteínas que controlan los flujos iónicos a través de las membranas, y con una sensibilidad tal que incluso permitía estudiar la actividad biológica de una única proteína (Hamill y col., 1981; Hille, 1992).

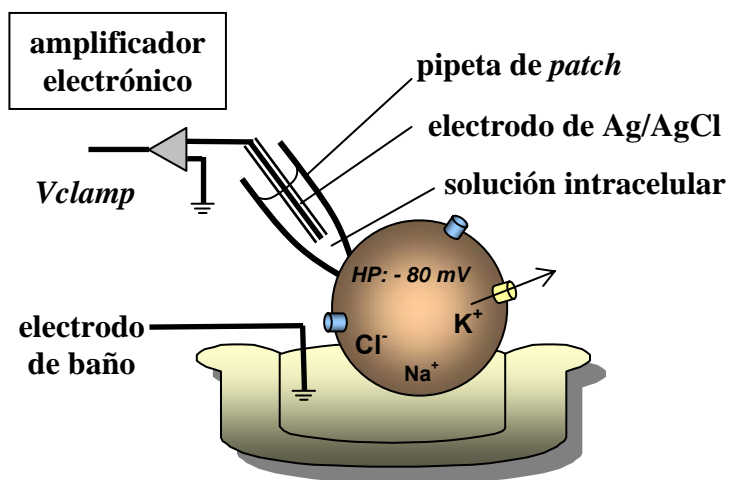
En este trabajo, las corrientes generadas tras la estimulación de una célula cromafín mediante la aplicación del agonista fisiológico ACh (100 μM), I_{ACh} , se registraron mediante la **técnica de *patch-clamp*** (Hamill y col., 1981) en su modalidad de fijación de voltaje y configuración de parche perforado.

La técnica de *patch-clamp* en su modalidad de fijación de voltaje consiste en mantener fija la diferencia de potencial de un pequeño trozo (o parche) de membrana de la célula (**figura 10**) con ayuda de un amplificador; de este modo, si en respuesta a un determinado estímulo, se produce alguna corriente de entrada o de salida de iones a través de los canales y/o receptores presentes en dicho parche de membrana (p. ej: se

abren nAChRs de la célula en respuesta a ACh y principalmente fluyen iones Na^+ y Ca^{2+} hacia el interior celular), la medición de la corriente que es necesario inyectar para mantener fijo el potencial de membrana será equivalente al flujo de iones que se ha producido a través del parche de membrana de la célula (a través de los nAChRs que se hayan abierto, siguiendo con el ejemplo).

Esta técnica emplea un único electrodo que simultanea a elevada frecuencia el registro de voltaje (para mantenerlo fijo en el parche de membrana) y el registro de corriente (la inyectada para mantener fijo el potencial de membrana). Sus ventajas con respecto a la clásica de fijación de voltaje con dos electrodos (desarrollada en los años 50 para el estudio de potenciales de acción, Cole, 1949; Marmont, 1949; Hodgkin y col., 1952) son que se puede aplicar a células pequeñas, en las que sería imposible introducir dos electrodos, y que presenta una buena relación señal-ruido, por lo que permite el registro de corrientes del orden de hasta pA. El electrodo de registro es de plata (Ag) recubierta de Ag/AgCl; estos iones son los que se utilizarán para estabilizar y fijar el potencial de membrana.

Figura 10. Patch-clamp. Representación esquemática de la técnica de *patch-clamp* en su modalidad de fijación de voltaje (*voltage clamp*) y configuración de célula adherida (*cell attached*).



El primer paso para ejecutar esta técnica es formar un sello de alta resistencia eléctrica entre la membrana celular y el electrodo de registro, para lo cual éste se introduce en el interior de una pipeta de vidrio cuya punta se pule al fuego hasta poseer un diámetro de aproximadamente $1 \mu\text{m}$. La pipeta se aproxima a la membrana de la célula y se presiona contra ella, con lo que se forma un sello eléctrico de alta resistencia

(de unos 50 M Ω) que asegura que la mayoría de corrientes originadas en el parche de membrana fluyan hacia el interior de la pipeta y de allí al circuito de medida de corriente.

Si la punta de la pipeta mantiene limpia su superficie, la aplicación de una ligera succión o presión negativa en su interior permite conseguir sellos de resistencia aún mayor, del orden de 10-100 G Ω , conocidos como *giga-sellos*, que reducen el ruido del registro y evitan el flujo de corriente entre la pipeta y el baño, por lo que se puede fijar el potencial del parche de membrana. Se adquiere así la configuración de célula adherida (o *cell attached*). Estos sellos son además mecánicamente muy estables, por lo que permiten diversas manipulaciones mecánicas que originarán las distintas configuraciones de la técnica (célula adherida, célula entera, parche escindido dentro-fuera, parche escindido fuera-dentro, etc).

Para este estudio se utilizó una variación de la configuración de célula entera que es el **parche perforado**. La configuración de célula entera se obtiene a partir de la de célula adherida, cuando la aplicación de una succión o presión negativa adicional al interior de la pipeta consigue romper el parche de membrana que hay bajo los bordes de la misma, con lo que todo el interior de la pipeta entra en contacto eléctrico con todo el interior de la célula y se podrán registrar las corrientes que fluyen a través de los canales y/o receptores abiertos en la totalidad de la membrana celular. Es la configuración más sencilla de obtener y permite cierto control de la composición intracelular, pero tiene el inconveniente de ser invasiva para la célula (debido al proceso de ruptura del parche de membrana), además de que provoca la pérdida gradual de los componentes intracelulares, ya que inmediatamente tras la ruptura del parche la solución intracelular se equilibra con la solución del interior de la pipeta, cuyo volumen es muchísimo mayor. Esto puede causar una eventual desaparición de las respuestas moduladas por compuestos intracelulares, principalmente segundos mensajeros.

La configuración de parche perforado (Horn y Marty, 1988; Rae y col., 1991) es una variación de la de célula entera que se obtiene por inclusión de moléculas de antifúngicos (amfotericina B, nistatina, β -escina, etc) en la solución del interior de la pipeta de *patch*; los antifúngicos formarán poros en el parche de membrana que queda bajo la punta de la pipeta y permitirán así el acceso eléctrico al interior celular.

Para conseguir esta configuración (**figura 11A**) se parte de la de célula adherida y se espera a que el antifúngico forme los poros en la membrana, sin aplicar succión alguna. Con respecto a la configuración de célula entera tiene la desventaja de no

permitir el control de la composición intracelular por parte del investigador; pero resulta menos invasiva para la célula (se evita la succión para romper el parche de membrana), por lo que el sello y la resistencia de acceso al interior celular son mucho más estables. Además, resulta de especial utilidad para estudiar procesos dependientes de componentes intracelulares, pues éstos no sufren un proceso de lavado. En efecto, los antifúngicos forman canales en las membranas celulares que contienen colesterol o ergosterol en su composición; canales que van a ser permeables a cationes monovalentes y a Cl^- (hasta nueve veces más permeables a cationes monovalentes que a Cl^-) e impermeables a iones multivalentes como el Ca^{2+} o el Mg^{2+} y a moléculas no electrolíticas de tamaño igual o superior al de la glucosa. Por todas estas características el parche perforado permite obtener registros de hasta 3 h de duración en una misma célula.

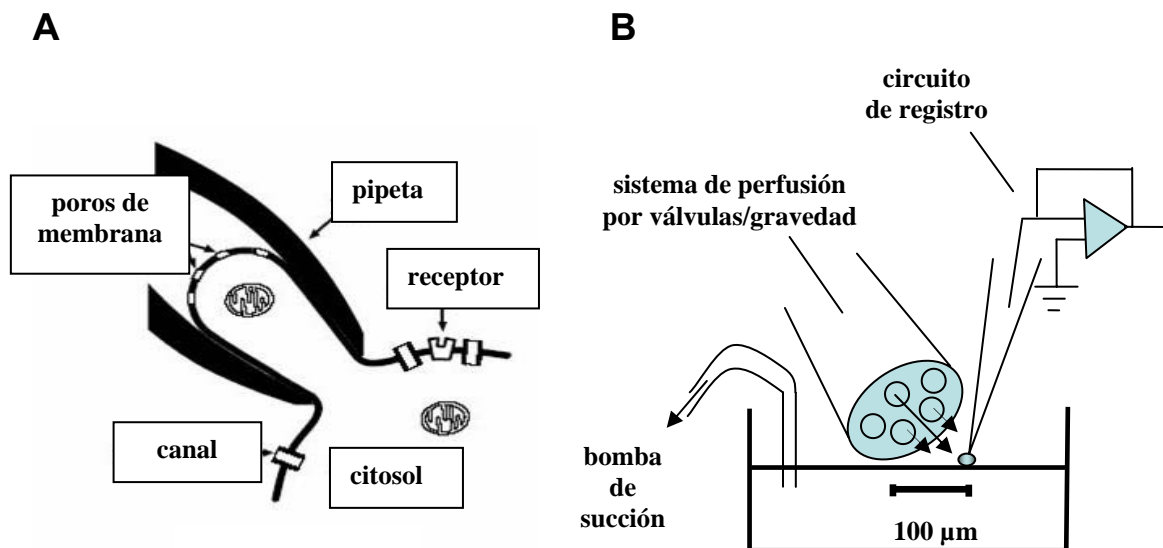


Figura 11. Parche perforado. A) Esquema de la obtención de la configuración de parche perforado (adaptado de *The Axon Guide*). **B)** Esquema del dispositivo experimental empleado para obtener los registros de parche perforado.

En los experimentos de este trabajo la solución de registro extracelular fue un KH idéntico al empleado para los registros de secreción en poblaciones (ver apartado 2 de *Materiales y Métodos*). El cubreobjetos con las células, colocado en una cámara de metacrilato sobre un microscopio invertido Nikon Diaphot TMD, se superfundió con un flujo basal de dicha solución a una velocidad de $1,5\text{-}2\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. La solución intracelular de

registro tenía la siguiente composición (en mM): 145 glutamato-Cs, 9 NaCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES; y 0,5 mg·ml⁻¹ de amfotericina B, pH ajustado a 7,3 con CsOH. Una solución madre de amfotericina B se preparaba nueva en el día en dimetilsulfóxido (DMSO), a la concentración de 50 mg·ml⁻¹, sonicándola hasta su solubilización protegida de la luz y del calentamiento. La concentración final de **amfotericina** se obtenía añadiendo 10 µl de esta solución madre a 1 ml de solución intracelular, y sonicándola también protegida de la luz y del calentamiento, hasta su completa homogenización; esta solución se mantenía en frío, se agitaba con frecuencia con vortex para evitar la adhesión del antifúngico a las paredes del recipiente contenedor y se empleaba en el plazo máximo de unas 3 h desde su preparación para asegurar que no se hubiese perdido la actividad del antifúngico. Las pipetas de registro se sumergían brevemente (unos seg) por la punta en solución intracelular sin amfotericina y a continuación se rellenaban por detrás con solución intracelular con amfotericina. De este modo se podía conseguir la configuración de célula adherida antes de que el antifúngico hubiese difundido hacia la punta de la pipeta para empezar a formar los poros en la membrana (esto dificultaría la obtención del sello). El proceso de perforación tardaba unos 10-15 min.

Los registros electrofisiológicos se realizaron a temperatura ambiente (24±2°C) con las pipetas montadas sobre el preamplificador de un **amplificador de patch-clamp EPC-9** (HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemania), que permite la minimización de los transientes capacitivos y la compensación electrónica de la resistencia en serie. La monitorización de los transientes capacitivos al aplicar un pulso cuadrado de voltaje a la célula a intervalos frecuentes se empleó para determinar cuándo se había producido la perforación del parche de membrana (cuando la resistencia de acceso del transiente alcanzaba valores ≤ 20 MΩ). Para la estimulación celular y la adquisición de datos se empleó el *software* PULSE (también de HEKA) y un ordenador PC. Los registros se adquirieron a una frecuencia de muestreo de 50 kHz.

El potencial de membrana de las células se fijó (*HP*) a -80 mV. Las pipetas se fabricaron a partir de capilares de vidrio de borosilicato (Kimax-51[®], Kimble Glass Inc., diámetros 1,5-1,8 mm x 100 mm) con ayuda de un estirador vertical (modelo PP-830, Narishige, Tokio, Japón), aplicando calor en dos pasos sucesivos. La punta de las pipetas se pulió al calor de una resistencia en una microforja (MF-830, también de Narishige), hasta que su diámetro interior era de unos 1 µm; la resistencia de las pipetas así obtenidas, una vez rellenadas con la solución intracelular, fue de 2,5-3 MΩ. Las soluciones externas que bañan a las células (adicionalmente a la superfusión basal con

KH de la cámara de metacrilato), esto es, una solución control de KH, de KH con Nic 3 μM , o de KH con ACh 100 μM , se intercambiaron mediante un sistema de válvulas excluyentes controladas electrónicamente, acopladas a una **pipeta de perfusión común** cuya punta se posicionaba a menos de 100 μm de la célula en experimentación. La velocidad de este sistema de perfusión es consecuencia de la presión por gravedad ejercida sobre el líquido así como de las características específicas de la pipeta empleada (ver apartado 4 de *Materiales y Métodos*). En este caso se empleó una pipeta con vías rápidas (para la aplicación del agonista ACh 100 μM , en pulsos de 250 ms cada 30 s) y con vías lentas (para la aplicación continuada de KH control o bien de KH con Nic 3 μM) (**figura 11B**).

El análisis de los datos se realizó con el programa OriginPro 7.0 (OriginLab), al que se exportaron los datos procedentes de Pulse con ayuda del programa Origin DataAccess 7.0 (Bruyton & OriginLab).

4.- Apunte sobre el sistema de perfusión empleado para el registro de I_{ACh}

Las diferentes soluciones a aplicar sobre la célula en estudio se depositan en sendas jeringas, que estarán conectadas a una pipeta de perfusión común mediante válvulas electrónicas excluyentes controladas por ordenador. La pipeta de perfusión (de fabricación artesanal) puede tener diferentes diseños en función de la velocidad con la que nos interese aplicar las soluciones, que a su vez va a depender del tipo de canal o receptor en estudio (de su velocidad de apertura/cierre y de su grado de desensibilización). Del receptor aquí estudiado, el nAChR, podríamos decir, a grandes rasgos, que es de apertura y desensibilización rápidas (aunque estas características varían en función del subtipo de receptor, como ya se comentó en la *Introducción*). Por ello se decidió emplear una pipeta de perfusión con dos tipos de vías de aplicación, las denominadas vías rápida y lenta. La **vía rápida** permitió velocidades de perfusión de aproximadamente $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ y se empleó para aplicar el agonista, esto es, ACh 100 μM ; es una velocidad suficiente como para poder detectar respuestas rápidas al agonista y sin problemas de desensibilización, pero no lo suficientemente rápida como para que el flujo despegue a la célula en estudio del cubreobjetos al que está adherida. Las **vías lentas** permitieron velocidades de perfusión de unos $0,08\text{-}0,10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ y se dejaron siempre abiertas, para aplicar o bien KH control o bien KH con Nic 3 μM (de este modo se

consigue una perfusión de las células adicional a la superfusión continua que experimentan en la cámara de metacrilato), lo que permitió el lavado del agonista y la eventual recuperación de los nAChRs de la desensibilización.

Ambos tipos de vías confluyen en un tubo de salida común que se coloca sobre la célula en estudio, a menos de 100 μm de distancia de ésta. Cuando se aplica un protocolo a través del ordenador se consigue la apertura electrónica de una de las válvulas, de tal manera que la solución contenida en la jeringa correspondiente caerá por gravedad hasta la célula bajo experimentación, que quedará bañada completamente por este medio. La velocidad de intercambio de soluciones en los alrededores de las células que se consiguió con este sistema de perfusión fue de unos 50 ms.

5.- Medición de los cambios del potencial de membrana en célula cromafín bovina aislada mediante *patch-clamp* en modo fijación de corriente y configuración de parche perforado

En el modo fijación de corriente de la técnica de *patch* lo que se mantiene constante es la corriente que atraviesa la membrana de la célula en todo momento, de modo que se pueden monitorizar los cambios en el potencial de membrana (V_m) que experimenta la célula a lo largo de un experimento.

Los cambios en el potencial de membrana de las células se midieron mediante un **amplificador de *patch-clamp* EPC-10** (HEKA Electronik, Lambrecht, Alemania) y los protocolos diseñados con el *software* PULSE (también de HEKA), en un set experimental por lo demás igual al de los registros de fijación de voltaje (ver apartado 3 de *Materiales y métodos*). El *HP* de las células se fijó a -80 mV (en modo fijación de voltaje) hasta adquirir la configuración de parche perforado, momento en el cual el amplificador se pasó a modo fijación de corriente. Los registros se adquirieron a una frecuencia de muestreo de 5,6 kHz.

Se emplearon los mismos capilares de vidrio de borosilicato que para los registros de fijación de voltaje (fabricados de la misma manera), hasta obtener resistencias de 2-3 M Ω . La configuración de parche perforado también se obtuvo del mismo modo que para los registros de I_{ACh} , pero variando la composición de la solución intracelular, compuesta por (en mM): 10 NaCl, 130 KCl, 14 EGTA, 20 HEPES, 5 MgATP y 0,3 NaGTP, pH ajustado a 7,3.

Las células se superfundieron externamente con una solución de Tyrode, compuesta por (en mM): 137 NaCl, 1 MgCl₂, 5,3 KCl, 10 HEPES y 2 CaCl₂, pH ajustado a 7.4. Mediante una pipeta de perfusión de vías lentas se aplicaron, según se indica, las soluciones experimentales: Tyrode con Nic 3 μM o Tyrode con diferentes concentraciones de K⁺ (y la consiguiente reducción de NaCl para mantener su osmolaridad).

6.- Determinación de cambios en la [Ca²⁺]_c en célula cromafín bovina aislada mediante la sonda fluorescente fura-2 acetoxi-metil éster (AM)

Los cambios en la [Ca²⁺]_c en células aisladas tras estimularlas con protocolos similares a los empleados en la medida de la secreción de catecolaminas (ver apartado 2 de *Materiales y Métodos*) se determinaron mediante la sonda ratiométrica sensible al calcio **fura-2, en su forma de AM, por microscopía de epifluorescencia.**

La emisión de fluorescencia por parte de un fluoróforo se puede explicar a partir de la interacción de la luz con la materia. Cuando un fotón de la longitud de onda (λ) adecuada incide en el fluoróforo (excitación), la absorción del fotón da lugar a que un electrón en el fluoróforo salte de su nivel basal a otro nivel de mayor energía, de manera que cuando el electrón regresa a su nivel original lo hace liberando energía en forma de fotón (emisión de fluorescencia), cuya longitud de onda va a depender de la cantidad de energía liberada. Las sustancias con propiedades fluoróforas pueden emitir a una o más λ, dando lugar a un espectro de emisión.

Las sondas fluorescentes sensibles al Ca²⁺ (el ion que desencadena la exocitosis y por tanto el que más interesaba estudiar en este trabajo) son fluoróforos que pueden unirse de forma selectiva y reversible al Ca²⁺, como resultado de lo cual varían sus propiedades ópticas: cambia su espectro de excitación (como en el fura-2) o de emisión (como en el indo-1) o bien la intensidad de la fluorescencia que emiten (como en el fluo-3 o el fluo-4). La mayoría son moléculas policarboxiladas que derivan del tampón de calcio BAPTA, desarrolladas por el grupo de Tsien y colaboradores (Tsien, 1980; Grynkiewicz y col., 1985; Minta y col., 1989).

Debido a las características de la preparación, en el presente estudio se usó la sonda ratiométrica fura-2 como indicador fluorescente sensible al calcio. Emite una buena intensidad de fluorescencia (brillo) por molécula, lo que permite obtener una buena relación señal-ruido con concentraciones de indicador pequeñas (de 1-5 μM) que evitan

problemas de tamponamiento del calcio. Su constante de disociación (K_d) de la unión al Ca^{2+} es muy sensible, como en todos los indicadores derivados del BAPTA, a múltiples factores -pH, temperatura, viscosidad y fuerza iónica del medio, unión a proteínas o presencia de otros cationes divalentes que puedan unirse a la sonda (Mg^{2+} , Mn^{2+})- pero se han calculado *in vitro* constantes de 115 y 224 nM según las soluciones empleadas (Grynkiewicz y col., 1985). El rango útil de concentraciones de Ca^{2+} que un indicador puede detectar abarca desde $0,1 \times K_d$ hasta $10 \times K_d$, por lo que el fura-2 es adecuado para medir variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en el rango de 100 nM a unos pocos μM , las de interés para este estudio (de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en estado de reposo a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ capaces de desencadenar la exocitosis tras un estímulo adecuado en la célula cromafin).

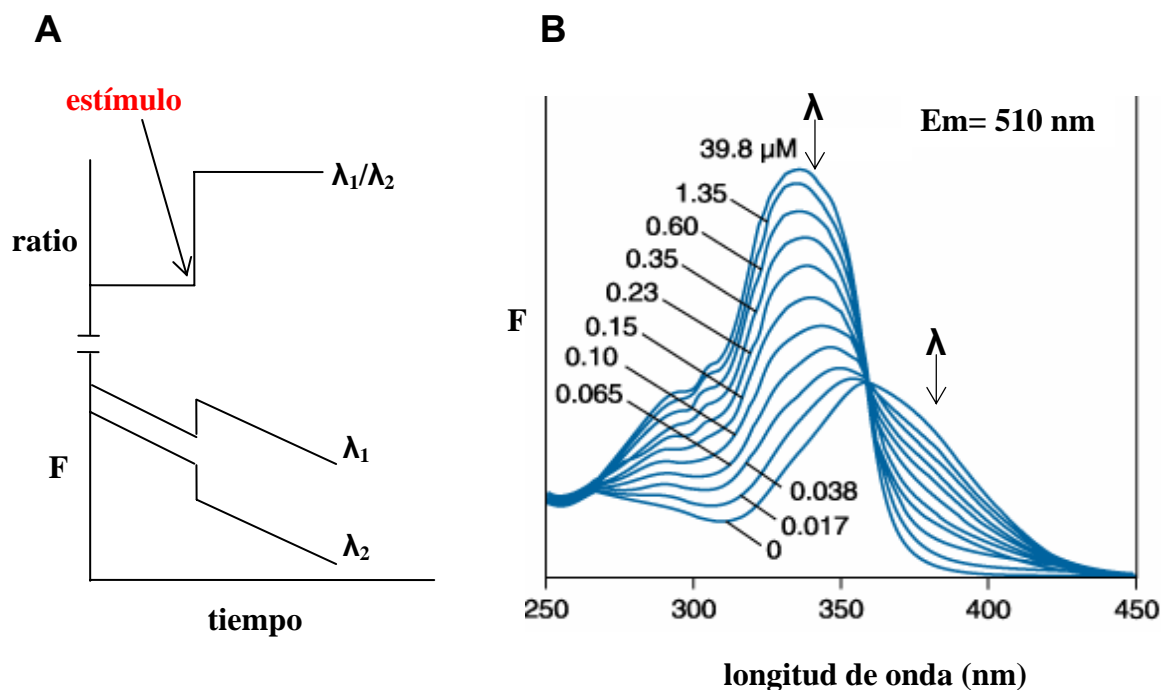


Figura 12. Características de la sonda ratiométrica Fura-2. **A)** Datos simulados que muestran la importancia práctica de las sondas ratiométricas. Se muestra una sonda cuya intensidad de fluorescencia emitida (F) tras la unión a un ion aumenta para la λ_1 y disminuye para la λ_2 (debido al cambio en su espectro de excitación o de emisión). La concentración intracelular de la sonda disminuye rápidamente debido a procesos como el fotoblanqueo o la fuga, pero el cambio en la concentración intracelular del ion tras la aplicación de un estímulo se detecta de forma inambigua debido al uso de la razón (o *ratio*) de fluorescencia (λ_1/λ_2). **B)** Espectro de excitación del fura-2 para diferentes concentraciones de calcio. Se presenta la intensidad de fluorescencia (F) emitida a 510 nm (ordenadas) tras la excitación con luz de distintas λ (abscisas). λ_1 y λ_2 muestran las longitudes de onda usadas en este trabajo (340 y 380 nm respectivamente). Se observa que la intensidad emitida aumenta con concentraciones crecientes de Ca^{2+} para la luz excitadora de 340 nm y disminuye para la de 380 nm. (Modificada de Grynkiewicz y col., 1985).

Como se acaba de comentar, el fura-2 es una sonda ratiométrica. Su espectro de emisión presenta un pico alrededor de 510 nm y no se desplaza con diferentes concentraciones de calcio. Sin embargo, la unión de calcio al fura-2 produce un desplazamiento en su espectro de excitación de unos 30 nm (**ver figura 12**). Este cambio espectral es lo que caracteriza a las denominadas **sondas ratiométricas** (en algunas lo que cambia es el espectro de emisión en vez de el de excitación).

La ventaja fundamental de las sondas ratiométricas con respecto a las no ratiométricas (aquellas en las que la unión de calcio únicamente produce un cambio en la intensidad de fluorescencia emitida, pero no un cambio espectral) es que la medida de fluorescencia obtenida es independiente de una serie de factores nada despreciables como: 1) la concentración que haya alcanzado la sonda en el interior celular (la mayor o menor carga de las células con la sonda), 2) variaciones en la intensidad/trayecto de la excitación y en la eficiencia de la detección (p. ej: por variaciones en el espesor de la muestra estudiada), 3) el grado de fotoblanqueo (*photobleaching*) de la sonda (proceso por el cual la luz excitadora genera la transformación irreversible de la sonda en metabolitos intermediarios igualmente fluorescentes pero con una afinidad por el calcio mucho menor o incluso nula), 4) la tasa de fuga (*leakage*) que experimente la sonda (extrusión de la sonda por parte de transportadores de aniones orgánicos presentes en las membranas celulares como la P-glicoproteína). El cambio espectral permite aplicar la técnica conocida como “razón de fluorescencia” para el cálculo de la $[Ca^{2+}]_c$ a partir de la relación entre las intensidades detectadas tras la excitación con dos λ diferentes (**figura 12**).

Para este trabajo se empleó la forma esterificada de la molécula de fura-2 (éster acetoximetilo). Las formas esterificadas son moléculas hidrofóbicas e insensibles a la presencia de iones que atraviesan las membranas plasmáticas; una vez en el citosol, los enlaces éster son hidrolizados por esterasas intracelulares ubicuas, liberándose la forma polianiónica del fluoróforo, ya sensible a iones, que quedará atrapada en el interior celular. Con respecto a las formas clásicas (en forma de sales) tienen la ventaja de que se cargan fácilmente de forma no invasiva para la célula y de que permiten el estudio simultáneo de varias células (las sales tienen que inyectarse de célula en célula a través de una pipeta de *patch* o de una micropipeta). Sus principales inconvenientes (de magnitud variable en función del tipo celular) son la posible hidrólisis incompleta de las formas éster (quedando formas insensibles al calcio pero igualmente fluorescentes en el interior celular, que pueden distorsionar las estimaciones de $[Ca^{2+}]_c$) y la

compartimentalización de la sonda en orgánulos intracelulares, donde resulta insensible a cambios en $[Ca^{2+}]_c$ (Roe y col., 1990).

La **carga de las células** con fura-2 AM se realizó a 37°C (en el incubador) durante 45 min con 5 μ M de sonda disuelta con ayuda del detergente aniónico plurónico en el KH a emplear durante el experimento (idéntico al de los experimentos de secreción y de *patch*, ver apartado 2 de *Materiales y Métodos*). Previamente a su carga las células se lavaron con KH para eliminar el posible suero presente en el medio de cultivo, ya que éste podría unirse al indicador y disminuir su concentración efectiva. Finalizada la carga se realizaron dos lavados con KH para eliminar los restos de sonda no captados por las células y se dejaron transcurrir 20 min a T^a amb para garantizar la completa desesterificación de la sonda sí captada en el interior celular.

Los cubreobjetos con las células ya cargadas se colocaron sobre una cámara de metacrilato idéntica a la empleada para los experimentos de *patch-clamp*, sobre un microscopio invertido Nikon Eclipse TE200. El sistema de perfusión empleado fue también idéntico al de los experimentos de *patch* (superfusión basal de la cámara con KH y perfusión de los estímulos o de la Nic ó K⁺ mediante un sistema de válvulas excluyentes controladas electrónicamente con ayuda del programa *Pulse* y acopladas a una pipeta de perfusión común), aunque en este caso se empleó una pipeta de vías únicamente lentas, pues las vías rápidas provocaban el desplazamiento de la célula en estudio a lo largo del experimento. Los pulsos de 100 μ M ACh ó 100 mM K⁺ aplicados fueron de 3 s de duración, cada 3 min (se redujo el intervalo entre pulsos con respecto a los experimentos de secreción con el fin acortar la duración de los experimentos y así asegurar que la sonda se encontraba en las mejores condiciones posibles).

Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente, seleccionando una o unas pocas células del campo cada vez (las colocadas justo por debajo de la pipeta de perfusión). La fuente de iluminación del sistema fue una lámpara de arco de xenon de 75 W (Cairn Research, Faversham, UK) conectada al microscopio mediante fibra óptica de cuarzo; la sonda se excitó alternando las longitudes de onda de 340 y 380 nm mediante un monocromador con DAC (*digital analogic control*) (Optoscan, también de Cairn Research). La señal de fluorescencia se adquirió por epifluorescencia con un objetivo de aire Nikon 40X/0,6AN conectado a una cámara digital con tecnología CCD (*charged coupled device*) de 12 bits de resolución (Hamamatsu Orca-AG, Hamamatsu City, Japón). La señal de emisión se recogió mediante un sistema de espejo dicróico y filtro adecuados (dicróico de 450 nm, filtro de emisión de 510 nm), con una frecuencia de adquisición de

0,5 Hz. El control del sistema de iluminación (monocromador) y de la adquisición y procesamiento de imágenes se realizó con ayuda del *software* MetaFluor 6.3 (Molecular Devices, Union City, CA, USA).

La calibración de la sonda para convertir las señales de ratio en valores absolutos de $[Ca^{2+}]_c$ puede estar sujeta a numerosos artefactos y resultar muy inexacta (Roe y col., 1990; Williams y Fay, 1990). Este factor, unido al mayor interés que tenía para este trabajo una estimación cualitativa de la $[Ca^{2+}]_c$ que una cuantitativa, llevó a expresar las medidas de fluorescencia como ratios (F_{340}/F_{380}) y no como $[Ca^{2+}]_c$.

7.- Fuentes de materiales y reactivos

El DMEM, colagenasa tipo I, suero fetal bovino, penicilina y estreptomycin se adquirieron en Gibco (Madrid, España). La lana de vidrio procedía de Panreac (España). Los capilares de vidrio de borosilicato para *patch* pertenecían a Kimble Glass Inc. (procedentes de Mexico). La nicotina (ditartrato) se compró a Calbiochem (La Jolla, CA, USA). El fura-2 AM y el ácido plurónico se obtuvieron de Molecular Probes (Eugene, OR, USA). El resto de los compuestos utilizados se adquirieron en Sigma-Aldrich o Panreac con grado analítico PA (España) y se disolvieron en agua o DMSO según las especificaciones del proveedor.

Las soluciones de ACh o Nic se preparaban en el día en la solución KH o Tyrode de trabajo a partir de soluciones madre preparadas en agua, alicuotadas y conservadas a $-20^{\circ}C$. La solución intracelular para *patch* sin amfotericina se descongelaba en el día a partir de un *stock* conservado a $-20^{\circ}C$. El fura-2 AM se disolvió en DMSO (con ayuda de vortex) para preparar soluciones madre de 1 mM, que se alicuotaron y conservaron a $-20^{\circ}C$; a partir de ellas se preparaba en el día la dilución a 5 μM en la solución KH de trabajo (a $37^{\circ}C$ y con ayuda de vortex para facilitar su disolución) a la que se había adicionado ácido plurónico al 20% (se añadieron volúmenes iguales de fura-2 y de ácido plurónico 20% en la solución KH de trabajo). El plurónico al 20% se preparó en DMSO y se conservó a T^a amb.

8.- Estadística

Los resultados se expresan como $\text{media} \pm \text{error estándar}$ de la media del número de células o experimentos indicado en cada protocolo experimental.

Las diferencias se consideraron significativas entre los diferentes grupos de datos, que se ajustaban a una distribución normal, comparándolos mediante las pruebas t de Student (2 colas, datos no pareados) o ANOVA (una variante) según correspondiese. El límite de significación estadística se estableció en el nivel de $p < 0,05$ (* ó #) ó $p < 0,01$ (**ó ##).

RESULTADOS

NOTA: Todos los experimentos se realizaron a $24 \pm 2^\circ\text{C}$. En todos los experimentos en los que se describe la aplicación de pulsos de ACh o de K^+ tras la perfusión de Nic (o de algún otro compuesto) se entiende que dichos pulsos no fueron en coaplicación con la Nic (o el compuesto que aplique), es decir, que durante el breve tiempo que dura el pulso de ACh o de K^+ , la Nic (o el compuesto correspondiente) no estuvieron presentes en el experimento. Para ver otros detalles de los protocolos experimentales empleados se pueden consultar también los apartados correspondientes de la sección *Materiales y Métodos*. La significación estadística de los datos se indica en las gráficas con # ó ## para los pulsos de ACh y * ó ** para los de K^+ .

1. POTENCIACIÓN DE LA SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS EN POBLACIONES DE CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS EN PRESENCIA DE BAJAS CONCENTRACIONES DE NICOTINA

1.1.- Respuesta control de la secreción de catecolaminas en poblaciones de células cromafines bovinas

La técnica de detección amperométrica en tiempo real se empleó para medir la secreción de catecolaminas en poblaciones de células cromafines bovinas (unos 5 millones de células por experimento) atrapadas en una camarita y rápidamente superfundidas con una solución de $\text{KH}/2 \text{ mM CaCl}_2$. Con esta técnica las células permanecen intactas y su composición intracelular no se ve alterada, por lo que son capaces de proporcionar respuestas secretoras altamente reproducibles en respuesta a la estimulación repetida con pulsos de concentraciones “supramáximas” de ACh ($100 \mu\text{M}$) ó K^+ (100 mM , con reducción osmótica del Na^+), aplicados a intervalos regulares (López y col., 1998; Montero y col., 2000; Cuchillo-Ibáñez y col., 2002 y 2004). “**Supramáximas**” se refiere a que son pulsos capaces de despolarizar a las células hasta el punto en que el máximo número de CCDV se abren (de aquí en adelante también referidos como pulsos de 100ACh ó 100 K^+).

En primer lugar se aplicaron pulsos de ACh $100 \mu\text{M}$, de 3 s de duración cada 5 min (3 s/5 min). Tras 10 min de estabilización de la señal amperométrica basal, los pulsos de 3 s de duración aseguraban respuestas secretoras robustas a la ACh (del orden de 150-200 nA de pico, aunque bastante variables entre cultivos), y el intervalo entre pulsos permitía el retorno de la señal hasta los niveles basales entre pulso y pulso.

La **figura 13A** muestra registros originales de un experimento de este tipo y la **figura 13C** cuantifica los datos obtenidos en 19 experimentos realizados siguiendo este protocolo. Para cuantificarlos, en cada experimento se midió el área bajo la curva (ABC)

de cada espiga amperométrica de secreción (es decir, la carga en μC del total de catecolaminas secretadas tras cada pulso de ACh) y se normalizó la respuesta de cada espiga con respecto a la de la espiga inicial. Como puede observarse, la respuesta secretora a ACh a lo largo de un experimento de este tipo no fue del todo estable, sino que aumentó del primer al segundo pulso ($109,6 \pm 4,8\%$, no significativo) y luego fue disminuyendo progresivamente, hasta resultar significativamente menor que la inicial a partir del 5º pulso (ver significación estadística de cada pulso en figura 13C). Al final del experimento se conservaba aproximadamente un 75% de la respuesta secretora inicial ($76,4 \pm 8,2\%$, $^{###}p < 0,01$).

Posteriormente se repitió el protocolo experimental sustituyendo como estímulo secretor a los pulsos de ACh por pulsos de K^+ 100 mM (que activan la cascada de señalización que conduce a la secreción de catecolaminas en un nivel por debajo de la activación de los nAChRs). En la **figura 13B** se pueden ver los registros originales de un experimento de este tipo (la secreción de catecolaminas, aunque también bastante variable entre cultivos, siempre fue superior en respuesta a pulsos de 100K^+ que en respuesta a pulsos de 100ACh para un mismo lote de células).

Tras la cuantificación de los datos para 21 experimentos con pulsos de K^+ (**figura 13C**) se observó una tendencia al aumento progresivo de las respuestas secretoras en la primera mitad del protocolo (las respuestas secretoras del 2º al 6º pulso fueron significativamente superiores a la respuesta inicial, ver significación estadística de cada pulso en figura 13C) y una tendencia a la disminución de las mismas en la segunda mitad del protocolo, pero sin que nunca llegaran a ser significativamente inferiores a la respuesta inicial (en el último pulso del experimento, p. ej., representaron un $99,3 \pm 7,9\%$ de la respuesta inicial).

Por todo ello se tomó el protocolo que acaba de ser descrito (pulsos de 3 s cada 5 min) como válido para proporcionar respuestas secretoras estables, y se asumió que la pérdida de la respuesta secretora en respuesta a los pulsos de ACh era inevitable, probablemente consecuencia de la **desensibilización característica de los nAChRs** (Dani, 2001; Quick y Lester, 2002).

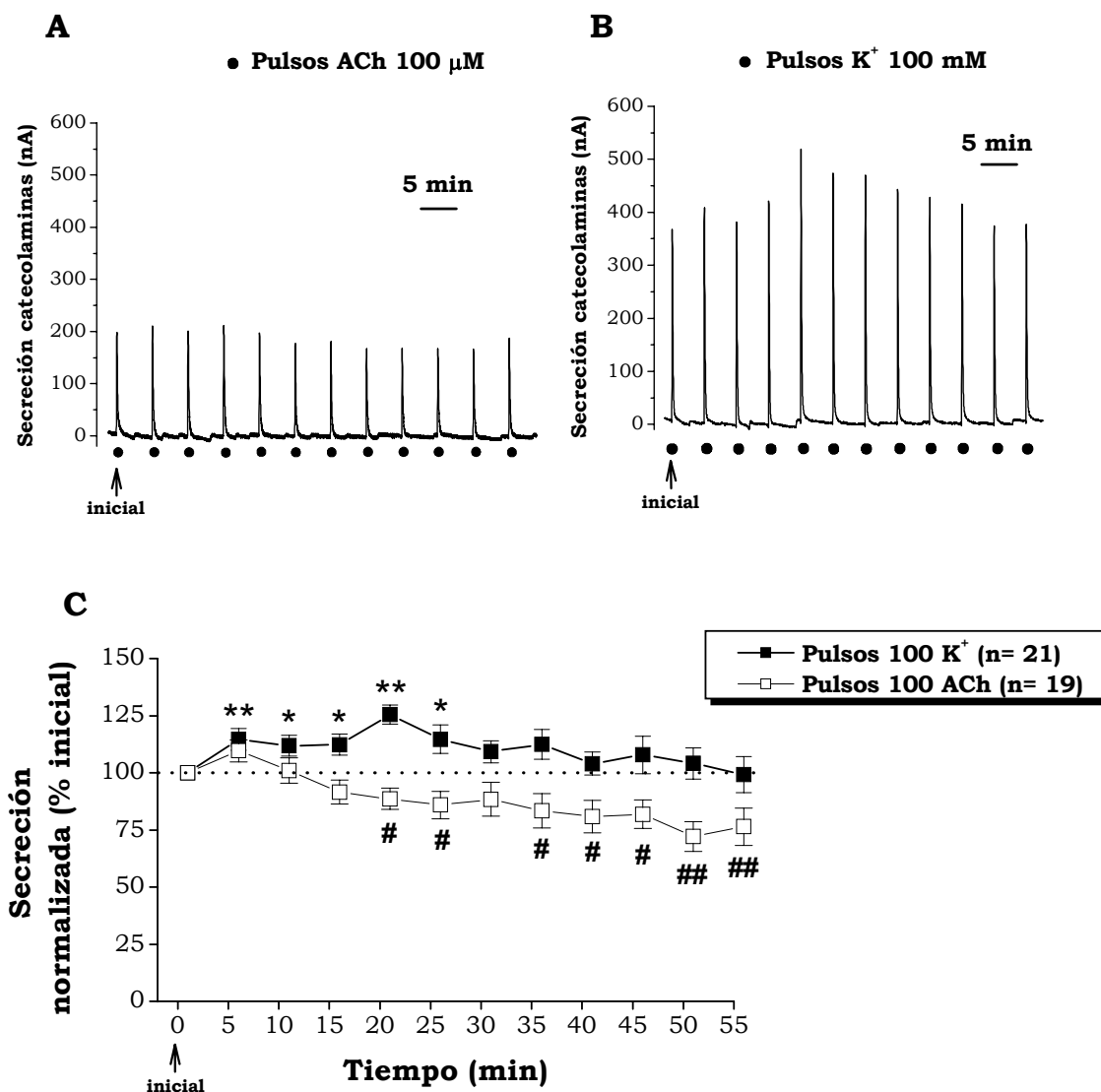


Figura 13. Respuesta control de la secreción de catecolaminas en poblaciones de células cromafines bovinas. A y B) Registros originales de las espigas de secreción obtenidas en una población de unas 5×10^6 células perfundidas con KH/2 mM $CaCl_2$ tras estimularlas con pulsos (●) de 3 s de duración cada 5 min, bien de ACh 100 μ M (A) o bien de K^+ 100 mM (B). **C)** La secreción de catecolaminas en cada espiga, expresada como ABC (en μ C), se normalizó con respecto a la de la espiga inicial, con lo que se obtuvo el curso temporal que muestra la figura. Se muestra el promedio de 19 experimentos con pulsos de ACh (□) y de 21 experimentos con pulsos de K^+ (■). Las células se obtuvieron de al menos 10 cultivos diferentes. #^o $p < 0,05$; ##^o $p < 0,01$ con respecto al pulso inicial.

1.2.- Potenciación de la secreción de catecolaminas evocada por pulsos de 100ACh ó 100K⁺ en presencia continua de una concentración umbral de nicotina en poblaciones de células cromafines bovinas (Protocolo #1)

Las células cromafines bovinas fueron sometidas a una variante del protocolo descrito en el apartado anterior (1.1). En esta variante, que se designará de aquí en adelante como **protocolo #1**, tras la administración de 4 pulsos control de ACh (para asegurar que el experimento/células estaban comportándose normalmente), las células empezaron a ser superfundidas de forma continua con un KH/2Ca²⁺ que contenía concentraciones “umbral” de nicotina (Nic, 3 μ M). El objetivo de este protocolo era estudiar los efectos de una estimulación “umbral” continuada de los nAChRs sobre la secreción de catecolaminas. “**Umbral**” se refiere a concentraciones que de por sí evocaban respuestas secretoras pequeñas o nulas en poblaciones de ccb y que reclutan pocos nAChRs en ccb aisladas (según datos de nuestro propio laboratorio).

Como se observa en la **figura 14B**, con el protocolo #1, al empezar a perfundir Nic 3 μ M, se produjo una pequeña y lenta respuesta secretora, lo cual es de esperar teniendo en cuenta que 3 μ M de Nic es una concentración capaz de reclutar unos pocos nAChRs en ccb aislada; secreción que, por otra parte, fue disminuyendo progresivamente en el tiempo (véase cómo la señal amperométrica regresa hasta los niveles iniciales a los 20-25 min de empezar la perfusión de Nic), probablemente debido a la desensibilización de las respuestas nicotínicas. En presencia de Nic 3 μ M, la aplicación de pulsos de 100ACh produjo una marcada potenciación de la respuesta secretora con respecto a las respuestas control, aunque el fenómeno fue declinando en el tiempo. Cuando el protocolo #1 se repitió perfundiendo una concentración de Nic menor (1,5 μ M), con el fin de minimizar la respuesta secretora inicial provocada por la mera administración de Nic (**figura 14A**), se observó el mismo patrón de potenciación de la respuesta secretora, aunque la magnitud de la potenciación resultó menor.

En algunos subtipos de nAChRs -heteroméricos $\alpha 4\beta 4$ de rata expresados heterológamente en ovocitos de *Xenopus*- se ha descrito que las I_{ACh} en respuesta a bajas concentraciones de ACh se pueden ver potenciadas por la presencia de un rango amplio de concentraciones (10 μ M-10 mM) de colina (agonista parcial y de baja afinidad para este subtipo de receptor), debido a un **fenómeno de potenciación competitiva** (Zwart y Vijverberg, 2000) también descrito para otras moléculas como la atropina (considerada clásicamente como un antagonista muscarínico) o la fisostigmina (clásico inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa) (Zwart y Vijverberg, 1997; Zwart y col., 1999).

Aunque este fenómeno varía tanto en función del subtipo de nAChR estudiado como de la especie o del modelo de expresión empleados (Smulders y col., 2005), podría estar sucediendo bajo las condiciones experimentales del protocolo #1, en el que se estimula la respuesta secretora con 100 μM ACh en presencia de bajas concentraciones (1,5-3 μM) de Nic, y justificar de alguna manera el fenómeno de potenciación de la secreción observado.

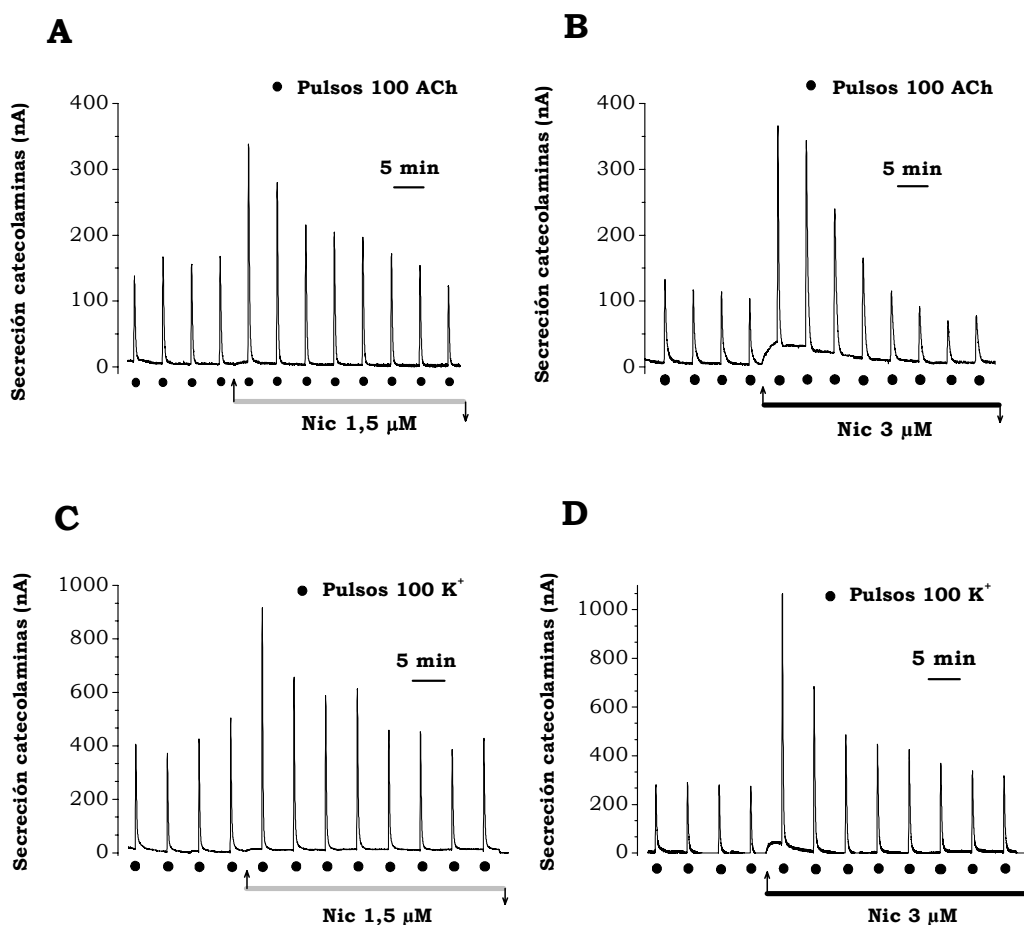


Figura 14. Potenciación de la secreción de catecolaminas en presencia continua de una concentración umbral de nicotina en poblaciones de células cromafines bovinas (Protocolo #1). **A y C)** Registros originales de las espigas de secreción obtenidas en una población de unas 5×10^6 células perfundidas con KH/2 mM CaCl_2 tras estimularlas con pulsos de 3 s de duración cada 5 min (\bullet), bien de ACh 100 μM (A) o bien de K^+ 100 mM (C); en la mitad entre el 4 $^\circ$ y el 5 $^\circ$ pulso control, una vez que la respuesta secretora al 4 $^\circ$ pulso había retornado a los niveles basales, se procedió a la perfusión continuada de las células con KH con Nic 1,5 μM (barra horizontal gris). **B y D)** Muestran los registros originales de los mismos protocolos que en A y C pero administrando una mayor concentración de Nic (3 μM) (barra horizontal negra).

Para confirmar o descartar tal fenómeno se repitió el protocolo #1 pero evocando la secreción con pulsos despolarizantes de K^+ 100 mM, que estimulan la secreción sin reclutar los nAChRs. Las **figuras 14C** y **14D** muestran registros originales de tales experimentos. Como se puede observar, el patrón de potenciación de la respuesta secretora frente a estímulos de K^+ fue muy parecido al observado frente a estímulos de ACh: fue significativo en los primeros pulsos que siguieron a la administración continuada de Nic, 1,5 ó 3 μ M, para luego ir declinando progresivamente en el tiempo hasta desaparecer.

En las **figuras 15A** y **B** se resume el análisis de los datos obtenidos con el protocolo #1. En cada experimento se midió el ABC (área bajo la curva) de cada espiga (en μ C). El promedio de las 4 primeras espigas (las previas a la administración de Nic) se tomó como la respuesta secretora control o inicial, con respecto a la cual se normalizaron las respuestas de todas las espigas subsiguientes del experimento. Así es como se obtuvieron los valores que muestran las figuras 15A y B y como se analizarán el resto de experimentos de este tipo en este trabajo (excepto que se especifique otra cosa).

Como ya se comentó en la figura 13, el patrón de la respuesta secretora en un experimento control (sin perfusión de Nic) no es del todo estable: al final de un experimento con pulsos de 100ACh se conserva aproximadamente un 75% de la respuesta secretora inicial; por otra parte, durante los primeros pulsos de 100 K^+ la respuesta secretora aumenta significativamente con respecto al primero. Ello implica que con el análisis que se acaba de describir la potenciación de la secreción en respuesta a pulsos de ACh estará algo subestimada y en respuesta a pulsos de K^+ algo sobreestimada. Sin embargo, un análisis cuantitativo exacto de la potenciación de la secreción se escapaba de los objetivos de este trabajo (debido a las propias limitaciones de la técnica de detección amperométrica en poblaciones de células), por lo que se asume este error o sesgo en el análisis de los datos.

Obsérvese cómo la potenciación de la secreción de catecolaminas tras la perfusión de Nic se fue perdiendo progresivamente en el tiempo, pulso tras pulso, tanto cuando éstos fueron de ACh como cuando fueron de K^+ . De hecho, la potenciación dejó de ser significativa a partir del 3^{er}-4^o pulso post-perfusión con Nic, e incluso decayó significativamente por debajo de las respuestas control cuando los pulsos fueron de ACh y la perfusión de Nic 3 μ M (ver significación estadística de cada pulso en figuras 15A y B).

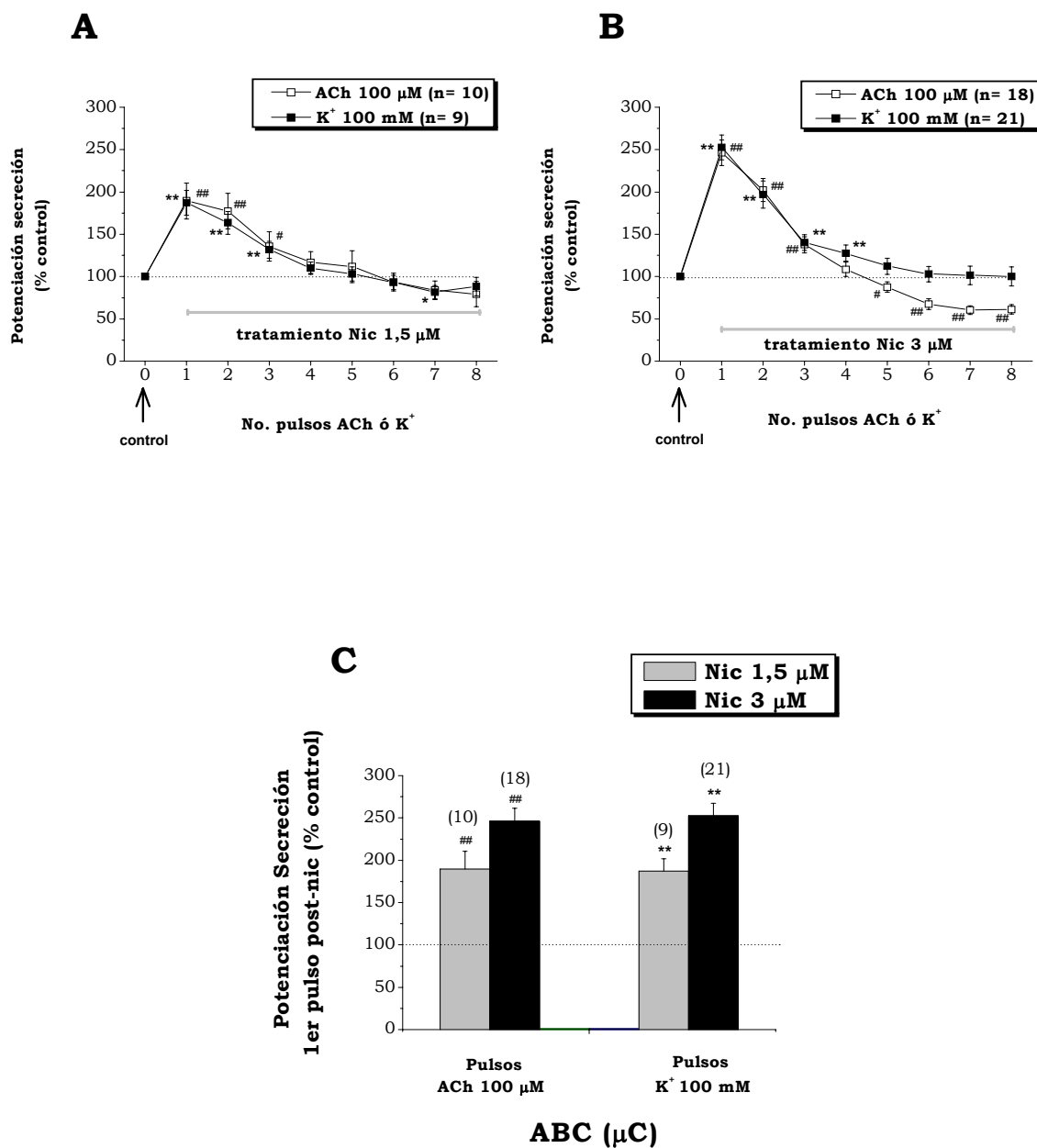


Figura 15. Cuantificación de la potenciación de la secreción de catecolaminas en presencia continua de una concentración umbral de nicotina en poblaciones de células cromafines bovinas (Protocolo #1). A y B) Curso temporal de la potenciación de la secreción de catecolaminas en cada una de las condiciones señaladas. El número de experimentos se indica entre paréntesis, obtenidos de al menos 7 cultivos diferentes. # ó *p<0,05; ## ó **p<0,01 con respecto a la respuesta control. C) Cuantificación de la máxima potenciación de la secreción (en el primer pulso tras la presencia de Nic 1,5 ó 3 μ M).

La **figura 15C** muestra el máximo grado de potenciación que experimentó la secreción de catecolaminas tras la aplicación de Nic (esto es, en el primer pulso post-perfusión de Nic). Tras la perfusión de Nic 1,5 μM fue de $189,5 \pm 21,2\%$ cuando los pulsos fueron de ACh ($n= 10$ experimentos) y de $187,2 \pm 14,8\%$ cuando los pulsos fueron de K^+ ($n= 9$ experimentos). Tras la perfusión de Nic 3 μM la potenciación fue aún mayor, de $246,3 \pm 15,2\%$ ó $252,6 \pm 14,8\%$ cuando los pulsos fueron de ACh ($n= 18$) ó K^+ ($n= 21$), respectivamente.

En conclusión: la perfusión continuada de Nic 1,5 ó 3 μM provocó una potenciación de la secreción en respuesta a pulsos de 100ACh ó 100 K^+ , cuya magnitud y pérdida progresiva en el tiempo fueron similares con uno y otro tipo de estímulo.

Como ya se ha comentado anteriormente, con el protocolo #1, al empezar a perfundir Nic 3 μM , se observaba una respuesta secretora *per se*; respuesta pequeña y lenta que se iba perdiendo en el tiempo y que se minimizó cuando se repitió el mismo protocolo con Nic 1,5 μM . La **figura 16** trata de detallar la magnitud de esta respuesta secretora a la mera perfusión continuada de bajas concentraciones de nicotina.

Así, para cada experimento con Nic 3 μM , independientemente de que los pulsos fueran de 100ACh ó 100 K^+ , se analizó el pico de secreción por Nic (en nA) en los puntos 1, 2 y 3 señalados en la **figura 16B** (esto es, en el momento previo a los pulsos 1, 3 y 5 post-perfusión con Nic 3 μM), y en el punto 1 también el ABC (en μC). Se tomaron estos puntos como representativos del momento en que la secreción por Nic fue máxima (punto 1), intermedia (punto 2) o casi despreciable (punto 3).

Cuando la perfusión se hizo con Nic 1,5 μM , únicamente se analizaron el pico y el ABC de secreción en el punto 1 (**figura 16A**), es decir, en el momento previo al pulso 1 post-perfusión con Nic 1, 5 μM , representativo del momento en que la secreción por Nic fue máxima (y puesto que posteriormente ésta fue despreciable).

El resumen de estos datos es el que muestran las **figuras 16C y D**. La perfusión de Nic 3 μM produjo picos de secreción *per se* (en nA) de $26,3 \pm 2,8$ ($n= 38$), $1,5 \pm 0,7$ ($n= 38$) y $0 \pm 0,5$ ($n= 33$) en los puntos 1, 2 y 3 respectivamente. En el punto 1, el ABC debida a la secreción por Nic 3 μM *per se* fue de $2878,9 \pm 300,1$ μC ($n= 35$). Cuando se perfundió Nic 1,5 μM , la respuesta secretora sólo fue apreciable en el punto 1: el pico de secreción fue de $6,9 \pm 2,2$ nA y el ABC de $537,9 \pm 266,0$ μC ($n= 17$).

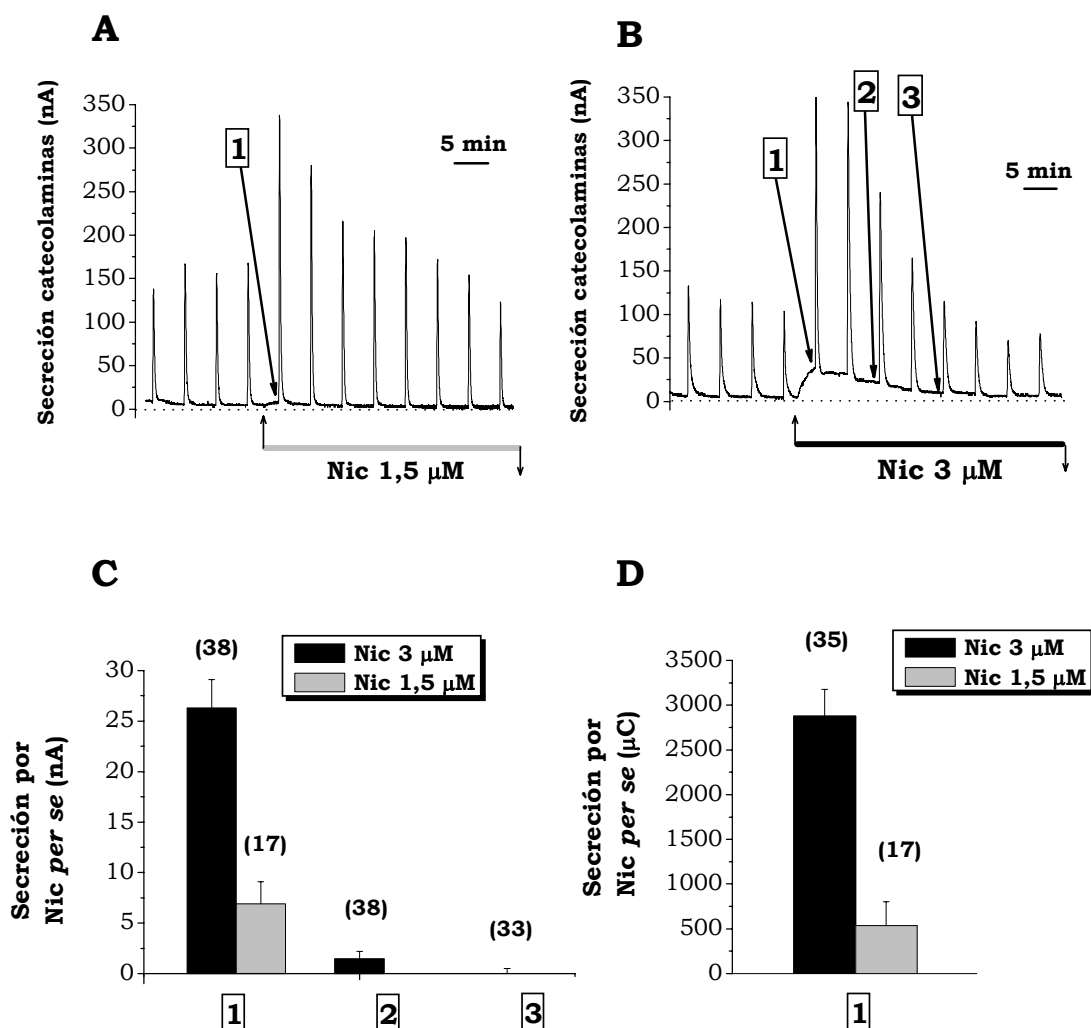


Figura 16. Cuantificación de la respuesta secretora a Nic per se con el Protocolo #1 en poblaciones de células cromafines bovinas. A y B) Muestran los puntos 1, 2 y 3 en los que se midió la respuesta secretora (en pico para todos los puntos y en ABC también para el punto 1) a la mera perfusión de Nic, 1,5 ó 3 μ M. **C)** Cuantificación de la magnitud de la respuesta secretora en nA a la mera perfusión de Nic 1,5 μ M (en el punto 1) ó Nic 3 μ M (en los puntos 1, 2 y 3) del protocolo #1. **D)** Cuantificación de la magnitud de la respuesta secretora en μ C a la mera perfusión de Nic 1,5 μ M ó Nic 3 μ M en el punto 1 del protocolo #1. El número de experimentos de cada tipo se muestra entre paréntesis. Se tomaron datos de todos los experimentos posibles, independientemente de que los pulsos aplicados hubiesen sido de 100ACh ó de 100K⁺.

2. CARACTERÍSTICAS DE LA POTENCIACIÓN DE LA RESPUESTA SECRETORA DE CATECOLAMINAS EN POBLACIONES DE CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS EN PRESENCIA DE BAJAS CONCENTRACIONES DE NICOTINA

2.1.- La potenciación de la respuesta secretora de catecolaminas por nicotina es dosis-dependiente

Para caracterizar la potenciación de la secreción de catecolaminas en poblaciones de ccb tras la perfusión continua con Nic, se decidió estudiar en primer lugar si el fenómeno era dependiente de la dosis de Nic aplicada. Para ello se repitió el protocolo #1 perfundiendo las concentraciones de Nic 0,3 μM y 10 μM , evocando la secreción tanto con pulsos de 100K⁺ (**figura 17**) como con pulsos de 100ACh (**figura 18**).

Las **figuras 17 y 18** muestran registros originales de los experimentos de dosis-dependencia. La **figura 19** muestra los datos cuantitativos de este tipo de experimentos para todas las concentraciones de Nic empleadas (0,3, 1,5, 3 y 10 μM), concretamente el curso temporal de la secreción medida en ABC y normalizada con respecto a la secreción inicial/control (excepto en la figura 19D, en la que se normalizaron los picos y no el ABC de secreción, por motivos que se comentan más adelante en este mismo apartado).

La perfusión de Nic 0,3 μM no produjo secreción *per se* detectable ni potenciación de la secreción estadísticamente significativa, ni cuando los pulsos fueron de K⁺ (n= 12 experimentos) ni cuando fueron de ACh (n= 8 experimentos). Es más, cuando los pulsos fueron de K⁺ incluso provocó una pérdida significativa de la respuesta secretora en los últimos pulsos del experimento con respecto al control (ver significación estadística de cada pulso en la figura 19A).

Los datos tras la perfusión de Nic 1,5 μM y 3 μM ya se han comentado anteriormente (figuras 14-16). Resumiéndolos, la perfusión de Nic 1,5 y 3 μM produjo una secreción *per se* y una potenciación de la secreción estadísticamente significativa entre el 1^{er} y el 3^{er}-4^o pulso post-perfusión, que fueron dependientes de la concentración de Nic (esto es, mayores tras la perfusión de Nic 3 μM que tras la perfusión de Nic 1,5 μM).

En cuanto a la perfusión continuada con Nic 10 μM (**figuras 17-19, paneles D**), se pueden destacar varias cosas: 1) La secreción debida a Nic 10 μM *per se* fue enorme, hasta el punto de alcanzarse un pico de secreción igual o incluso superior al de los pulsos de 100K⁺ ó 100ACh; 2) Cuando los pulsos fueron de K⁺ (n= 10 experimentos), la potenciación de la secreción por Nic 10 μM , frente a la que se había obtenido tras la

perfusión con Nic 3 μM , fue inferior y se mantuvo por menos tiempo (sólo en los 2 primeros pulsos post-perfusión); 3) Cuando los pulsos fueron de ACh (n= 4 experimentos), la perfusión de Nic 10 μM abolió casi por completo toda respuesta a los pulsos subsiguientes de ACh (solamente en el primer pulso post-perfusión de Nic se observó, en algunos casos, una pequeña respuesta secretora a ACh 100 μM , como la que muestra la figura 18D).

Estas particularidades tras la perfusión de Nic 10 μM impidieron cuantificar los datos para los pulsos de 100ACh, y en el caso de los pulsos de 100K⁺ obligaron a medir y normalizar los picos y no el ABC de secreción (**figura 19D**), ya que no se podía discernir, tras la perfusión de Nic 10 μM , entre ABC debida a la Nic 10 μM *per se* y ABC debida al pulso de 100K⁺. El 1^{er}, 2^o y 3^{er} pico de K⁺ post-perfusión de Nic 10 μM representaron un 224,4 \pm 23,4% (**p<0,01), 128,4 \pm 11,4% (*p<0,05) y 95,5 \pm 11,5% de las respuestas control, respectivamente (n= 10 experimentos).

La **figura 19E** resume el máximo grado de potenciación (esto es, en el primer pulso post-perfusión) que se alcanzó tras la perfusión de las diferentes concentraciones de Nic. Para los pulsos de K⁺ fue de 96,8 \pm 7,1% (n= 12), 187,2 \pm 14,8% (n= 9), 252,6 \pm 14,8% (n= 21) y 224,4 \pm 23,4% (n= 10) cuando se perfundió Nic 0,3 μM , 1,5 μM , 3 μM y 10 μM , respectivamente. Para los pulsos de ACh, la máxima potenciación fue de 113,4 \pm 15,6% (n= 8), 189,5 \pm 21,2% (n=10) y 246,3 \pm 15,2% (n= 18) cuando se perfundió Nic 0,3 μM , 1,5 μM y 3 μM , respectivamente.

En todos los experimentos posteriores de este trabajo, cuando se hable de una concentración “umbral” de Nic, se estará empleando Nic 3 μM ; se eligió esta concentración porque de entre todas las concentraciones estudiadas es la que potenció la secreción de la forma más reproducible

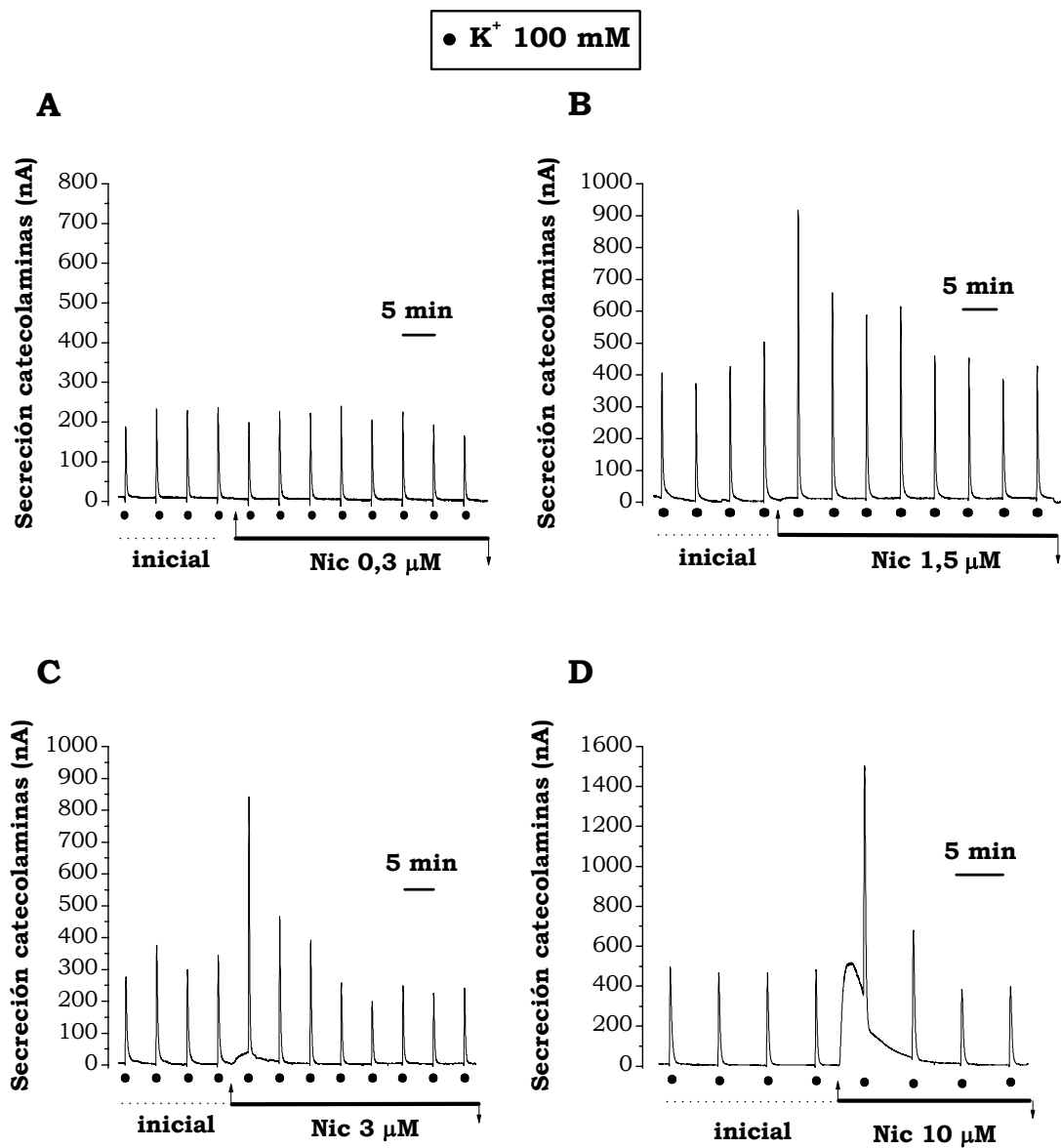


Figura 17. Respuesta de poblaciones de ccb al protocolo #1 cuando la perfusión se realizó con diferentes concentraciones de Nic. A-D) Registros originales de las espigas de secreción obtenidas en poblaciones de unas 5×10^6 células sometidas al protocolo #1 con pulsos de K⁺ 100 mM y perfusión (barra horizontal negra) de Nic 0,3 μM (A), Nic 1,5 μM(B), Nic 3 μM (C) ó Nic 10 μM (D).

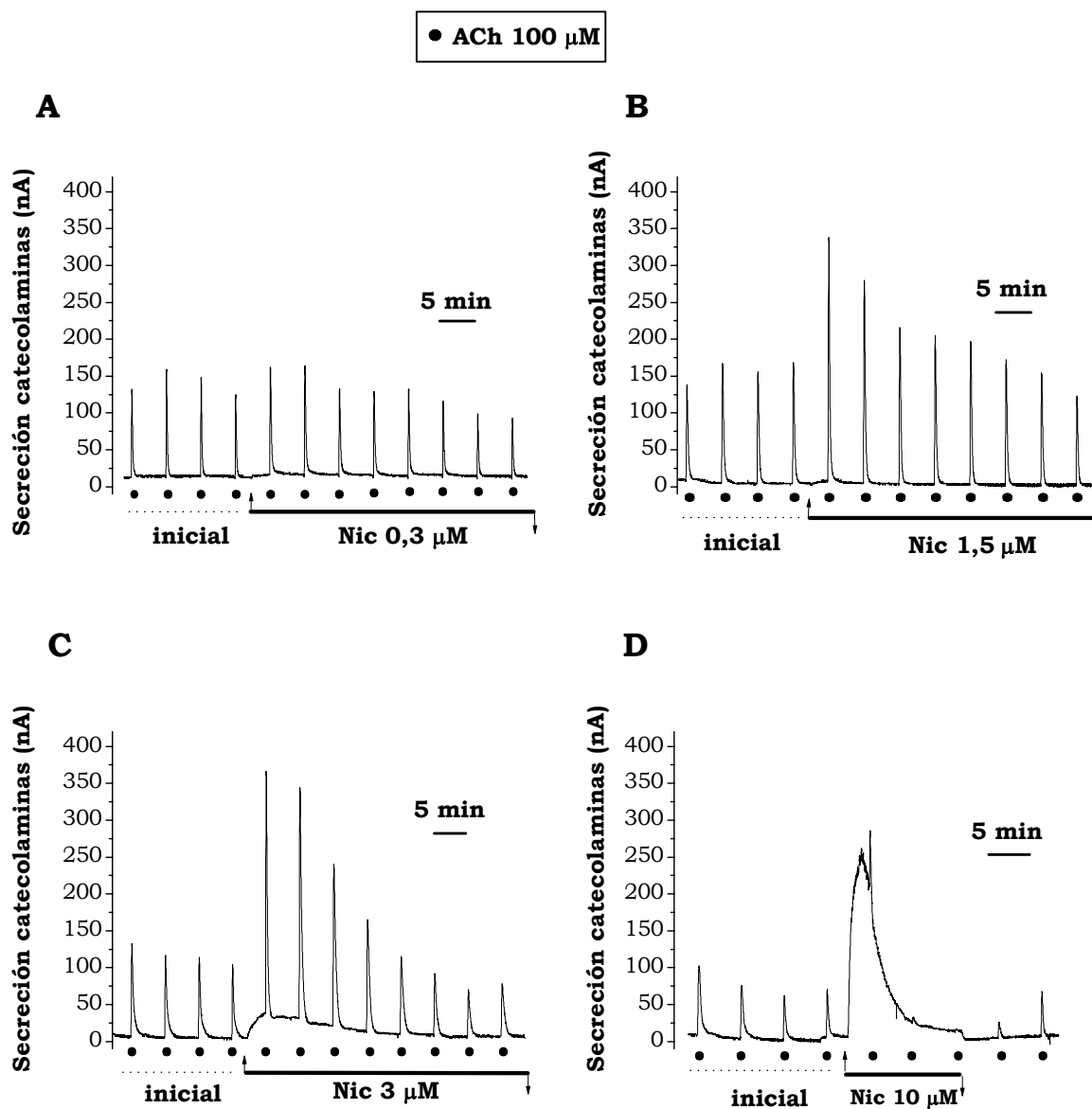


Figura 18. Respuesta de poblaciones de ccb al protocolo #1 cuando la perfusión se realizó con diferentes concentraciones de Nic. A-D) Registros originales de las espigas de secreción obtenidas en poblaciones de unas 5×10^6 células sometidas al protocolo #1 con pulsos de ACh 100 μ M y perfusión (barra horizontal negra) de Nic 0,3 μ M (A), Nic 1,5 μ M (B), Nic 3 μ M (C) ó Nic 10 μ M (D).

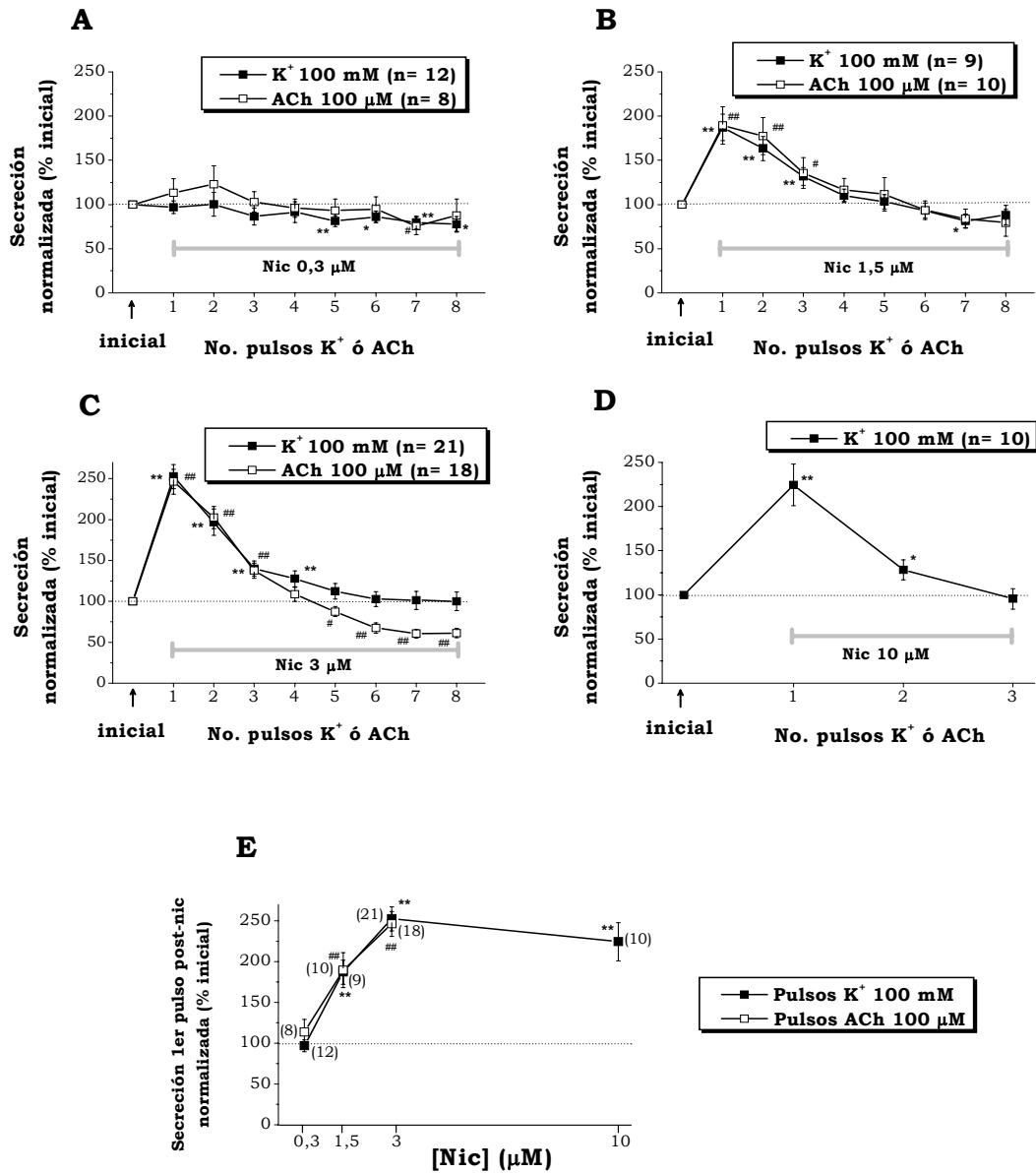


Figura 19. Respuesta de poblaciones de ccb al protocolo #1 cuando la perfusión se realizó con diferentes concentraciones de Nic. A-D) Resumen del curso temporal de la secreción medida en ABC (A-C) o en pico (D) y normalizada con respecto a la respuesta inicial/control, cuando se aplicaron en perfusión diferentes concentraciones de Nic (barras horizontales grises), con pulsos de 100 mM K⁺ ó de 100 μM ACh. Entre paréntesis se indica el número de experimentos de cada tipo, procedentes de células de al menos 6 lotes diferentes. **E)** Dosis-dependencia de la máxima potenciación de la secreción (esto es, en el primer pulso post-perfusión de Nic). # ó *p<0,05; ## ó **p<0,01 con respecto a las respuestas control.

2.2.- La potenciación de la respuesta secretora de catecolaminas por nicotina es tiempo-dependiente

En la caracterización de la potenciación de la secreción de catecolaminas en poblaciones de ccb tras la perfusión continuada de concentraciones umbral de Nic se estudió asimismo si el fenómeno era tiempo-dependiente (**figuras 20-22**). Así, en experimentos con pulsos de ACh 100 μM (se asume que los experimentos con pulsos de 100K^+ hubiesen arrojado resultados parecidos), se dejó que la perfusión de Nic 3 μM actuase durante períodos crecientes de tiempo, desde sólo durante 3 s (en coaplicación con los pulsos de 100ACh, **figura 20**), hasta durante 300 s, pasando por los tiempos intermedios de 5, 10, 30, 60 y 90 s (**figura 21**).

La **figura 20** compara los resultados de coaplicación de ACh 100 μM + Nic 3 μM con respecto a los de aplicación de pulsos de ACh 100 μM sola. En primer lugar se comprobó que las 2 vías por las que se iban a perfundir alternativamente las soluciones de ACh 100 μM +Nic 3 μM ó de ACh 100 μM sola no diferían significativamente (esto es, que el flujo por ambas vías era similar, de modo que las células “veían” cantidades equivalentes de pulso secretor por una y otra vía). La **figura 20A** es un experimento representativo de aquellos en los que se comprobó la no diferencia entre las 2 vías: perfundiendo por ambas la misma solución de ACh 100 μM las respuestas secretoras fueron similares. La **figura 20B** es un ejemplo de los experimentos en que se comparó la respuesta secretora a ACh 100 μM +Nic 3 μM con respecto a la respuesta secretora a pulsos de sólo ACh 100 μM . La **figura 20C** resume el curso temporal de ambos tipos de experimentos. La secreción de cada espiga, medida en ABC, se normalizó con respecto a la de la espiga control, que en los experimentos “tipo figura 20A” se tomó como la 2^a espiga y en los experimentos “tipo figura 20B” se tomó como la 3^a espiga. La razón de elegir éstas y no otras como las espigas “control” fue la de descartar como espiga control a la 1^a de cada experimento, puesto que nuestra experiencia indica que esta 1^a espiga suele ser algo diferente (menor) que las subsiguientes, más parecidas entre sí.

El análisis estadístico de estos resultados no arrojó diferencias significativas entre las respuestas a ACh 100 μM sola y las respuestas a ACh 100 μM en coaplicación con Nic 3 μM . Por tanto, la aplicación de Nic 3 μM durante 3 s fue insuficiente para provocar una potenciación de la respuesta secretora de catecolaminas.

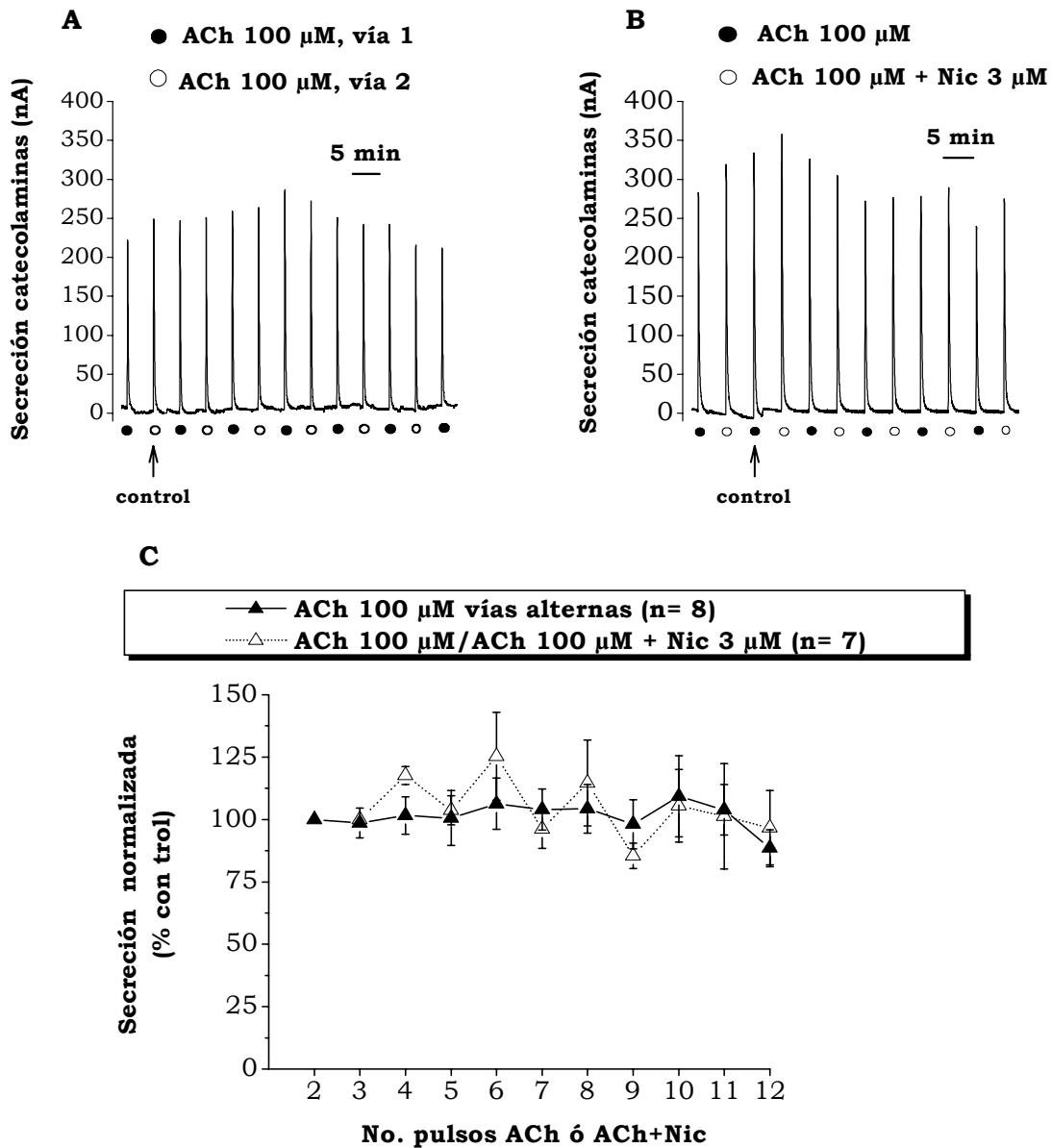


Figura 20. Respuesta de poblaciones de ccb a la aplicación de Nic 3 μM únicamente durante 3 s (en coaplicación con los pulsos de ACh 100 μM). **A)** Registro representativo de experimentos en los que se comprobó la no-diferencia entre perfundir el mismo pulso secretor de 3 s de ACh 100 μM (cada 5 min) por una vía (●) o por otra (○) del equipo experimental. **B)** Ejemplo de experimento en el que se comparó la respuesta secretora a ACh 100 μM (●) y la respuesta secretora a ACh 100 μM +Nic 3 μM (○). **C)** Resumen del curso temporal de la secreción medida en ABC y normalizada respecto a la respuesta control (en A y B se indica qué se tomó como respuesta secretora control) para ambos tipos de experimentos. Entre paréntesis se indica el número de experimentos de cada tipo, realizados con células de por los menos 3 lotes diferentes.

La **figura 21** muestra ejemplos de los experimentos en los que la perfusión de Nic $3 \mu\text{M}$ se aplicó durante 5, 10, 30, 60, 90 y 300 s antes del primer pulso de ACh $100 \mu\text{M}$ post-perfusión (**paneles A, B, C, D, E y F**, respectivamente).

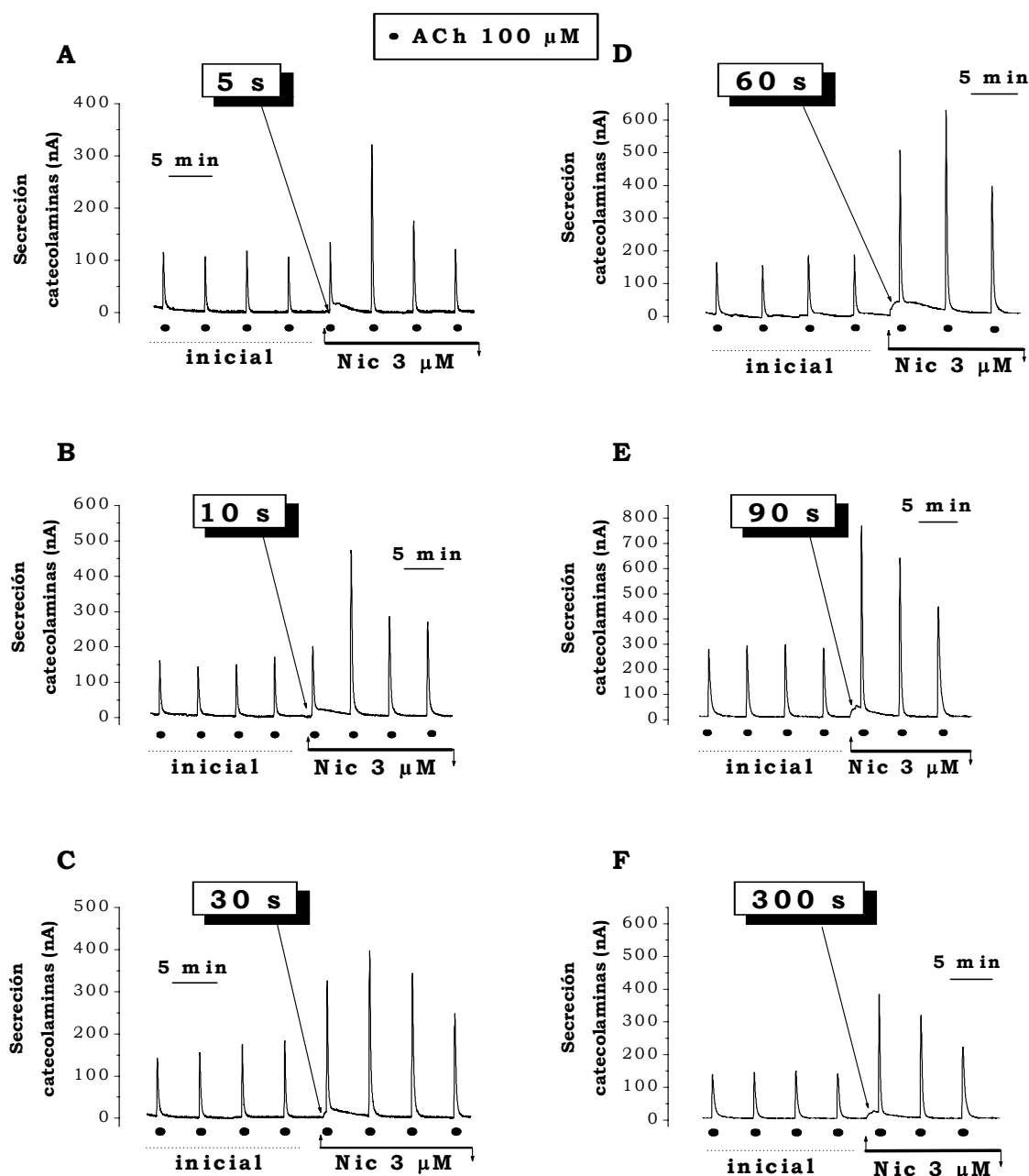


Figura 21. Respuesta de poblaciones de ccb a una modificación del protocolo #1 acortado, en la que la perfusión de Nic $3 \mu\text{M}$ se aplicó durante tiempos crecientes. **A-F**) Registros representativos de experimentos en los que la perfusión de Nic $3 \mu\text{M}$ (barra horizontal negra) se inició 5, 10, 30, 60, 90 y 300 s antes del primer pulso de $100 \mu\text{M}$ ACh (•) post-perfusión. NOTA: en el protocolo #1 "prototipo" esta perfusión se iniciaba 150 s antes del primer pulso post-perfusión.

Obsérvese cómo la potenciación de la secreción fue aumentando conforme aumentaba el tiempo del que disponía la Nic para actuar. Hasta el punto de que cuando se la dejó actuar durante sólo 5, 10 ó 30 s (figuras 21A, B y C), la potenciación en el segundo pulso post-perfusión (lo que correspondería a una perfusión de Nic 3 μ M durante 305, 310 ó 330 s, respectivamente) siempre fue mayor que en el primero (en el que ya era, sin embargo, estadísticamente significativa). Estos resultados sugieren que la Nic umbral requiere de un tiempo de actuación para que sus efectos potenciadores de la secreción puedan desarrollarse al máximo.

La **figura 22** resume el grado de potenciación que experimentó la secreción de catecolaminas en función del tiempo durante el cual había podido actuar la Nic 3 μ M. La secreción de la 1ª espiga post-perfusión de Nic, medida en ABC, se normalizó con respecto a la respuesta secretora inicial. Los valores de potenciación tras la perfusión de Nic 3 μ M durante 5, 10, 30, 60, 90, 150 y 300 s fueron, respectivamente: 123,7 \pm 6,9% (n= 12), 125,2 \pm 7,5% (n= 8), 165,0 \pm 8,5% (n= 8), 218,5 \pm 18,8% (n= 8), 274,1 \pm 18,1% (n= 7), 246,3 \pm 15,2% (n= 18) y 309,0 \pm 24,7% (n= 8) (todos ellos significativos, ^{###}p<0,01).

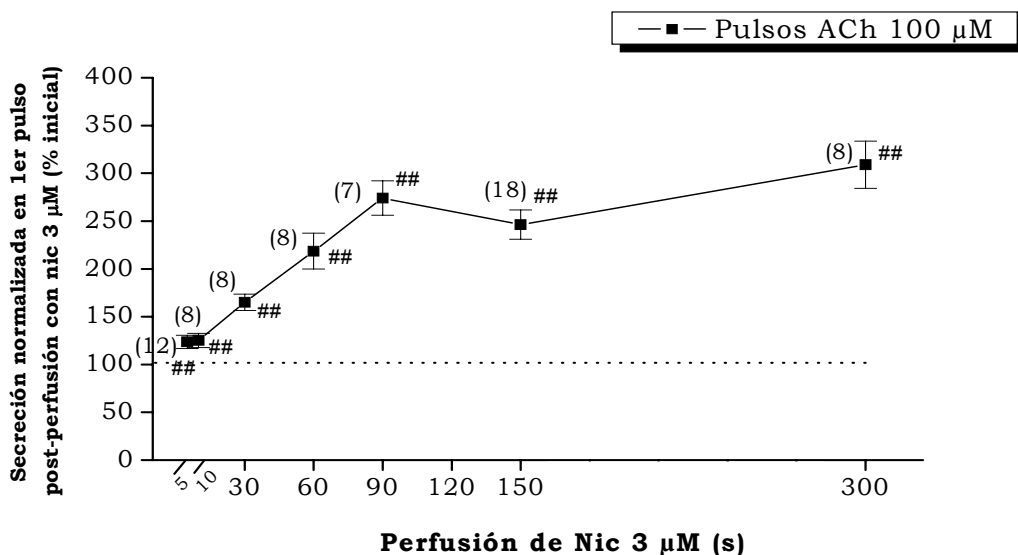


Figura 22. Potenciación de la secreción de catecolaminas en poblaciones de ccb en el primer pulso tras la perfusión de Nic 3 μ M durante tiempos crecientes. La secreción de catecolaminas en el primer pulso de ACh 100 μ M tras la perfusión de Nic 3 μ M durante 5, 10, 30, 60, 90, 150 y 300 s se muestra normalizada con respecto a la respuesta secretora inicial/control, para el número de experimentos mostrados entre paréntesis, procedentes de al menos 4 lotes de células diferentes. ^{###}p<0,01 con respecto a las respuestas control.

2.3.- La potenciación de la respuesta secretora de catecolaminas por nicotina es reversible

La **figura 23** muestra los protocolos que se emplearon para explorar si los efectos potenciadores de la secreción por nicotina umbral se mantienen tras la retirada de ésta (se muestran experimentos realizados con pulsos de 100ACh, pero también se realizaron con pulsos de 100K⁺). Tras 4 pulsos control, la Nic 3 μ M se perfundi3 durante 150 s (como en el protocolo #1 est3andar), tiempo suficiente para provocar la potenciación de la respuesta secretora; a continuaci3n se lav3 la Nic, perfundiendo de nuevo KH/2 mM CaCl₂ durante 1, 5 3 10 min (**paneles A, B y C** respectivamente).

La **figura 23D** resume el an3lisis de los datos obtenidos en este tipo de experimentos, con pulsos de 100ACh y pulsos de 100K⁺. La secreci3n de la 1^a espiga post-lavado de Nic se midi3 en ABC y se normaliz3 con respecto a la respuesta secretora inicial. Cuando los pulsos fueron de ACh, la potenciaci3n en el primer pulso post-lavado de Nic fue de 2,46 \pm 0,15 (n= 18), 1,83 \pm 0,11 (n= 7), 1,12 \pm 0,11 (n= 6) y 0,97 \pm 0,07 (n= 7) para un lavado de 0, 1, 5 y 10 min respectivamente. Para los pulsos de K⁺ dicha potenciaci3n fue de 2,53 \pm 0,15 (n= 21), 2,10 \pm 0,18 (n= 7), 1,22 \pm 0,12 (n= 5) y 0,96 \pm 0,07 (n= 5) cuando se lav3 la Nic durante 0, 1, 5 y 10 min respectivamente. Como puede observarse, la potenciaci3n de la secreci3n por Nic revirti3 de forma tiempo-dependiente, hasta el punto de que 3sta no fue estadisticamente significativa a partir de los 5 min de “lavado” de la Nic. N3tese c3mo este “lavado” del efecto potenciador fue muy similar para los pulsos de ACh y para los pulsos de K⁺.

Estos datos sugieren que la presencia de Nic es necesaria para poder observar sus efectos potenciadores de la secreci3n, esto es, que el mecanismo por el cual Nic potencia la secreci3n no se conserva en la “memoria de las c3lulas”, de manera que deja de observarse cuando se lava la Nic. Se trata, por tanto, de un **mecanismo reversible**.

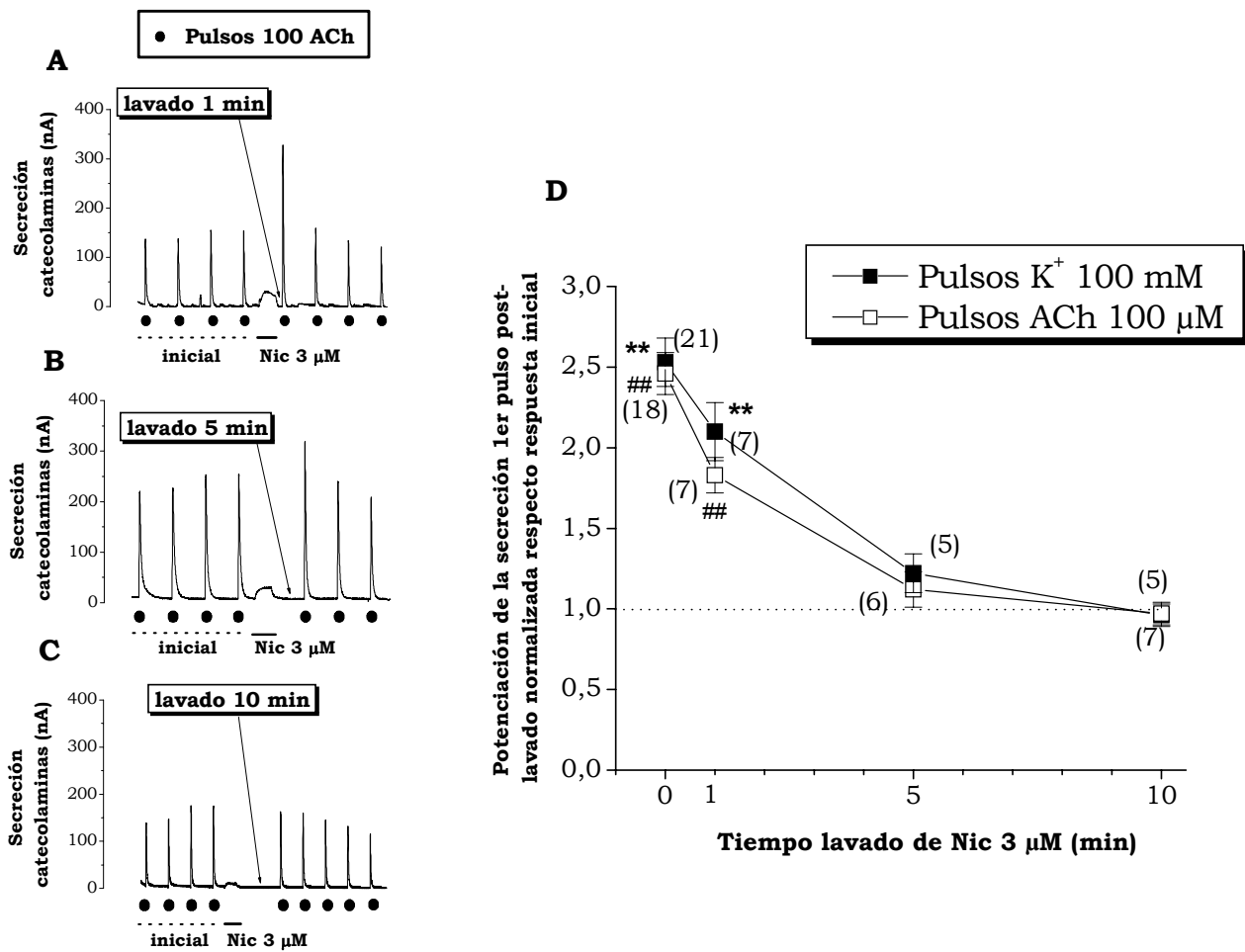


Figura 23. Potenciación de la secreción de catecolaminas en poblaciones de ccb en el primer pulso post-lavado de Nic 3 μM durante tiempos crecientes. A-C) Registros representativos de los experimentos en los que, tras la perfusión de Nic 3 μM durante 150 s (como en el protocolo #1 estándar), se procedió al lavado de la misma durante 1, 5 ó 10 min (A, B y C respectivamente). En los tres ejemplos mostrados los pulsos secretores fueron de ACh 100 μM, pero se repitieron estos mismos protocolos con pulsos de K⁺ 100 mM. **D)** La secreción de catecolaminas en el primer pulso de K⁺ 100 mM (■) ó de ACh 100 μM (□) tras el lavado de Nic 3 μM durante 0, 1, 5 ó 10 min se muestra normalizada con respecto a la secreción inicial, para el número de experimentos mostrados entre paréntesis, procedentes de al menos 5 lotes de células diferentes. Los experimentos donde el lavado fue de 0 min son los de la figura 15 (protocolo #1 estándar). ## ó **p<0,01 con respecto a las respuestas control.

2.4.- La potenciación de la respuesta secretora de catecolaminas por nicotina es un fenómeno reproducible tras un período de reposo adecuado

Como ya se ha comentado en la figura 15, las respuestas secretoras a 100ACh ó 100K⁺ durante el protocolo #1 decayeron a lo largo de los 8 pulsos durante los cuales estuvo presente la Nic umbral, incluso hasta niveles por debajo de los iniciales.

Por ello se quiso explorar la posibilidad de que las células estuviesen experimentando un progresivo deterioro durante el transcurso de este tipo de experimentos. La **figura 24A** muestra el protocolo experimental empleado con tal fin. Tras aplicar 3 pulsos control de K⁺ 100 mM (se eligió K⁺ como secretagogo por la mayor estabilidad de las respuestas secretoras a éste en comparación con ACh) se perfundi6 Nic 3 μ M en los dos pulsos subsiguientes (observándose la potenciación de la secreción esperable); a continuación se lavó la Nic durante 10 min (perfundiendo únicamente KH/2 mM CaCl₂), y posteriormente se repitió el mismo patrón de estimulación. Se puede apreciar cómo las mismas células se comportaron de manera muy similar las 2 veces; no se observaron diferencias significativas ni en el tamaño de los pulsos control de K⁺, ni en el tamaño de la respuesta secretora a la Nic *per se*, ni en el grado de potenciación de la respuesta secretora tras la perfusión de Nic 3 μ M entre la primera y la segunda aplicación (las similitudes se mantuvieron en los 6 experimentos de este tipo llevados a cabo).

La **figura 24B** cuantifica dichos experimentos. La secreción de la 1^a espiga post-perfusión de Nic se midió en ABC y en Pico y se normalizó con respecto a la secreción inicial (media del ABC o del Pico de las 3 espigas control), para el 1^{er} y el 2^o tratamiento (tto) con Nic 3 μ M. Cuando se midió el ABC, la potenciación de la secreción en la 1^a espiga post-perfusión de Nic fue de 243,0 \pm 20,2% en el 1er tto y de 224,6 \pm 24,8% en el 2^o tto. Cuando se midió el Pico, estos valores fueron de 286,9 \pm 18,7% y 248,9 \pm 23,1% respectivamente, sin que se observasen por tanto diferencias significativas entre los dos ciclos de tratamiento.

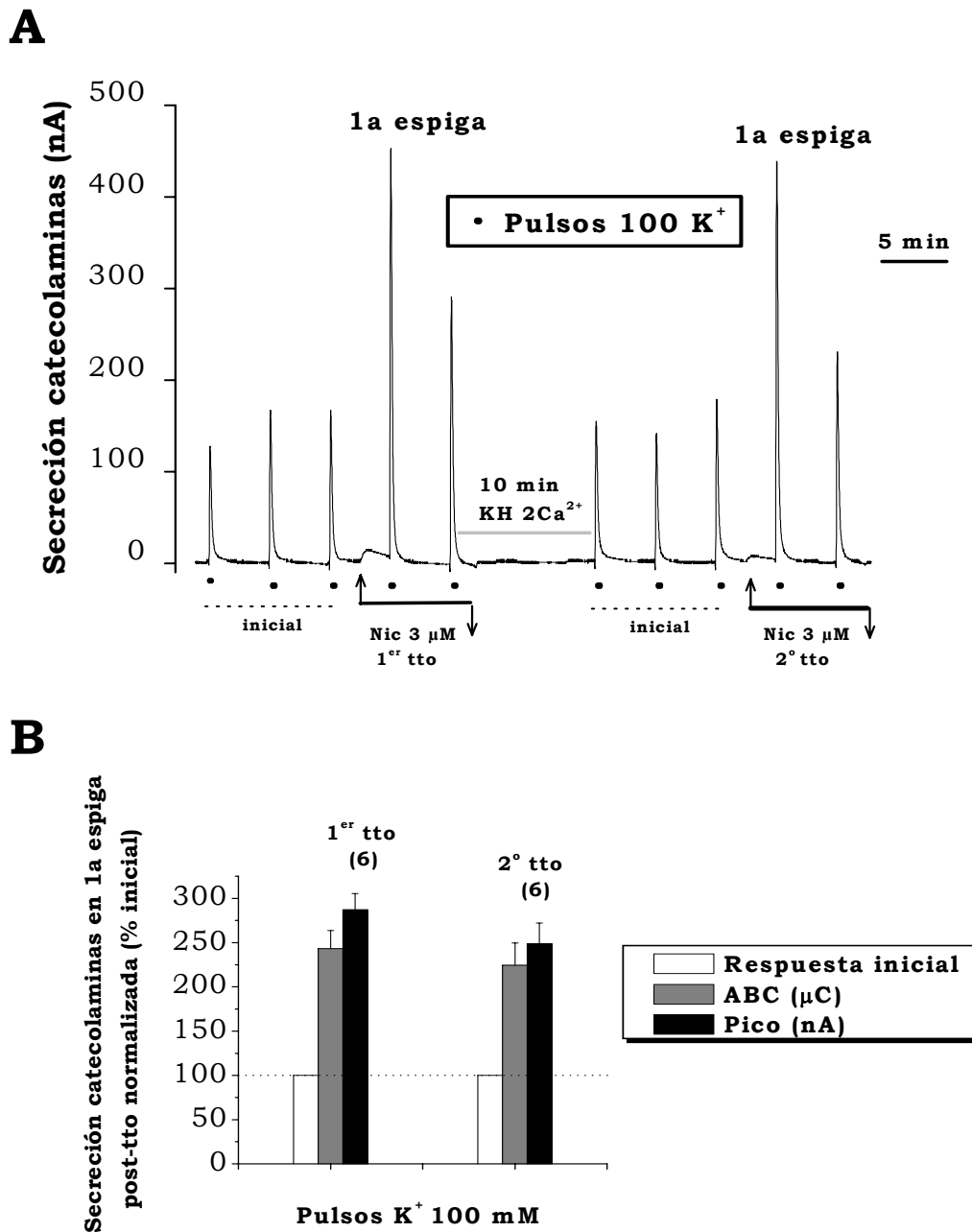


Figura 24. La potenciación de la secreción de catecolaminas en poblaciones de ccb por perfusión continuada de Nic 3 μM es un fenómeno reproducible. A) Registro representativo del protocolo experimental con el que se estudió el fenómeno. Después de aplicar 3 pulsos control de K⁺ 100 mM (●), de 3 s/5 min, se perfundió Nic 3 μM (barra horizontal negra) desde los 150 s previos a los 2 pulsos subsiguientes de K⁺, lo que permitió observar la consiguiente potenciación de la secreción. A continuación se realizó un lavado de 10 min de la Nic, durante el cual se aplicó KH/2 mM CaCl₂ (barra horizontal gris), y se repitió el mismo protocolo. **B)** La secreción de catecolaminas en el primer pulso de K⁺ 100 mM post-perfusión de Nic 3 μM (medida en ABC y en Pico) se normalizó con respecto a la secreción inicial, para el 1^{er} y el 2^o tto con Nic 3 μM. Los datos proceden de 6 experimentos con células de 2 lotes diferentes.

3. IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS EN LA POTENCIACIÓN DE LA SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS EN POBLACIONES DE CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS POR CONCENTRACIONES UMBRAL DE NICOTINA

Para intentar esclarecer la participación de los receptores nicotínicos en la potenciación de la respuesta secretora se diseñaron varios experimentos, que se irán comentando en los apartados que vienen a continuación.

3.1.- Efectos de mecamilamina, un antagonista nicotínico

Como ya se comentó en la *Introducción* (sección 3.1), los receptores para la acetilcolina presentes en la célula cromafín pueden ser tanto de tipo nicotínico como de tipo muscarínico. La nicotina es un agonista selectivo de los receptores nicotínicos; por tanto, es de esperar que el fenómeno de potenciación que acaba de ser descrito esté ligado a la activación/desensibilización de nAChRs, sin implicación de los receptores muscarínicos.

Aun así, se quiso descartar cualquier otro efecto inespecífico que pudiera estar teniendo la Nic en estos experimentos, por lo que se repitió el protocolo #1 acortado (se aplicaron únicamente 3 pulsos de ACh/K⁺ tras la perfusión con Nic) perfundiendo Nic 3 μ M en presencia de un antagonista nicotínico: mecamilamina (Mec). Se eligió Mec por ser un antagonista inespecífico y no competitivo de los nAChRs (Martin y col., 1989), y a una concentración de 10 μ M por ser capaz de bloquear completamente tanto los nAChRs de tipo heteromérico (que se bloquearían con concentraciones inferiores) como los de tipo α 7 (algo menos sensibles al bloqueo por mecamilamina que los de tipo heteromérico) (Sharples y Wonnacott, 2001).

La **figura 25** resume los resultados obtenidos con este protocolo experimental. Se muestran sólo los resultados obtenidos con pulsos de 100K⁺, ya que Mec abolió las respuestas a los pulsos de 100ACh (datos no mostrados), confirmando su efecto antagonista sobre los nAChRs. Los paneles A, B y C muestran registros originales de experimentos realizados en el mismo día, con células procedentes del mismo cultivo. Tras comprobar la potenciación de la secreción por Nic 3 μ M (**figura 25A**) en un experimento, en el siguiente se procedió a perfundir únicamente Mec 10 μ M (**figura 25B**), con lo que se pudo comprobar que ésta no afecta a las espigas secretoras en respuesta a pulsos de 100K⁺. Finalmente, en el siguiente experimento se perfundieron simultáneamente Nic 3 μ M+Mec 10 μ M (**figura 25C**); como puede apreciarse, el efecto

potenciador de la secreción de Nic fue abolido completamente en presencia de mecamilamina. En la **figura 25D** se resumen los datos de 6 experimentos perfundiendo únicamente Mec y 6 experimentos perfundiendo Nic+Mec, junto con todos los datos disponibles tras perfundir Nic 3 μM (los de la figura 15). Se muestra el curso temporal de la secreción de catecolaminas (medida en ABC y normalizada con respecto a la respuesta secretora control/inicial) durante el transcurso del protocolo #1 acordado.

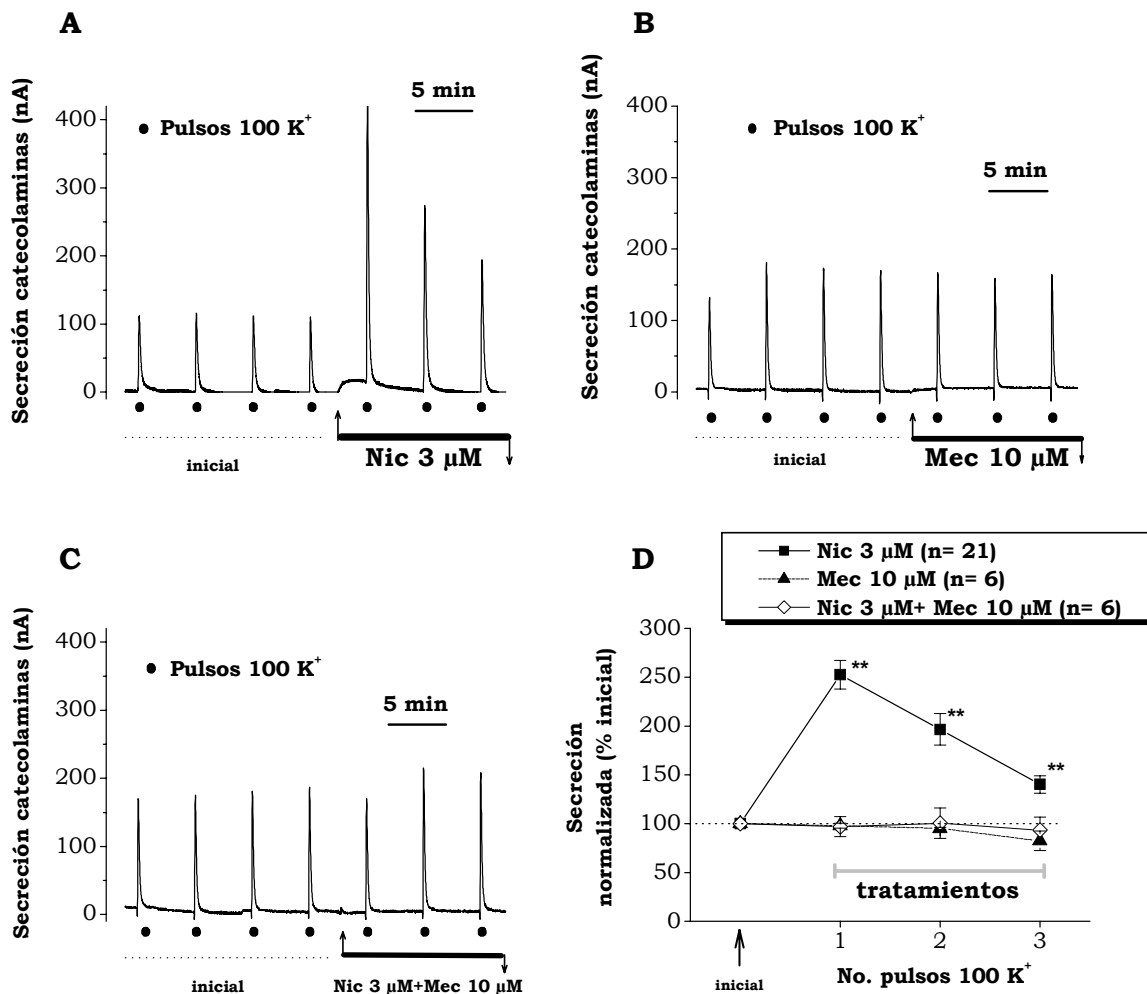


Figura 25. Respuesta de poblaciones de ccb al protocolo #1 acordado y con perfusión de Nic 3 μM + Mec 10 μM . A, B y C) Registros originales de las espigas de secreción obtenidas en una población de unas 5×10^6 células perfundidas con KH/2 mM CaCl₂ tras estimularlas con pulsos de 3 s/5 min (●) de K⁺ 100 mM y sometidas al protocolo #1 acordado. La potenciación de la secreción por Nic 3 μM (A) fue totalmente abolida en presencia de Mec 10 μM (C), que *per se* no produjo ninguna alteración en las respuestas secretoras a K⁺ 100 mM (B). D) Curso temporal de la secreción, medida en ABC y normalizada respecto a la respuesta inicial, cuando se aplicaron en perfusión Nic 3 μM , Mec 10 μM ó Nic 3 μM + Mec 10 μM . Entre paréntesis se indica el número de experimentos de cada tipo. Las células para los experimentos con perfusión de Mec ó Nic+Mec procedieron de al menos 4 cultivos diferentes. **p<0,01 con respecto a la respuesta control/inicial.

3.2.- Efecto de otros agonistas nicotínicos

Una vez caracterizado el efecto potenciador de Nic umbral sobre la secreción de catecolaminas, se consideró de interés estudiar si la estimulación umbral de los nAChRs por otros agonistas de receptores nicotínicos diferentes a la Nic tendría consecuencias similares sobre la secreción.

Para ello se eligieron concentraciones “umbral” de otras dos moléculas agonistas de los nAChRs: 10 μM de ACh y 1 mM de Cho. Se escogieron estas moléculas por el interés que podían revestir desde un punto de vista fisiológico. En efecto, en la sinapsis espláncnico-cromafín, tras la liberación de cuantos de ACh por parte del nervio espláncnico, es de esperar que se acumulen uno u otro tipo de molécula (la Cho debido a la actuación inmediata de la enzima acetilcolinesterasa, que degrada ACh a Cho y acetato).

No hay que olvidar, sin embargo, las diferencias de estos dos agonistas nicotínicos frente a Nic. Así, la ACh estimula en células cromafines no sólo los receptores nicotínicos sino también los muscarínicos (Douglas y Poisner, 1965). La Cho, por su parte, está descrita como un agonista total sólo para los nAChRs de subtipo $\alpha 7$; para los nAChRs heteroméricos está descrita como agonista parcial y de baja afinidad, e incluso en trabajos previos del grupo se la describió como bloqueante de los nAChRs $\alpha 3\beta 4$ bovinos expresados heterológicamente en ovocitos de *Xenopus* (ver secciones 3.1 y 5.4 de *Introducción*).

La **figura 26** resume los resultados obtenidos con el protocolo #1 cuando en lugar de bajas concentraciones de Nic se perfundieron Cho 1 mM ó ACh 10 μM (esta última se empleó únicamente en combinación con pulsos de K^+ 100 mM, para evitar un posible efecto aditivo entre la ACh perfundida -10 μM - y los pulsos secretagogos de 100 μM ACh). Las **figuras 26A y B** muestran registros originales de los experimentos en los que se perfundió Cho 1 mM. Como puede apreciarse, el comportamiento de las células a lo largo del protocolo siguió, a grandes rasgos, el mismo patrón que cuando la perfusión se hizo con Nic 3 μM . Lo mismo sucedió cuando la perfusión fue con ACh 10 μM (datos no mostrados).

Los **paneles C y D** comparan el curso temporal de la secreción de catecolaminas (medida en ABC y normalizada con respecto a la respuesta control/inicial) tras la perfusión de Nic 3 μM , Cho 1 mM ó ACh 10 μM , cuando los pulsos secretagogos fueron de 100 K^+ (**figura 26C**) ó de 100ACh (**figura 26D**).

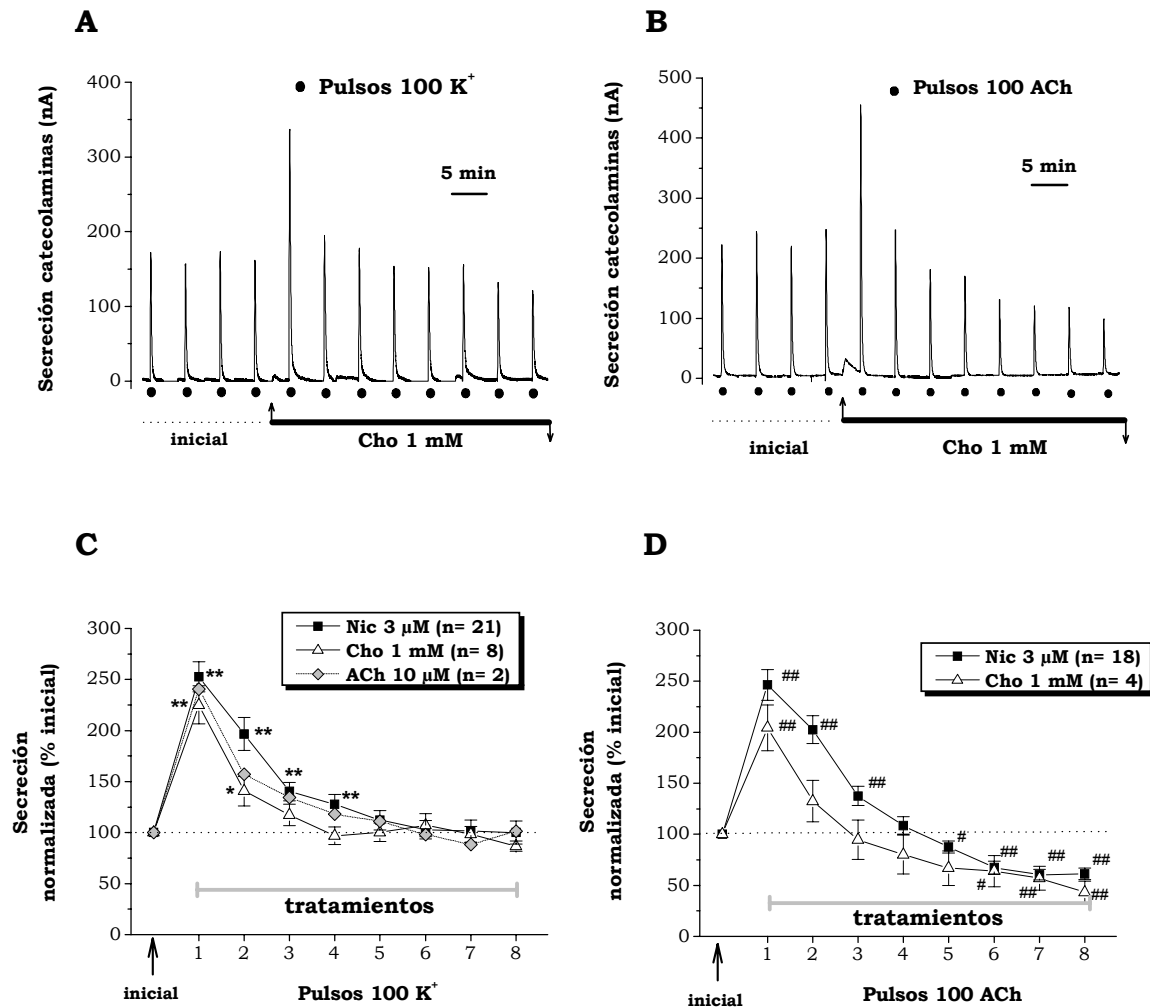


Figura 26. Respuesta de poblaciones de células cromafines bovinas al protocolo #1 cuando la perfusión se realizó con Cho 1 mM ó ACh 10 μM (en lugar de con Nic). **A y B**) Registros originales de las espigas de secreción obtenidas en una población de unas 5×10^6 células perfundidas con KH/2 mM CaCl₂ tras estimularlas con pulsos de 3 s/5 min (●), bien de K⁺ 100 mM (A) o bien de ACh 100 μM (B), y sometidas al protocolo #1 con perfusión de Cho 1 mM. **C y D**) Comparación del curso temporal de la potenciación de la secreción, medida en ABC, con el protocolo #1, cuando se aplicaron en perfusión Nic 3 μM, Cho 1mM ó ACh 10 μM. Entre paréntesis se muestra el número de experimentos de cada tipo. Las células para los experimentos con perfusión de Cho ó ACh procedían de al menos 2 cultivos diferentes. #^o *p<0,05; ##^o **p<0,01 con respecto a las respuestas control. NOTA: los datos tras perfusión de ACh no se analizaron estadísticamente por ser n= 2.

El máximo grado de potenciación de la secreción (esto es, en el primer pulso de K^+ ó ACh post-perfusión) tras la perfusión de Cho 1 mM fue de $225,2 \pm 18,7\%$ en respuesta a pulsos de K^+ ($n= 8$ experimentos) y de $204,3 \pm 22,5\%$ en respuesta a pulsos de ACh ($n= 4$ experimentos). Tras la perfusión de ACh 10 μ M, el promedio de la potenciación máxima fue de $240,5\%$ ($n= 2$ experimentos).

Nótese que la potenciación de la secreción de catecolaminas tras la perfusión de Cho ó ACh se perdió progresivamente en el tiempo (dejó de ser significativa después del 1^{er}-2^o pulso post-perfusión de Cho/ACh) de forma más rápida que cuando la perfusión se hizo con Nic 3 μ M (que dejó de ser significativa después del 3^{er}-4^o pulso post-perfusión de Nic). Además, en los últimos pulsos post-perfusión de Cho 1 mM, las respuestas a 100ACh disminuyeron significativamente con respecto a la respuesta inicial, al igual que sucedía cuando se perfunde Nic 3 μ M (ver significación estadística de cada dato en figura 26).

3.3.- Efectos de un agente despolarizante (K^+ 17 mM)

En la literatura está descrita la potenciación de la respuesta secretora de catecolaminas en ccb tras incrementos ligeros y sostenidos en la $[Ca^{2+}]_c$, independientemente de que este Ca^{2+} proceda del exterior celular o de la liberación desde depósitos a través de CICR. Así, Forsberg y col. (1986) describen la potenciación de la secreción tras la activación de receptores muscarínicos (liberación de Ca^{2+} desde depósitos), mientras que von Ruden y Neher (1993) describen la potenciación tras ligeras despolarizaciones de la célula (entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular a través de CCDV) o tras la aplicación de histamina (liberación de Ca^{2+} desde depósitos).

Por ello se decidió explorar si una solución ligeramente despolarizante (que contenía 17 mM de K^+) era capaz de emular la potenciación de la secreción provocada por Nic 3 μ M. Esto es, si la potenciación era atribuible a un efecto nicotínico específico, o si por el contrario cualquier maniobra experimental capaz de provocar incrementos ligeros y sostenidos del Ca^{2+} en el citosol de las células sería capaz de emular este fenómeno.

La elección de una concentración de 17 mM de K^+ se basó en que ésta es capaz de despolarizar a las células en un grado similar al de la Nic 3 μ M (en unos 10 mV, ver apartado 4 de *Resultados*); por tanto, es de esperar que genere entradas de Ca^{2+} en el citosol y secreción de catecolaminas, pero obviando el paso de la activación de nAChRs en la cascada de señalización del proceso.

La **figura 27** resume los resultados obtenidos con el protocolo #1 acertado cuando se perfundi6 17 mM K⁺ (por lo que se emplearon s6lo pulsos de 100ACh y no de K⁺) en lugar de Nic. La **figura 27A** es un ejemplo de los registros originales de un experimento de este tipo. La **figura 27B** compara los cursos temporales de la secreci6n post-perfusi6n de 17 mM K⁺ y de Nic 3 μM (medida en ABC y normalizada con respecto a la respuesta secretora inicial). Como se puede observar, la perfusi6n de 17 mM K⁺ provoc6 una potenciaci6n de la secreci6n muy inferior a la provocada por Nic 3 μM, potenciaci6n que por otro lado declin6 mucho m6s r6pidamente en el tiempo (dej6 de ser significativa tras el primer pulso post-perfusi6n, ver significaci6n estadística de los resultados en la figura 27). La **figura 27C** cuantifica la magnitud de la m6xima potenciaci6n, esto es, en el primer pulso post-perfusi6n de K⁺ o Nic: 142,8±18,3% (n= 10 experimentos) 6 246,3±15,2% (n= 18), respectivamente.

En la interpretaci6n de estos datos conviene considerar algunos aspectos, que se comentaran m6s detalladamente en la *Discusi6n*: 1) La mera perfusi6n de 17 mM K⁺ elev6 la seńal basal en la mayoría de experimentos, pero con un patr6n diferente a como lo hizo Nic. Con Nic la elevaci6n de la basal se fue perdiendo progresivamente en el tiempo, por lo que es atribuible a una secreci6n en respuesta a la Nic *per se*, que se va perdiendo en el tiempo por desensibilizaci6n de los nAChRs. Con 17 mM de K⁺, en cambio, la elevaci6n de la seńal basal apenas se fue perdiendo en el tiempo (**figura 27A**); este cambio de basales parece ser que fue m6s bien un artefacto debido al cambio de soluciones, ya que se sigui6 observando cuando las soluciones se intercambiaron (de KH/2 mM CaCl₂ a 17 mM K⁺/2 mM CaCl₂) en ausencia de c6lulas (**figura 27D**), cosa que no sucedi6 al pasar de KH/2 mM CaCl₂ a KH con Nic 3 μM/2mM CaCl₂ en ausencia de c6lulas (no mostrado). 2) En el inicio de la perfusi6n con 17 mM K⁺, sin embargo, probablemente s6 se produjo secreci6n (el pico seńalado con un asterisco en la figura 27A, que no se observ6 en ausencia de c6lulas, figura 27D).

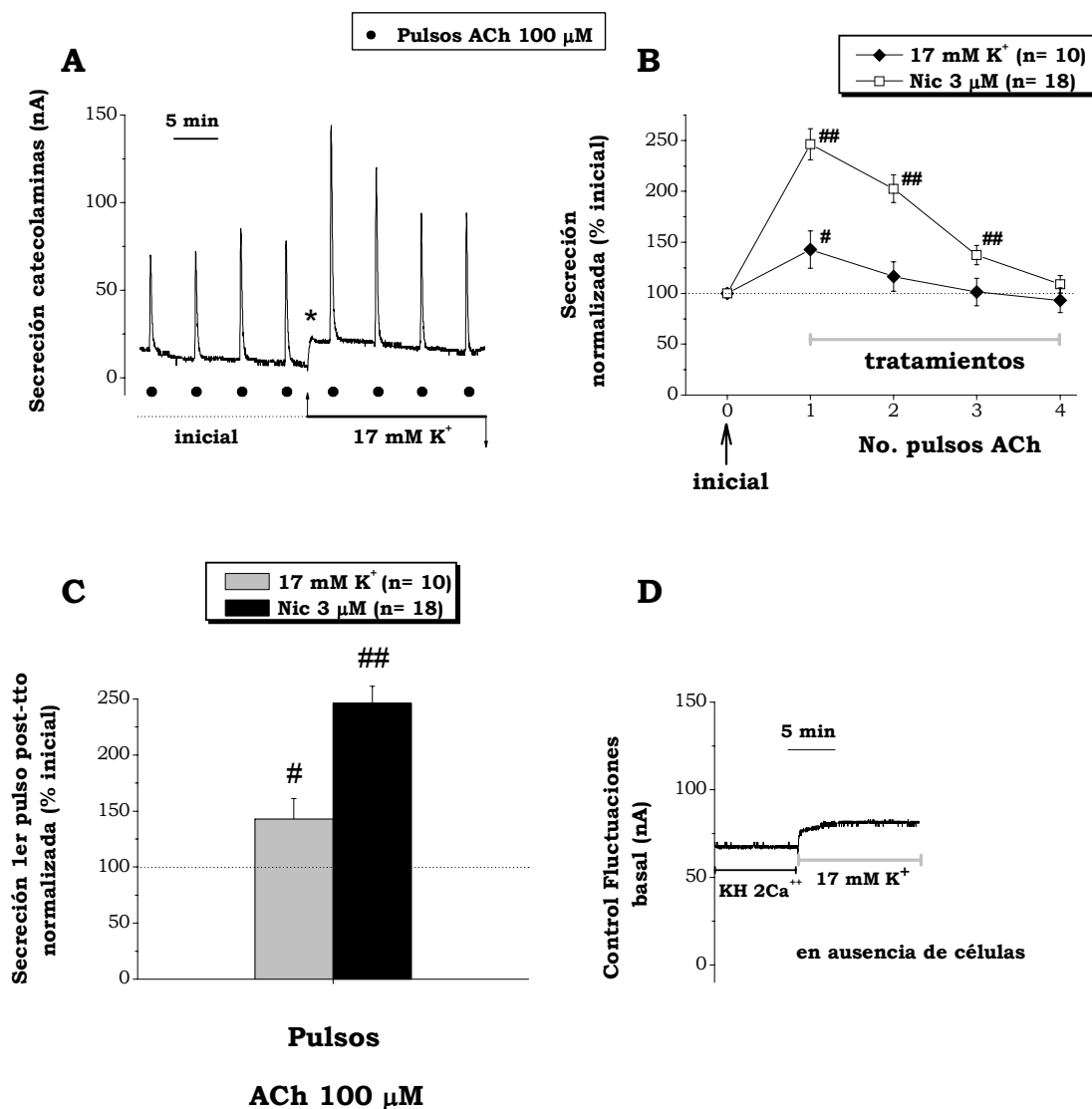


Figura 27. Respuesta de poblaciones de ccb al protocolo #1 acortado cuando la perfusión se realizó con 17 mM K^+ en lugar de con Nic 3 μM . **A)** Registro original de las espigas de secreción obtenidas en una población de unas 5×10^6 células sometidas al protocolo #1 acortado, con pulsos de ACh 100 μM (●) y perfusión de 17 mM K^+ (barra horizontal negra). **B)** Curso temporal de la secreción, medida en ABC y normalizada respecto a la respuesta inicial, cuando se aplicaron en perfusión 17 mM K^+ ó Nic 3 μM . Entre paréntesis se indica el número de experimentos de cada tipo. Las células para los experimentos con perfusión de 17 mM K^+ procedían de al menos 4 cultivos diferentes. **C)** Magnitud de la potenciación de la secreción en el primer pulso post-tratamiento de 17 mM K^+ ó Nic 3 μM , medida en ABC. **D)** Muestra cómo fluctuó la señal amperométrica basal en ausencia de células por el simple cambio de soluciones (entre un KH normal y el 17 mM K^+ , ambos con 2 mM CaCl_2). # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ con respecto a las respuestas control.

3.4.- Efectos de agonistas muscarínicos

Otra maniobra experimental empleada para intentar elevar discretamente los niveles citosólicos de calcio consistió en la aplicación de agonistas muscarínicos. Para este tipo de experimentos se emplearon en concreto metacolina (30 y 100 μM) y oxotremorina M (30 μM).

En primer lugar se repitió el protocolo #1 acertado perfundiendo 30 μM de metacolina (cloruro de acetil- β -metilcolina), sin que se observase una alteración significativa de la respuesta secretora a lo largo de todo el experimento. Ni siquiera al aumentar la concentración de metacolina hasta 100 μM se detectaron alteraciones significativas de la respuesta secretora control (datos no mostrados).

Por ello se decidió recurrir a un segundo agonista muscarínico inespecífico, la oxotremorina M (Oxo) (Freedman y col., 1988). La **figura 28** resume los resultados obtenidos con el protocolo #1 acertado cuando se perfundió Oxo 30 μM . Las **figuras 28A** y **B** muestran registros originales de experimentos de este tipo, con pulsos de 100ACh ó de 100K⁺. Las **figuras 28C** y **D** comparan los cursos temporales de la secreción post-perfusión de Oxo 30 μM ó Nic 3 μM (medidas en ABC y normalizadas con respecto a la respuesta secretora inicial), para pulsos de 100ACh ó de 100K⁺. De manera similar a lo que sucedió tras perfundir 17 mM de K⁺, la respuesta secretora tras la perfusión de Oxo 30 μM se vio potenciada, pero la potenciación se perdió muy rápidamente en el tiempo (sólo fue estadísticamente superior al control en el primer pulso post-perfusión). La magnitud de la potenciación en este primer post-pulso, sin embargo, no mostró diferencias significativas entre la perfusión de Nic 3 μM o de Oxo 30 μM . Cuando los pulsos fueron de ACh dicha magnitud fue de 246,3 \pm 15,2% (n= 18 experimentos) y 204,7 \pm 46,2% (n= 3) tras la perfusión de Nic y Oxo, respectivamente. Para los pulsos de K⁺, la potenciación en el primer pulso post-perfusión de Nic y Oxo fue de 243,7 \pm 33,4% (n= 21 experimentos) y 252,6 \pm 14,8% (n= 4), respectivamente (ver significación estadística de los datos en la figura 28).

Nótese un fenómeno que se observó en todos los experimentos al empezar a perfundir Oxo 30 μM (**figura 28E**): la señal amperométrica experimentó una primera subida inmediata, de una magnitud de 76,2 \pm 19,6 nA como promedio (n= 7), y posteriormente, en el minuto 1,3-1,6 post-perfusión, una segunda subida, mucho menor que la anterior (de magnitud 11,3 \pm 2,3 nA como promedio, n= 6). En ausencia de células (**figura 28F**), la primera subida de la señal amperométrica siguió observándose (y tuvo una magnitud de 39,1 nA, n= 1), la segunda no. Es probable que la primera subida se

deba a una fluctuación de la señal amperométrica en respuesta al simple cambio de soluciones, mientras que la segunda, ligera y retardada en el tiempo, podría deberse a una secreción en respuesta a la estimulación de receptores muscarínicos (Augustine y Neher, 1992).

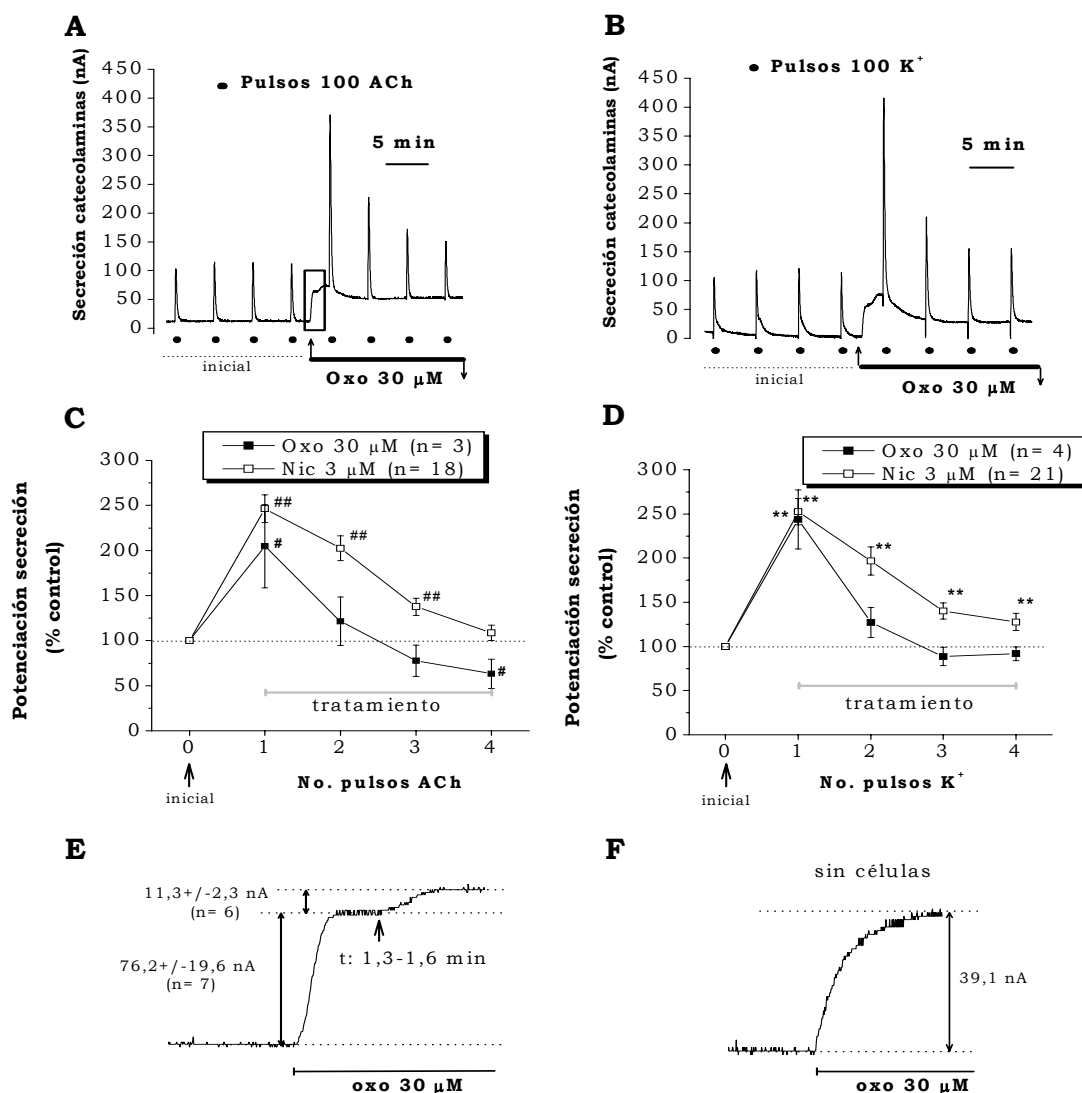


Figura 28. Respuesta de poblaciones de ccb al protocolo #1 acortado cuando la perfusión se realizó con Oxo 30 μM en lugar de con Nic 3 μM. **A y B)** Registro original de las espigas de secreción obtenidas en una población de unas 5×10^6 células sometidas al protocolo #1 acortado, con pulsos (●) de ACh 100 μM (A) o K⁺ 100 mM (B), y perfundidas con Oxo 30 μM (barra horizontal negra). **C y D)** Comparan el curso temporal de la secreción, medida en ABC y normalizada con respecto a la respuesta inicial, cuando se aplicó en perfusión Oxo 30 μM ó Nic 3 μM, para los experimentos con pulsos de ACh (C) o de K⁺ (D). Entre paréntesis se indica el número de experimentos de cada tipo, realizados con células procedentes de al menos 3 cultivos diferentes. # ó *p<0,05; ## ó **p<0,01 con respecto a las respuestas control. **E y F)** Comparan la fluctuación de la señal amperométrica entre un experimento con células (E, que corresponde a la porción enmarcada del experimento mostrado en A) y uno sin células (F). En F se muestra por tanto la fluctuación de la línea basal por el simple cambio de soluciones, esto es, por pasar de un KH normal a un KH con Oxo 30 μM, ambos con 2 mM CaCl₂.

4. PATRÓN DE DESPOLARIZACIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS AISLADAS EN RESPUESTA A LA PERFUSIÓN CONTINUADA DE NICOTINA 3 μM Ó DE SOLUCIONES DESPOLARIZANTES CON ALTO K^+

En la figura 27 se mostraban los resultados obtenidos tras someter a las células al protocolo #1 acortado perfundiendo una solución ligeramente despolarizante de 17 mM de K^+ en lugar de Nic. ¿Por qué se optó por 17 mM y no por otra concentración de K^+ ?

La **figura 29** muestra los resultados que condujeron a esta elección. En ccb aisladas sometidas a *patch-clamp* en el modo fijación de corriente y en la configuración de parche perforado, se estudió el patrón de despolarización de la membrana plasmática en respuesta a la perfusión continuada de Nic 3 μM o de soluciones con diferentes concentraciones de K^+ mM (y la consiguiente reducción en la concentración de Na^+ , con el fin de mantener su osmolaridad dentro de los rangos fisiológicos).

La **figura 29A** muestra el patrón de despolarización de la membrana de una célula en respuesta a la perfusión de Nic 3 μM . Obsérvese cómo Nic elevó el V_m de forma ligera, sostenida y reversible en unos 10 mV y produjo el disparo de potenciales de acción a baja frecuencia (de unos 0,3 Hz) solapados con dicha despolarización. La **figura 29B** resume los valores del V_m promedio antes, durante y después de la perfusión de Nic 3 μM , que resultaron ser (en mV): $-51,2 \pm 3,8$, $-38,2 \pm 2,5$ y $-55,2 \pm 5,4$ respectivamente ($n=6$ células).

La **figura 29C** muestra el patrón de despolarización de membrana en respuesta a la perfusión de concentraciones decrecientes de K^+ (60, 30, 15, 10 y 0 mM K^+). Se aprecia un patrón de despolarización muy diferente al que provocó la Nic. Así, las soluciones de K^+ provocaron elevaciones sostenidas del V_m (a mayor concentración de K^+ , mayor despolarización), pero en ningún momento provocaron el disparo de potenciales de acción. La dosis-dependencia de los saltos cuadrados del V_m en respuesta a las diferentes soluciones de K^+ se cuantifica en la **figura 29D**: la perfusión de soluciones de K^+ (en mM) de 0, 10, 15, 30, 45, 60 y 90 provocó valores del V_m (en mV) de $-54,5 \pm 1,5$, $-51,4 \pm 1,6$, $-45,1 \pm 0,7$, $-35,3 \pm 0,9$, $-26,9 \pm 0,9$, $-21,9 \pm 1,3$ y $-12,3 \pm 0,7$ respectivamente ($n=14, 6, 6, 6, 7, 6$ y 8 respectivamente).

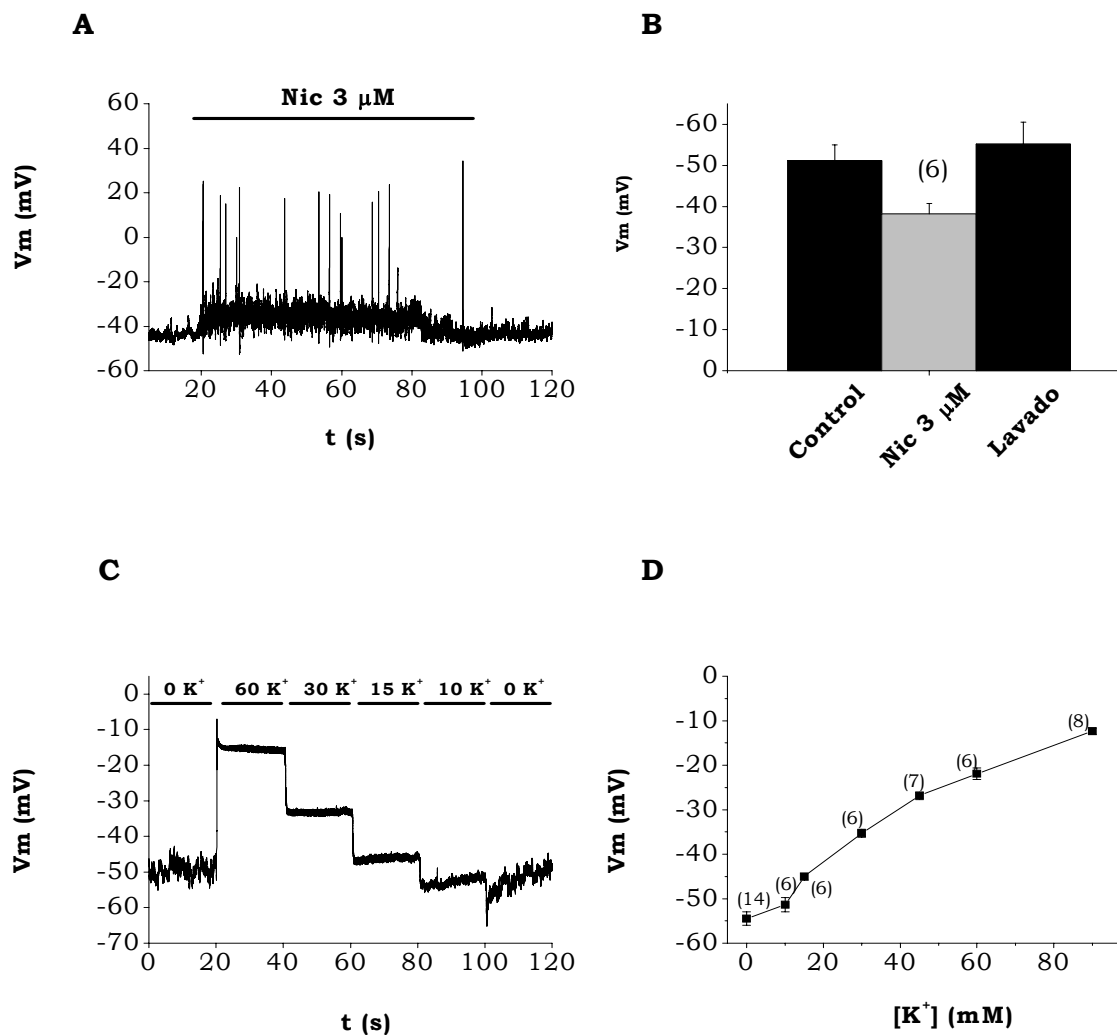


Figura 29. Patrón de despolarización de la membrana plasmática de ccb aisladas en respuesta a la perfusión de Nic 3 μM o de soluciones despolarizantes con alto K⁺. A y C) Registros originales del Vm de ccb aisladas sometidas a la perfusión (barras horizontales negras) de una solución de Tyrode con Nic 3 μM /2 mM CaCl₂ (A) o de Tyrode/2 mM CaCl₂ con diferentes concentraciones de K⁺ (60, 30, 15, 10 ó 0 mM) (C), según se indica. **B)** Cuantificación del grado de despolarización sostenida de la membrana tras la perfusión de Nic 3 μM (sin tener en cuenta los potenciales de acción). **D)** Cuantificación del Vm tras la perfusión de las soluciones de K⁺ (en mM): 0, 10, 15, 30, 45, 60 y 90. El número de datos se indica entre paréntesis, obtenidos de células de al menos 3 cultivos diferentes.

5. DESENSIBILIZACIÓN DEL RECEPTOR NICOTÍNICO NEURONAL POR NICOTINA UMBRAL

Para tratar de esclarecer el mecanismo por el cual los agonistas nicotínicos a concentraciones umbral son capaces de potenciar la respuesta secretora de catecolaminas en poblaciones de ccb, se decidió ahondar en el estudio de las respuestas de sus nAChRs en célula aislada.

Como ya se comentó en la *Introducción* (sección 5.3), una de las propiedades de los nAChRs es la desensibilización. Ésta depende, entre otras cosas, del tipo de agonista, de su concentración, del tiempo y frecuencia con que se aplique y del subtipo de nAChR con el que se esté tratando. Aunque los subtipos de nAChRs que expresa la ccb en su membrana no están del todo claros, ello no impide caracterizar la desensibilización de las respuestas nicotínicas nativas de ccb aisladas, que es lo que se describe en este apartado. Concretamente se caracterizó la desensibilización de las corrientes nicotínicas en respuesta a aplicaciones de pulsos de 250 ms de duración cada 30 s del agonista fisiológico ACh, a la concentración de 100 μM (en este modelo y condiciones experimentales nuestro grupo ha calculado una EC_{50} para la ACh de unos 180 μM).

Mediante la técnica de *patch-clamp* en el modo de fijación de voltaje, y tras adquirir la configuración de parche perforado, se fijó el potencial de membrana de la célula en -80 mV, y se superfundió a la misma con una solución extracelular de KH/2 mM CaCl_2 . La **figura 30A** muestra un registro representativo de las I_{ACh} obtenidas tras aplicar ACh en las condiciones arriba mencionadas: se obtuvieron corrientes de rápida activación y de rápida desensibilización.

La cuantificación de la desensibilización del receptor nicotínico (**figura 30B**) se hizo midiendo la fracción de corriente que quedaba al final de la aplicación del pulso (F) con respecto al pico máximo de corriente alcanzado (P) (cociente F/P), que fue de $0,27 \pm 0,02$ ($^{##}p < 0,01$) para 29 registros analizados, procedentes de 8 células diferentes.

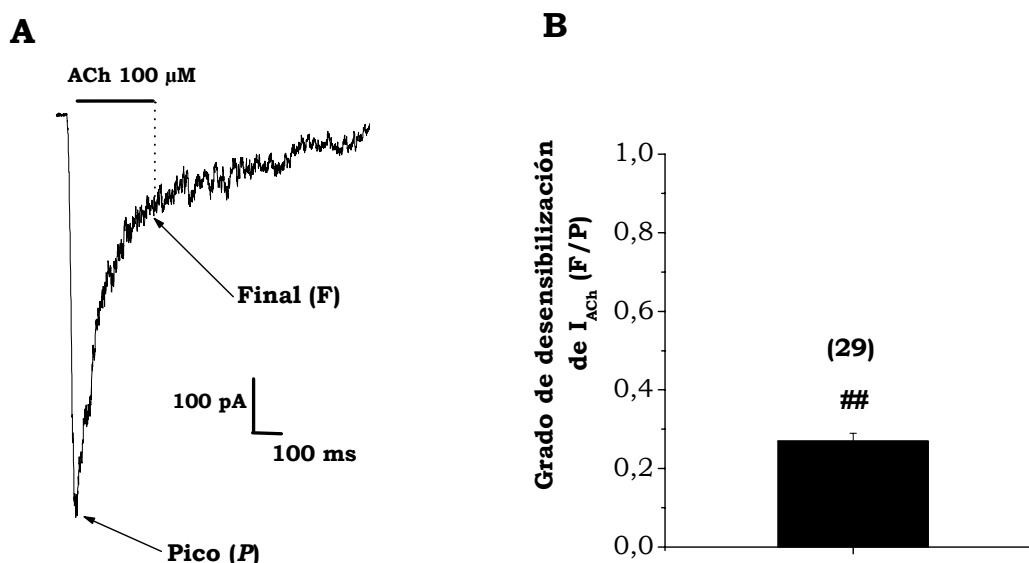


Figura 30. Desensibilización de I_{ACh} en células cromafines bovinas aisladas. A) Registro original ejemplo de las corrientes obtenidas tras aplicar 100 μM de ACh durante 250 ms (barra horizontal negra) a una ccb aislada. **B)** Para cada registro se calculó la fracción de corriente que quedaba al finalizar el pulso (F) con respecto al pico máximo de corriente alcanzado (P). Los datos proceden de 29 registros obtenidos de 8 células de al menos 4 cultivos diferentes. ## $p < 0,01$.

5.1.- Desensibilización de I_{ACh} en presencia continua de una concentración umbral de nicotina en células cromafines bovinas aisladas

Una vez caracterizada la desensibilización de I_{ACh} en ccb aisladas, se decidió estudiar qué efectos tenía la presencia continuada de Nic 3 μM (el agonista nicotínico empleado en primer lugar en los protocolos de secreción en poblaciones) sobre dichas corrientes.

En la **figura 31A** se resume el protocolo empleado para ello. Siguiendo con la estimulación con 100 μM ACh, 250 ms/30 s, una vez que las I_{ACh} se habían estabilizado, se empezó a superfundir de forma continua Nic 3 μM , a partir de la mitad entre dos pulsos de ACh, y se registraron las I_{ACh} subsiguientes. Las respuestas a ACh en presencia de Nic se repitieron hasta conseguir nuevamente respuestas estables, tras lo cual se procedió al "lavado" de la Nic, volviendo a perfundir KH/2 mM CaCl_2 .

La **figura 31B** muestra el curso temporal de los picos de I_{ACh} a lo largo de un experimento de este tipo, normalizados con respecto al pico alcanzado en el primer pulso, para una célula experimento y para una célula control (no sometida a perfusión con Nic). En la célula control se aprecia la estabilidad de los picos de I_{ACh} a lo largo del

experimento. En la célula experimento se observa cómo la disminución de I_{ACh} tras la perfusión continua de Nic fue progresiva (hasta estabilizarse tras 2-3 pulsos de ACh) y parcialmente reversible, como muestra la recuperación de I_{ACh} tras el lavado de Nic. El grado de recuperación de I_{ACh} y el número de pulsos de ACh que fueron necesarios para ello fue variable entre células; pero no se consiguió una recuperación del 100% de la respuesta de I_{ACh} en ninguna de ellas.

En la **figura 31C** se puede observar más detalladamente la cinética de recuperación de I_{ACh} tras el lavado de Nic. En el primer pulso post-lavado se había recuperado ya más del 50% de la respuesta inicial; la recuperación posterior fue más lenta y progresiva, hasta alcanzarse una recuperación máxima en los pulsos post-lavado 9-10.

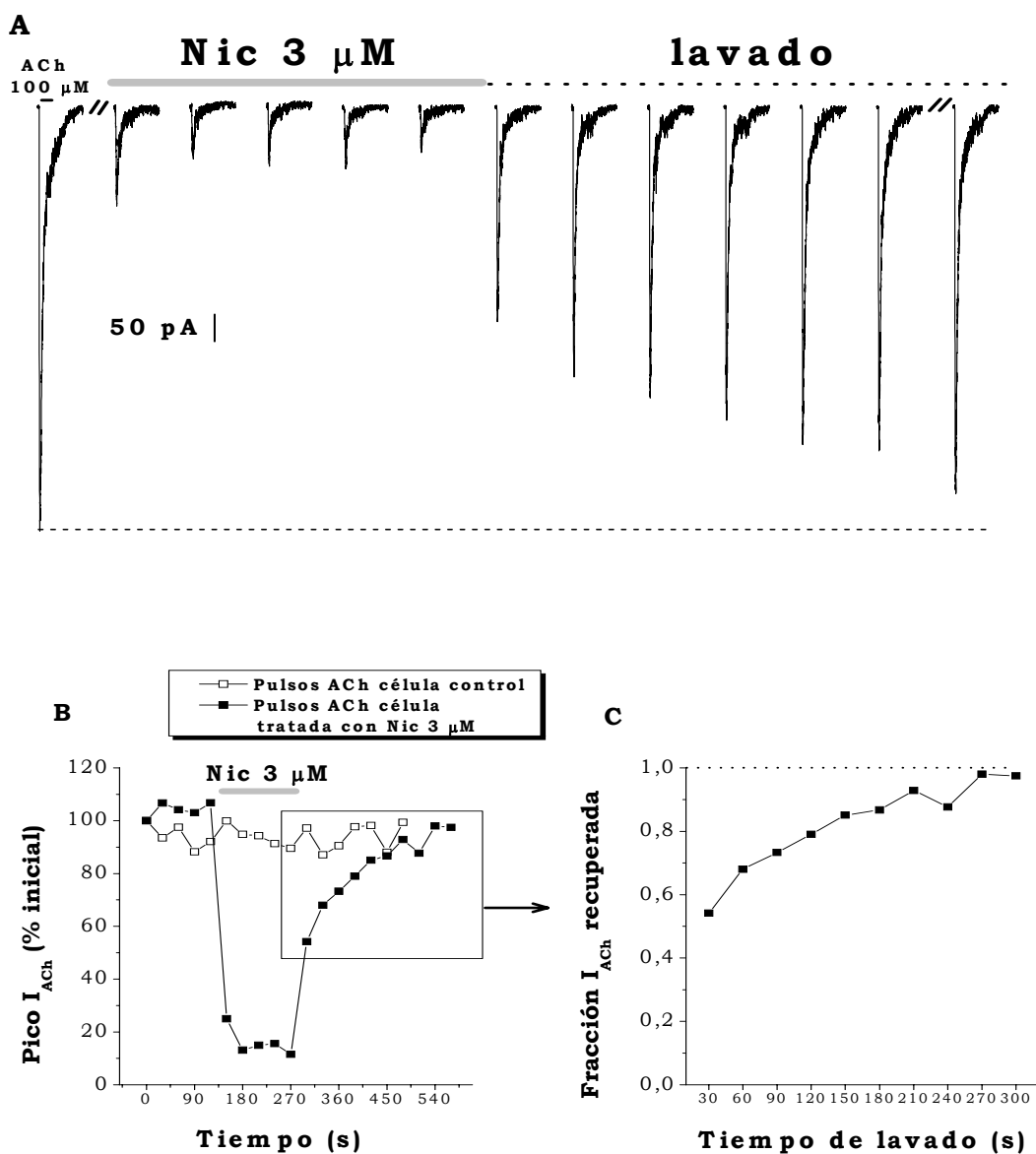


Figura 31. Protocolo de incubación de ccb aisladas con Nic 3 μ M. **A)** Las células se estimularon con pulsos de 250 ms de ACh 100 μ M (barra horizontal negra, mostrada sólo sobre el primer registro) cada 30 s. Tras conseguir I_{ACh} estables (representadas en la figura con un solo registro), se aplicó Nic 3 μ M en perfusión (barra horizontal gris) hasta conseguir de nuevo I_{ACh} estables, tras lo cual se procedió al lavado de la Nic (// indica discontinuidad en el curso temporal, esto es, que los registros mostrados no fueron consecutivos). **B)** Curso temporal de los picos de I_{ACh} , normalizados con respecto al primero, para una célula control (□) y para una célula experimento (■), sobre la cual se perfundió Nic 3 μ M durante el tiempo que muestra la barra horizontal gris. **C)** Muestra más detalladamente la cinética de recuperación de I_{ACh} tras el lavado de Nic.

En la **figura 32A** se muestran registros estables de I_{ACh} control, I_{ACh} en presencia de Nic 3 μM e I_{ACh} lavado en una célula sometida a un protocolo como el de la figura 31. Se observa cómo la incubación con Nic disminuyó considerablemente la amplitud de I_{ACh} pero no alteró su cinética, así como tampoco se vio alterada la cinética de las corrientes tras el lavado de la Nic.

Para analizar los datos (**figura 32B**), en cada I_{ACh} se midió tanto el pico de corriente (en pA) como la cantidad de carga que pasa por el canal abierto (calculada como el área bajo la curva de cada registro, ABC, en nC). Se tomó el promedio de las 4 primeras respuestas de I_{ACh} como I_{ACh} control. Tras la aplicación de Nic, la disminución de I_{ACh} era progresiva y generalmente se estabilizaba tras 2-3 pulsos de ACh; esta respuesta estable y mínima es la que se promedió para obtener la respuesta de I_{ACh} en presencia de Nic 3 μM . Las I_{ACh} tras la aplicación de Nic, normalizadas con respecto a las I_{ACh} control, se vieron significativamente disminuidas: representaron un $11,5 \pm 1,9\%$ si se mide el pico de corriente ($^{###}p < 0,01$) y un $9,1 \pm 1,7\%$ si se mide la carga de corriente ($^{###}p < 0,01$) ($n = 8$ células, 3 cultivos diferentes).

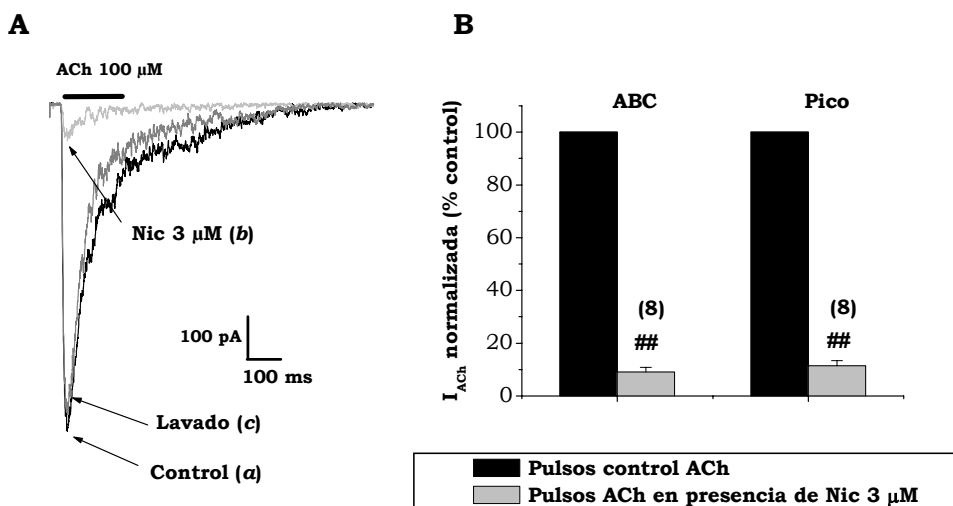


Figura 32. Desensibilización de I_{ACh} en presencia continua de una concentración umbral de nicotina en células cromafines bovinas aisladas. A) Registros originales de las corrientes estables obtenidas tras estimular una célula cromafín bovina con ACh 100 μM durante 250 ms (barra horizontal) cada 30 s en presencia de KH control (a), tras la perfusión de KH con Nic 3 μM (b) o tras lavar la Nic (c). **B)** Cuantificación del grado en que la perfusión de Nic 3 μM disminuyó el pico y el ABC de I_{ACh} . El número de células se indica entre paréntesis, obtenidas de al menos 3 cultivos diferentes. $^{###}p < 0,01$.

6. EFECTO DE NICOTINA UMBRAL SOBRE LA SEÑAL DE CALCIO CITOSÓLICO EN CÉLULA CROMAFÍN BOVINA

Con el fin de intentar dilucidar el mecanismo implicado en la potenciación por nicotina umbral de las respuestas secretoras evocadas por pulsos de 100ACh ó 100K⁺ en poblaciones de ccb, se decidió estudiar los cambios que experimentaba la señal citosólica de calcio en ccb aisladas sometidas a un protocolo muy similar al protocolo #1. Así, se registró la señal de calcio citosólico mediante el uso de la sonda ratiométrica fura-2 AM por epifluorescencia en ccb aisladas superfundidas con un KH/2 mM CaCl₂ y sobre las que se aplicaron pulsos de 100 μM ACh de 3 s de duración cada 3 min (se acortó el intervalo entre pulsos con respecto al protocolo #1, en el que se producían cada 5 min, con el fin de acortar la duración de los experimentos y evitar así la pérdida de fluorescencia por razones varias asociadas a la técnica que ya se han comentado en el apartado 6 de *Materiales y Métodos*).

La **figura 33** muestra registros originales de los 3 tipos de experimentos que se llevaron a cabo midiendo la señal de calcio citosólico (n= 20 células para cada tipo de experimento). En los del tipo **figura 33A** se aplicaron pulsos repetidos de 100ACh con el fin de comprobar que los incrementos del calcio citosólico en respuesta a 100 μM ACh eran reproducibles, esto es, su magnitud se mantenía más o menos constante a lo largo de todo un experimento (de unos 30 min de duración). La **figura 33B** muestra cómo la aplicación de Nic umbral (3 μM) en perfusión produjo una ligera elevación del Ca²⁺ citosólico basal, junto con una drástica reducción de los picos de Ca²⁺ citosólico evocados por los pulsos subsiguientes de 100ACh (que se recuperaron parcialmente tras el lavado de Nic). La **figura 33C** muestra cómo la perfusión de 17 mM K⁺ produjo también una elevación del calcio citosólico basal y una reducción de los picos de Ca²⁺ citosólico evocados por los pulsos subsiguientes de 100ACh, aunque no tan evidente como cuando lo que se aplicaba en perfusión era Nic 3 μM.

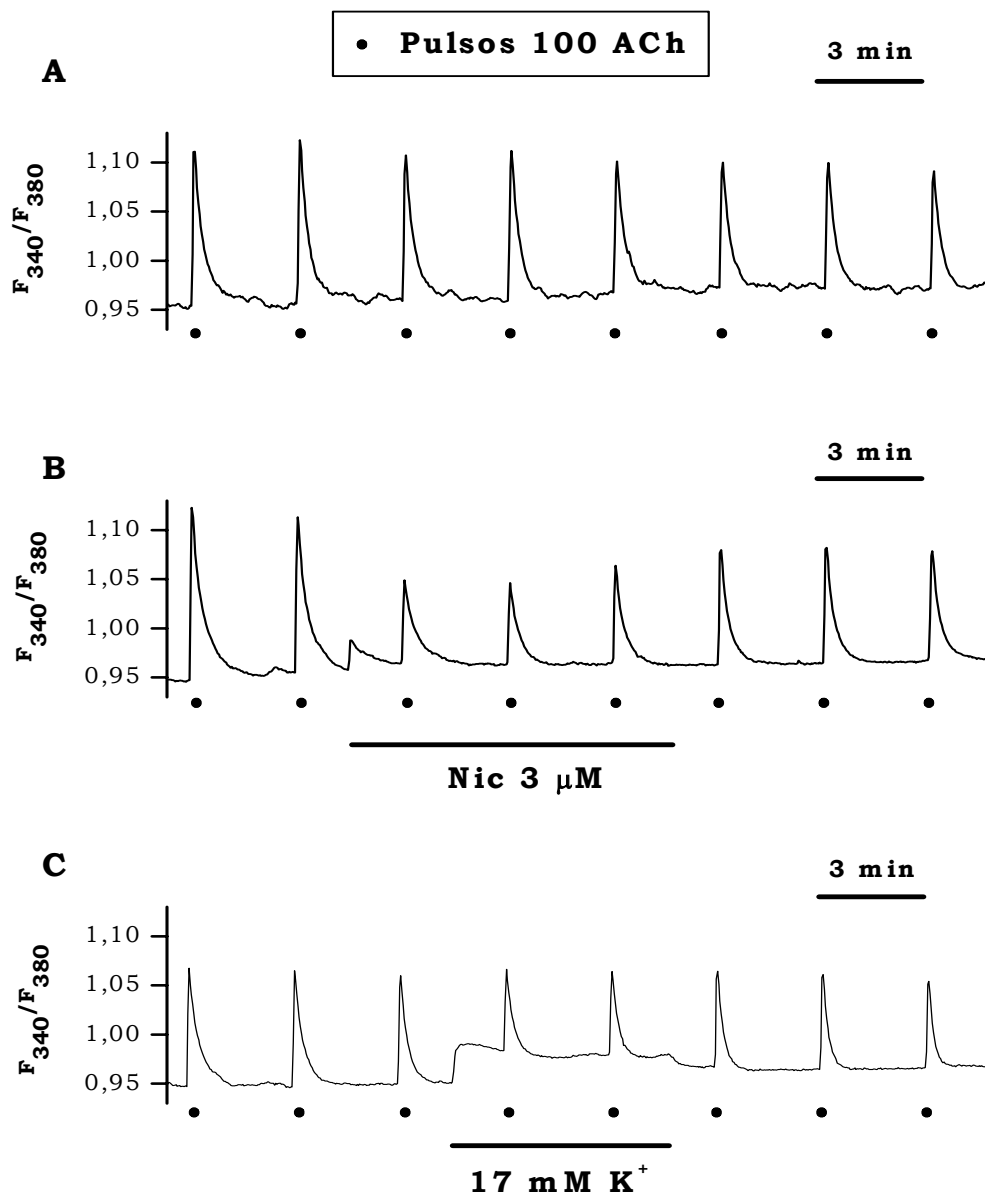


Figura 33. Señal citosólica de calcio en ccb aisladas. Registros originales de los tres tipos de experimentos en los que se registró la señal de calcio citosólico (expresada como ratio 340/380) en ccb aisladas superfundidas con KH/2 mM $CaCl_2$. Las células fueron estimuladas con pulsos de 100 μ M ACh (●) de 3 s de duración cada 3 min. **A)** Muestra un experimento control, en el que se aplicaron 8 pulsos de 100ACh. **B)** Experimento en el cual se aplicó Nic 3 μ M en perfusión durante el período que indica la barra horizontal negra. **C)** El mismo experimento que en B) pero aplicando 17 mM K^+ en perfusión.

DISCUSIÓN

En este trabajo se describe cómo la nicotina a concentraciones “umbral” es capaz de potenciar las respuestas secretoras de catecolaminas evocadas por la aplicación intermitente de pulsos breves de 100 μM ACh ó 100 mM K^+ en poblaciones de células cromafines bovinas en cultivo rápidamente superfundidas con un KH/2 CaCl_2 (figuras 14-16).

Dos cosas parecen bastante claras en cuanto al fenómeno: 1) que implica a los nAChRs, como demuestra su abolición por mecamilamina 10 μM (figura 25) y la capacidad para emularlo (figura 26) de bajas concentraciones de otros agonistas nicotínicos (ACh 10 μM y Cho 1 mM; ver comentarios respecto a estos dos agonistas más adelante); 2) que es Ca^{2+} -dependiente, como se concluye de experimentos en los que Nic umbral en 0Ca “nominal” fue incapaz de potenciar las respuestas secretoras a pulsos de ACh o K^+ (datos no mostrados).

En la búsqueda de una explicación para este hallazgo podría considerarse en primer lugar que la nicotina umbral **esté potenciando las respuestas de los nAChRs a los pulsos secretagogos de 100 μM ACh**, provocando así la entrada de un mayor número de iones al citosol, entre ellos el Ca^{2+} ; y que este Ca^{2+} adicional en el momento de la estimulación secretagoga contribuyera a una mayor respuesta secretora. En efecto, un fenómeno de potenciación competitiva de las I_{ACh} se ha descrito en nAChRs de tipo $\alpha 4\beta 4$ de rata expresados en ovocitos de *Xenopus* para otras combinaciones de agonistas nicotínicos, en concreto para la combinación de bajas concentraciones de ACh (10 μM) y un rango amplio de concentraciones (10 μM a 10 mM) de Cho (Zwart y Vijverberg, 2000). Los datos de I_{ACh} (figuras 31-32) y de señal de calcio citosólico (figura 33) obtenidos en este trabajo, sin embargo, son contrarios a esta hipótesis: la perfusión continuada de Nic 3 μM produjo una disminución drástica tanto de las corrientes iónicas de entrada como de las elevaciones del calcio citosólico en respuesta a los pulsos subsiguientes de 100 μM ACh, probablemente debido a la desensibilización de los nAChRs por exposición continuada a un agonista nicotínico, propiedad ampliamente descrita en la literatura (Quick y Lester, 2002). Desensibilización de los nAChRs que, por otra parte, parecen avalar los experimentos de dosis-dependencia en secreción en poblaciones (figuras 17 y 18), en los que la perfusión continuada de Nic 10 μM abolió en casi su totalidad las respuestas a cualquier pulso subsiguiente de 100ACh (figura 18), pero no a los pulsos subsiguientes de 100 K^+ (figura 17). Otros datos que no apoyarían la hipótesis de la potenciación de las I_{ACh} son los que muestran que la Nic umbral fue capaz de potenciar la

secreción no sólo en respuesta a pulsos de 100ACh sino también en respuesta a pulsos de 100K⁺, en los que no interviene para nada el reclutamiento de nAChRs (figuras 14-15).

Otro posible efecto de la nicotina umbral a tener en cuenta serían sus efectos despolarizantes: su aplicación (a 3 µM) en ccb aisladas despolarizó de forma sostenida la membrana plasmática de las mismas en unos 10 mV, y **evocó potenciales de acción superpuestos a tal despolarización**, con una frecuencia de unos 0,3 Hz (figura 29). En principio la pequeña despolarización sería insuficiente para abrir CCDV HVA (Gandía y col., 1993a), pero los potenciales de acción sí pueden abrir tales canales, permitiendo la entrada de Ca²⁺ en la célula (como por otra parte puede observarse en la figura 33), calcio que explicaría la pequeña y lenta respuesta secretora observada en poblaciones de ccb tras empezar a ser perfundidas con Nic umbral (figuras 14 y 16). Estos resultados estarían en concordancia con los obtenidos en ccb aisladas sometidas a trenes de potenciales de acción de baja frecuencia mediante *patch-clamp*, en los que las respuestas secretoras, medidas por técnicas de capacitancia, fueron pequeñas o nulas (García-de-Diego y col., 2006).

Como ya se mencionó en la sección 3.3 de los *Resultados*, en la literatura está descrita la potenciación de la respuesta secretora de catecolaminas en ccb tras incrementos ligeros y sostenidos de la [Ca²⁺]_c, independientemente de que el Ca²⁺ proceda del exterior celular a través de CCDV o de la liberación desde depósitos a través de CICR (Forsberg y col., 1986; von Ruden y Neher, 1993). Podría argumentarse que los efectos despolarizantes de la Nic umbral son responsables de ligeras elevaciones de la [Ca²⁺]_c, y que estas elevaciones potenciarían la posterior respuesta secretora de catecolaminas.

Ahora bien, aunque la Nic umbral dispara potenciales de acción y en consecuencia la entrada de Ca²⁺ desde el exterior celular a través de CCDV, bien pudiera ser que **el Ca²⁺ que entra a través de los nAChRs per se** tras ser activados por la Nic umbral fuese suficiente para justificar el fenómeno de potenciación de la secreción. En efecto, en células cromafines, aunque la principal fuente para el incremento del calcio citosólico que desencadena la exocitosis es el Ca²⁺ extracelular que entra por CCDV, se han descrito otras fuentes de Ca²⁺ también implicadas en la respuesta secretora de catecolaminas, como la liberación de Ca²⁺ desde depósitos o la activación de los nAChRs (esto último ya sugerido para la glándula adrenal intacta por Douglas y Rubin (1961), o por Holz y Senter (1981) en células cromafines en cultivo). Así, en ccb (Mollard y col., 1995) y en células PC12 (Harkins y Fox, 1998), la activación de nAChRs es capaz de

desencadenar exocitosis aun cuando el V_m esté hiperpolarizado (de -60 a -90 mV), esto es, aunque no se abran CCDV. Esta exocitosis se debe a la entrada de Ca^{2+} a través de los nAChRs *per se* -dada su modesta pero significativa permeabilidad al Ca^{2+} , el cual contribuye en aproximadamente un 2,5% a la corriente total (Zhou y Neher, 1993)-, que en el trabajo con ccb se demostró que era además capaz de reclutar un mecanismo dependiente de depósitos intracelulares sensibles a Thap. El trabajo con células PC12 no fue capaz de manifestar tal participación de depósitos tras la activación de nAChRs, pero sin embargo fue más allá, estudiando si los nAChRs estaban implicados en la secreción a V_m despolarizados (0 y +20 mV) como los que se alcanzan tras la activación de los nAChRs en condiciones fisiológicas. Y mostró cómo la activación simultánea de nAChRs y CCDV potenciaba las respuestas secretoras con respecto a las que se obtenían si sólo se activaban CCDV. En definitiva: los nAChRs constituyen una fuente de Ca^{2+} para la exocitosis que puede funcionar independientemente de la despolarización de la membrana, o bien conjuntamente con ésta, potenciando en ese caso la respuesta secretora.

Por ello este trabajo se planteó explorar si el fenómeno de potenciación por Nic umbral podría deberse a una entrada de Ca^{2+} por los nAChRs *per se*. Concretamente se pensó en llevar a cabo experimentos en secreción en poblaciones con el protocolo #1 estándar perfundiendo Nic umbral en combinación con bloqueantes no selectivos para CCDV. Pero la incapacidad para encontrar bloqueantes no selectivos de los CCDV que no bloqueasen a su vez a los nAChRs, esto es, las I_{ACh} medidas mediante *path-clamp* en célula única, (se probaron $MgCl_2$ 20 mM y $CdCl_2$ 20 y 0,2 μM), abortó el profundizar en este tema.

Otra posible explicación al fenómeno de potenciación de la secreción descrito en este trabajo sería que la perfusión continuada de Nic 3 μM **estuviera desencadenando un fenómeno de CICR**, esto es, liberando desde depósitos calcio que pudiera contribuir a potenciar la respuesta secretora. Tanto en células PC12 como en células de la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y se ha descrito que la nicotina (a concentraciones de 30 ó 200 μM) es capaz de activar el fenómeno de CICR -mediado por IP_3 o por RyR-, desencadenando incrementos de la $[Ca^{2+}]_c$ ligeros y bastante sostenidos en el tiempo (sobre todo gracias a la contribución de IP_3), siempre y cuando se mantenga la nicotina en el medio (Gueorguiev y col., 1999 y 2000; Dajas-Bailador y col., 2002). Por otra parte, en las células de este estudio, las ccb, el empleo de ecurinas directamente dirigidas al RE para monitorizar $[Ca^{2+}]_{RE}$ permitió describir que las soluciones despolarizantes de alto

K^+ (70 mM) o el agonista nicotínico DMPP eran capaces de desencadenar el fenómeno de CICR (Alonso y col., 1999). Previamente, en el trabajo de Lara y col. (1997) se sugería que las respuestas secretoras de ccb tras estimulaciones repetitivas con alto K^+ (70 mM K^+) se mantenían gracias al aporte de Ca^{2+} por parte de depósitos intracelulares sensibles a cafeína, lo cual fue demostrado posteriormente por Pan y Fox (2000). Todos estos datos serían acordes con los mencionados más arriba de ccb (Mollard y col., 1995), en los que se demostró que la activación de nAChRs era capaz de reclutar un mecanismo dependiente de depósitos intracelulares sensibles a Thap.

Por ello en este trabajo se decidió explorar si la potenciación seguía observándose en ccb con su RE depletado de Ca^{2+} . Para ello se repitió el protocolo #1 estándar (perfundiendo Nic 3 μ M) con pulsos de 100ACh en células a las que previamente se las había tratado para depletar su RE. Los resultados obtenidos (no se observaron diferencias significativas en las respuestas secretoras entre poblaciones de células control y poblaciones de células con el RE depletado) no avalan esta hipótesis para el modelo, técnica y protocolos experimentales empleados en este trabajo, aunque tampoco permiten descartarla.

Hasta aquí parece claro que la exposición prolongada a concentraciones umbral de nicotina provoca, sea cual sea su mecanismo, elevaciones ligeras del calcio citosólico. Y como ya se mencionó en la sección 3.3 de los *Resultados*, en la literatura está descrita la potenciación de la respuesta secretora de catecolaminas en ccb tras incrementos ligeros y sostenidos de la $[Ca^{2+}]_c$. Pero se quiso ahondar en si la potenciación descrita bajo las condiciones experimentales de este trabajo era atribuible a la estimulación específica de los nAChRs (como por otra parte parecen indicar su abolición por mecamilamina 10 μ M (figura 25) y la capacidad para emularlo (figura 26) de bajas concentraciones de otros agonistas nicotínicos, ACh 10 μ M y Cho 1 mM), o si por el contrario otras manipulaciones capaces de provocar incrementos ligeros y más o menos sostenidos del Ca^{2+} en el citosol de las células (como el K^+ 17 mM) serían capaces de emular el fenómeno. A continuación se comentarán las **peculiaridades de los datos obtenidos tras la perfusión continuada de 17 mM K^+** .

En primer lugar, los efectos de la perfusión continuada de 17 mM K^+ sobre la secreción en poblaciones de ccb (figura 27) mostraron las siguientes diferencias con respecto a los de Nic umbral: 1) Al empezar a perfundir 17 mM K^+ se elevó la basal en la mayoría de experimentos, pero esta elevación se mantuvo en el tiempo (panel 27A), a diferencia de lo que ocurría con Nic. Pensamos que la elevación de la basal en respuesta

a Nic refleja una respuesta secretora, que se fue perdiendo progresivamente en el tiempo por desensibilización de los nAChRs, mientras que en respuesta a 17 mM de K^+ probablemente sea un artefacto debido al cambio de soluciones. Nótese que en ausencia de células el cambio de soluciones -de KH/2 mM Ca^{2+} a 17 mM K^+ /2 mM Ca^{2+} , panel 27D- produjo esta misma elevación de la basal, algo que no se observó al cambiar entre KH/2 mM Ca^{2+} y KH+Nic 3 μ M/2mM Ca^{2+} (no mostrado). 2) No obstante, en el inicio de la perfusión con 17 mM K^+ probablemente sí se produjo secreción, como indica el pico señalado con un asterisco en el panel 27A, que no se observó en ausencia de células, panel 27D. Datos que apoyarían la hipótesis de que hay secreción al inicio de la perfusión con 17 mM K^+ son los de la señal de señal de calcio citosólico en ccb aisladas tras empezar a aplicar 17 mM K^+ (panel 33C), que experimentó un ligero incremento. Pese a todas estas diferencias, la perfusión continuada de 17 mM K^+ potenció la secreción de catecolaminas en respuesta a pulsos de 100ACh, si bien en un grado mucho menor y menos sostenido en el tiempo que la de bajas concentraciones de nicotina (figura 27).

En segundo lugar, los efectos de la perfusión continuada de 17 mM K^+ sobre la señal de $[Ca^{2+}]_c$ medida en ccb aisladas (figura 33) mostraron las siguientes diferencias con respecto a los de Nic umbral: si bien se observó una pequeña y transitoria elevación del $[Ca^{2+}]_c$ tras la aplicación tanto de Nic umbral como de 17 mM K^+ , las elevaciones del $[Ca^{2+}]_c$ en respuesta a los pulsos subsiguientes de 100ACh se vieron drásticamente disminuidas tras la perfusión de Nic umbral y también disminuidas, pero en mucho menor grado, tras la perfusión de 17 mM K^+ .

Parece claro, pues, que la exposición prolongada a concentraciones umbral de nicotina provocó elevaciones ligeras del calcio citosólico. Y que estas elevaciones también se produjeron en respuesta a la perfusión continuada de una solución ligeramente despolarizante de 17 mM K^+ , pese a lo cual la capacidad de potenciación de la secreción de esta última resultó considerablemente inferior y menos sostenida en el tiempo que la de las concentraciones umbral de nicotina (figura 27).

Tal vez la explicación a todas estas diferencias radique en los efectos despolarizantes que tuvo 17 mM K^+ sobre las ccb aisladas (figura 29): si bien provocó una despolarización sostenida similar a la provocada por Nic 3 μ M (de unos 10 mV), fue incapaz de provocar el disparo de potenciales de acción solapados con tal despolarización. En efecto, está ampliamente descrito y aceptado en la literatura que los agonistas nicotínicos y las soluciones despolarizantes de alto K^+ despolarizan a la célula cromafín bovina, pero por mecanismos muy diferentes. Así, mientras que los agonistas

nicotínicos aumentan de forma dosis-dependiente la frecuencia de disparo de los potenciales de acción espontáneos de la célula (Brandt y col., 1976), el alto K^+ lo que provoca es una despolarización química cuadrada en la célula que se mantiene mientras dure el estímulo despolarizante. Y en relación con ello, no debería olvidarse el fenómeno de inactivación de los CCDV, que en ccb es voltaje y tiempo-dependiente (Villarroya y col., 1999) y Ca^{2+} -dependiente (Hernández-Guijo y col., 2001).

Volviendo de nuevo a los efectos sobre la secreción en poblaciones de la perfusión continuada de 17 mM K^+ , puesto que éste despolariza de forma continuada a las células en unos 10 mV, estaría favoreciendo la inactivación voltaje -dependiente de los CCDV, contrarrestándose así su efecto potenciador de la secreción, lo cual podría explicar su capacidad menor y menos sostenida en el tiempo para potenciar la secreción en comparación con la de Nic 3 μ M. Sin embargo, con el fin de permitir que los CCDV se recuperasen de su eventual inactivación tras la perfusión de 17 mM K^+ , se realizaron experimentos como el que muestra la figura 23A pero perfundiendo 17 mM K^+ . Es decir, se dejó que el 17 mM K^+ actuase durante 2,5 min y luego se lavó durante 1 min, tiempo insuficiente en el caso de la Nic para que se lavase por completo su efecto potenciador; los resultados de este tipo de experimentos no mostraron potenciación alguna de la respuesta secretora tras la perfusión y lavado de 17 mM K^+ (datos no mostrados).

La inactivación de los CCDV estaría también implicada en la reducción de la señal de $[Ca^{2+}]_c$ en respuesta a pulsos de ACh tras la perfusión continuada de 17 mM K^+ ó Nic 3 μ M. Si bien tras la perfusión de Nic 3 μ M estaría implicada no sólo la inactivación de CCDV sino también la desensibilización de nAChRs.

Otro factor a tener en cuenta es que, en comparación con la Nic umbral, la perfusión de 17 mM K^+ no sólo produce un diferente patrón de despolarización de la célula sino que también podría estar produciendo una diferente distribución espacio-temporal de la señal celular del calcio, razones que podrían justificar la diferente capacidad para potenciar la secreción de 17 mM K^+ vs nicotina umbral. De hecho, en un trabajo previo del grupo (Cuchillo-Ibáñez y col., 2002) se compararon en ccb a 37°C las características como secretagogos de 100 μ M ACh vs 100 mM K^+ . Y se observó que eran capaces de provocar respuestas secretoras similares en cuanto a cantidad total de catecolaminas liberadas, pero con un patrón de entrada y de distribución del Ca^{2+} intracelular (medido por microscopía confocal) muy diferente. Ello se tradujo funcionalmente en que las respuestas secretoras a ACh se vieron más afectadas por las actividades tamponadoras/liberadoras de Ca^{2+} del RE y de la mitocondria que las

respuestas a K^+ . Es decir, que el modo en que RE y mitocondria “vieron” los incrementos del $[Ca^{2+}]_c$, esto es, el modo en que la señal de entrada de Ca^{2+} se acopló a los mecanismos intracelulares de la homeostasia del Ca^{2+} , fue muy diferente tras uno u otro tipo de estímulo. En el presente trabajo, los datos de elevación del $[Ca^{2+}]_c$ (medidos por epifluorescencia con fura-2AM) no permitieron discernir este tipo de diferencias entre perfusión de 17 mM K^+ vs perfusión de Nic 3 μ M, pero no por ello pueden descartarse. No debe olvidarse la limitada resolución espacio-temporal de las técnicas clásicas de microscopía de epifluorescencia para medir $[Ca^{2+}]_c$. De hecho, el fenómeno de CICR en células cromafines bovinas tras su estimulación con DMPP o alto K^+ no se pudo demostrar hasta que se pudieron medir directamente los cambios en la $[Ca^{2+}]_{RE}$ (Alonso y col., 1999). Otro ejemplo: pese a que Mollard y col. (1995) sugirieron que la entrada de Ca^{2+} por nAChRs *per se* reclutaba algún mecanismo de liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares, no fueron capaces de detectarlo mediante las técnicas convencionales de imagen de $[Ca^{2+}]_c$ con fluo-3.

Como ya se ha comentado anteriormente, el fenómeno de potenciación de la secreción por bajas concentraciones de Nic fue emulado por **concentraciones umbral de otros agonistas nicotínicos**, concretamente por ACh 10 μ M y por Cho 1 mM. La elección de estas moléculas se hizo por el interés que podían revestir desde un punto de vista fisiológico: tras la liberación de cuantos de ACh por parte del nervio esplácnico es de esperar que en la sinapsis esplácnico-cromafín se acumulen uno u otro tipo de molécula (la Cho debido a la actuación inmediata de la enzima acetilcolinesterasa). A continuación se discuten las peculiaridades de cada uno de estos agonistas y de los resultados obtenidos con ellos.

En primer lugar, los de **colina**. Ya en la *Introducción* (secciones 3.1 y 5.4) se comentó que muy probablemente, por los efectos sobre nAChRs que se han descrito en la literatura para colina, ésta ejerza un papel modulador durante el ciclo de actividad fisiológica de la célula cromafín bovina. Por una parte, Cho ha sido caracterizada: 1) como agonista nicotínico total para los nAChRs de subtipo $\alpha 7$ (Mandelzys y col., 1995; Papke y col., 1996; Alkondon y col., 1997); 2) como agonista parcial y de baja afinidad para los nAChRs heteroméricos; 3) como bloqueante de los nAChRs de tipo $\alpha 3\beta 4$ de la ccb cuando se expresan heterológicamente en ovocitos de *Xenopus* (González-Rubio y col., 2006). Por otra parte, aún no se ha esclarecido qué subtipos de receptores nicotínicos expresa la célula cromafín bovina en cultivo ni en qué grado contribuye cada uno a la secreción de catecolaminas. Se sabe que la ccb expresa los ARNm de las

subunidades $\alpha 3$, $\beta 4$, $\alpha 7$ y $\alpha 5$ (García-Guzmán y col., 1995; Campos-Caro y col., 1997) y se especula con la presencia de receptores de tipo $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$, ambos contribuyendo a la secreción de catecolaminas (López y col., 1998), pero datos posteriores de nuestro laboratorio no nos permiten descartar la presencia de un receptor complejo de tipo $\alpha 3\beta 4\alpha 7^*$, de receptores $\alpha 7$ en muy pequeña proporción o incluso de receptores $\alpha 7$ atípicos.

En la figura 26 se observa cómo Cho 1 mM potenció la secreción, aunque algo menos que Nic 3 μ M, y de forma menos sostenida en el tiempo. La pérdida de la potenciación en el tiempo fue especialmente llamativa cuando los pulsos secretagogos fueron de 100ACh. El hecho de que Cho sea capaz de bloquear a los nAChRs de subtipo $\alpha 3\beta 4$ bovinos (González-Rubio y col., 2006) tal vez sea la clave para explicar este resultado. Aunque no esté claramente dilucidada la composición de los nAChRs en la ccb, sí se cree que un componente $\alpha 3\beta 4^*$ contribuye a la secreción de catecolaminas en dichas células. No se puede descartar, por tanto, que en los experimentos en los que el estímulo secretor fue la ACh la perfusión de Cho estuviera disminuyendo la respuesta secretora a los pulsos de ACh, enmascarando de ese modo la potenciación de la secreción por Cho. Por otra parte, en este trabajo se intentó abolir el efecto potenciador de Cho 1 mM con el antagonista $\alpha 7$ -específico MLA (1 y 10 nM) sin conseguirlo (datos no mostrados), lo cual abogaría de nuevo porque los subtipos de nAChRs que contribuyen a la secreción en ccb no son claramente del tipo $\alpha 3\beta 4$ ó $\alpha 7$.

En cuanto a los resultados obtenidos tras la perfusión de **ACh 10 μ M**, en primer lugar debemos tener en cuenta que ésta, a diferencia de Nic o Cho, es agonista no sólo de los receptores nicotínicos sino también de los muscarínicos, también presentes en la membrana de las células cromafines (Douglas y Poisner, 1965). Y que en ccb está descrito que la estimulación muscarínica, aunque produce una secreción de catecolaminas escasa o nula (Cheek y Burgoyne, 1985; Augustine y Neher, 1992), sí es capaz de generar elevaciones ligeras y sostenidas del Ca^{2+} citosólico (mediante CICR), capaces de potenciar la posterior secreción de catecolaminas en respuesta a agonistas nicotínicos. Así, (Forsberg y col., 1986) describen en poblaciones de ccb que la activación del receptor muscarínico es capaz de potenciar la secreción de catecolaminas en respuesta a nicotina hasta 1.7 veces si la activación muscarínica se produce en una ventana de tiempo de entre 30 s y 1 min previos a la aplicación de nicotina. Y atribuyen esta potenciación a posibles incrementos ligeros del $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Cheek y Burgoyne, 1985; Kao y Schneider, 1985) mediados por la liberación de IP_3 tras la activación muscarínica,

que por sí solos no activan la secreción pero que estarían contribuyendo al “*priming*” de las vesículas secretoras. Curiosamente, reproducen este mismo fenómeno de potenciación cuando en vez de un agonista muscarínico lo que aplican previamente (o simultáneamente) a la nicotina es una solución ligeramente despolarizante de 10 mM K⁺.

La perfusión de ACh 10 μM potenció la secreción de manera similar a como lo hizo Nic 3 μM (figura 26). Parecer ser, pues, que los efectos potenciadores de ACh observados bajo las condiciones experimentales de este trabajo estarían ligados a su capacidad para activar receptores nicotínicos más que a la de activar receptores muscarínicos. Estos resultados serían coherentes con los descritos anteriormente de depleción de RE, que no evidenciaron una aportación significativa de CICR al fenómeno de potenciación de la secreción. Otra forma de investigar la posible participación de los depósitos intracelulares en la potenciación habría sido estudiar si Mec (antagonista selectivo de los nAChRs) bloqueaba toda capacidad de la ACh para potenciar la secreción (pero estos experimentos no llegaron a realizarse para este trabajo).

Con el objetivo de esclarecer la posible implicación de receptores muscarínicos en el fenómeno de potenciación, no obstante, se decidió explorar si ésta seguía produciéndose, y con el mismo patrón, tras la **estimulación con dos agonistas específicos muscarínicos: metacolina y oxotremorina M**. La metacolina (30 y 100 μM) no mostró ningún efecto sobre la secreción de catecolaminas. La oxo (30 μM), en cambio, sí mostró capacidad para potenciar la secreción de catecolaminas, aunque sólo de forma significativa en el primer pulso post-perfusión (figura 28). Las discrepancias en los resultados con uno y otro agonista muscarínico podrían tener su explicación si ponemos en duda la supuesta selectividad de la Oxo por los receptores muscarínicos. En efecto, a pesar de que Oxo ha sido considerada clásicamente como un agonista muscarínico, numerosos trabajos en la literatura la describen como un posible agonista también de receptores nicotínicos, ya sean de tipo muscular (Haggblad y col., 1985; Hong y Chang, 1990; Akk y Auerbach, 1999), de tipo neuronal en ccb (Shirvan y col., 1991), de tipo neuronal en neuronas simpáticas de cobaya (Xian y col., 1994), del tipo neuronal α4β2 (Akk y Auerbach, 1999) o del subtipo α9 ó α9/α10 de los epitelios sensoriales (Elgoyhen y col., 1994 y 2001). Resultados no publicados de nuestro grupo también evidencian su efecto agonista sobre diversos subtipos de nAChRs humanos y bovinos expresados en ovocitos de *Xenopus*. Por todo ello, no podemos concluir que una estimulación específicamente muscarínica esté contribuyendo de manera significativa a la potenciación de la secreción de catecolaminas descrita en este trabajo.

Llegados a este punto, cabría la posibilidad de considerar la hipótesis de que Nic umbral **esté favoreciendo el tráfico y/o maduración de las vesículas secretoras**, aumentando el tamaño de la población de vesículas listas para ser secretadas en respuesta a los pulsos de 100ACh ó 100K⁺. Los siguientes argumentos apoyarían dicha hipótesis: 1) Una elevación ligera y algo sostenida de la $[Ca^{2+}]_c$, como la que provoca Nic umbral (figura 33), favorece el relleno de la población de vesículas listas para ser secretadas (von Ruden y Neher, 1993; Neher y Zucker, 1993; Pan y Fox, 2000); 2) como ya se ha comentado anteriormente, los efectos de Nic son Ca²⁺-dependientes; 3) el relleno de la población de vesículas listas para ser secretadas es un fenómeno que requiere de tiempo (Neher, 1998), al igual que el fenómeno de potenciación de la secreción por Nic umbral descrito en este trabajo (figuras 20-22); 4) los estímulos de ACh ó 100K⁺ son supramaximales, esto es, causan la máxima despolarización y la máxima respuesta secretora (Cuchillo-Ibáñez y col., 2002). En este tipo de respuestas secretoras se está liberando toda la población de vesículas listas para ser secretadas (Neher, 1998). Por tanto, es lógico pensar que el único modo en que la Nic umbral podría estar aumentando las respuestas secretoras hasta en 2,5 veces tiene que tener relación con un aumento del tráfico y/o maduración de vesículas y con el relleno de la población de vesículas listas para ser secretadas. ¿No sería esta hipótesis contraria al hecho de que la potenciación sea reversible, tal y como muestra la figura 23? En principio no, pues en la teoría clásica de la transición entre las diferentes poblaciones de vesículas potencialmente todos los pasos son reversibles, aunque no necesariamente con las mismas constantes cinéticas en uno y otro sentido de la reacción (Sorensen, 2004). Que la potenciación sea un fenómeno reversible, esto es, un proceso que se lava, en principio lo único que nos indica es que el mecanismo por el que se produce, sea cual sea, requiere de la presencia continuada de Nic.

Otra posible interpretación del fenómeno estaría relacionada con la hipótesis de la existencia de **zonas activas y de microdominios de calcio tras la aplicación de estímulos secretagogos**, ampliamente aceptada para terminales nerviosas y recientemente demostrada también en células neuroendocrinas. Concretamente en ccb, en las que Becherer y col. (2003), como se comenta más abajo, demostraron que tras haberse generado un microdominio de calcio las vesículas ancladas a la membrana y los CCDV se aproximan, aumentando la probabilidad de que tras otra entrada de calcio dichas vesículas experimenten exocitosis.

En las terminales nerviosas la hipótesis de los microdominios postula la existencia de “zonas activas” donde los CCDV se colocan con los sitios de exocitosis, estos es, con las proteínas sinápticas y con las vesículas que se hayan ancladas y maduras en la membrana, de manera que cuando los CCDV se abren generan microdominios donde las $[Ca^{2+}]_c$ son muy elevadas, y las vesículas que experimentan exocitosis son las localizadas en dichos microdominios. La existencia de estas zonas activas explica que las vesículas sinápticas experimenten exocitosis tan rápidamente tras la llegada de un potencial de acción a la terminación nerviosa, permitiendo una comunicación interneuronal rápida.

En las células neuroendocrinas la existencia de un análogo de las zonas activas ha sido un tema controvertido durante mucho tiempo. De hecho, puesto que los productos de secreción de estas células llegan a sus tejidos diana en el organismo a través del torrente sanguíneo, en principio no se creía necesaria una sincronización tan estrecha entre la llegada de potenciales de acción y la exocitosis en este tipo de células. Así, en células cromafines, diferentes estudios en los que se midió la exocitosis con técnicas de alta resolución temporal –amperometría o capacitancia en células sometidas a *patch-clamp*- o en los que se emplearon simulaciones matemáticas llegaron a la conclusión de que los CCDV y los sitios de exocitosis no estaban estrechamente colocados, sino que entre las vesículas cromafines y los CCDV podían mediar distancias de hasta 300 nm (Chow y col., 1994; Zhou y Mislner, 1995; Klingauf y Neher, 1997).

En los últimos años, sin embargo, han aparecido trabajos en los que, gracias al empleo de las técnicas de TIRFM, se ha podido estudiar la dinámica de las vesículas secretoras durante la exocitosis con una resolución de submicrómetros. Destaca entre ellos el de Becherer y col. (2003), que midió simultáneamente en la submembrana de ccb las concentraciones de Ca^{2+} y los movimientos de las vesículas cromafines. Este trabajo consiguió demostrar varias cosas: 1) la existencia de microdominios de calcio tras la apertura de CCDV de tipo L; 2) que tales microdominios activan selectivamente la liberación rápida (en menos de 50 ms) de las vesículas cromafines ancladas a la membrana a no más allá de 300 nm del microdominio; 3) pero no de todas las vesículas ancladas a no más de 300 nm, lo cual estaría en concordancia con la vieja hipótesis de que no todas las vesículas ancladas a la membrana están listas para ser secretadas; 4) que tras haberse generado un microdominio de calcio las vesículas ancladas a la membrana y los CCDV se aproximan, constituyendo un nuevo mecanismo de facilitación estímulo y Ca^{2+} -dependiente de la exocitosis: aumentando la colocación entre los

sitios de entrada del calcio y las vesículas aumenta la probabilidad de que tras la entrada de calcio dichas vesículas experimenten exocitosis.

¿Pueden tener algún significado fisiológico los resultados descritos en este trabajo? Nos gustaría sugerir que la Nic umbral de estos experimentos podría estar emulando las situaciones de reposo en las que el nervio esplácnico dispara potenciales de acción a baja frecuencia (a unos 0,1 Hz, Brandt y col., 1976), liberando cuantos de ACh al espacio sináptico esplácnico-cromafín. En tales situaciones, el acúmulo de ACh o de su producto de degradación colina podría estar estimulando ligeramente a los nAChRs de las células cromafines (de manera similar a como lo hace la Nic umbral en este trabajo), provocando en las mismas una despolarización ligera y el disparo de potenciales de acción a baja frecuencia. Ello sería insuficiente para provocar una respuesta secretora de catecolaminas significativa, pero suficiente para potenciar -por un mecanismo aún por dilucidar- la secreción de catecolaminas ante futuros aumentos de la frecuencia de disparo del nervio esplácnico (esto es, ante futuras situaciones de estrés, en las que el nervio puede llegar a disparar a 10-20 Hz). De este modo, las bajas concentraciones de ACh de las situaciones de reposo estarían asegurando una liberación masiva de catecolaminas en futuras situaciones de estrés (p. ej durante una crisis asmática, infarto agudo de miocardio, *shock* anafiláctico o situaciones de estrés emocional). Y por tanto, la regulación fina de la liberación de catecolaminas en cada momento se conseguiría no sólo mediante los mecanismos clásicamente descritos de modulación autocrina/paracrina de los CCVD, de los nAChRs o de los canales de K^+ Ca^{2+} -dependientes, sino también mediante un mecanismo dependiente de la activación umbral de los nAChRs aún por descifrar.

Ahora bien, si en condiciones fisiológicas de baja frecuencia de disparo del nervio esplácnico las concentraciones de ACh o Cho en el espacio sináptico esplácnico-cromafín alcanzan valores suficientes y durante el tiempo suficiente como para modular la secreción de catecolaminas del modo en que se acaba de describir es asunto de difícil aseveración y estudio. En efecto, las concentraciones de ACh o de Cho y su distribución espacio-temporal en las sinapsis colinérgicas son difíciles de determinar y los datos de la literatura resultan controvertidos. Por ejemplo, en la sinapsis neuromuscular se han descrito concentraciones de ACh de 0,3 mM tras la liberación de un cuanto de ACh (Kuffler y Yoshikami, 1975); tras la liberación simultánea o sucesiva de varios cuantos de ACh probablemente se detectarían concentraciones mayores de ACh o de su producto de degradación, Cho. En cuanto a las concentraciones fisiológicas de Cho en el organismo,

en el suero humano se han detectado niveles de 10 μM , que se elevan hasta 30 μM tras la administración oral de Cho o de su precursor lecitina (Wurtman y col., 1977); en la rata se han descrito concentraciones basales de colina de 7 μM , 11,4 μM y 64 μM en el líquido cerebroespinal, plasma y tejido cerebral respectivamente (Klein y col., 1993).

En este trabajo se muestra, pues, que los agonistas nicotínicos a concentraciones umbral (es decir, en rangos de concentraciones determinados) en células cromafines bovinas producen una despolarización de la membrana y un patrón de señal celular del calcio citosólico tales que, a pesar de estar desensibilizando las respuestas de los nAChRs, tienen como efecto final la potenciación de la respuesta secretora de catecolaminas. Estos resultados aportarían un nuevo punto de vista en cuanto a las funciones que la desensibilización de los nAChRs pueda desempeñar en la transmisión colinérgica normal, fenómeno este no del todo esclarecido, pero cuya capacidad para modular la actividad colinérgica y para inducir cambios adaptativos no es desdeñable (Giniatullin y col., 2005).

En cuanto a la técnica de detección amperométrica de secreción en poblaciones empleada en este trabajo, no deberían obviarse sus limitaciones: el hecho de que estudia la respuesta de una población de células, no de células aisladas, y su baja resolución temporal, que impide un estudio detallado de los diferentes componentes cinéticos de la exocitosis. En el supuesto de que el fenómeno de potenciación estuviese mediado por un aumento en el ritmo de suministro de vesículas secretoras, por ejemplo, no permitiría distinguir si se trata de una facilitación del relleno de la población de vesículas listas para ser secretadas y/o de fases previas del tráfico y maduración de vesículas. Por ello sería de gran interés poder corroborar estos resultados en célula aislada y midiendo la secreción mediante técnicas más resolutivas como la amperometría o la capacitancia. Estas técnicas, combinadas con otras de biología molecular o con técnicas de TIRFM, permitirían además ahondar en los posibles mecanismos moleculares implicados en el fenómeno de potenciación de la secreción.

Por último, y ante estos resultados, merecería también ser estudiado en futuros trabajos si el fenómeno de potenciación de la neurosecreción tras la estimulación umbral de nAChRs es extrapolable o no a la exocitosis de las vesículas sinápticas en las sinapsis colinérgicas del SNC.

CONCLUSIONES

De la discusión de los resultados obtenidos en este trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones puntuales:

1. En poblaciones de ccb en cultivo rápidamente superfundidas con KH/2CaCl₂, la presencia continuada de bajas concentraciones de nicotina (1,5 y 3 μM) -que por sí solas estimulan una respuesta secretora escasa o nula- es capaz de potenciar (de a 1,8 a 2,5 veces) la secreción de catecolaminas medida por la técnica de detección amperométrica en tiempo real en respuesta a estímulos repetitivos (3 s/5 min) y supramaximales de ACh (100 μM) o K⁺ (100 mM).
2. La mencionada potenciación de la respuesta secretora de catecolaminas en poblaciones de ccb por bajas concentraciones de Nic posee además las siguientes características:
 - es dosis-dependiente
 - es tiempo-dependiente
 - es reversible (requiere de la presencia continuada de Nic)
 - es reproducible tras un período de reposo adecuado
 - es Ca²⁺-dependiente
 - es abolida por el antagonista nicotínico no selectivo mecamilamina (10 μM)
3. El patrón de potenciación de la secreción por bajas concentraciones de Nic fue imitado por bajas concentraciones de otros agonistas nicotínicos (ACh 10 μM y Cho 1 mM) pero no por una solución ligeramente despolarizante de K⁺ (17 mM) ni por agonistas muscarínicos (metacolina 30 y 100 μM, oxotremorina M 30 μM).
4. La presencia continuada de Nic 3 μM en ccb en cultivo aisladas rápidamente superfundidas con KH o Tyrode/2 CaCl₂ tuvo estos otros efectos:
 - provocó una despolarización sostenida de la membrana de las células de unos 10 mV, junto con el disparo de potenciales de acción a baja frecuencia solapados
 - provocó una drástica reducción (del 90%) de las corrientes iónicas de entrada en respuesta a pulsos de 100 μM ACh de 250 ms/30 s
 - provocó inicialmente una elevación ligera del calcio citosólico, medido por epifluorescencia mediante fura-2AM, que se fue perdiendo paulatinamente en el tiempo, junto con una drástica reducción de la señal de calcio citosólico en respuesta a los pulsos subsiguientes de 100 μM ACh de 3 s/3 min

5. La presencia continuada de 17 mM K⁺ en ccb en cultivo aisladas rápidamente superfundidas con KH o Tyrode/2CaCl₂ también provocó una despolarización sostenida de las células de unos 10 mV, pero sin el disparo de potenciales de acción solapados, así como una ligera elevación del calcio citosólico medido por epifluorescencia mediante fura-2AM y una reducción de la señal de calcio citosólico en respuesta a los pulsos subsiguientes de 100 μM ACh de 3 s/3 min, aunque dicha reducción fue menor que la observada tras la aplicación de Nic 3 μM en perfusión.

Y como conclusión global: la activación umbral de los receptores nicotínicos neuronales de la membrana de la célula cromafín bovina parece ejercer un papel modulador de la liberación de catecolaminas, favoreciendo el atraque y maduración de vesículas secretoras. De esta manera, la maquinaria de la exocitosis estaría preparada para activar una secreción masiva de catecolaminas en situaciones de estrés.

BIBLIOGRAFÍA

- Akk G and Auerbach A.** (1999) Activation of muscle nicotinic acetylcholine receptor channels by nicotinic and muscarinic agonists. *Br J Pharmacol* **128**, 1467-1476
- Albillos A, García AG and Gandía L.** (1993) Omega-agatoxin-IVA-sensitive calcium channels in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett* **336**, 259-262
- Albillos A, Artalejo AR, López MG, Gandía L, García AG and Carbone E.** (1994) Calcium channel subtypes in cat chromaffin cells. *J Physiol* **477**, 197-213
- Albillos A, Carbone E, Gandía L, García AG and Pollo A.** (1996a) Opioid inhibition of Ca^{2+} channel subtypes in bovine chromaffin cells: selectivity of action and voltage-dependence. *Eur J Neurosci* **8**, 1561-1570
- Albillos A, Gandía L, Michelena P, Gilabert JA, del Valle M, Carbone E and García AG.** (1996b) The mechanism of calcium channel facilitation in bovine chromaffin cells. *J Physiol* **494**, 687-695
- Albillos A, García AG, Olivera B and Gandía L.** (1996c) Re-evaluation of the P/Q Ca^{2+} channel components of Ba^{2+} currents in bovine chromaffin cells superfused with solutions containing low and high Ba^{2+} concentrations. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **432**, 1030-1038
- Albillos A, Dernick G, Horstmann H, Almers W, Álvarez de Toledo G and Lindau M.** (1997) The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature* **389**, 509-512
- Albillos A, Neher E and Moser T.** (2000) R-Type Ca^{2+} channels are coupled to the rapid component of secretion in mouse adrenal slice chromaffin cells. *J Neurosci* **20**, 8323-8330
- Alés E, Tabares L, Poyato JM, Valero V, Lindau M and Álvarez de Toledo G.** (1999) High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nat Cell Biol* **1**, 40-44
- Alkondon M, Pereira EF, Cortes WS, Maelicke A and Albuquerque EX.** (1997) Choline is a selective agonist of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Eur J Neurosci* **9**, 2734-2742
- Alonso MT, Barrero MJ, Michelena P, Carnicero E, Cuchillo-Ibáñez I, García AG, García-Sancho J, Montero M and Álvarez J.** (1999) Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release in chromaffin cells seen from inside the ER with targeted aequorin. *J Cell Biol* **144**, 241-254
- An SJ and Almers W.** (2004) Tracking SNARE complex formation in live endocrine cells. *Science* **306**, 1042-1046
- Appel ED and Elde RP.** (1988) The intermediolateral cell column of the thoracic spinal cord is comprised of target-specific subnuclei: evidence from retrograde transport studies and immunohistochemistry. *J Neurosci* **8**, 1767-1775
- Artalejo AR, García AG and Neher E.** (1993) Small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels in bovine chromaffin cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **423**, 97-103

- Artalejo AR.** (1995) Electrical properties of adrenal chromaffin cells. En: *The electrophysiology of neuroendocrine cells*. Eds. H. Scherubl and J. Hescheler. CRC Press Inc., pp. 259-299
- Artalejo CR, Perlman RL and Fox AP.** (1992a) Omega-conotoxin GVIA blocks a Ca^{2+} -current in bovine chromaffin cells that is not of the *classic* N type. *Neuron* **8**, 85-95
- Artalejo CR, Rossie S, Perlman RL and Fox AP.** (1992b) Voltage-dependent phosphorylation may recruit Ca^{2+} -current facilitation in chromaffin cells. *Nature* **358**, 63-66
- Artalejo CR, Adams ME and Fox AP.** (1994) Three types of calcium channels trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. *Nature* **367**, 72-76
- Ashery U, Varoqueaux F, Voets T, Betz A, Thakur P, Koch H, Neher E, Brose N and Rettig J.** (2000) Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *EMBO J* **19**, 3586-3596
- Augustine GJ, Adler EM and Charlton MP.** (1991) The calcium signal for transmitter secretion from presynaptic nerve terminals. *Ann NY Acad Sci* **635**, 365-381
- Augustine GJ and Neher E.** (1992) Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *J Physiol* **450**, 247-271
- Aunis D.** (1998) Exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Int Rev Cytol* **181**, 213-320
- Aunis D and Langley K.** (1999) Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta Physiol Scand* **167**, 89-97
- Axon Instruments.** (1993) "The Axon Guide for Electrophysiology and Biophysics Laboratory Techniques". Copyright Axon Instruments, Inc.
- Babcock DF, Herrington J, Park YB and Hille B.** (1997) Mitochondrial participation in the intracellular Ca^{2+} network. *J Cell Biol* **136**, 833-843
- Baker PF and Knight DE.** (1978) Calcium-dependent exocytosis in bovine adrenal medullary cells with leaky plasma membranes. *Nature* **276**, 620-622
- Baldelli P, Hernández-Guijo JM, Carabelli V, Novara M, Cesetti T, Andrés-Mateos E, Montiel C and Carbone E.** (2004) Direct and remote modulation of L-channels in chromaffin cells: distinct actions on $\alpha 1C$ and $\alpha 1D$ subunits? *Mol Neurobiol* **29**, 73-96
- Barbara JG, Poncer JC, McKinney RA and Takeda K.** (1998) An adrenal slice preparation for the study of chromaffin cells and their cholinergic innervation. *J Neurosci Methods* **80**, 181-189
- Bean BP.** (1985) Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol* **86**, 1-30

- Becherer U, Moser T, Stuhmer W and Oheim M.** (2003) Calcium regulates exocytosis at the level of single vesicles. *Nat Neurosci* **6**, 846-853
- Berridge MJ, Bootman MD and Lipp P.** (1998) Calcium--a life and death signal. *Nature* **395**, 645-648
- Berridge MJ, Bootman MD and Roderick HL.** (2003) Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 517-529
- Biales B, Dichter M and Tischler A.** (1976) Electrical excitability of cultured adrenal chromaffin cells. *J Physiol* **262**, 743-753
- Bittner MA and Holz RW.** (1992) Kinetic analysis of secretion from permeabilized adrenal chromaffin cells reveals distinct components. *J Biol Chem* **267**, 16219-16225
- Blanton MP and Cohen JB.** (1992) Mapping the lipid-exposed regions in the *Torpedo californica* nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* **31**, 3738-3750
- Blanton MP and Cohen JB.** (1994) Identifying the lipid-protein interface of the *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptor: secondary structure implications. *Biochemistry* **33**, 2859-2872
- Blaustein MP and Lederer WJ.** (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* **79**, 763-854
- Borges R, Sala F and García AG.** (1986) Continuous monitoring of catecholamine release from perfused cat adrenals. *J Neurosci Methods* **16**, 289-300
- Bossu JL, De Waard M and Feltz A.** (1991a) Inactivation characteristics reveal two calcium currents in adult bovine chromaffin cells. *J Physiol* **437**, 603-620
- Bossu JL, De Waard M and Feltz A.** (1991b) Two types of calcium channels are expressed in adult bovine chromaffin cells. *J Physiol* **437**, 621-634
- Bournaud R, Hidalgo J, Yu H, Jaimovich E and Shimahara T.** (2001) Low threshold T-type calcium current in rat embryonic chromaffin cells. *J Physiol* **537**, 35-44
- Brandt BL, Hagiwara S, Kidokoro Y and Miyazaki S.** (1976) Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *J Physiol* **263**, 417-439
- Brejč K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der Oost J, Smit AB and Sixma TK.** (2001) Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* **411**, 269-276
- Brose N, Rosenmund C and Rettig J.** (2000) Regulation of transmitter release by Unc-13 and its homologues. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 303-311
- Bruns D and Jahn R.** (1995) Real-time measurement of transmitter release from single synaptic vesicles. *Nature* **377**, 62-65

- Buck E, Zimanyi I, Abramson JJ and Pessah IN.** (1992) Ryanodine stabilizes multiple conformational states of the skeletal muscle calcium release channel. *J Biol Chem* **267**, 23560-23567
- Burgoyne RD and Cheek TR.** (1987) Reorganization of peripheral actin filaments as a prelude to exocytosis. *Biosci Rep* **7**, 281-288
- Cachelin AB and Jaggi R.** (1991) Beta subunits determine the time course of desensitization in rat alpha3 neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **419**, 579-582
- Campos-Caro A, Smillie FI, Domínguez del Toro E, Rovira JC, Vicente-Agulló F, Chapulil J, Juiz JM, Sala S, Sala F, Ballesta JJ and Criado M.** (1997) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors on bovine chromaffin cells: cloning, expression, and genomic organization of receptor subunits. *J Neurochem* **68**, 488-497
- Carabelli V, Giancippoli A, Baldelli P, Carbone E, Artalejo AR.** (2003) Distinct potentiation of L-type currents and secretion by cAMP in rat chromaffin cells. *Biophys J* **85**, 1326-1337
- Carbone E and Lux HD.** (1984a) A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons. *Biophys J* **46**, 413-418
- Carbone E and Lux HD.** (1984b) A low voltage-activated, fully inactivating calcium channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* **310**, 501-502
- Carmichael SW, Brooks JC, Malhotra RK, Wakade TD and Wakade AR.** (1989) Ultrastructural demonstration of exocytosis in the intact rat adrenal medulla. *J Electron Microscop Tech* **12**, 316-322
- Carmichael SW and Stoddard SL.** (1993) "The adrenal medulla". CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, USA. pp. 1989-1991
- Changeux JP, Devillers-Thierry A and Chemouilli P.** (1984) Acetylcholine receptor: an allosteric protein. *Science* **225**, 1335-1345
- Changeux JP.** (1990) The TiPS lecture. The nicotinic acetylcholine receptor: an allosteric protein prototype of ligand-gated ion channels. *Trends Pharmacol Sci* **11**, 485-492
- Cheek TR and Burgoyne RD.** (1985) Effect of activation of muscarinic receptors on intracellular free calcium and secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta* **846**, 167-173
- Cheek TR and Burgoyne RD.** (1986) Nicotine-evoked disassembly of cortical actin filaments in adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett* **207**, 110-114
- Cheek TR, Moreton RB, Berridge MJ, Stauderman KA, Murawsky MM and Bootman MD.** (1993) Quantal Ca²⁺ release from caffeine-sensitive stores in adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem* **268**, 27076-27083

- Chheda MG, Ashery U, Thakur P, Rettig J and Sheng ZH.** (2001) Phosphorylation of Snapin by PKA modulates its interaction with the SNARE complex. *Nat Cell Biol* **3**, 331-338
- Chow RH, Kinglauf J and Neher E.** (1994) Time course of Ca^{2+} concentration triggering exocytosis in neuroendocrine cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 12765-12769
- Cocchia D and Michetti F.** (1981) S-100 antigen in satellite cells of the adrenal medulla and the superior cervical ganglion of the rat. An immunochemical and immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* **215**, 103-112
- Cole KS.** (1949) Some physical aspects of bioelectric phenomena. *Proc Natl Acad Sci USA* **35**, 558-566
- Combi R, Dalpra L, Tenchini ML and Ferini-Strambi L.** (2004) Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. A critical overview. *J Neurol* **251**, 923-934
- Corbin J, Methot N, Wang HH, Baenziger JE and Blanton MP.** (1998) Secondary structure analysis of individual transmembrane segments of the nicotinic acetylcholine receptor by circular dichroism and Fourier transform infrared spectroscopy. *J Biol Chem* **273**, 771-777
- Coupland RE.** (1965) The natural history of the chromaffin cell. *Longmans*, London. Longmans, Green.
- Crespi F.** (1991) *In vivo* voltammetric detection of neuropeptides with micro carbon fiber biosensors: possible selective detection of somatostatin. *Anal Biochem* **194**, 69-76
- Cuchillo-Ibáñez I, Olivares R, Aldea M, Villarroya M, Arroyo G, Fuentealba J, García AG and Albillos A.** (2002) Acetylcholine and potassium elicit different patterns of exocytosis in chromaffin cells when the intracellular calcium handling is disturbed. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **444**, 133-142
- Cuchillo-Ibáñez I, Lejen T, Albillos A, Rose SD, Olivares R, Villarroya M, García AG and Trifaró JM.** (2004) Mitochondrial calcium sequestration and protein kinase C cooperate in the regulation of cortical F-actin disassembly and secretion in bovine chromaffin cells. *J Physiol* **560**, 63-76
- Czajkowski C, Kaufmann C and Karlin A.** (1993) Negatively charged amino acid residues in the nicotinic receptor delta subunit that contribute to the binding of acetylcholine. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 6285-6289
- Dajas-Bailador F, Mogg AJ and Wonnacott S.** (2002) Intracellular Ca^{2+} signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells: contribution of voltage-operated Ca^{2+} channels and Ca^{2+} stores. *J Neurochem* **81**, 606-614
- Dajas-Bailador F and Wonnacott S.** (2004) Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signaling. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 317-324
- Dani JA.** (2001) Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol Psych* **49**, 166-174

- Douglas WW and Rubin RP.** (1961) The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J Physiol* **159**, 40-47
- Douglas WW and Poisner AM.** (1965) Preferential release of adrenaline from the adrenal medulla by muscarine and pilocarpine. *Nature* **208**, 1102-1103
- Douglas WW.** (1968) Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol* **34**, 453-474
- Duchen MR.** (1999) Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signaling and cell death. *J Physiol* **516**, 1-17
- Duvoisin RM, Deneris ES, Patrick J and Heinemann S.** (1989) The functional diversity of the neuronal nicotinic acetylcholine receptors is increased by a novel subunit: beta4. *Neuron* **3**, 487-496
- Elgoyhen AB, Johnson DS, Boulter J, Vetter DE and Heinemann S.** (1994) $\alpha 9$: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* **79**, 705-715
- Elgoyhen AB, Vetter DE, Katz E, Rothlin CV, Heinemann SF and Boulter J.** (2001) $\alpha 10$: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 3501-3506
- Fabiato A.** (1983) Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* **245**, 1-14
- Fawcett DW, Jensch RP and Bloom W.** (2002) "Bloom & Fawcett's Concise Histology". Arnold, London.
- Feldberg W, Mintz B and Tsudzimura H.** (1934) The mechanism of the nervous discharge of adrenaline. *J Physiol* **331**, 577-597
- Feltz A and Trautmann A.** (1982) Desensitization at the frog neuromuscular junction: a biphasic process. *J Physiol* **322**, 257-272
- Fenwick EM, Marty A and Neher E.** (1982) Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol* **331**, 599-635
- Fomina AF and Nowycky MC.** (1999) A current activated on depletion of intracellular Ca^{2+} stores can regulate exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* **19**, 3711-3722
- Forsberg EJ, Rojas E and Pollard HB.** (1986) Muscarinic receptor enhancement of nicotine-induced catecholamine secretion may be mediated by phosphoinositide metabolism in bovine adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem* **261**, 4815-4920
- Fox AP, Nowycky MC and Tsien RW.** (1987) Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. *J Physiol* **394**, 173-200

- Freedman SB, Harley EA, Iversen LL.** (1988) Relative affinities of drugs acting at cholinergic receptors in displacing agonist and antagonist radioligands: the NMS/Oxo-M ratio as an index of efficacy at cortical muscarinic receptors. *Br J Pharmacol* **93**, 437-445
- Freedman R, Adams CE, Adler LE, Bickford PC, Gault J, Harris JG, Nagamoto HT, Olincy A, Ross RG and Stevens KE et al.** (2000) Inhibitory neurophysiological deficit as a phenotype for genetic investigation of schizophrenia. *Am J Med Genet* **97**, 58-64
- Fuentealba J, Olivares R, Alés E, Tapia L, Rojo J, Arroyo G, Aldea M, Criado M, Gandía L and García AG.** (2004) A choline-evoked $[Ca^{2+}]_c$ signal causes catecholamine release and hyperpolarization of chromaffin cells. *FASEB J Express*, published online July 1
- Fujita H, Tanizawa Y and Hiura M.** (1976) Ontogenesis of granule formation in adrenal chromaffin cells of the chick. En: *Chromaffin, enterochromaffin and related cells*. Ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 1-12
- Fujita T, Kanno T and Kobayashi S.** (1988) Adrenal chromaffin cells. En: *The paraneuron*. Ed. Springer-Verlag, Tokio, pp. 135-144
- Gahring LC and Rogers SW.** (2005) Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells. *AAPS J* **7**, 885-894
- Gandía L, Albillos A and García AG.** (1993a) Bovine chromaffin cells possess FTX-sensitive calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun* **194**, 671-676
- Gandía L, García AG and Morad M.** (1993b) ATP modulation of calcium channels in chromaffin cells. *J Physiol* **470**, 55-72
- García AG, Sala F, Reig JA, Viniegra S, Frías J, Fonteriz R and Gandía L.** (1984) Dihydropyridine Bay-K-8644 activates chromaffin cell calcium channels. *Nature* **309**, 69-71
- García AG, Gandía L, López MG and Montiel C.** (2000) Calcium channels for exocytosis: functional modulation with toxins. En *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection*. Ed. Botana L. Marcel-Decker, New York, pp. 91-124
- García AG, García-de-Diego AM, Gandía L, Borges R and García-Sancho J.** (2006) Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev* **86**, 1093-1131
- García-de-Diego AM, Arnaiz JJ, Hernández-Guijo JM, Gandía L and García AG.** (2006) Different patterns of exo-endocytosis elicited by acetylcholine-type action potential trains or by single square depolarizing pulses in bovine chromaffin cells. *J Physiol*, in press.
- García-Guzmán M, Sala F, Sala S, Campos-Caro A, Stuhmer W, Gutiérrez LM and Criado M.** (1995) alpha-Bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors on bovine chromaffin cells: molecular cloning, functional expression and alternative splicing of the alpha7 subunit. *Eur J Neurosci* **7**, 647-655

- García-Palomero E, Cuchillo-Ibáñez I, García AG, Renart J, Albillos A and Montiel C.** (2000) Greater diversity than previously thought of chromaffin cell Ca^{2+} channels, derived from mRNA identification studies. *FEBS Lett* **481**, 235-239
- Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Belan PV and Petersen OH.** (1996) Inositol triphosphate and cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca^{2+} from single isolated pancreatic zymogen granules. *Cell* **84**, 473-480
- Gil A, Rueda J, Viniegra S and Gutiérrez LM.** (2000) The F-actin cytoskeleton modulates slow secretory components rather than readily releasable vesicle pools in bovine chromaffin cells. *Neuroscience* **98**, 605-614
- Gillis KD, Mossner R and Neher E.** (1996) Protein kinase C enhances exocytosis from chromaffin cells by increasing the size of the readily releasable pool of secretory granules. *Neuron* **16**, 1209-1220
- Giniatullin R, Nistri A and Yakel JL.** (2005) Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. *Trends Neurosci* **28**, 371-378
- Glowinski J.** (1973) Some characteristics of the "functional" and "main storage" compartments in central catecholaminergic neurons. *Brain Res* **62**, 489-493
- Goldstein M, Fuxe K, Hökfelt T and Joh TH.** (1971) Immunohistochemical studies of phenylethanolamine N-methyltransferase, dopa decarboxylase and dopamine- β -hydroxylase. *Experientia Basel* **27**, 951-952
- González-García C, Ceña V, Keiser HR and Rojas E.** (1993) Catecholamine secretion induced by tetraethylammonium from cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta* **1177**, 99-105
- González-Rubio JM, Rojo J, Tapia L, Maneu V, Mulet J, Valor LM, Criado M, Sala F, García AG and Gandía L.** (2006) Activation and blockade by choline of bovine $\alpha 7$ and $\alpha 3\beta 4$ nicotinic receptors expressed in oocytes. *Eur J Pharmacol* **535**, 53-60
- Green DJ and Perlman RL.** (1981) On-line measurement of catecholamine secretion. *Anal Biochem* **110**, 270-276
- Gromada J, Hoy M, Renstrom E, Bokvist K, Eliasson L, Gopel S and Rorsman P.** (1999) CaM kinase II-dependent mobilization of secretory granules underlies acetylcholine-induced stimulation of exocytosis in mouse pancreatic β -cells. *J Physiol* **518**, 745-759
- Grynkiewicz G, Poenie M and Tsien RY.** (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**, 3440-3450
- Gueorguiev VD, Zeman R, Hiremagalur B, Menezes A and Sabban EL.** (1999) Differing temporal roles of Ca^{2+} and cAMP in nicotine-elicited elevation of tyrosine hydroxylase mRNA. *Am J Physiol* **276**, 54-65
- Gueorguiev VD, Zeman R, Meyer EM and Sabban EL.** (2000) Involvement of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in activation of tyrosine hydroxylase and dopamine- β -hydroxylase gene expression in PC12 cells. *J Neurochem* **75**, 1997-2005

- Gunter TE, Buntinas L, Sparagna G, Eliseev R and Gunter K.** (2000) Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium* **28**, 285-296
- Hagglad J, Eriksson H and Heilbronn E.** (1985) Oxotremorine acts as a partial nicotinic agonist on cultured chick myotubes. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* **57**, 317-21
- Haigh JR, Parris R and Phillips JH.** (1989) Free concentrations of sodium, potassium and calcium in chromaffin granules. *Biochem J* **259**, 485-491
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B and Sigworth FJ.** (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **391**, 85-100
- Hans M, Illes P and Takeda K.** (1990) The blocking effects of omega-conotoxin on calcium current in bovine chromaffin cells. *Neurosci Lett* **114**, 63-68
- Harkins AB and Fox AP.** (1998) Activation of nicotinic receptors augments calcium channel-mediated exocytosis in PC12 cells. *J Gen Physiol* **111**, 257-269
- Harvey SC and Luetje CW.** (1996) Determinants of competitive antagonist sensitivity on neuronal nicotinic receptor beta subunits. *J Neurosci* **16**, 3798-3806
- Heidelberger R, Heinemann C, Neher E and Matthews G.** (1994) Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature* **371**, 513-515
- Heinemann C, von Ruden L, Chow RH and Neher E.** (1993) A two-step model of secretion control in neuroendocrine cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **424**, 105-112
- Heinemann C, Chow RH, Neher E and Zucker RS.** (1994) Kinetics of the secretory response in bovine chromaffin cells following flash photolysis of caged Ca^{2+} . *Biophys J* **67**, 2546-2557
- Hernández-Guijo JM, Gandía L, Lara B and García AG.** (1998) Autocrine/paracrine modulation of calcium channels in bovine chromaffin cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **437**, 104-113
- Hernández-Guijo JM, Maneu-Flores VE, Ruiz-Nuño A, Villarroya M, García AG and Gandía L.** (2001) Calcium-dependent inhibition of L, N, and P/Q Ca^{2+} channels in chromaffin cells: role of mitochondria. *J Neurosci* **21**, 2553-2560
- Herrera M, Kao LS, Curran D J and Westhead EW.** (1985) Flow-injection analysis of catecholamine secretion from bovine adrenal medulla cells on microbeads. *Anal Biochem* **144**, 218-227
- Herrington J, Park YB, Babcock DF and Hille B.** (1996) Dominant role of mitochondria in clearance of large Ca^{2+} loads from rat adrenal chromaffin cells. *Neuron* **16**, 219-228
- Hille, B.** (1992) *Ionic channels of excitable membranes*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.

- Hodgkin AL, Huxley AF and Katz B.** (1952) Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* **116**, 424-448
- Holets V and Elde R.** (1982) The differential distribution and relationship of serotonergic and peptidergic fibers to sympathoadrenal neurons in the intermediolateral cell column of the rat: a combined retrograde axonal transport and immunofluorescence study. *Neuroscience* **7**, 1155-1174
- Hollins B and Ikeda SR.** (1996) Inward currents underlying action potentials in rat adrenal chromaffin cells. *J Neurophysiol* **76**, 1195-1211
- Holz RW and Senter RA.** (1981) Choline stimulates nicotinic receptors on adrenal medullary chromaffin cells to induce catecholamine secretion. *Science* **214**, 466-468
- Hong SJ and Chang CC.** (1990) Nicotinic actions of oxotremorine on murine skeletal muscle. Evidence against muscarinic modulation of acetylcholine release. *Brain Res* **534**, 142-148
- Horn R and Marty A.** (1988) Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol* **92**, 145-159
- Hoshi T and Smith SJ.** (1987) Large depolarization induces long openings of voltage-dependent calcium channels in adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* **7**, 571-580
- Huganir RL, Delcour AH, Greengard P and Hess GP.** (1986) Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor regulates its rate of desensitization. *Nature* **321**, 774-776
- Ikeda SR.** (1991) Double-pulse calcium channel current facilitation in adult rat sympathetic neurones. *J Physiol* **439**, 181-214
- Inoue M, Lin H, Imanaga I, Ogawa K and Warashina A.** (2004) InsP₃ receptor type 2 and oscillatory and monophasic Ca²⁺ transients in rat adrenal chromaffin cells. *Cell Calcium* **35**, 59-70
- Jones S, Sudweeks S and Yakel JL.** (1999) Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function. *Trends Neurosci* **22**, 555-561
- Johns LM, Levitan ES, Shelden EA, Holz RW and Axelrod D.** (2001) Restriction of secretory granules motion near the plasma membrane of chromaffin cells. *J Cell Biol* **153**, 177-190
- Kageyama H and Guidotti A.** (1984) Effect of alpha-bungarotoxin and etorphine on acetylcholine-evoked release of endogenous and radiolabeled catecholamines from primary culture of adrenal chromaffin cells. *J Neurosci Methods* **10**, 9-16
- Kajiwara R, Sand O, Kidokoro Y, Barish ME and Iijima T.** (1997) Functional organization of chromaffin cells and cholinergic synaptic transmission in rat adrenal medulla. *Jpn J Physiol* **47**, 449-464

- Kaneko S, Maeda T, Kume T, Kochiyama H, Akaike A, Shimohama S and Kimura J.** (1997) Nicotine protects cultured cortical neurons against glutamate-induced cytotoxicity via alpha7-neuronal receptors and neuronal CNS receptors. *Brain Res* **765**, 135-140
- Kanno T.** (1998) Intra- and intercellular Ca²⁺ signaling in paraneurons and other secretory cells. *Jpn J Physiol* **48**, 219-227
- Kao LS and Schneider AS.** (1985) Muscarinic receptors on bovine chromaffin cells mediate a rise in cytosolic calcium that is independent of extracellular calcium. *J Biol Chem* **260**, 2019-2022
- Kataoka Y, Fujimoto M, Alho H, Guidotti A, Geffard M, Kelly GD and Hanbauer I.** (1986) Intrinsic gamma aminobutyric acid receptors modulate the release of catecholamines from canine adrenal glands *in situ*. *J Pharmacol Exp Ther* **239**, 584-590
- Katz B and Thesleff SA.** (1957) Study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J Physiol* **138**, 63-80
- Kidokoro Y and Ritchie AK.** (1980) Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. *J Physiol* **307**, 199-216
- Kilpatrick DL, Slepatis R and Kirshner N.** (1981) Ion channels and membrane potential in stimulus-secretion coupling in adrenal medulla cells. *J Neurochem* **36**, 1245-1255
- Kits KS and Mansvelder HD.** (2000) Regulation of exocytosis in neuroendocrine cells: spatial organization of channels and vesicles, stimulus-secretion coupling, calcium buffers and modulation. *Brain Res Brain Res Rev* **33**, 78-94
- Klein J, González R, Koppen A, Loffelholz K.** (1993) Free choline and choline metabolites in rat brain and body fluids: sensitive determination and implications for choline supply to the brain. *Neurochem Int* **22**, 293-300
- Klingauf J and Neher E.** (1997) Modeling buffered Ca²⁺ diffusion near the membrane: implications for secretion in neuroendocrine cells. *Biophys J* **72**, 674-690
- Knight DE and Kesteven NT.** (1983) Evoked transient intracellular free Ca²⁺ changes and secretion in isolated bovine adrenal medullary cells. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **218**, 177-199
- Kobayashi S.** (1977) Adrenal medulla: chromaffin cells as paraneurons. *Arch Histol Jap* **40**, 61-79
- Koval LM, Yavorskaya EN and Lukyanetz EA.** (2001) Electron microscopic evidence for multiple types of secretory vesicles in bovine chromaffin cells. *Gen Comp Endocrinol* **121**, 261-277
- Krnjevic K and Reinhardt W.** (1979) Choline excites cortical neurons. *Science* **206**, 1321-1323

- Kubo Y and Kidokoro Y.** (1989) Potassium currents induced by muscarinic receptor activation in the rat adrenal chromaffin cell. *Biomed Res* **10**, 71-81
- Kuffler SW and Yoshikami D.** (1975) The number of transmitter molecules in a quantum: an estimate from iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse. *J Physiol* **251**, 465-482
- Kumakura K, Karoum F, Guidotti A and Costa E.** (1980) Modulation of nicotinic receptors by opiate receptor agonists in cultured adrenal chromaffin cells. *Nature* **283**, 489-492
- Lara B, Zapater P, Montiel C, de la Fuente MT, Martínez-Sierra R, Ballesta JJ, Gandía L and García AG.** (1995) Density of apamin-sensitive Ca^{2+} -dependent K^+ channels in bovine chromaffin cells: relevance to secretion. *Biochem Pharmacol* **49**, 1459-1468
- Lara B, López MG, Villarroya M, Gandía L, Cleeman L, Morad M and García AG.** (1997) A caffeine-sensitive Ca^{2+} store modulates K^+ -evoked secretion in chromaffin cells. *Am J Physiol* **272**, 1211-1221
- Lara B, Gandía L, Martínez-Sierra R, Torres A and García AG.** (1998) Q-type Ca^{2+} channels are located closer to secretory sites than L-type channels: functional evidence in chromaffin cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **435**, 472-478
- Lee RW and Trifaró JM.** (1981) Characterization of anti-actin antibodies and their use in immunocytochemical studies on the localization of actin in adrenal chromaffin cells in culture. *Neuroscience* **6**, 2087-2108
- Lester HA, Dibas MI, Dahan DS, Leite JF and Dougherty DA.** (2004) Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends Neurosci* **24**, 329-336
- Lindstrom J, Anand R, Peng X, Gerzanich V, Wang F and Li Y.** (1995) Neuronal nicotinic receptor subtypes. *Ann NY Acad Sci* **757**, 100-116
- Linnoila RI, Diaugustine RP, Hervonen A and Miller RJ.** (1980) Distribution of [Met5]- and [Leu5]-enkephalin-, vasoactive intestinal polypeptide- and substance P-like immunoreactivities in human adrenal glands. *Neuroscience* **5**, 2247-2259
- Livett BG.** (1984) Adrenal medullary chromaffin cells *in vitro*. *Physiol Rev* **64**, 1103-1161
- López MG, Villarroya M, Lara B, Martínez-Sierra R, Albillos A, García AG and Gandía L.** (1994) Q- and L- type Ca^{2+} channels dominate the control of secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett* **349**, 331-337
- López MG, Montiel C, Herrero CJ, García-Palomero E, Mayorgas I, Hernández-Guijo JM, Villarroya M, Olivares R, Gandía L, Mcintosh JM, Olivera BM and García AG.** (1998) Unmasking the functions of the chromaffin cell $\alpha 7$ nicotinic receptor by using short pulses of acetylcholine and selective blockers. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 14184-14189
- Luetje CW and Patrick J.** (1991) Both alpha- and beta-subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* **11**, 837-845

- Malgaroli A and Meldolesi J.** (1991) $[Ca^{2+}]_i$ oscillations from internal stores sustain exocytic secretion from the chromaffin cells of the rat. *FEBS Lett* **283**, 169-172
- Malinski T and Taha Z.** (1992) Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature* **358**, 676-678
- Mandelzys A, De Koninck P and Cooper E.** (1995) Agonist and toxin sensitivities of ACh-evoked currents on neurons expressing multiple nicotinic ACh receptor subunits. *J Neurophysiol* **74**, 1212-1221
- Maneu V, Rojo J, Mulet J, Valor LM, Sala F, Criado M, García AG and Gandía L.** (2002) A single neuronal nicotinic receptor $\alpha 3\alpha 7\beta 4^*$ is present in the bovine chromaffin cell. *Ann NY Acad Sci* **971**, 165-167
- Mansvelder HD, Keath JR and McGehee DS.** (2002) Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron* **33**, 905-919
- Marmont G.** (1949) Studies on the axon membrane; a new method. *J Cell Physiol* **34**, 351-382
- Martin AO, Mathieu MN, Chevillard C and Guerinéau NC.** (2001) Gap junctions mediate electrical signaling and ensuing cytosolic Ca^{2+} increases between chromaffin cells in adrenal slices: A role in catecholamine release. *J Neurosci* **21**, 5397-5405
- Martin AO, Mathieu MN and Guerinéau NC.** (2003) Evidence for long-lasting cholinergic control of gap junctional communication between adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* **23**, 3669-3678
- Martin BR, Onaivi ES and Martin TJ.** (1989) What is the nature of mecamylamine's antagonism of the central effects of nicotine? *Biochem Pharmacol* **38**, 3391-3397
- Marty A.** (1981) Ca^{2+} -dependent K^+ channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature* **291**, 497-500
- Marubio LM, Gardier AM, Durier S, David D, Klink R, Arroyo-Jimenez MM, McIntosh JM, Rossi F, Champtiaux N, Zoli M and Changeux JP.** (2003) Effects of nicotine in the dopaminergic system of mice lacking the $\alpha 4$ subunit of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Neurosci* **17**, 1329-1337
- McGehee DS and Role LW.** (1995) Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu Rev Physiol* **57**, 521-546
- Meir A, Ginsburg S, Butkevich A, Kachalsky SG, Kaiserman I, Ahdut R, Demirgoren S and Rahamimoff R.** (1999) Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiol Rev* **79**, 1019-1088
- Meissner G, Darling E and Eveleth J.** (1986) Kinetics of rapid Ca^{2+} release by sarcoplasmic reticulum. Effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} , and adenine nucleotides. *Biochemistry* **25**, 236-244

- Meldolesi J and Pozzan T.** (1998) The endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci* **23**, 10-14
- Millar NS.** (2003) Assembly and subunit diversity of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Soc Trans* **31**, 869-874
- Minta A, Kao JP and Tsien RY.** (1989) Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem* **264**, 8171-8178
- Miyakawa T, Mizushima A, Hirose K, Yamazawa T, Bezprozvanny I, Kurosaki T and Iino M.** (2001) Ca^{2+} -sensor region of IP_3 receptor controls intracellular Ca^{2+} signaling. *EMBO J* **20**, 1674-1680
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Stowell M and Unwin N.** (1999) Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J Mol Biol* **288**, 765-786
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y and Unwin N.** (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* **423**, 949-955
- Mollard P, Seward EP and Nowycky MC.** (1995) Activation of nicotinic receptors triggers exocytosis from bovine chromaffin cells in the absence of membrane depolarization. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 3065-3069
- Monod J, Wyman J and Changeux JP.** (1965) On the Nature of Allosteric Transitions: a plausible model. *J Mol Biol* **12**, 88-118
- Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibáñez I, Albillos A, García AG, García-Sancho J and Álvarez J.** (2000) Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol* **2**, 57-61
- Montero M, Alonso MT, Albillos A, Cuchillo-Ibáñez I, Olivares R, García AG, García-Sancho J and Álvarez J.** (2001) Control of secretion by mitochondria depends on the size of the local $[Ca^{2+}]$ after chromaffin cell stimulation. *Eur J Neurosci* **13**, 2247-2254
- Montiel C, López MG, Sánchez-García P, Maroto R, Zapater P and García AG.** (1995) Contribution of SK and BK channels in the control of catecholamine release by electrical stimulation of the cat adrenal gland. *J Physiol* **486**, 427-437
- Morgan A and Burgoyne RD.** (1995) A role for soluble NSF attachment proteins (SNAPs) in regulated exocytosis in adrenal chromaffin cells. *EMBO J* **14**, 232-239
- Moro MA, López MG, Gandía L, Michelena P and García AG.** (1990) Separation and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medullae. *Anal Biochem* **185**, 243-248
- Moro MA, Michelena P, Sánchez-García P, Palmer R, Moncada S and García AG.** (1993) Activation of adrenal medullary L-arginine: nitric oxide pathway by stimuli which induce the release of catecholamines. *Eur J Pharmacol* **246**, 213-218
- Moser T and Neher E.** (1997) Rapid exocytosis in single chromaffin cells recorded from mouse adrenal slices. *J Neurosci* **17**, 2314-2323

- Moser T.** (1998) Low-conductance intercellular coupling between mouse chromaffin cells in situ. *J Physiol* **506**, 195-205
- Mundorf ML, Troyer KP, Hochstetler SE, Near JA and Wightman RM.** (2000) Vesicular Ca^{2+} participates in the catalysis of exocytosis. *J Biol Chem* **275**, 9136-9142
- Nassar-Gentina V, Pollard HB and Rojas E.** (1988) Electrical activity in chromaffin cells of intact mouse adrenal gland. *Am J Physiol* **254**, 675-683
- Neely A and Lingle CJ.** (1992) Effects of muscarine on single rat adrenal chromaffin cells. *J Physiol* **453**, 133-166
- Neher E and Augustine GJ.** (1992) Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *J Physiol* **450**, 273-301
- Neher E and Zucker RS.** (1993) Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron* **10**, 21-30
- Neher E.** (1998) Vesicle pools and Ca^{2+} microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* **20**, 389-399
- Nowycky MC, Fox AP and Tsien RW.** (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* **316**, 440-443
- Núñez L, de la Fuente MT, García AG and García-Sancho J.** (1995) Differential Ca^{2+} responses of adrenergic and noradrenergic chromaffin cells to various secretagogues. *Am J Physiol* **269**, 1540-1546
- Ñeco P, Gil A, Frances M del M, Viniegra S and Gutiérrez LM.** (2002) The role of myosin in vesicle transport during bovine chromaffin cell secretion. *Biochem J* **368**, 405-413
- Ñeco P, Giner D, Viniegra S, Borges R, Villarroel A and Gutiérrez LM.** (2004) New roles of myosin II during vesicle transport and fusion in chromaffin cells. *J Biol Chem* **279**, 27450-27457
- Ochoa EL, Chattopadhyay A and McNamee MG.** (1989) Desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor: molecular mechanisms and effect of modulators. *Cell Mol Neurobiol* **9**, 141-178
- Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J and Adams ME** (1994). Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu Rev Biochem* **63**, 823-867
- Ornberg RL, Furuya S, Goping G and Kuijpers GAJ.** (1995) Granule swelling in stimulated bovine adrenal chromaffin cells: regulation by internal granule pH. *Cell Tissue Res* **279**, 85-92
- O'Sullivan AJ and Burgoyne RD.** (1989) A comparison of bradykinin, angiotensin II and muscarinic stimulation of cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Biosci Rep* **9**, 243-252

- Pan CY and Fox AP.** (2000) Rundown of secretion after depletion of intracellular calcium stores in bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem* **75**, 1132-1139
- Papke RL and Heinemann SF.** (1991) The role of the beta4 subunit in determining the kinetic properties of rat neuronal nicotinic acetylcholine alpha3 receptors. *J Physiol* **440**, 95-112
- Papke RL, Bencherif M and Lippiello P.** (1996) An evaluation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation by quaternary nitrogen compounds indicates that choline is selective for the alpha7 subtype. *Neurosci Lett* **213**, 201-204
- Paradiso KG and Steinbach JH.** (2003) Nicotine is highly effective at producing desensitization of rat $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic receptors. *J Physiol* **553**, 857-871
- Parekh AB and Putney JW Jr.** (2005) Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* **85**, 757-810
- Parsons TD, Coorsen JR, Horstmann H and Almers W.** (1995) Docked granules, the exocytic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells. *Neuron* **15**, 1085-1096
- Pedersen SE and Cohen JB.** (1990) d-Tubocurarine binding sites are located at alpha-gamma and alpha-delta subunit interfaces of the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 2785-2789
- Pelto-Huikko M, Salminen T and Hervonen A.** (1985) Localization of enkephalins in adrenaline cells and the nerves innervating adrenaline cells in rat adrenal medulla. *Histochemistry* **82**, 377-383
- Peters JA, Lambert JJ and Cottrell GA.** (1989) An electrophysiological investigation of the characteristics and function of GABA_A receptors on bovine adrenomedullary chromaffin cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **415**, 95-103
- Perrin D and Aunis D.** (1985) Reorganization of alpha-fodrin induced by stimulation in secretory cells. *Nature* **315**, 589-592
- Perrin D, Langley OK and Aunis D.** (1987) Anti-alpha-fodrin inhibits secretion from permeabilized chromaffin cells. *Nature* **326**, 498-501
- Phillips JH.** (1982) Dynamic aspects of chromaffin granule structure. *Neurosci* **7**, 1595-1609
- Picciotto MR, Zoli M, Rimondini R, Lena C, Marubio LM, Pich EM, Fuxe K and Changeux JP.** (1998) Acetylcholine receptors containing the $\beta 2$ subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature* **391**, 173-177
- Pivovarova NB, Hongpaisan J, Andrews SB and Friel DD.** (1999) Depolarization-induced mitochondrial Ca accumulation in sympathetic neurons: spatial and temporal characteristics. *J Neurosci* **19**, 6372-6384

- Plattner H, Artalejo AR and Neher E.** (1997) Ultrastructural organization of bovine chromaffin cell cortex-analysis by cryofixation and morphometry of aspects pertinent to exocytosis. *J Cell Biol* **139**, 1709-1717
- Powell AD, Teschemacher AG and Seward EP.** (2000) P2Y purinoceptors inhibit exocytosis in adrenal chromaffin cells via modulation of voltage-operated calcium channels. *J Neurosci* **20**, 606-616
- Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P and Meldolesi J.** (1994) Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* **74**, 595-636
- Putney JW Jr.** (2003) Capacitative calcium entry in the nervous system. *Cell Calcium* **34**, 339-344
- Quick MW and Lester RAJ.** (2002) Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J Neurobiol* **53**, 457-478
- Rae J, Cooper K, Gates P and Watsky M.** (1991) Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *J Neurosci Methods* **37**, 15-26
- Ramírez-Latorre J, Yu CR, Qu X, Perin F, Karlin A and Role L.** (1996) Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature* **380**, 347-351
- Reeves JP and Hale CC.** (1984) The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange system. *J Biol Chem* **259**, 7733-7739
- Reim K, Mansour M, Varoqueaux F, McMahon HT, Sudhof TC, Brose N and Rosenmund C.** (2001) Complexins regulate a late step in Ca²⁺-dependent neurotransmitter release. *Cell* **104**, 71-81
- Rizzuto R, Brini M, Murgia M and Pozzan T.** (1993) Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* **262**, 744-747
- Roe MW, Lemasters JJ and Herman B.** (1990) Assessment of Fura-2 for measurements of cytosolic free calcium. *Cell Calcium* **11**, 63-73
- Role LW.** (1984) Substance P modulation of acetylcholine-induced currents in embryonic chicken sympathetic and ciliary ganglion neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 2924-2928
- Rorsman P, Eliasson L, Renstrom E, Gromada J, Barg S and Gopel S.** (2000) The cell physiology of biphasic insulin secretion. *News Physiol Sci* **15**, 72-77
- Roth D and Burgoyne RD.** (1994) SNAP-25 is present in a SNARE complex in adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett* **351**, 207-210
- Sargent PB.** (1993) The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Neurosci* **16**, 403-443

- Schneider AS, Herz R and Rosenheck K.** (1977) Stimulus-secretion coupling in chromaffin cells isolated from bovine adrenal medulla. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5036-5040
- Seddik R, Bradaia A and Trouslard J.** (2003) Choline induces Ca^{2+} entry in cultured sympathetic neurones isolated from rat superior cervical ganglion. *Eur J Pharmacol* **471**, 165-176
- Sharples CGV and Wonnacott S.** (2001) Neuronal nicotinic receptors. *Tocris Reviews* **19**, 1-12 (from Tocris Cookson Inc., USA).
- Shimohama S, Akaike A and Kimura J.** (1996) Nicotine-induced protection against glutamate cytotoxicity. Nicotinic cholinergic receptor-mediated inhibition of nitric oxide formation. *Ann NY Acad Sci* **777**, 356-361
- Shirvan MH, Pollard HB and Heldman E.** (1991) Mixed nicotinic and muscarinic features of cholinergic receptor coupled to secretion in bovine chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 4860-4864
- Sine SM.** (1993) Molecular dissection of subunit interfaces in the acetylcholine receptor: identification of residues that determine curare selectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 9436-9440
- Smith C, Moser T, Xu T and Neher E.** (1998) Cytosolic Ca^{2+} acts by two separate pathways to modulate the supply of release-competent vesicles in chromaffin cells. *Neuron* **20**, 1243-1253
- Smulders CJGM, Zwart R, Bermudez I, van Kleef RGDM, Groot-Kormelink PJ and Vijverberg HPM.** (2005) Cholinergic drugs potentiate human nicotinic $\alpha 4\beta 2$ acetylcholine receptors by a competitive mechanism. *Eur J Pharmacol* **509**, 97-108
- Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH and Rothman JE.** (1993) A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* **75**, 409-418
- Sontag JM, Sanderson P, Klepper M, Aunis D, Takeda K and Bader MF.** (1990) Modulation of secretion by dopamine involves decreases in calcium and nicotinic currents in bovine chromaffin cells. *J Physiol* **427**, 495-517
- Sorensen JB, Nagy G, Varoquaux F, Nehring RB, Brose N, Wilson MC and Neher E.** (2003) Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23. *Cell* **114**, 75-86
- Sorensen JB.** (2004) Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **448**, 347-362
- Sorensen JB.** (2005) SNARE complexes prepare for membrane fusion. *Trends Neurosci* **28**, 453-455
- Steyer JA, Horstmann H and Almers W.** (1997) Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature* **388**, 474-478

- Steyer JA and Almers W.** (1999) Tracking single secretory granules in live chromaffin cells by evanescent-field fluorescence microscopy. *Biophys J* **76**, 2262-2271
- Sudhof TC.** (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* **375**, 645-653
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R and Brunger AT.** (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395**, 347-353
- Tang YM, Travis ER, Wightman RM and Schneider AS.** (2000) Sodium-calcium exchange affects local calcium signal decay and the rate of exocytotic secretion in single chromaffin cells. *J Neurochem* **74**, 702-710
- Tapper AR, McKinney SL, Nashmi R, Schwarz J, Deshpande P, Labarca C, Whiteaker P, Marks MJ, Collins AC and Lester HA.** (2004) Nicotine activation of $\alpha 4^*$ receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. *Science* **306**, 1029-1032
- Taylor CW.** (1998) Inositol triphosphate receptors: Ca^{2+} -modulated intracellular Ca^{2+} channels. *Biochim Biophys Acta* **1436**, 19-33
- Taylor CW and Laude AJ.** (2002) IP_3 receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca^{2+} . *Cell Calcium* **32**, 321-334
- Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR and Dawson AP.** (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 2466-2470
- Thomas P, Wong JG and Almers W.** (1993) Millisecond studies of secretion in single rat pituitary cells stimulated by flash photolysis of caged Ca^{2+} . *Embo J* **12**, 303-306
- Trifaró JM and Lee RW.** (1980) Morphological characteristics and stimulus-secretion coupling in bovine adrenal chromaffin cell cultures. *Neuroscience* **5**, 1533-1546
- Trifaró JM and Vitale ML.** (1993) Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *Trends Neurosci* **16**, 466-472
- Trifaró JM, Rose SD, Lejen T and Elzagallaai A.** (2000) Two pathways control chromaffin cell cortical F-actin dynamics during exocytosis. *Biochimie* **82**, 339-352
- Tsien RY.** (1980) New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* **19**, 2396-2404
- Uceda G, Artalejo AR, de la Fuente MT, López MG, Albillos A, Michelena P, García AG and Montiel C.** (1994) Modulation by L-type Ca^{2+} channels and apamin-sensitive K^+ channels of muscarinic responses in cat chromaffin cells. *Am J Physiol* **266**, 1432-1439
- Uceda G, Michelena P, López M, García AG and Colombo J.** (1995) Rat striatal astroglia induces morphological and neurochemical changes in adult bovine,

- adrenergic-enriched adrenal chromaffin cells in vitro. *Restor Neur and Neurosc* **8**, 129-136
- Ulate G, Scott SR, González J, Gilabert JA and Artalejo AR.** (2000) Extracellular ATP regulates exocytosis in inhibiting multiple Ca^{2+} channel types in bovine chromaffin cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **439**, 304-314
- Unsicker K, Rieffert B and Ziegler W.** (1980) Effects of cell culture conditions, nerve growth factor, dexamethasone, and cyclic AMP on adrenal chromaffin cells *in vitro*. *Adv Biochem Psychopharmacol* **25**, 51-59
- Unwin N.** (1993) Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J Mol Biol* **229**, 1101-1124
- Unwin N.** (1995) Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature* **373**, 37-43
- Unwin N.** (2005) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution. *J Mol Biol* **346**, 967-989
- Villalobos C, Núñez L, Montero M, García AG, Alonso MT, Chamero P, Álvarez J and García-Sancho J.** (2002) Redistribution of Ca^{2+} among cytosol and organelle during stimulation of bovine chromaffin cells. *FASEB J* **16**, 343-353
- Villarroya M, Olivares R, Ruiz A, Cano-Abad MF, Pascual R, Lomax RB, López MG, Mayorgas I, Gandía L and García AGG.** (1999) Voltage inactivation of Ca^{2+} entry and secretion associated with N- and P/Q-type but not L-type Ca^{2+} channels of bovine chromaffin cells. *J Physiol* **516**, 421-432
- Vitale ML, Rodriguez Del Castillo A, Tchakarov L and Trifaró JM.** (1991) Cortical filamentous actin disassembly and scinderin redistribution during chromaffin cell stimulation precede exocytosis, a phenomenon not exhibited by gelsolin. *J Cell Biol* **113**, 1057-1067
- Vitale ML, Seward EP and Trifaró JM.** (1995) Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron* **14**, 353-363
- Voets T, Neher E and Moser T.** (1999) Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron* **23**, 607-615
- Voets T.** (2000) Dissection of three Ca^{2+} -dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron* **28**, 537-545
- Voets T, Moser T, Lund PE, Chow RH, Geppert M, Sudhof TC and Neher E.** (2001) Intracellular calcium dependence of large dense-core vesicle exocytosis in the absence of synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 11680-11685
- von Ruden L and Neher E.** (1993) A Ca-dependent early step in the release of catecholamines from adrenal chromaffin cells. *Science* **262**, 1061-1065

- Wakade AR.** (1981) Facilitation of secretion of catecholamines from rat and guinea-pig adrenal glands in potassium-free medium or after ouabain. *J Physiol* **313**, 481-498
- Wang F, Gerzanich V, Wells GB, Anand R, Peng X, Keyser K and Lindstrom J.** (1996) Assembly of human neuronal nicotinic receptor alpha5 subunits with alpha3, beta2, and beta4 subunits. *J Biol Chem* **271**, 17656-17665
- Weber T, Zemelman BV, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, Sollner TH and Rothman JE.** (1998) SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**, 759-772
- Werth JL and Thayer SA.** (1994) Mitochondria buffer physiological calcium loads in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* **14**, 346-356
- White RJ and Reynolds IJ.** (1997) Mitochondria accumulate calcium following intense glutamate stimulation of cultured rat forebrain neurons. *J Physiol* **498**, 31-47
- Williams DA and Fay FS.** (1990) Intracellular calibration of the fluorescent calcium indicator Fura-2. *Cell Calcium* **11**, 75-83
- Wilson SP and Kirshner N.** (1977) The acetylcholine receptor of the adrenal medulla. *J Neurochem* **28**, 687-695
- Winkler H.** (1976) The composition of adrenal chromaffin granules: an assessment of controversial results. *Neuroscience* **1**, 65-80
- Winkler H.** (1993) The adrenal chromaffin granule: a model for large dense core vesicles of endocrine and nervous tissue. *J Anat* **183**, 237-252
- Winkler H and Fischer-Colbrrie R.** (1998) Regulation of the biosynthesis of large dense-core vesicles in chromaffin cells and neurons. *Cell Mol Neurobiol* **18**, 193-209
- Wonnacott S.** (1997) Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* **20**, 92-98
- Wurtman RJ, Hirsch MJ and Growdon JH.** (1977) Lecithin consumption raises serum-free-choline levels. *Lancet* **2**, 68-69
- Xian H, Coggan JS, Knoper SR and Kreulen DL.** (1994) The muscarinic receptor agonist oxotremorine methiodide evokes a nicotinic response in mammalian sympathetic neurons. *Eur J Pharmacol* **259**, 21-25
- Yarom Y, Sugimori M and Llinas R.** (1985) Ionic currents and firing patterns of mammalian vagal motoneurons *in vitro*. *J Neurosci* **16**, 719-737
- Zanardi A, Leo G, Biagini G and Zoli M.** (2002) Nicotine and neurodegeneration in ageing. *Toxicology Letters* **127**, 207-215
- Zhang H and Karlin A.** (1997) Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the M1 segment of the beta-subunit. *Biochemistry* **36**, 15856-15864

- Zhou XF and Livett BG.** (1990) Substance P increases catecholamine secretion from perfused rat adrenal glands evoked by prolonged field stimulation. *J Physiol* **425**, 321-334
- Zhou Z and Neher E.** (1993) Calcium permeability of nicotinic acetylcholine receptor channels in bovine adrenal chromaffin cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **425**, 511-517
- Zhou Z and Mislér S.** (1995) Action potential-induced quantal secretion of catecholamines from rat adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem* **270**, 3498-3505
- Zucchi R and Ronca-Testoni S.** (1997) The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev* **49**, 1-51
- Zwart R and Vijverberg HPM.** (1997) Potentiation and inhibition of neuronal nicotinic receptors by atropine: competitive and noncompetitive effects. *Mol Pharmacol* **52**, 886-895
- Zwart R, van Kleef RGDM and Vijverberg HPM.** (1999) Physostigmine and atropine potentiate and inhibit neuronal $\alpha 4\beta 4$ nicotinic receptors. *Ann NY Acad Sci* **886**, 636-839
- Zwart R and Vijverberg HPM.** (2000) Potentiation and inhibition of neuronal $\alpha 4\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors by choline. *Eur J Pharmacol* **393**, 209-214