

615 (J.B.2)
S.R.
J.C.
T

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

-o0o-

INFLUENCIA DEL LITIO SOBRE LA SECRECION
ADRENOMEDULAR DE CATECOLAMINAS

-o0o-

TESIS DOCTORAL

M^a ANTONIA SERRANO CASTRO

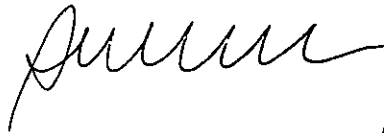
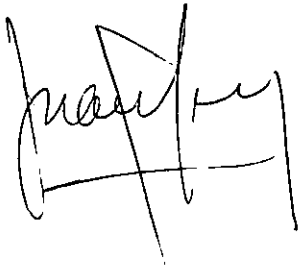
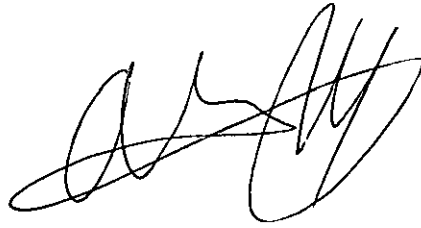
Reg. F. M. 9.602

MADRID, 1989

UNIVERSIDAD
AUTONOMA
DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
BIBLIOTECA

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral
con la censura de *Apto "Cum laude" por unanimidad*

Madrid, 19 de Diciembre de 1989





Facultad de Medicina
Departamento de Farmacología y Terapéutica

PEDRO SANCHEZ GARCIA, Catedrático y Director del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

C E R T I F I C A: Que la Tesis Doctoral que lleva por título: "INFLUENCIA DEL LITIO SOBRE LA SECRECIÓN ADRENOMEDULAR DE CATECOLAMINAS" de la que es autora Doña MARIA ANTONIA SERRANO CASTRO, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que conste y a petición del interesado, firma el presente certificado en Madrid, dos de Octubre de mil novecientos ochenta y nueve.

A handwritten signature in black ink is written over a circular official stamp. The stamp contains the text 'UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID' and 'FACULTAD DE MEDICINA' around its perimeter. The signature is a cursive script that extends to the right of the stamp.

Fdo.: Prof. Pedro Sánchez García

Este trabajo ha sido subvencionado con ayudas de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (Ministerio de Educación y Ciencia) y del Fondo de Investigaciones Sanitarias (INSALUD).

A mi Familia

A mamá Petra

Sirva este apartado para dejar constancia de algunos efectos del litio no relacionados con la secreción catecolaminérgica pero muy importantes para quien es autora de esta Tesis Doctoral.

- Gracias a este elemento he descubierto en el Profesor Pedro Sánchez a mi Maestro.
- Con el litio he tenido la oportunidad de compartir el quehacer cotidiano en el laboratorio con mis entrañables compañeros: Paco de Abajo, Belén Garijo, Carmen R. Lopo y Antonio R. Artalejo; con su colaboración y apoyo me han enseñado que lo difícil llega a resultar fácil.
- Por este pequeño ión he convivido con el buen hacer y entusiasmo de los miembros del Departamento; esta experiencia, sin duda positiva, siempre influirá en mi trabajo.
- Este elemento me ha permitido comprobar, una vez más, la excelente labor de Estanislao Prado en la mecanografía y de Matilde de Abajo en las figuras.
- También por el litio, otras personas me han prestado de algún modo su desinteresada colaboración.

Reconozco que mi deuda es enorme, y en esta situación solo acierto a decir GRACIAS.

"Cuando todo parece ocurrir de forma apacible y adecuada, el progreso puede ser imposible porque no hay problema alguno que pueda ser utilizado como aliciente para la superación."

Edward de Bono, 1967

The Use of Lateral Thinking

I N D I C E

| | <u>PAGINA</u> |
|--|---------------|
| I. INTRODUCCION | 1 |
| 1.- Las catecolaminas como neurotransmisores químicos | 1 |
| 2.- Aspectos morfológicos y funcionales de la glándula adrenal | 4 |
| 3.- La célula cromafín como modelo de paraneurona . | 6 |
| 4.- Síntesis y almacenamiento de las catecolaminas. | 8 |
| 5.- El proceso secretor de catecolaminas | 11 |
| 6.- El calcio: la señal intracelular | 12 |
| 7.- Trásiego de iones a nivel de membrana y actividad celular | 14 |
| 8.- Regulación de la concentración intracelular de calcio..... | 15 |
| 9.- Importancia funcional del sodio en la célula cromafín | 41 |
| 10.- El Litio: similitudes con el Na y otros cationes celulares | 50 |
| | .../... |

| | <u>PAGINA</u> |
|---|---------------|
| II. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y OBJETIVOS | 54 |
| III. MATERIAL Y METODO | 56 |
| 1.- Preparación de la glándula adrenal para su perfusión "in vitro" | 56 |
| 2.- Líquidos de perfusión y fármacos utilizados . | 57 |
| 3.- Diseño experimental | 60 |
| 4.- Método para medir la concentración de catecolaminas | 61 |
| 5.- Análisis estadístico | 65 |
| IV. RESULTADOS | 66 |
| 1.- Liberación espontánea de catecolaminas en la glándula adrenal de gato | 66 |
| 2.- Liberación de catecolaminas evocada por litio en la glándula adrenal de gato perfundida | 66 |
| 3.- Efecto de mecamilamina más atropina sobre la liberación de catecolaminas inducida por Li .. | 71 |
| | .../... |

| | |
|--|-----|
| 4.- Efecto de la sustitución del Li por Na o <u>sa</u> carosa en el líquido de perfusión sobre la secreción de catecolaminas inducida por Li..... | 72 |
| 5.- Efecto de la sustitución de Na por Li o <u>sa</u> carosa sobre la secreción de catecolaminas observada en glándulas pretratadas con ouabaína y perfundidas con Krebs-normal | 76 |
| 6.- Efecto de la perfusión de las glándulas con Krebs-Li sobre la respuesta secretora <u>evoca</u> da por la reintroducción de Ca | 77 |
| 7.- Efecto de la duración de la perfusión con Krebs-Li y de la concentración de Li en el mismo sobre la respuesta secretora <u>evo</u> cada por la reintroducción de Ca | 83 |
| 8.- Efecto de la presencia de Na, Li y <u>sacaro</u> sa durante la reintroducción de Ca sobre la secreción de catecolaminas evocada | 87 |
| 9.- Efecto de (+)-PN 200-110 sobre la secreción de catecolaminas evocada por Li..... | 90 |
| 10.- Reversibilidad de la respuesta secretora de catecolaminas inducida por Li..... | 96 |
| 11.- Efecto de la inhibición de la bomba de Na con ouabaína sobre la secreción de <u>cateco</u> laminas evocada por Li | 100 |

| | <u>PAGINA</u> |
|---|---------------|
| V. DISCUSION | 107 |
| 1. El Li como elemento activador del proceso secretor de catecolaminas en la médula adrenal | 109 |
| 2. Posibles mecanismos implicados en la secre ción de catecolaminas inducida por litio | 110 |
| 3. Contribución de la bomba de Na a la extru sión de Li en la célula cromafín | 120 |
| VI. CONCLUSIONES | 124 |
| VII. RESUMEN | 127 |
| VIII. BIBLIOGRAFIA | 128 |

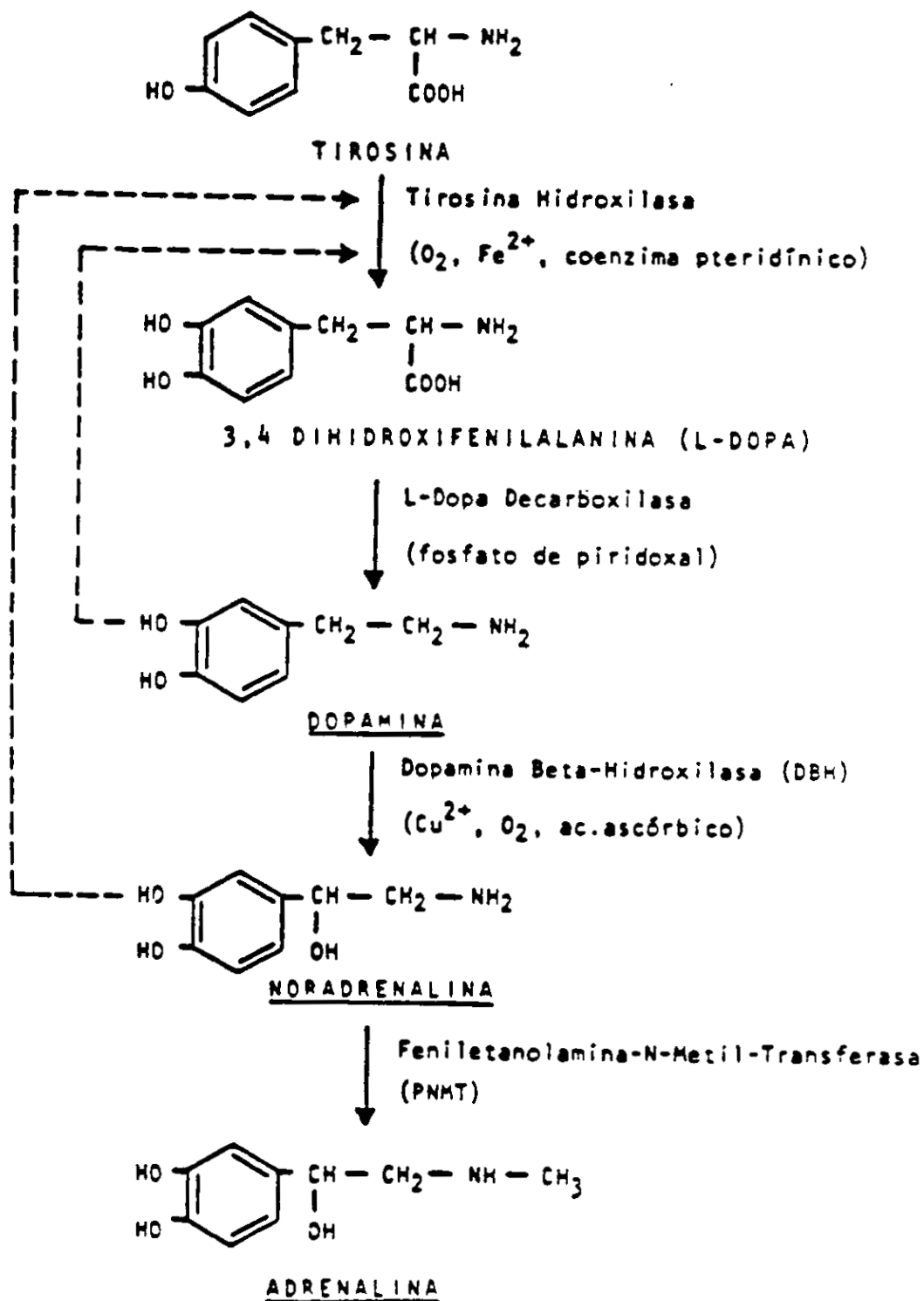
I.- INTRODUCCION

1.- LAS CATECOLAMINAS COMO NEUROTRANSMISORES QUIMICOS

Las catecolaminas son aminos simpaticomiméticas que poseen un grupo aromático común dihidroxifenilo o catecol y una cadena lateral etilamino con diversas modificaciones (ver Figura 1). Adrenalina, noradrenalina y dopamina constituyen el conjunto de catecolaminas de origen natural implicados como mediadores químicos en el proceso de comunicación interneuronal. De su descubrimiento deriva el conocimiento actual sobre el fenómeno de la neurotransmisión que ha sido implicado en un gran número de procesos biológicos tanto fisiológicos como patológicos. Además, los estudios realizados en este campo han permitido diseñar nuevos tratamientos farmacológicos eficaces en enfermedades tan comunes como la hipertensión arterial, el asma o la angina de pecho y que suponen sin duda un avance muy importante en la terapéutica moderna.

La noradrenalina se localiza fundamentalmente en las neuronas postganglionares del sistema nervioso simpático y en neuronas adrenérgicas centrales. La adrenalina, considerada clásicamente como una sustancia exclusivamente hormonal liberada a la circulación sistémica por la médula adrenal, ha pasado en los últimos años a ser reconocida como neurotransmisor a nivel del sistema nervioso central a raíz de los estudios de Saavedra y col. (1974) quienes

FIGURA 1. Biosíntesis de las catecolaminas.



detectaron concentraciones apreciables de esta amina en tejido cerebral de rata. Por otra parte, el descubrimiento de que la dopamina se encontraba en concentraciones elevadas en ciertos núcleos cerebrales (Carlsson y col., 1958) permitió catalogar a este precursor de la noradrenalina como un neurotransmisor de pleno derecho. Algunos años después se demostró la implicación de la dopamina en procesos patológicos tan relevantes como la enfermedad de Parkinson (Hornykiewicz, 1973) o la esquizofrenia (Meltzer, 1976).

También se han descrito elementos neuronales conteniendo dopamina en órganos periféricos especialmente riñón (Lackowic y Neff, 1980), y se ha postulado su existencia en otros, como la propia médula adrenal, donde podrían ejercer un efecto modulador de la transmisión adrenérgica (Artalejo y col., 1985; Montiel y col., 1986).

2.- ASPECTOS MORFOLOGICOS Y FUNCIONALES DE LA GLANDULA ADRENAL

En la glándula adrenal (suprarrenal) de los mamíferos existen dos porciones embriológica, morfológica y funcionalmente bien diferenciadas: corteza y médula. La corteza, de origen mesodérmico, no posee inervación y está formada por tres zonas: glomerular, fasciculada y reticular. Su función consiste en elaborar y secretar distintas hormonas esteroideas. La médula puede considerarse parte del sistema nervioso simpático, pues el tipo celular pre-

dominante deriva de un esbozo ectodérmico común para otras neuronas adrenérgicas, la cresta neural. Se trata de la célula cromafín, que debe su nombre al cambio de color característico que sufre al contacto con las sales de cromo. Tanto su desarrollo como su función son influenciados por la corteza que le rodea (Weinkove y Anderson, 1985). Las células cromafines están inervadas por fibras colinérgicas que proceden directamente de la médula espinal (nervios espláncnicos) y pueden considerarse un tipo especializado de neurona ganglionar. Su función es sintetizar y almacenar catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina, en proporciones que varían de una especie a otra), que serán liberadas en situaciones de miedo o estrés en un intento conjunto de todo el sistema nervioso simpático de poner al organismo en condiciones óptimas para acciones físicas rápidas.

Se ha descrito que la hipoglucemia, frío, ejercicio, cirugía, infarto agudo de miocardio etc. causan un incremento en las concentraciones plasmáticas de adrenalina-catecolamina predominante en la médula adrenal humana (Cryer, 1980), y son cada vez más abundantes los estudios que pretenden aclarar el papel que juega el sistema nervioso simpato-adrenal en la protección o desencadenamiento de numerosas enfermedades. La posible utilidad de los implantes cerebrales de médula adrenal en pacientes con enfermedad de Parkinson grave (Goetz y col., 1989), amplía las expectativas acerca de la importancia que puede tener este órgano para el hombre en el futuro.

Además de por su posible significación biológica y terapéutica la médula adrenal ha centrado el interés de numerosos investigadores porque puede ser utilizada como modelo experimental para el estudio del funcionamiento y organización de las células nerviosas (Sanchez Garcia, 1987).

3.- LA CELULA CROMAFIN COMO MODELO DE PARANEURONA

Partiendo de la premisa de que no existen límites rígidos entre las células nerviosas típicas y algunas células endocrinas que secretan péptidos y hormonas, el término "paraneurona" fue propuesto por Fujita y Kobayashi (1975) para abarcar tanto a las células endocrinas con propiedades similares a las neuronas como a las células nerviosas con características endocrinas. Para que una célula pueda considerarse paraneurona debe reunir las siguientes características (Fujita y col., 1988):

- a) Ser capaz de sintetizar: 1) sustancias conocidas como neurotransmisores o sospechosas de serlo, ó 2) sustancias protéicas o polipéptidos que posean acción hormonal.
- b) Poseer vesículas sinápticas y/o gránulos de secreción.
- c) Secretar en respuesta a un estímulo adecuado que actúe sobre un receptor situado en la membrana celular.

Las células cromafines cumplen todas esas características:

- a) Producen y almacenan catecolaminas, en especial adrenalina, pero también noradrenalina y dopamina, e incorporan aminas exógenas y precursores como serotonina, dopa, dopamina y noradrenalina.
- b) Tienen un patrón de almacenamiento común con las paraneuronas. Ya en 1953, Blaschko y Welch y Hillarp y col. obtuvieron indicios de que la noradrenalina se encontraba almacenada en los gránulos subcelulares, dada su escasez en el contenido soluble del citoplasma. Esta sospecha fue confirmada por Lever (1955) dos años más tarde quien mediante técnicas de microscopía electrónica visualizó los gránulos cromafines. Son pequeñas vesículas de unas 0,3 micras de diámetro y se calcula que una célula cromafín contiene alrededor de 30.000.
- c) Secretan el contenido de estas vesículas por un mecanismo de exocitosis en respuesta a la acetilcolina liberada desde el nervio espláncnico. Pero además en condiciones experimentales también secretan catecolaminas en respuesta a un estímulo eléctrico, soluciones despolarizantes que contienen alto potasio, veratridina, inhibidores de la actividad ATPasa Na-K, etc.

El carácter de paraneurona unido al hecho de que pueden ser aisladas y mantenidas en cultivo justifica que las células cromafines sean empleadas como modelo neuronal. Ofrecen además la ventaja de carecer de elemento

postsináptico, lo que permite que el producto de su secreción rico en catecolaminas pueda ser recogido sin interferencias del órgano efector.

4.- SINTESIS Y ALMACENAMIENTO DE LAS CATECOLAMINAS

El proceso de síntesis de las catecolaminas está representado en la figura 1. El primer paso, la conversión de la tirosina en dopa, está catalizado por la tirosina-hidroxilasa (TH) presente en el citoplasma de las células cromafines. Un segundo enzima la dopa-descarboxilasa, también en el citoplasma, transforma rápidamente la dopa en dopamina que es captada por los gránulos cromafines donde tiene lugar su transformación en noradrenalina por la dopamina-beta-hidroxilasa. En algunas células de la médula suprarrenal (el 10% en la especie humana) el proceso de síntesis termina en la noradrenalina, tal como ocurre en las neuronas adrenérgicas, pero en el 90% restante la noradrenalina sale al citoplasma para ser transformada por la feniletanolamina-N-metil-transferasa (PNMT) en adrenalina, que pasará a formar parte del contenido de las vesículas cromafines. El hecho de que en su interior la concentración sea al menos 25.000 veces mayor que la del citosol, da fe de la eficacia del mecanismo de transporte.

El proceso de síntesis de la adrenalina está regulado fundamentalmente a dos niveles. En primer lugar depende del número de moléculas de TH en estado de activación. La

actividad de este enzima es 100 a 1.000 veces inferior a la de los otros tres y constituye por tanto un paso limitante en la producción de todos los tipos de catecolaminas. En segundo lugar, la proporción de adrenalina almacenada en los gránulos secretores se ve influenciada por los glucocorticoides liberados por la corteza adrenal que retardan el ritmo de degradación de la PNMT (Wong y Ciarranello, 1982). El estrés incrementa la actividad de la TH y secundariamente, a través de la liberación concomitante de corticoides, la de la PNMT (Ungar y Phillips, 1983).

Las catecolaminas son almacenadas en los gránulos cromafines junto a otros constituyentes en una solución concentrada que mantiene la estabilidad osmótica gracias a la presencia de ATP. Su acumulación, al igual que la de serotonina o acetilcolina en otros tipos de células secretoras, depende del gradiente electroquímico de protones promovido por la ATPasa de la membrana vesicular, aunque el mecanismo preciso de este proceso de transporte queda todavía por determinar. La composición química de la membrana y el contenido soluble de los gránulos cromafines bovinos aparecen en la Tabla 1. Cromograninas y neuropéptidos constituyen los elementos protéicos más destacados entre los incluidos en las vesículas secretoras. Aunque su función no se conoce con exactitud, las cromograninas podrían estabilizar la presión oncótica en el interior de los gránulos (Helle y col., 1985). Se ha sugerido que los neuropéptidos liberados por la médula adrenal, especialmente las encefalinas, podrían proporcionar cierta analgesia

TABLA 1

COMPOSICION QUIMICA DE LA MEMBRANA Y DEL CONTENIDO SOLUBLE
DE LOS GRANULOS CROMAFINES BOVINOS (WINKLER Y WESTHEAD,
1980)

| | <u>CONSTITUYENTES</u> | <u>Nº. RELATIVO DE MOLECULAS</u> |
|----------|----------------------------|--------------------------------------|
| | DBH | 1 |
| | Cromogranina A | 36 |
| | Encefalinas | 64 |
| Fracción | Catecolaminas | 22.000 |
| soluble | Nucleótidos | 6.830 |
| | Calcio | 660 |
| | Acido ascórbico | 880 |
| | Mucopolisacáridos | 930 |
| | DBH | 1 |
| | ATPasa Mg ²⁺ | 0,05 |
| | Citocromo b ₅₆₁ | 8,4 |
| Membrana | Actina | 0,7 |
| | Fosfolípidos | 2.800 |
| | Colesterol | 1.690 |
| | Mucopolisacáridos | 144 |

durante el estrés (Carmichael y Winkler, 1985), y también ejercer un efecto modulador de la propia secreción de catecolaminas (Critchley y col., 1988).

5.- EL PROCESO SECRETOR DE CATECOLAMINAS

Cuando un impulso nervioso alcanza las neuronas que inervan la médula adrenal, éstas liberan acetilcolina. La interacción de este neurotransmisor con los receptores nicotínicos (y/o muscarínicos según la especie) hace que por un mecanismo dependiente de calcio los gránulos secretorios se aproximen al plasmalema celular con el que se fusionan para verter su contenido al espacio extracelular. Este proceso denominado exocitosis fue sugerido por De Robertis y Vaz Ferreira en 1957 al observar los cambios inducidos en las células cromafines de conejo cuando era estimulado el nervio esplácnico: el aumento de tamaño de las vesículas con disminución de su densidad electrónica, y la unión de muchas de ellas al plasmalema celular que conducía a la completa excreción de su contenido quedando sólo la membrana. Esta evidencia morfológica, comprobada en otros trabajos posteriores (Edwards y col., 1984), es un fiel reflejo de lo que ocurre a nivel molecular. De ello dan prueba los estudios de tipo bioquímico en los que se comprobó que junto con las catecolaminas se liberaban otros componentes intravesiculares de alto peso molecular como las cromograninas que no podrían abandonar la célula de otro modo (Banks y Helle, 1965; Douglas y col., 1965;

Blaschko y col., 1967). Posteriormente, la utilización de técnicas inmunocitoquímicas ha permitido conocer que al aumento de superficie celular determinado por la exocitosis le sigue el desprendimiento de dicha porción de membrana en el interior celular para constituir vesículas endocitóticas que acaban por reciclarse en el aparato de Golgi (Phillips y col., 1983). Hoy se sabe que el proceso de exocitosis constituye el mecanismo primario de liberación de todos los neurotransmisores y hormonas, con excepción de los esteroides.

6.- EL CALCIO: LA SEÑAL INTRACELULAR

Douglas y Rubin en 1961 estudiaron la influencia del medio iónico extracelular en la secreción evocada por un estímulo colinérgico. Sus experimentos revelaron que el calcio era el único elemento necesario y suficiente para poner en marcha el proceso secretor, y este hallazgo les llevó a sugerir que la secreción de catecolaminas se debía a que la acetilcolina aumentaba transitoriamente la permeabilidad al calcio en la membrana de la célula cromafín. En base a estas observaciones encontraron un paralelismo entre el papel desempeñado por el Ca en el proceso secretor y en la contracción muscular, y acuñaron para describir el primero el término acoplamiento estímulo-secreción, similar a la expresión acoplamiento excitación-contracción previamente establecida en relación con la actividad muscular. El hallazgo de que la estimulación promovía la

captación de Ca^{45} en la médula adrenal (Douglas y Poisner, 1962) apoyaba la hipótesis de que el aumento de calcio intracelular era la señal que desencadenaba el proceso secretor. En 1978 Baker y Knight obtuvieron la prueba definitiva. Estos autores sometiendo células cromafines a campos eléctricos intensos pero de breve duración, con lo que aumentaba su permeabilidad a los iones calcio del medio extracelular ("leaky-cells") y evitaban la barrera que supone el plasmalema, observaron que el proceso exocitótico quedaba preservado. Esta es una prueba contundente de que el calcio activa la maquinaria secretora a nivel intracelular. El mecanismo por el cual ejerce este efecto no se ha esclarecido todavía, aunque se han sugerido varias hipótesis. Entre ellas, las que proponen una fosforilación de proteínas dependiente de calcio con participación de proteínas contráctiles a nivel de las vesículas son las que cuentan con más apoyo experimental (Wise y Costa, 1985; Carmichael, 1986).

La importancia de este ion queda fuera de toda duda, pero para que su acción pueda tener efecto deben producirse cambios transitorios en la estructura de la membrana que hagan posible su paso a través de la misma. Por eso, la intervención del Ca sobre las funciones celulares está íntimamente relacionada con los procesos de activación e inactivación de canales, bombas y sistemas de intercambio iónico, enzimas y receptores de la membrana plasmática celular, y en ellos ocupan también un lugar destacado otros cationes como el Na y el K.

7.- TRASIEGO DE IONES A NIVEL DE MEMBRANA Y ACTIVIDAD CELULAR

Todas las células excitables en reposo mantienen en su interior un medio cuya composición difiere marcadamente de la del líquido extracelular. El medio interno es unas 10 veces más rico en K que el externo, mientras que el externo es unas 10 veces más rico en Na que el interno. Por otra parte la concentración de Ca iónico intracelular, en torno a 10^{-7} M, es 4 o 5 órdenes de magnitud más baja que la concentración en el medio extracelular ($[Ca]_e = 1-5 \times 10^{-3}$ M). Estos gradientes iónicos transmembrana, especialmente el de K, condicionan una diferencia de cargas entre el interior y el exterior celular que se expresa en el potencial de membrana (Douglas y col., 1967).

De acuerdo con la teoría iónica formulada por Hodgking y Huxley en 1952, hoy sabemos que los cambios eléctricos en el plasmalema neuronal que se producen como respuesta a diversos estímulos (despolarización / repolarización) son consecuencia de la apertura secuencial y transitoria de canales que permiten el paso transmembrana de Na, Ca y K a favor de su gradiente electroquímico. En la célula cromafín el ionóforo asociado a los receptores colinérgicos y el canal de Na sensible a voltaje son las vías de acceso a la célula para el Na (Cefía y col., 1983; Ito y col., 1978), el K utiliza canales de K dependientes de Ca y canales de K sensibles a voltaje para salir al

espacio extracelular (Marty y Neher, 1985), y el canal de Ca sensible a voltaje es la principal vía de entrada para el Ca (Ceña y col., 1983; García y col., 1986).

El mantenimiento de los gradientes de Na, K y Ca es por tanto imprescindible para que puedan sucederse los periodos de actividad y reposo necesarios para el normal funcionamiento celular. A ello contribuyen los mecanismos de transporte activo a nivel de la membrana, fundamentalmente bombas y sistemas de transporte iónico. Entre ellos, la ATPasa Na-K activada por Mg, al expulsar continuamente iones Na desde el citoplasma al exterior a la vez que introduce K en la célula, contrarresta la pequeña difusión de estos iones que tiene lugar en reposo y facilita su redistribución tras los periodos de actividad.

8.- REGULACION DE LA CONCENTRACION INTRACELULAR DE CALCIO

De todos los iones que intervienen de forma significativa en la actividad biológica, el Ca es el que juega un papel más relevante como mensajero intracelular. El Ca se encuentra en forma libre (iónica) en el citoplasma en muy baja concentración. Según Knight y Kesteven (1983) en el rango de 10^{-7} M en la célula cromafin, más de 20.000 veces inferior a la habitualmente encontrada en el medio extracelular (2,5 mM). A este enorme gradiente transmembrana se debe que la entrada de cantidades relativamente pequeñas de este ion durante los periodos de actividad

incrementen de forma rápida y significativa el nivel de Ca intracelular. La gran versatilidad de este catión para unirse a las macromoléculas (Papahadjopoulos y col., 1978; Rubin, 1982), hace que tal concentración sea suficiente para activar el proceso secretor de catecolaminas.

En estas circunstancias es comprensible que la célula disponga de mecanismos específicamente destinados a mantener las concentraciones de Ca bajo un riguroso control (Figura 2).

8.1.- ENTRADA DE CALCIO EN LA CELULA CROMAFIN

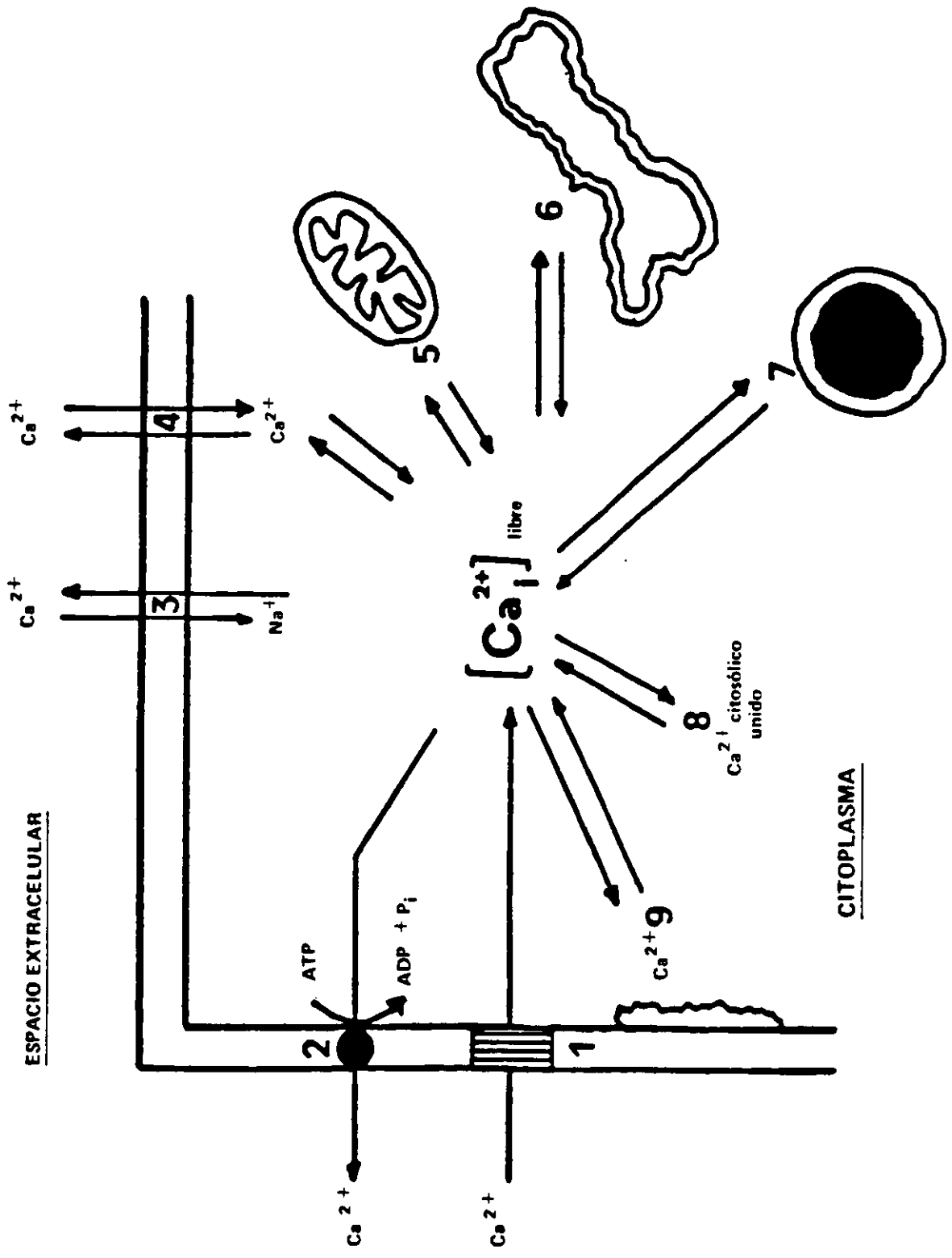
En la célula cromafín se han descrito hasta el momento tres posibles vías de entrada de Ca: el canal de Ca sensible a voltaje (CCSV), el canal asociado a receptores colinérgicos y el sistema de intercambio Na-Ca. Queda por determinar cual es el grado de participación de cada una en la secreción fisiológica de catecolaminas.

8.1.1.- Canales de calcio sensibles a voltaje (CCSV)

Los canales de calcio sensibles a voltaje son estructuras de naturaleza glicoproteica situadas en la membrana celular que se caracterizan por dos propiedades

FIGURA 2. Principales mecanismos que regulan la concentración intracelular de calcio

- 1.- Canal de Ca sensible a voltaje
- 2.- Bomba de Ca (ATPasa de Ca)
- 3.- Intercambio Na-Ca
- 4.- Intercambio Ca-Ca
- 5.- Secuestro de Ca en las mitocondrias
- 6.- Secuestro de Ca en el retículo endoplásmico
- 7.- Secuestro de Ca en los gránulos cromafines
- 8.- Ca unido a proteínas citoplasmáticas
- 9.- Ca unido a proteínas de la membrana



importantes: selectividad iónica (bastante acusada para el paso de Ca) y cinética de apertura y cierre peculiares que dependen de cambios en el potencial de membrana (Hagiwara y Byerly, 1983). Su estudio ha suscitado un enorme interés debido a su amplia distribución en gran variedad de células y participación por tanto en numerosas funciones celulares. En la célula cromafín la densidad de CCSV se estima entre cinco y quince canales por μm^2 (Fenwick y col., 1982; Artalejo y col., 1987).

La identificación de los canales de Ca ha sido posible gracias al desarrollo de técnicas electrofisiológicas que permiten medir la corriente generada por el paso de iones Ca a través de la membrana en ciertos tipos de células excitables (fundamentalmente cardíacas y nerviosas). La aplicación de técnicas de perfusión intracelular y de registro de corrientes iónicas unitarias en zonas reducidas de membrana con fijación de voltaje ("Patch-Clamp") ha hecho posible un rápido avance en el conocimiento de sus propiedades biofísicas (Hagiwara y Byerly, 1983).

Hoy sabemos que los CCSV se abren en ráfagas, es decir, de forma intermitente durante cortos periodos de tiempo separados por momentos en que permanecen cerrados, y se acepta desde un punto de vista funcional la existencia de al menos tres estados diferentes: abierto, cerrado e inactivado (Fenwick y col., 1982). La despolarización aumenta de forma marcada la probabilidad de

que se abra este canal, aunque también se considera un factor que contribuye a su cierre o inactivación (Hurwitz, 1986); sin embargo, en la célula cromafín el aumento de la concentración de calcio intracelular parece ser el principal responsable de que los CCSV pasen a un estado no funcional (Fenwick y col., 1982; Artalejo y col., 1987).

El descubrimiento de una serie de fármacos e iones capaces de impedir de manera más o menos selectiva el paso de Ca a través de los CCSV ha contribuido de manera importante a la identificación de estos canales en múltiples tejidos. Se trata de los comúnmente denominados "antagonistas del calcio", conjunto de sustancias que, atendiendo a su naturaleza química, puede ser dividido en dos grandes grupos:

- a) Inhibidores inorgánicos.
- b) Inhibidores orgánicos.

a) Inhibidores inorgánicos

A este grupo pertenecen el Zn, Cd, La, Ni, Co, Mn y Mg, metales todos ellos con características fisico-químicas similares a las del Ca. Se cree que actúan obstaculizando de forma competitiva el paso de Ca a través del canal posiblemente fijándose a la parte externa del mismo. Gandía y col. (1987) han establecido recientemente sus potencias relativas

como inhibidores de los CCSV en la médula adrenal de gato. Son las siguientes: $Zn > Cd > La > Ni > Co > Mn > Mg$. Sin embargo, todos ellos pueden interferir también el paso de iones a través de otros canales y mecanismos de transporte a nivel de membrana, lo que dificulta su empleo como herramientas experimentales.

b) Inhibidores orgánicos

Los inhibidores orgánicos constituyen un conjunto de sustancias químicamente diferentes que tienen en común la propiedad de bloquear la captación de ^{45}Ca mediada por CCSV en células excitables despolarizadas.

Clasificar estos fármacos no es fácil ya que difieren además, por su especificidad tisular, mecanismo de acción y lugares de fijación en la membrana celular. Siguiendo la clasificación de Spedding (1985) se pueden separar en tres grupos atendiendo a la relación estructura - actividad y a los lugares de fijación en los CCSV:

Clase I. DIHIDROPIRIDINAS (DHP): Nifedipino, Nimodipino, Nitrendipino, Niludipino, Isradipino (PN 200-110), etc.

Clase II. Verapamilo, Metoxiverapamilo (D-600), etc.

Clase III. DIFENILALQUILAMINAS: Cinaricina, Flunaricina, Prenilamina, Fendilina, etc.

Estos fármacos, especialmente las DHP por su mayor selectividad, han sido elementos claves para la identificación de funciones mediadas por CCSV en las células excitables.

En los últimos años se han caracterizado tres tipos de canales de Ca sensibles a voltaje -L, N y T- en base a las diferencias observadas en su sensibilidad a los cambios en el potencial de membrana, propiedades cinéticas y sensibilidad a diversos agentes farmacológicos (Nowycky y col., 1985; Hosey y Lazdunski, 1988). Sólo el tipo L parece ser influenciado por las DHP y se ha sugerido que una distribución tisular desigual podría ser la causa de la escasa actividad que muestra este tipo de fármacos en el SNC con respecto a los efectos marcados sobre miocardio y músculo liso (Spedding y Middlemiss, 1985).

El empleo de las DHP como marcadores específicos ha permitido purificar el CCSV tipo L en el músculo esquelético. En su estructura se han diferenciado cuatro subunidades: α_1 , α_2 , beta y gamma; aunque sus cometidos no han sido totalmente identificados, la subunidad α_1 parece contener el sensor de voltaje, un lugar de fijación para DHP y la vía de conducción iónica del canal; además, junto con beta y gamma parece tener un papel regulador del funcionamiento global del canal (ver Campbell y col., 1988).

La existencia de CCSV en la célula cromafín ha sido puesta de manifiesto mediante diferentes aproximaciones experimentales. Utilizando glándulas adrenales bovinas perfundidas, Pinto y Trifaró (1976) observaron que el metoxiverapamil bloqueaba la respuesta secretora de catecolaminas inducida por alto K y por acetilcolina, aunque la concentración requerida era varios órdenes de magnitud superior a la que ocasionaba este efecto en miocardio y músculo liso vascular. Posteriormente, el estudio electrofisiológico de las corrientes de Ca transmembrana, utilizando técnicas de patch-clamp, permitió a Fenwick y col. (1982) confirmar en la célula cromafín la existencia de CCSV similares a los descritos en la membrana de células musculares y nerviosas.

Las DHP se han revelado como los más potentes -y por ello presumiblemente los más selectivos- inhibidores orgánicos de los CCSV en la médula adrenal. Gandía y col. (1987) observaron que el orden relativo de potencia para inhibir la respuesta secretora de catecolaminas evocada por 35 mM de K en la glándula adrenal de gato perfundida fue el siguiente: (+)PN 200-110 > nisoldipina > nitrendipina > (+)PN 200-110 > nicardipina > (-)Sandoz 202-791 > nimodipina > nifedipina > (-)PN 200-110 > niludipina > verapamil > diltiazem > flunaricina > amlodipina. La IC_{50} para (+)PN 200-110 fue 0,84 nM.

Utilizando ^3H -nitrendipina García y col. (1984) demostraron la existencia de un lugar de unión de alta afinidad (K_D aparente de $1,18 \pm 0,32$ nM) en fragmentos de membrana adrenomedular bovina. Sólo la nitrendipina y el BAY-K-86-44, un agonista de los CCSV también de estructura dihidropiridínica, desplazaron a la ^3H -nitrendipina de sus lugares de fijación. Estos hallazgos apoyan la especificidad del radioligando para el canal de Ca y sugieren que los CCSV tipo L son los predominantes en la célula cromafín.

Recientemente en nuestro laboratorio Artalejo y col. (1988) han demostrado que la acción de las DHP es claramente más eficaz en glándulas adrenales previamente despolarizadas. Que en estas condiciones también se incrementa la fijación tisular de estos fármacos sugiere que el receptor para DHP ocupa un lugar en el interior del canal. La fijación de las DHP se veía facilitada cuando el CCSV se encuentra activado.

8.1.2.- Canales Iónicos asociados a los Colinoceptores

La acetilcolina liberada en los nervios espláncnicos es el neurotransmisor fisiológico que activa el proceso secretor de catecolaminas actuando sobre receptores específicos en la membrana de las células cromafines. La mayoría de las especies (gato, perro, rata ...) poseen tanto colinoceptores muscarínicos

como nicotínicos y ambos intervienen en la liberación de catecolaminas, aunque el receptor nicotínico parece el responsable principal de la respuesta secretora. Sin embargo, las células cromafines del pollo sólo disponen de receptores muscarínicos, y en las bovinas, aunque existen receptores muscarínicos, su estimulación no ocasiona respuesta secretora alguna (Borges y col., 1987)

Estas sorprendentes diferencias de especie son todavía mal comprendidas y se ignora cuál puede ser la finalidad funcional de los receptores muscarínicos en células en las que predominan los nicotínicos. Sin embargo, en aquellas especies en que la estimulación de los receptores muscarínicos promueve la secreción de catecolaminas se piensa que el receptor estaría acoplado a un canal iónico (ionóforo) que permitiría la entrada al Ca cuando es estimulado (Borges y col., 1987).

El receptor nicotínico es mucho mejor conocido, especialmente por los estudios realizados en músculo estriado y en los órganos eléctricos del pez Torpedo, extraordinariamente ricos en este tipo de receptor. Se sabe que es una estructura protéica de unos 90 Å de diámetro que atraviesa la membrana plasmática, constituida por cinco subunidades (2 alfa, 1 beta, 1 gamma y 1 delta) dispuestas a modo de roseta, de forma que queda en su interior un canal que permite el

paso de iones. Farmacológicamente se ha podido evidenciar un lugar de fijación específico para agonistas como acetilcolina, nicotina o alfa-bungarotoxina ("sitio receptor") que no depende del potencial de membrana, y un segundo sitio ("canal iónico" o "ionóforo") al que se unen antagonistas no competitivos como imipramina o cocaína (Ceña y col., 1983). Existen dos sitios receptor en cada receptor nicotínico, y parecen corresponderse con las subunidades alfa.

Desde el punto de vista funcional, se sabe que la acetilcolina produce una despolarización en la membrana de la célula cromafín cuya amplitud depende en su mayor parte de la concentración de Na extracelular (Douglas y col., 1967; Brandt y col., 1976). Ello sugirió inicialmente la idea de que muy probablemente la despolarización condicionaría los cambios en la permeabilidad de la membrana al calcio; el hecho de que bloqueadores orgánicos de los CCSV, como el D-600 (Pinto y Trifaró, 1976) o inorgánicos como el Mg (Douglas y Rubin, 1963) redujeran significativamente la liberación de catecolaminas inducida por acetilcolina parecía confirmarlo. Sin embargo, la observación de que la estimulación colinérgica podía ocasionar una respuesta secretora en glándulas adrenales de gato perfundidas con un medio desprovisto de Na, indujo a Douglas y Rubin (1961) a pensar que en la entrada de Ca ocasionada por efecto de la acetilcolina podría estar involucrado algún mecanismo no

dependiente de voltaje. Esto unido a la evidencia de que acetilcolina causa una pequeña despolarización incluso en ausencia de Na, planteaba la posibilidad de que el Ca pudiera acceder directamente por el ionóforo nicotínico al citoplasma de la célula. En 1979 Stallcup comunicaba los resultados de algunos experimentos realizados en células cultivadas PC12 de feocromocitoma de rata que parecían probar esta hipótesis: en presencia de concentraciones fisiológicas de Na, un estímulo nicotínico promueve la captación de ^{22}Na y paralelamente de ^{45}Ca . Sin embargo, la captación de ^{45}Ca se reduce hasta un 8-10% de la captación total en presencia de 1 mM de Mn (inhibidor inorgánico de los CCSV). Esto hacía pensar que sólo la captación residual estaba mediada por el ionóforo nicotínico. En ausencia de Na, la captación de ^{45}Ca insensible a Mn asciende al 40% del total captado, lo que sugiere que en condiciones normales Na y Ca compiten por ganar el acceso al interior celular a través del ionóforo asociado al receptor nicotínico.

8.1.3.- Otras vías de entrada de calcio

En ciertas condiciones experimentales se ha descrito el paso de Ca a la célula a través de otros canales, por ejemplo el canal de Na sensible a voltaje (Baker y col., 1971). Sin embargo es poco probable que tenga alguna trascendencia fisiológica.

Además de los canales iónicos, el Ca utiliza para atravesar las membranas plasmáticas de las células excitables otros sistemas de transporte mediados por proteínas de membrana cuya función es permitir un intercambio de iones entre el medio intra y extracelular. El más importante con diferencia es el intercambio Na-Ca que será abordado posteriormente con detenimiento. Aunque existe un intercambio Ca-Ca se desconoce por el momento cual puede ser su finalidad.

8.2.- EXPULSION DEL CALCIO LIBRE CITOPLASMATICO

La recuperación de las concentraciones de Ca citoplasmáticas en el orden de 100 nM tras los periodos de actividad resulta fundamental para el normal funcionamiento celular. Esto es posible gracias, por un lado, a la impermeabilidad de la membrana plasmática al Ca en reposo y por otro, a la existencia de mecanismos celulares específicos localizados a nivel de membrana y en ciertas organelas intracelulares que reducen la concentración de Ca en el citosol.

Se han descrito tres sistemas que podrían intervenir de forma secuencial según la concentración de Ca iónico en el citoplasma. En orden creciente de capacidad que a la vez es decreciente de sensibilidad o afinidad por el Ca libre intracelular serían:

- a) ATPasa - Ca dependiente de Mg (Bomba de Ca).
- b) Intercambio Na-Ca.
- c) Secuestro intracelular (proteínas y organelas).

8.2.1.- La Bomba de Ca

Este sistema extrusor de Ca es una ATPasa dependiente de Mg que expulsa un ion Ca por cada enlace fosfato terminal de ATP hidrolizado. Fue descrito inicialmente por Shatzman en 1966 en eritrocitos, y posteriormente se ha demostrado su existencia en membranas de diversas células excitables (DiPolo y Beaugé, 1983; 1988). Su actividad está regulada por el propio calcio a través de la calmodulina, y es altamente sensible a la inhibición por vanadio (Caroni y Carafoli, 1981). Posee una gran afinidad por el Ca, que se expresa en una Km entre 0,1 y 0,5 μM (DiPolo y Beaugé, 1983), lo que indica que actúa en presencia de concentraciones fisiológicas de Ca intracelular. Sin embargo su capacidad es muy reducida, la velocidad máxima de eflujo de Ca es aproximadamente 200 fmoles/cm²/segundo. Todo ello sugiere que su cometido principal sea el mantener baja la concentración de Ca libre citoplasmático cuando la célula se encuentra en reposo o ha recibido estímulos pequeños. Si el estímulo fuera intenso, y la entrada de Ca grande, el reclutamiento de sistemas de mayor capacidad, como el intercambio Na-Ca, sería necesario.

8.2.2.- El Intercambio Na-Ca

El sistema de intercambio Na-Ca fue propuesto en la célula miocárdica como un mecanismo extrusor de Ca que explicaría el hecho de que parte de la salida de Ca observado en la aurícula de cobaya cargada con ^{45}Ca dependiera de la presencia de Na extracelular (Reuter y Seitz, 1968). En la misma época otro grupo de investigadores señalaba el mismo fenómeno en el axón gigante de calamar, observando además, que aumentando la concentración de Na intracelular y/o reduciendo la concentración de Na extracelular se conseguía a la vez incrementar la entrada y reducir la salida de Ca de la célula, mientras de forma paralela se producía un eflujo de Na dependiente de Ca extracelular (Baker y col., 1969a). Estos hallazgos apoyaban fuertemente el carácter reversible de dicho intercambio que podría transportar Ca en dirección opuesta al gradiente electroquímico de Na.

Estudios posteriores han permitido conocer que este sistema contribuye a regular la concentración de Ca intracelular también en otros tipos de células, entre los que se encuentran las del músculo liso vascular (Ozaki y Urakawa, 1979) e intestinal (Brading, 1978), y las células cromafines (Rink, 1977; Nishimura y Sorimachi, 1984).

Hoy se sabe que se intercambian al menos 3 iones Na por cada ion Ca y hay por tanto un desplazamiento neto de cargas hacia el lado del transporte de Na (Baker y col., 1969a; Mullins, 1979; Reeves y Sutko, 1983). Este hecho y la sensibilidad de este sistema al potencial de membrana (Mullins y Brinley, 1975; Baker y Allen, 1984) indican que se trata de un mecanismo de intercambio electrogénico. Los gradientes electroquímicos de Na y Ca y el voltaje a nivel de membrana son los factores que fundamentalmente modulan el sentido en que se moverá el Ca.

En base a estas características distintos autores (Baker y col. 1969a; Blaustein y Russel, 1975; Reeves y Sutko, 1983) han propuesto la existencia de 2 lugares de acoplamiento catiónico en el transportador. Uno de ellos, divalente, fijaría 1 ion Ca o 1-2 iones Na y el otro fijaría al menos 1 ion Na adicional. Ambos cationes, por tanto, podrían competir por el sitio divalente; esto explicaría el bien conocido antagonismo entre Na y Ca que Lüttgau y Niederggerke señalaron en 1958 en el músculo cardíaco.

Los estudios sobre la especificidad de los sitios de fijación catiónica han ofrecido resultados dispares, muchas veces en relación con el tipo de preparado o las condiciones experimentales. En vesículas de sarcolema cardíaco canino los iones divalentes Sr, Ba, Cd y Mn pueden sustituir parcialmente al

Ca en el sitio divalente (Trosper y Philipson, 1983). En la misma preparación (Ledvora y Hegyvary, 1983) y en células cromafines bovinas en cultivo (Nishimura y Sorimachi, 1984) el Li parece sustituir parcialmente al Na.

8.2.2.1.- Expulsión del Ca intracelular a través del intercambio Na-Ca

Entre un 5 y un 15% del Ca que es expulsado en axones de calamar en reposo depende del Na. El resto aparentemente tiene lugar a través de la bomba de Ca (DiPolo y Beaugé, 1983). Sin embargo, la velocidad de la salida de Ca dependiente de Na extracelular se incrementa conforme aumenta la concentración de Ca intracelular, de manera que la capacidad de este intercambio supera ampliamente la de la ATPasa-Ca cuando la concentración de Ca intracelular alcanza el rango micromolar. Se ha descrito un valor máximo de 2000 a 3000 fmoles/cm²/seg. (DiPolo y Beaugé, 1983). Como contrapartida la afinidad del transportador por el Ca es baja. Se ha estimado una Km entre 5 y 10 μ M en presencia de ATP y concentraciones fisiológicas de Na intracelular. Estos valores indican que el intercambio Na-Ca interviene como sistema expulsor de Ca en condiciones fisiológicas, sólo cuando el Ca intracelular ha alcanzado niveles claramente superiores a los de reposo.

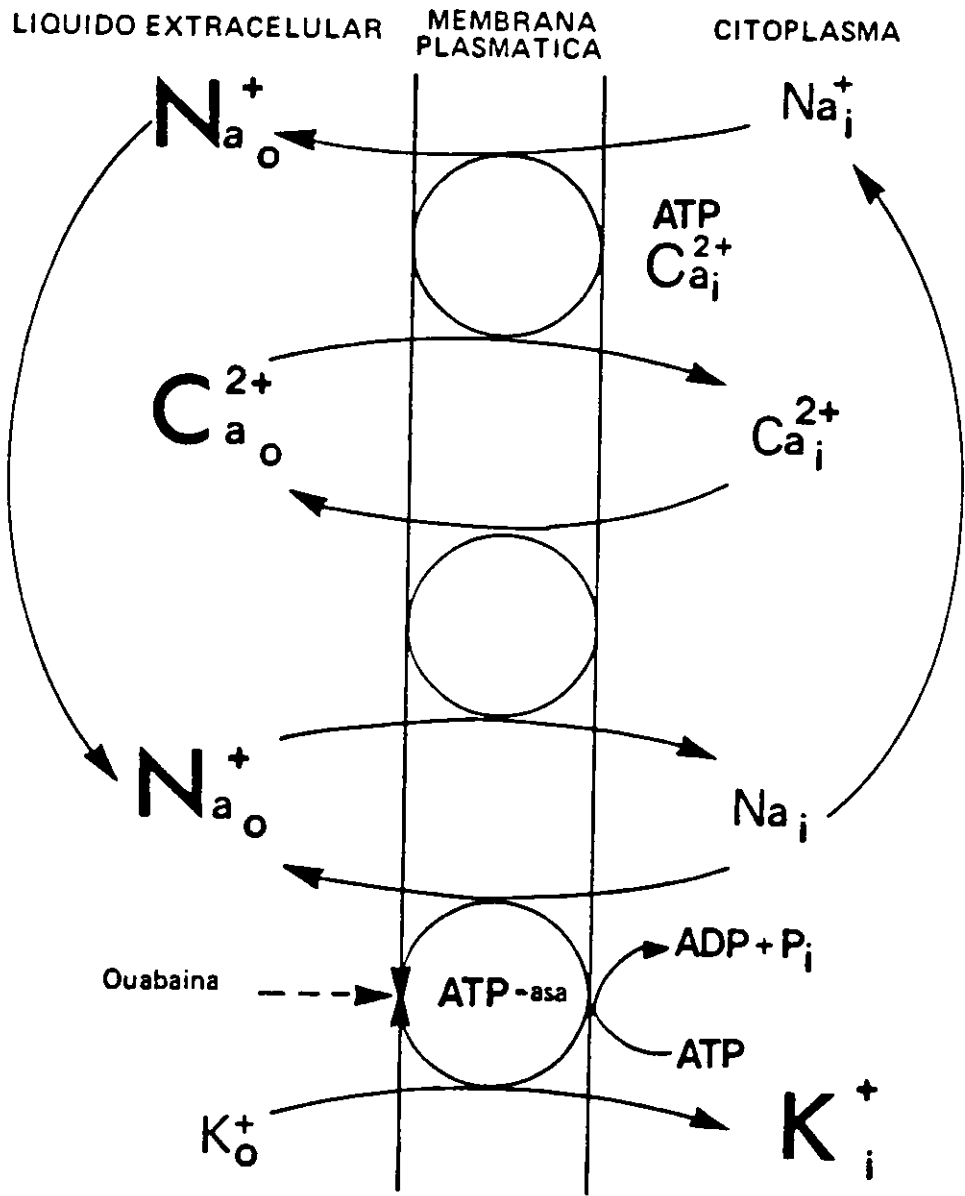
El gradiente electroquímico de Na transmembrana, mantenido gracias a la actividad de la ATPasa Na-K, es el que aporta la energía al sistema para expulsar el Ca en exceso (ver figura 3); así se ha explicado que este tipo de transporte no dependa directamente del ATP. Sin embargo se ha sugerido que la fosforilación de la proteína transportadora facilita la actividad del intercambio aumentando la afinidad del sistema por el Ca_i (DiPolo y Beaugé, 1988).

La proteína transportadora ha sido caracterizada y parcialmente purificada en vesículas derivadas de sarcolema de corazón bovino (Hale y col., 1984), y es previsible que pronto pueda ser secuenciada.

8.2.2.2.- Entrada de Ca a la célula a través del intercambio Na-Ca

Una de las características de este sistema que más interés ha suscitado es su capacidad para funcionar en sentido inverso, es decir, intercambiando Ca extracelular por Na intracelular cuando se reducen las concentraciones de Na fuera de la célula o se incrementan en su interior (esta última circunstancia se consigue eficazmente inhibiendo la ATPasa Na-K). Esta propiedad plantea la posibilidad de que en las células excitables el intercambio Na-Ca pueda comportarse, al menos en determinadas circunstancias, como una vía de entrada de Ca adicional a las

FIGURA 3. Sistema de intercambio Na-Ca.

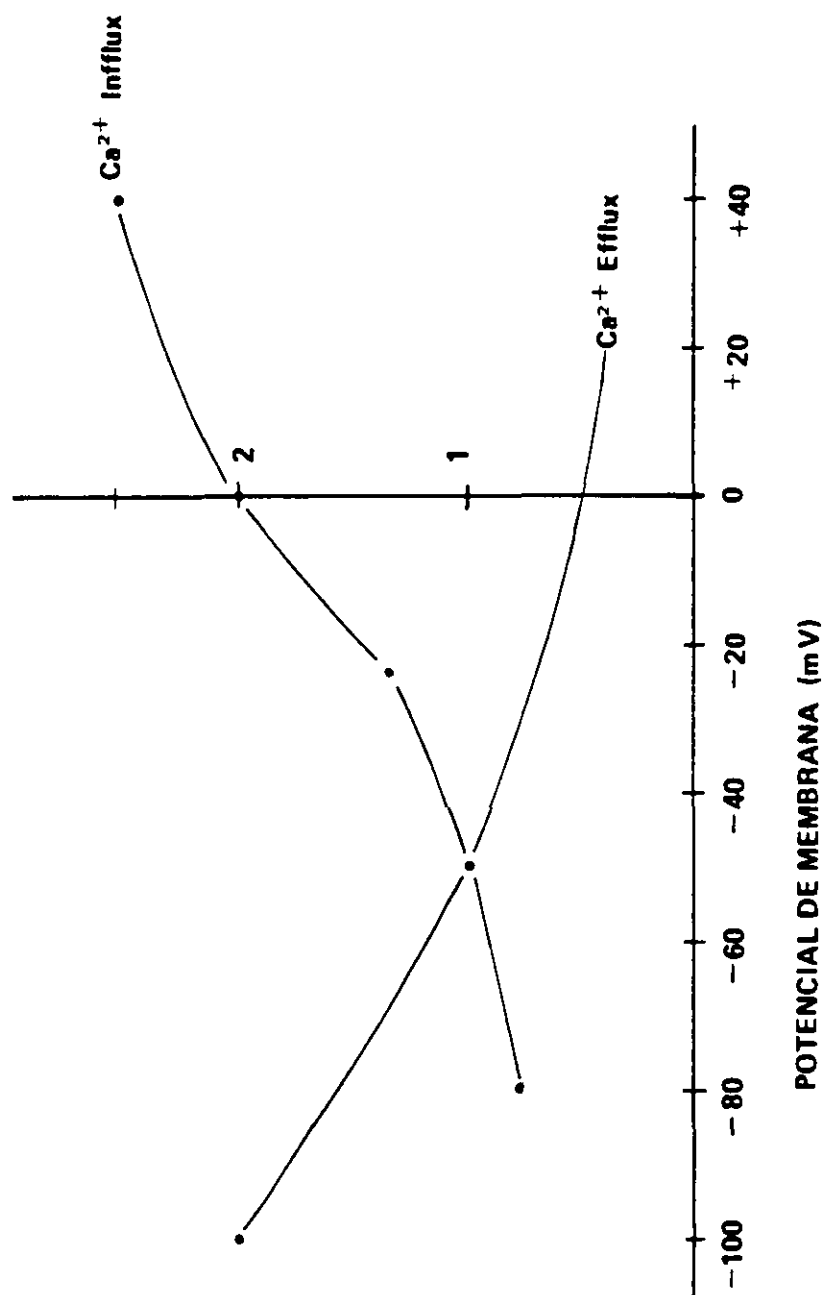


ya descritas. Esta posibilidad resulta especialmente atractiva si se tiene en cuenta el carácter electrogénico del intercambio que le hace sensible a los cambios en el potencial transmembrana; como se observa en la figura 4, la despolarización incrementa la entrada de Ca dependiente de Na intracelular y reduce la salida de Ca, mientras que la hiperpolarización ejerce el efecto contrario (Mullins y Brinley, 1975; Baker y Allen, 1984). A diferencia de lo que ocurre con la expulsión de Ca, el ATP intracelular resulta imprescindible para que pueda llevarse a cabo la captación de Ca dependiente de Na_i . El hecho de que ésta sea activada por la propia concentración intracelular de Ca, sugiere la existencia de una retroalimentación positiva que podría tener importancia desde el punto de vista funcional (Baker y Allen, 1984).

En base a estos datos, Mullins (1979) postuló la siguiente secuencia de acontecimientos durante un potencial de acción en las células cardíacas:

- 1) Entrada de Na por canales rápidos de Na.
- 2) Inactivación de los canales rápidos de Na.
- 3) Entrada de Ca por los CCSV.
- 4) Entrada de Ca a través del Sistema de intercambio Na-Ca.
- 5) Inactivación de los CCSV.
- 6) Inactivación del intercambio Na-Ca.

FIGURA 4. Dependencia de voltaje del sistema de intercambio Na-Ca. La despolarización de la membrana favorece la captación de Ca (sentido inverso), mientras que la hiperpolarización aumenta la extrusión de Ca (Baker y Allen, 1984).



El sistema de intercambio Na-Ca sería activado en la fase de meseta del potencial de acción y, al igual que los CCSV, tendería a introducir Ca en la célula, pero con la diferencia de que ésta se acompañaría de una corriente hacia afuera por la salida de Na. Todavía no se ha demostrado si esta secuencia se ajusta a la realidad, pero se han obtenido evidencias a favor de que, al menos en parte, la entrada de Ca inducida por la despolarización en células cardíacas (Sheu y col., 1986) y en el axón gigante de calamar (Mullins, 1981) se realiza habitualmente a través de este sistema.

En las células cromafines no hay evidencia de que el intercambio Na-Ca contribuya a la entrada de Ca promovida por un estímulo despolarizante, y se considera a los CCSV la principal vía de acceso de Ca a la célula (García y col., 1986).

Sin embargo, el funcionamiento en sentido inverso del intercambio Na-Ca se ha sugerido para explicar la secreción de catecolaminas inducida por la retirada de Na del medio (Nishimura y col., 1981; Sorimachi y Nishimura, 1981), y por inhibición de la ATPasa Na-K con ouabaína (García y col., 1980; 1981; Sorimachi y col., 1981; Esquerro y col., 1980; Artalejo y García, 1986) o con un medio exento de K (García y col., 1981; Sorimachi y col., 1981; Artalejo y García, 1986).

8.2.3.- Secuestro intracelular de calcio

Los tampones citoplasmáticos de Ca son proteínas que por su gran afinidad por el Ca son capaces de tamponar de forma inmediata los incrementos de este catión en el citoplasma. Entre ellas se encuentran "sensores" para el Ca como la calmodulina o la troponina C que participan en la regulación de los procesos activados por este ion.

El retículo endoplásmico acumula Ca mediante una ATPasa específica similar a la que se encuentra en la membrana citoplasmática.

Se ha sugerido que los gránulos cromafines también podrían comportarse como un sistema de secuestro intracelular. El intercambio Na-Ca permitiría la incorporación de Ca a su interior, gracias a la existencia de un gradiente electroquímico de Na intravesicular (Krieger-Brauer y Gratzl, 1983).

La captación de Ca en las mitocondrias tiene lugar gracias al potencial de membrana negativo establecido en su cara interna por la actividad de la cadena respiratoria (Carafoli y Lehninger, 1971). Además de Ca la mitocondria incorpora fosfatos que hacen posible la formación de precipitados de hidroxiapatita en el espacio interior (matriz). Se explica

de este modo que esta organela sea el sistema de secuestro intracelular con mayor capacidad para acumular Ca (Carafoli, 1987).

En las células nerviosas, aunque no se conoce con precisión cual es el papel que juegan estos mecanismos en la homeostasis intracelular del Ca, el rápido descenso de la $[Ca]_i$ tras la repolarización -en el rango de 1 mseg.- sugiere la actuación de mecanismos de regulación muy rápidos. Los sistemas de membrana tardan algunos milisegundos en hacer frente a elevaciones de Ca intracelular, mientras que los sistemas de secuestro intracelulares tardan sólo unas décimas de milisegundo. En base a estos hallazgos, Sánchez-Armass y Blaustein (1987) han propuesto que el rápido descenso de la concentración de Ca es debido, en primera instancia, al secuestro del catión por las proteínas citoplasmáticas y el retículo endoplásmico (las mitocondrias participarían sólo si la carga de Ca es suficientemente elevada). Los sistemas a nivel de la membrana plasmática, particularmente el intercambio Na-Ca, garantizarían la liberación desde estos depósitos al exterior de la célula.

9.- IMPORTANCIA FUNCIONAL DEL SODIO EN LA CELULA CROMAFIN

La participación del Na en los fenómenos de excitación celular fue sugerida en 1949 por Hodgkin y Katz. El potencial de acción sería la consecuencia de un rápido

incremento en la permeabilidad de la membrana para el Na. Poco después Hodgkin y Huxley (1952), en base a unos interesantes experimentos realizados en axón gigante de calamar, postulaban que los cambios eléctricos observados en la membrana de las células nerviosas eran la consecuencia de una apertura secuencial de canales (en sentido funcional) de Na y K. Hoy se sabe que la difusión de ambos iones una vez permeabilizada la membrana plasmática es posible gracias a la existencia de un sistema de transporte activo dependiente de ATP que mantiene los gradientes de Na (a favor de su entrada a la célula) y K (a favor de su salida al medio extracelular): la ATPasa Na-K (bomba de Na). Este sistema y las vías que a nivel de la membrana permiten el paso de Na, actuando de forma coordinada, constituyen el soporte molecular de la participación del Na en la biología de las células excitables.

9.1.- ENTRADA DE SODIO EN LA CELULA CROMAFIN

9.1.1.- Canales rápidos de sodio

Estos canales, también llamados canales de sodio sensibles a voltaje, deben su nombre a que son activados de forma rápida cuando se producen cambios de voltaje en la membrana celular. La difusión de Na a través de los mismos se expresa en la fase inicial del potencial de acción. Su selectividad iónica no es total, ya que por ellos pueden pasar otros iones monovalentes como Li o Rb e incluso se

ha observado que podrían ser utilizados por el Ca aunque en condiciones que parecen tener poca relevancia fisiológica (Baker y col., 1971).

Algunas sustancias como la veratridina, la batracotoxina o la aconitina permiten la activación mantenida de estos canales, mientras que otras como la tetrodotoxina (TTX) o saxitoxina los bloquean de forma altamente específica (Narashi y col., 1964). El empleo de estas sustancias ha facilitado enormemente la identificación y caracterización de varios tipos de canales de Na en diversos tejidos.

Las primeras evidencias que indicaban la existencia de canales rápidos de Na en la médula adrenal fueron obtenidas por dos grupos de investigadores: Biales y col. (1976) y Brandt y col. (1976). Ambos registraron en células cromafines cultivadas de diferentes especies potenciales de acción dependientes de Na extracelular que eran bloqueados por TTX. Poco después Ito y col. (1978) y Kirpekar y Pratt (1979) demostraban la repercusión funcional de la activación de estos canales al observar que la veratridina estimulaba la liberación de catecolaminas de forma Na y Ca dependiente en glándulas adrenales perfundidas de cobiya y gato respectivamente. Estudios posteriores han revelado el mecanismo iónico subyacente en

esta secreción al demostrar: 1) que la veratridina incrementa la captación de ^{22}Na en células cromafines cultivadas (Amy y Kirshner, 1982; Kilpatrick y col., 1982) y en células de la línea PC12 de feocromocitoma de rata (Stallcup, 1979), siendo dicho efecto bloqueado por TTX (Amy y Kirshner, 1982) y 2) que secundariamente a la captación de ^{22}Na hay un incremento de la captación de ^{45}Ca (Kilpatrick y col., 1982) que se realiza utilizando CCSV, dado que la respuesta secretora se bloquea en presencia de 1 mM de Mn (Stallcup, 1979). Recientemente Fenwick y col. (1982), utilizando la técnica de registro de corrientes en parches de membrana, han comprobado que la cinética de activación e inactivación de los canales rápidos de Na en las células cromafines bovinas es similar a la descrita para otras células excitables.

Se ha sugerido que en el proceso secretor fisiológico estos canales permitirían la propagación intercelular de los potenciales de acción (Ceña y col., 1983).

9.1.2.- Canal iónico asociado al receptor nicotínico

La estimulación nicotínica induce en células PC12 (Stallcup, 1979) y en células cromafines bovinas (Amy y Kirshner, 1982) un aumento de la captación de ^{22}Na insensible a TTX. Este efecto

depende de la concentración de Na extracelular y es bloqueado por antagonistas nicotínicos como la d-tubocuranina y el hexametonio, lo que indica que el paso de Na se realiza a través del ionóforo nicotínico.

Sin embargo, se ha comprobado que también a través de esta vía es posible el paso de Ca a la célula (Stallcup, 1979). Esta evidencia suscitaba la posibilidad de que el Na no fuera necesario para la liberación de catecolaminas inducida por la estimulación colinérgica. Algunos experimentos realizados recientemente en nuestro laboratorio (Abajo y col., 1989a) resultan clarificadores respecto al papel que corresponde a ambos iones en este proceso. En la glándula adrenal perfundida de gato, la nicotina (10, 50 μ M) induce liberación de catecolaminas en ausencia de Na, pero la introducción progresiva (en forma de gradiente) o brusca de este ion amplifica dicha respuesta secretora. Además, mientras que la liberación obtenida en 134 mM de Na es abolida en su totalidad por el bloqueo selectivo de los CCSV con (+)-PN 200-110, la liberación en 0Na apenas se modifica. Estos resultados sugieren fuertemente que en presencia de concentraciones fisiológicas de Na la entrada de este catión a través del ionóforo resulta necesaria

para que tenga lugar el paso de Ca al citoplasma, que se realiza de forma mayoritaria a través de los CCSV.

9.2.- LA ATPasa Na-K. SU INHIBICION FARMACOLOGICA Y EL INTERCAMBIO Na-Ca

En 1957 Skou descubrió en fragmentos de membrana microsomales la existencia de una ATPasa que era activada por Na y K. Tres años más tarde, el mismo autor relacionaba este enzima con la bomba de Na en base a un argumento farmacológico: la ouabaína inhibía la actividad enzimática de los microsomas y la bomba de Na en células intactas (Skou, 1960). Este descubrimiento se convertía así en una herramienta esencial para el estudio de los trasiegos iónicos en la membrana celular. A la vez surgía la primera aproximación al mecanismo de acción del efecto terapéutico de estos fármacos en relación con la inhibición de la ATPasa Na-K. A finales de la década de los 60 con el descubrimiento del sistema de intercambio Na-Ca y su posibilidad de funcionamiento en sentido inverso esta hipótesis fue formulada con mayor claridad: la acumulación de Na en la célula cardiaca promovería la entrada de Ca a través del intercambio con el Na intracelular. El incremento en la concentración citoplasmática de Ca sería el responsable del efecto inotrópico positivo. Sin embargo esta hipótesis tardaría mucho tiempo en ser aceptada, fundamentalmente debido a que muchos estudios no habían conseguido demostrar un

incremento significativo en la concentración de Na intracelular cuando el efecto inotrópico positivo era ocasionado por concentraciones de digitálicos equivalentes a las terapéuticas (Lee, 1985).

La aplicación de nuevas técnicas electrofisiológicas al músculo cardíaco en la década de los ochenta ha permitido poner fin a tal controversia. En 1985 el grupo de Chin O. Lee publicaba una serie de experimentos sumamente interesantes. Mediante microelectrodos que permitían medir continua y simultáneamente los cambios en la concentración de Na intracelular, el potencial de acción y la fuerza contráctil, estos autores demostraron que el gradiente electroquímico de Na es el factor que en todo momento condicionaba la respuesta contráctil a la estrofantidina, presumiblemente actuando sobre el sistema de intercambio Na-Ca del sarcolema que en última instancia aportaría el Ca necesario para la contracción (Lee, 1985; Lee y col., 1985).

9.2.1.- Efectos de la inhibición experimental de la ATPasa Na-K en las células nerviosas

Existen numerosas evidencias directas e indirectas que indican que los glucósidos cardíacos incrementan la liberación espontánea de neurotransmisores (acetilcolina, catecolaminas, serotonina y prostaglandinas) en diferentes preparaciones celulares tanto del sistema nervioso central como periférico. Esta libera-

ción está estrechamente relacionada con la concentración de Na extracelular (García y col., 1980; Esquerro y col., 1980) y parece ligada a la inhibición de la actividad de la ATPasa Na-K (Aunis y García, 1981). El hecho de que la inhibición de este enzima por medio de otras maniobras experimentales, como la privación de K en el medio extracelular incrementa también la liberación de neurotransmisores (Wakade, 1981; García y col., 1981; Powis, 1983) apoya firmemente esta idea. Que otros inhibidores como el vanadato (Aunis y García, 1981) o la N-etilmaleimida (García y col., 1981) no ocasionen dicho efecto podría ser debido a que estas sustancias ejerzan adicionalmente una influencia negativa sobre el propio proceso secretor (García y col., 1981).

Junto a estas características, la necesidad de Ca extracelular y la demostración de un sistema de intercambio Na-Ca en las células nerviosas (Baker y col., 1969a), incluida la célula cromafín (Rink, 1977; Nishimura y Sorimachi, 1984), han llevado a la hipótesis de que la liberación podría estar mediada, al igual que la contracción en el músculo cardíaco por la activación del intercambio Na-Ca en sentido inverso gracias a la acumulación intracelular de Na y consecuente reducción de su gradiente electroquímico (Powis, 1983).

Como consecuencia de la redistribución iónica secundaria a la inhibición de la ATPasa Na-K, (aumento del Na y disminución del K intracelulares) cabría esperar una alteración en el potencial de membrana. En células cromafines bovinas incubadas en Krebs-normal, el tratamiento con ouabaína (10^{-4} M) ocasiona una ligera despolarización; ésta empieza a ser evidente 30 min. después de haber introducido el digitálico y a los 90 min. llega a ser equivalente a la ocasionada por 15 mM de K extracelular (Pocock, 1983a). Por otra parte, Artalejo y García (1986) han sugerido recientemente la participación de los CCSV junto al intercambio Na-Ca en el efecto secretor evocado por ouabaína en la glándula adrenal de gato; los hallazgos que fundamentan esta proposición son la potenciación que BAY-K-8644 (10^{-6} M) es capaz de inducir sobre la liberación de catecolaminas provocada por ouabaína y el bloqueo parcial de la misma que causan Nimodipina 10^{-6} M y Mg 20 mM.

En células cromafines bovinas Pocock (1983a; 1983b) ha comunicado que la ouabaína induce liberación de catecolaminas en ausencia de Ca extracelular. Para explicar estos resultados este autor ha propuesto como posibles mecanismos de acción, una disminución del eflujo de Ca o una liberación de Ca desde los depósitos intracelulares.

10. EL LITIO: SIMILITUDES CON EL Na y OTROS CATIONES CELULARES

El Litio, con el número atómico 3, es el más ligero de los metales conocidos. En la Tabla Periódica de los Elementos se incluye entre los metales alcalinos, grupo al que también pertenecen dos elementos con gran significación biológica, el sodio y el potasio. Como éstos posee un único catión en la última capa que pierde con facilidad debido a su gran poder de ionización y por ello se encuentra en la naturaleza en forma de sales (Schou, 1957). Su densidad de cargas y radio iónico le confieren también algunas similitudes con el Ca y Mg, y se ha sugerido que el Li es capaz de emular a estos cationes (Birch, 1974).

Tras su descubrimiento en 1818, el Li atrajo por primera vez el interés médico a mediados del siglo XIX cuando Garrod en base a una mayor solubilidad del urato de Li con respecto a los uratos de Na y K intentó poner remedio con este ion a la gota. La mayor ubicuidad del Na y K en los fluidos corporales impidió que esta diferencia de solubilidad se reflejara en una mejoría clínica. Posteriormente, en base a su similitud con el Na el Li empezó a ser utilizado por los fisiólogos como herramienta para estudiar los fenómenos sodio-dependientes (ver Schou, 1957). También las aplicaciones médicas variaron y de mero sustituto del Na para proporcionar sabor a las dietas hiposódicas pasó a ser un agente psicoactivo para tratar las crisis de manía y prevenir los episodios de reagudización en la enfermedad maniaco-depresiva. Mientras que el

primer uso tuvo como consecuencia la aparición de efectos tóxicos severos, del segundo se derivó la consagración de este elemento como agente terapéutico de eficacia reconocida.

Todas estas circunstancias han despertado un enorme interés por este ion, que se ha plasmado en la realización de numerosísimos trabajos de investigación. De este modo han llegado a describirse una larga serie de efectos relacionados con las propiedades de las membranas celulares, metabolismo de las aminas biógenas, función neuroendocrina y microambiente celular (Schou, 1957; Singer y Rotenberg, 1973; Ehrlich y Diamond, 1980; Wood y Goodwin, 1987). Aunque todavía no se ha logrado precisar su mecanismo de acción, se acepta que éste guarda relación con las propiedades físico-químicas del Li que le permiten un comportamiento en parte similar a los del Na y K en diversas estructuras celulares (Ehrlich y Diamond, 1980). Dado que existe una importante vinculación entre los procesos de transporte iónico transmembrana y la función celular, el comportamiento del Li a nivel de la membrana plasmática adquiere especial relevancia. Ya en 1902 Overton descubrió que el Li era el único catión inorgánico capaz de mantener la excitabilidad celular en ausencia de Na en el músculo estriado de rana (ver Schou, 1957); posteriormente el mismo fenómeno ha sido observado también en otros tejidos tales como miocardio (Carmeliet, 1964) o axón gigante de calamar (Hodgkin y Katz, 1949). Aunque la difusión pasiva a favor del gradiente electroquímico contribuye de forma

importante a la entrada de Li en las células excitables (Keynes y Swan, 1959), estos datos sugerían que el Li también podía atravesar la membrana celular a través de los canales de Na sensibles a voltaje y sustituir a este ion en la generación de potenciales de acción. El hallazgo de una selectividad del canal de Na similar para Na y Li en el axón gigante de calamar (Chandler y Meves, 1965) y la observación de un aumento en la captación de Li en presencia de veratridina en células de neuroblastoma (Richelson, 1977) han permitido confirmarlo.

La similitud entre Li y Na también ha sido puesta de manifiesto en el sistema de intercambio Na-Ca. En células cromafines bovinas cultivadas (Nishimura y Sorimachi, 1984), cortes de médula adrenal bovina (Rink, 1977) y mitocondrias de corazón de rata (Crompton y col. 1977), el Li fue capaz de mantener parte del eflujo de Ca dependiente de Na extracelular en ausencia de este ion, y fue el único catión monovalente capaz de preservar -aunque débilmente- la entrada de Ca en vesículas de sarcolema de perro desprovistas de Na en su interior (Ledvora y Hegyvary, 1983).

Sin embargo, el Li parece ser mal sustrato para la ATPasa Na-K (Keynes y Swan, 1959) y aunque se ha descrito un intercambio Li/Na como forma de transporte activo de Li al exterior celular (Ehrlich y Diamond, 1980), esta circunstancia hace que el Li se acumule de forma progresiva en la célula. Cuando está presente en el medio extra-

celular en concentraciones inferiores a 40 mM la relación $[Li]_i/[Li]_e$ en situación de estado estacionario oscila entre 1,5 y 2 en músculo liso (Friedman, 1977) y 4 en células de neuroblastoma cultivadas (Richelson, 1977). Este incremento en la concentración de Li intracelular se acompaña de un descenso proporcional en las concentraciones de Na y sobre todo de K (Carmeliet, 1964; Friedman, 1977) y se ha relacionado con grados variables de despolarización cuando la exposición al Li es prolongada. (Carmeliet, 1964; Gallego y Lorente de Nó, 1947).

II.- PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

Desde hace casi dos décadas nuestro laboratorio se ha dedicado a la tarea de esclarecer los mecanismos involucrados en la secreción de catecolaminas por la médula adrenal. El trabajo que constituye esta tesis doctoral tiene como marco de referencia esta labor, y responde al siguiente planteamiento:

Entre las sustancias que han sido empleadas con más frecuencia como sustituyentes osmóticos del Na, el Li, debido a sus propiedades fisico-químicas, es el elemento con un comportamiento biológico más similar al del Na desde el punto de vista funcional; evita los fenómenos que se producen como consecuencia de la ausencia de Na en el medio extracelular y puede atravesar casi con la misma facilidad que el Na la membrana celular. Sin embargo, el Li tiende a acumularse de forma gradual en el interior de las células excitables, probablemente como consecuencia de una baja afinidad por la ATPasa Na-K (bomba de Na).

Teniendo en cuenta que el incremento en la concentración intracelular de Na es un factor determinante de la secreción de catecolaminas que se observa en glándulas adrenales tratadas con ouabaina, se ha pensado que si el Li se acumulara en la célula cromafín y se comportara de manera similar al Na en el citoplasma, glándulas

adrenales de gato perfundidas con un medio rico en Li podrían comportarse de forma similar a las tratadas con ouabaína y perfundidas con Krebs-normal.

El objetivo central de esta tesis doctoral ha sido el estudio de la influencia del Li sobre el proceso secretor de catecolaminas en la médula adrenal y de los posibles mecanismos implicados en dicho fenómeno. Con este fin se ha investigado la liberación de catecolaminas en la glándula adrenal de gato perfundida con soluciones de composición iónica variable en presencia o ausencia de algunos agentes farmacológicos.

El abordaje experimental utilizado se encuadra dentro de lo que podríamos denominar "farmacología de la neurosecreción". Este tipo de abordaje, frente a aquel que ofrecen los estudios electrofisiológicos y bioquímicos, es indiscutiblemente menos directo pero tiene la ventaja de ofrecer datos de carácter global o integrado, como de hecho ocurren todos los procesos en la célula, y entre ellos el acoplamiento estímulo-secreción de catecolaminas.

III.- MATERIAL Y METODO

Los experimentos fueron realizados en glándulas adrenales procedentes de gatos de ambos sexos y peso comprendido entre 2,5 y 5 Kg. Los animales habían permanecido controlados en una habitación a temperatura estable (20-22 °C) con agua y alimentación "ad libitum" antes de ser llevados al laboratorio.

1.- PREPARACION DE LA GLANDULA ADRENAL PARA SU PERFUSION "IN VITRO"

El animal era anestesiado, previa inducción con éter, con cloralosa (40-60 mg/Kg). Para ello se disecaba la vena femoral y mediante una cánula, se inyectaba lentamente el anestésico. De esta forma se conseguía una anestesia profunda y duradera. La cloralosa no ejerce ninguna influencia sobre la secreción de catecolaminas.

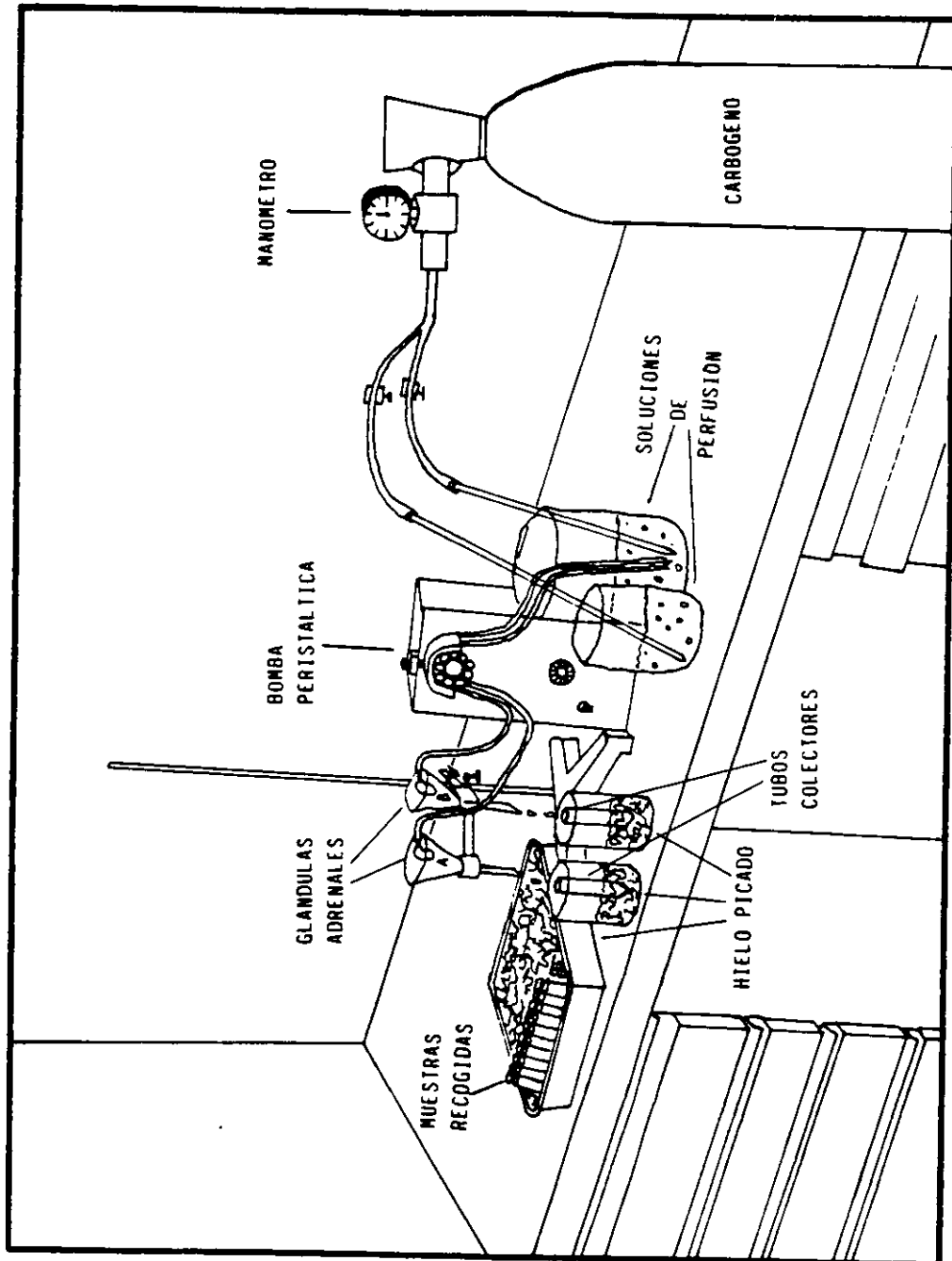
Una vez anestesiado el animal, se realizaba una incisión en el abdomen a nivel de la línea media, dejando el mayor campo posible para visualizar bien las glándulas adrenales. Seguidamente se procedía a la adrenalectomía bilateral, previa inserción de una fina cánula en la vena adrenolumbar correspondiente según la técnica descrita por Dixon y col. (1975). A través de esta cánula las glándulas eran perfundidas retrógradamente mediante una bomba de perfusión peristáltica tipo Buchler. El líquido

de perfusión drenaba a través de pequeñas incisiones realizadas en la corteza adrenal con una aguja hipodérmica y era recogido en tubos de ensayo (García y col., 1980) (ver figura 5).

2.- LIQUIDOS DE PERFUSION Y FARMACOS UTILIZADOS

La solución base utilizada fue Krebs-bicarbonato-normal (Krebs-normal) con la siguiente composición (mM): ClNa 119; ClK 4,7; Cl₂Ca 2,5; SO₄Mg.7H₂O 1,2; PO₄H₂K 1,2; Glucosa 11 y CO₃HNa 25, equilibrada con una mezcla de oxígeno (95%) y CO₂ (5%) para mantener el pH en 7,4. Las soluciones carentes de Ca (0Ca) fueron preparadas retirando el Cl₂Ca sin ser sustituido. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la respuesta secretora cuando el Cl₂Ca fue reemplazado por cantidades equimolares de Cl₂Mg. Cuando la concentración de Na se redujo a 25 mM, la osmolaridad de la solución se mantuvo con cantidades equimolares de sacarosa (Krebs-sacarosa), cloruro de colina (Krebs-colina) o ClLi (Krebs-Li). Los líquidos de perfusión conteniendo Li en concentraciones 25, 60 y 238 mM fueron realizados sustituyendo el ClNa por ClLi de forma equimolecular. Cuando la concentración de Na extracelular se redujo a 10 mM, se empleó tris-hidroxi-metil-amino-metano (10 mM) en lugar de bicarbonato como buffer. El pH de estas soluciones, en las que el Na fue sustituido isoosmolarmente por Li o sacarosa,

FIGURA 5. Esquema del sistema experimental utilizado en este trabajo. Las glándulas adrenales son perfundidas "in vitro" a través de una fina cánula insertada en la vena adrenolumbar. Las soluciones, equilibradas con carbógeno, se infunden a una velocidad constante, impulsadas por una bomba de perfusión peristáltica a través de tubos de polietileno. El líquido de perfusión que fluye de la glándula se recoge en tubos de ensayo que se mantienen en hielo picado a 4° C.



se ajustó a 7,4 con ClH y fueron burbujeadas con O₂ puro. La solución con alto potasio (59 mM) se preparó añadiendo ClK y reduciendo el ClNa para mantener la osmolaridad.

Los fármacos utilizados: nicotina, ouabaína, atropina, mecamilamina y (+)-PN 200-110 fueron disueltos en los medios de perfusión para alcanzar en ellos las concentraciones indicadas en los experimentos correspondientes. En todos los casos, se adoptaron las medidas pertinentes con el fin de preservarlos de la luz.

3.- DISEÑO EXPERIMENTAL

Los experimentos comenzaban una vez transcurridos 45-60 min. de perfusión inicial con Krebs-normal. Este periodo permite a las glándulas adaptarse al nuevo ambiente experimental tras su extracción. A partir de este tiempo, la secreción espontánea de catecolaminas se estabiliza en unos 45 ± 5 ng/2 min.

Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

La velocidad de perfusión habitual fue de 1 ml/min., pero en los experimentos en los que se recogían muestras durante intervalos de tiempo pequeños (30 seg.), la velocidad de perfusión fue de 2 ml/min. con el fin de asegurar un volumen de muestra de aproximadamente 1 ml.

Los protocolos experimentales se describen detalladamente en el apartado resultados. Siempre finalizaban con la perfusión de la glándula con una solución 59 mM de K, con la finalidad de conocer su viabilidad, al menos en lo que a la respuesta secretora se refiere.

Con el fin de evitar la oxidación espontánea de las catecolaminas y su inactivación, las muestras se recogían en tubos de ensayo graduados que contenían ácido perclórico (PCA) 0,4 N en cantidad suficiente para que la normalidad final de las muestras fuera 0,05 N y se almacenaban en hielo durante el periodo de colección. Finalizado éste se procedía directamente a la cuantificación de catecolaminas en las mismas o bien se congelaban, manteniéndose de esta forma inalteradas hasta que se realizara la determinación. Siempre se recogía una muestra basal previa a la estimulación en la que se cuantificaba la secreción espontánea de catecolaminas.

4.- METODO PARA MEDIR LA CONCENTRACION DE CATECOLAMINAS

El contenido total de catecolaminas (noradrenalina más adrenalina) fue determinado por fluorometría según el método de Anton y Sayre (1962), sin purificación en alúmina. Consiste este método en la oxidación de las catecolaminas a pH 7 con ferrocianuro, lo que origina derivados que emiten una intensa fluorescencia que es leída en un

espectrofotofluorímetro (Aminco-Bowman) en las siguientes longitudes de onda: 395 nm de excitación y 505 nm de emisión.

Reactivos utilizados:

- 1.- Buffer de fosfatos 0,5 M, pH 7. Ajustado el pH a 7 con Na(OH) 10 N. Se conserva a 4°C.
- 2.- Ferrocianuro potásico al 0,25%. Esta solución se prepara inmediatamente antes de ser usada.
- 3.- Ascorbato alcalino. Como la anterior, esta solución se prepara cuando va a ser utilizada. Para ello se disuelven 10 mg de ácido ascórbico en 0,1 ml de agua destilada y se añaden entonces 5 ml de Na(OH) 10 N.

Procedimiento:

- 1.- Se ponen 2 alícuotas de 0,2 ml de la muestra en 2 tubos de ensayo, y se añade 0,1 ml de buffer fosfato a cada uno de ellos agitándose inmediatamente. Un tubo sirve como "problema" y el otro como "blanco".
- 2.- Se añaden a la alícuota problema 0,02 ml de ferrocianuro potásico y se agita inmediatamente en vortex durante unos segundos.

- 3.- Al cabo de exactamente un minuto se añaden 0,2 ml de ascorbato alcalino tanto a la muestra problema como al blanco y se agitan inmediatamente.
- 4.- Tras un minuto de espera se añaden 0,5 ml. de agua destilada a ambos tubos y se agitan en el vortex.
- 5.- Las muestras son leídas en el espectrofotofluorímetro en un margen de 3 a 5 min.

De igual manera se procesa y mide la fluorescencia emitida por un estándar y su blanco que contiene una cantidad conocida de catecolaminas (1 mcg/ml). Al pH en que se realiza la reacción los compuestos oxidados derivados de noradrenalina y adrenalina emiten la misma intensidad de fluorescencia, por ello se puede utilizar como estandar una solución de cualquiera de las dos catecolaminas. En nuestro caso se utilizó una solución de bitartrato de noradrenalina de 1 mcg/ml, procedente de una solución madre que contenía 1 mg/ml de noradrenalina base. En ambos casos el disolvente utilizado fue ácido perclórico 0,05 N.

Cálculo de la concentración de catecolaminas en las muestras.

- 1.- La fluorescencia neta de las muestras se determina restando al valor leído en el espectrofotofluorímetro correspondiente a la alícuota problema el de la alí-

cuota blanco, utilizando siempre la misma unidad de fluorescencia. este valor corresponde a 0,2 ml de muestra problema.

2.- La fluorescencia neta para el estándar corresponde a los 0,2 ml de la solución de noradrenalina cuya concentración conocemos (1 mcg/ml) por tanto a 0,2 mcg.

Por consiguiente:

Fluorescencia neta estándar 0,2 mcg CA
Fluorescencia neta problema X mcg

$$X \text{ mcg}/0,2 \text{ ml} = \frac{\text{Fluorescencia problema} \times 0,2}{\text{Fluorescencia estándar}}$$

X mcg 0,2 ml
Y mcg volumen de muestra (ml)

$$Y = \frac{X \times \text{volumen de muestra recogida}}{0,2} \text{ (mcg CA/muestra)}$$

Teniendo en cuenta el tiempo durante el cual ha sido recogida la muestra, podemos expresar la concentración de catecolaminas (CA) en mcg/min. de perfusión.

5.- ANALISIS ESTADISTICO

Los datos se han expresado como media \pm error estandar de la media. Para la determinación de la significación estadística entre dos grupos de experimentos se ha utilizado el test de la t de Student; pareada cuando los datos correspondían a las glándulas de un mismo animal, y no pareada cuando correspondían a animales diferentes. Se han considerado como significativos valores de P menores de 0,05.

IV.- RESULTADOS

1.- LIBERACION ESPONTANEA DE CATECOLAMINAS EN LA GLANDULA ADRENAL DE GATO

En todos los experimentos que se describen en este trabajo, una vez canulada la vena adrenolumbar y extraída la glándula adrenal, ésta se perfundi6 durante un periodo de 60 min. con una soluci6n Krebs-normal. La liberaci6n espontánea de catecolaminas al cabo de este periodo se ha considerado secreci6n basal. En un grupo de 25 glándulas alcanz6 un valor medio de 45 ± 5 ng/2 min.

2.- LIBERACION DE CATECOLAMINAS EVOCADA POR LITIO EN LA GLANDULA ADRENAL DE GATO PERFUNDIDA

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la perfusi6n con Krebs-normal de glándulas adrenales previamente tratadas con ouabaína determina un incremento progresivo en la liberaci6n de catecolaminas (García y col., 1980). Una probable explicaci6n para dicho efecto secretor ha sido que debido al aumento gradual de la concentraci6n de sodio en el interior de las células cromafines se favorecía la entrada de calcio a la célula acoplada a la salida del sodio intracelular acumulado.

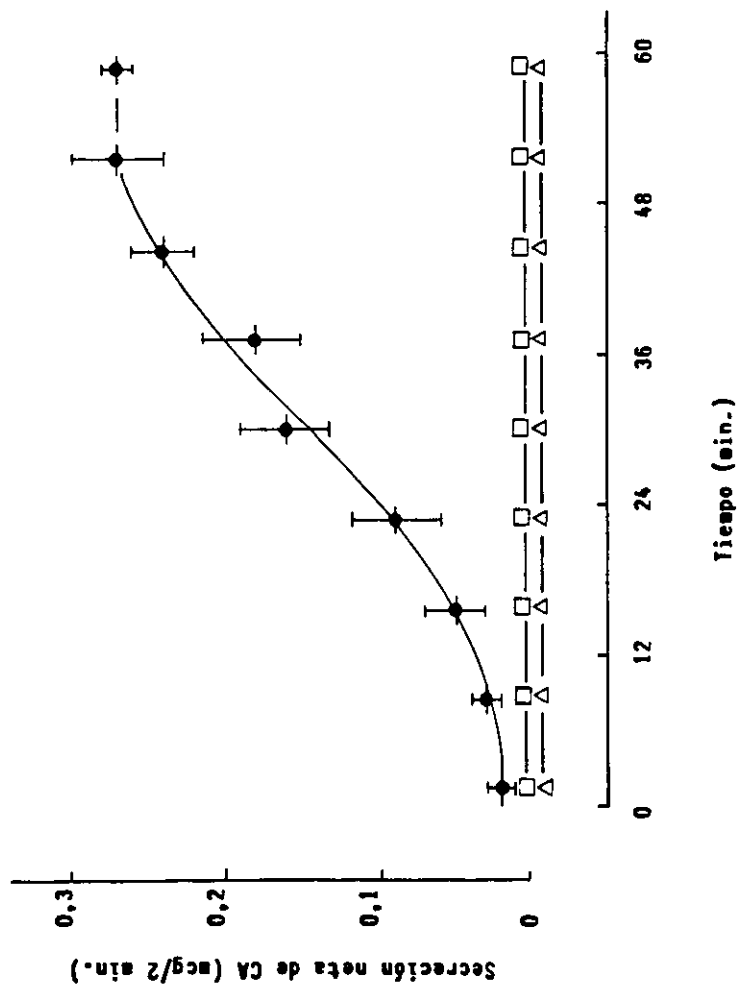
Se sabe que el litio, lo mismo que el sodio, puede penetrar pasivamente en las células excitables cuando el gradiente electroquímico es favorable (Ehrlich y Diamond, 1980); sin embargo, probablemente debido a que es un mal sustrato para la ATPasa Na-K (Keynes y Swan, 1959), su concentración intracelular aumenta de manera gradual. Teniendo en cuenta este hecho, si la membrana de la célula cromafín no pudiera distinguir al litio del sodio (Lastowecka y Trifaró, 1974) el litio acumulado podría salir de la célula intercambiándose por calcio, utilizando para ello el lugar del sodio en el sistema de intercambio Na-Ca. Para evaluar esta posibilidad nos pareció interesante realizar algunos experimentos empleando un Krebs-Li como líquido de perfusión.

La ausencia de sodio en el medio extracelular determina "per se" un incremento en la liberación espontánea de catecolaminas en la glándula adrenal perfundida (Douglas y Rubin, 1963; Lastowecka y Trifaró, 1974; Nishimura y col., 1981), que sin embargo no aparece cuando se mantiene al menos un 20% de sodio en el medio de perfusión (Douglas y Rubin, 1963). Por ello se consideró conveniente emplear una solución que contuviera junto a una elevada concentración de litio, una pequeña cantidad de sodio que no influyera por sí misma en la secreción basal de catecolaminas. La cantidad elegida fue 25 mM.

La sustitución de 119 mM de ClNa por cantidades equiosmolares de ClLi (Krebs-Li) dio lugar a un aumento progresivo en la cantidad de catecolaminas liberada. Este incremento empezó a ser evidente a los 10 min. de perfusión y aumentó gradualmente hasta alcanzar un valor máximo de $0,26 \pm 0,04$ mcg/2 min. (n=16) aproximadamente a los 45 min. (Figura 6). A partir de entonces la respuesta secretora descendió en forma lenta y progresiva alcanzando los niveles basales 120 min. después de iniciada la perfusión con Krebs-Li. La sustitución de 119 mM de ClNa en el medio de perfusión por cantidades equiosmolares tanto de sacarosa como de cloruro de colina, no modificó la liberación espontánea de catecolaminas.

La ausencia de calcio en el líquido de perfusión hizo desaparecer la secreción de catecolaminas previamente descrita. Además la perfusión prolongada de las glándulas con Krebs-Li-0Ca no determinó modificación alguna en la liberación espontánea de catecolaminas (Figura 9). Ambos hechos indican que la respuesta secretora evocada por litio tiene un carácter estrictamente dependiente de la presencia de calcio en el medio extracelular.

FIGURA 6. Efecto de la sustitución de 119 mM de Na por Li sobre la liberación espontánea de catecolaminas (CA) en la glándula adrenal de gato perfundida. Las glándulas fueron perfundidas inicialmente con Krebs-normal durante 60 min. A partir de entonces (tiempo 0 en la gráfica) comenzó la perfusión con Krebs-Li (◄—►), Krebs-sacarosa (▲—▲) o Krebs-colina (◻—◻). Los datos representan las medias de 16 experimentos, las líneas verticales representan el error estandar de la media y cada punto corresponde a la secreción neta media de catecolaminas contenida en el efluente recogido durante periodos de 2 min.



3.- EFECTO DE MECAMILAMINA MAS ATROPINA SOBRE LA LIBERACION DE CATECOLAMINAS INDUCIDA POR Li

La respuesta secretora evocada por litio podría estar mediada por la liberación de acetilcolina a nivel de las terminaciones del nervio esplácnico presentes en la médula adrenal. Con el fin de valorar esta posibilidad, se llevaron a cabo una serie de experimentos en los cuales el efecto secretor evocado por Krebs-Li se estudió en ausencia y en presencia (10 min. antes y toda la perfusión con Krebs-Li) de mecamilamina (10^{-4} M) más atropina (10^{-6} M), clásicos bloqueantes de los receptores nicotínicos y muscarínicos respectivamente. La respuesta secretora en ambos casos (antes y después del bloqueo) fue similar. Para evitar errores experimentales comprobamos que el tratamiento farmacológico había sido eficaz aplicando al final del experimento dos tipos de estímulos: nicotina cuyo efecto secretor requiere la activación de los receptores nicotínicos y altas concentraciones de potasio cuya respuesta está mediada exclusivamente por un efecto despolarizador directo y consecuente apertura de los canales de calcio sensibles a voltaje (CCSV). Nicotina (50 μ M, 2 min.), como cabía esperar no indujo cambio alguno en la respuesta secretora; sin embargo el estímulo posterior con 59 mM de K, 2 min. ocasionó una gran liberación de catecolaminas.

Los datos obtenidos excluyen por tanto la participación de un factor de índole colinérgica en la secreción evocada por litio.

4.- EFECTO DE LA SUSTITUCION DEL Li POR Na O SACAROSA EN EL LIQUIDO DE PERFUSION SOBRE LA SECRECION DE CATECOLAMINAS INDUCIDA POR Li

Si el litio pudiera en realidad ocupar el lugar del sodio a nivel del sistema de intercambio Na-Ca, la retirada del litio del líquido de perfusión (espacio extracelular) una vez que éste se hubiera acumulado suficientemente en la célula, invertiría de forma brusca su gradiente de concentración favoreciendo el funcionamiento del sistema de intercambio en sentido inverso, es decir la salida de Li acoplada a la entrada de Ca, y por tanto debería inducir un aumento en la respuesta secretora de catecolaminas.

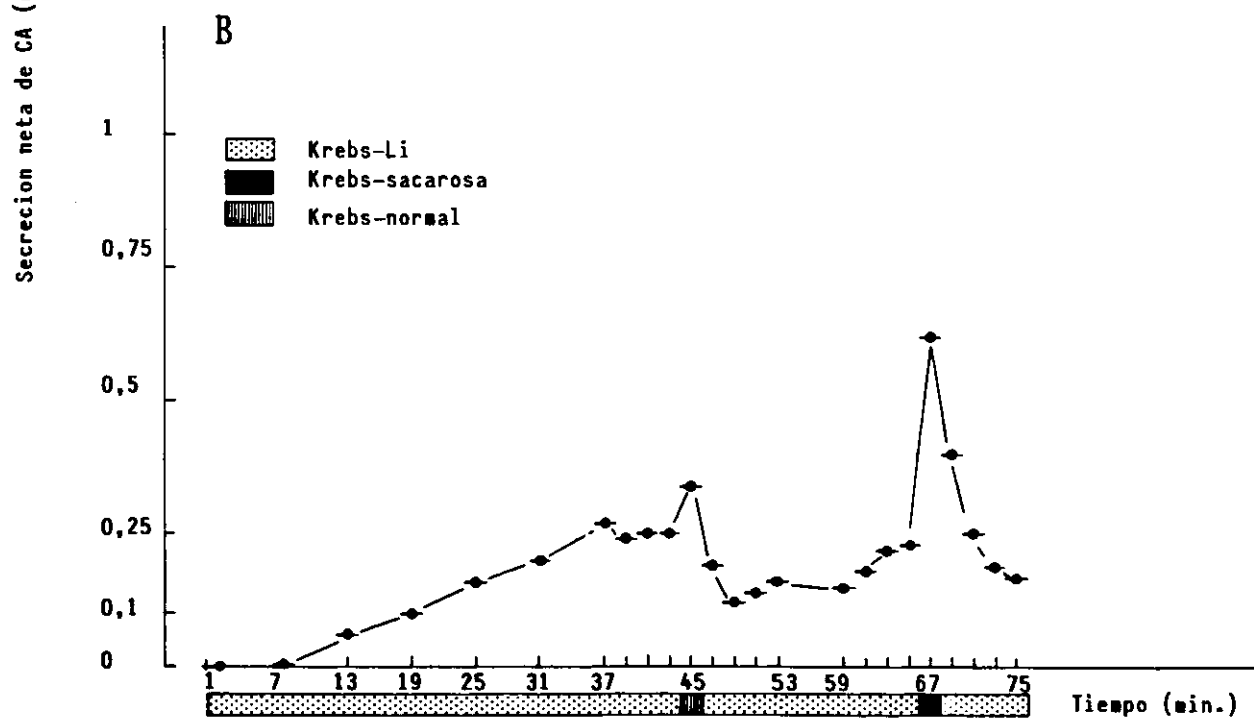
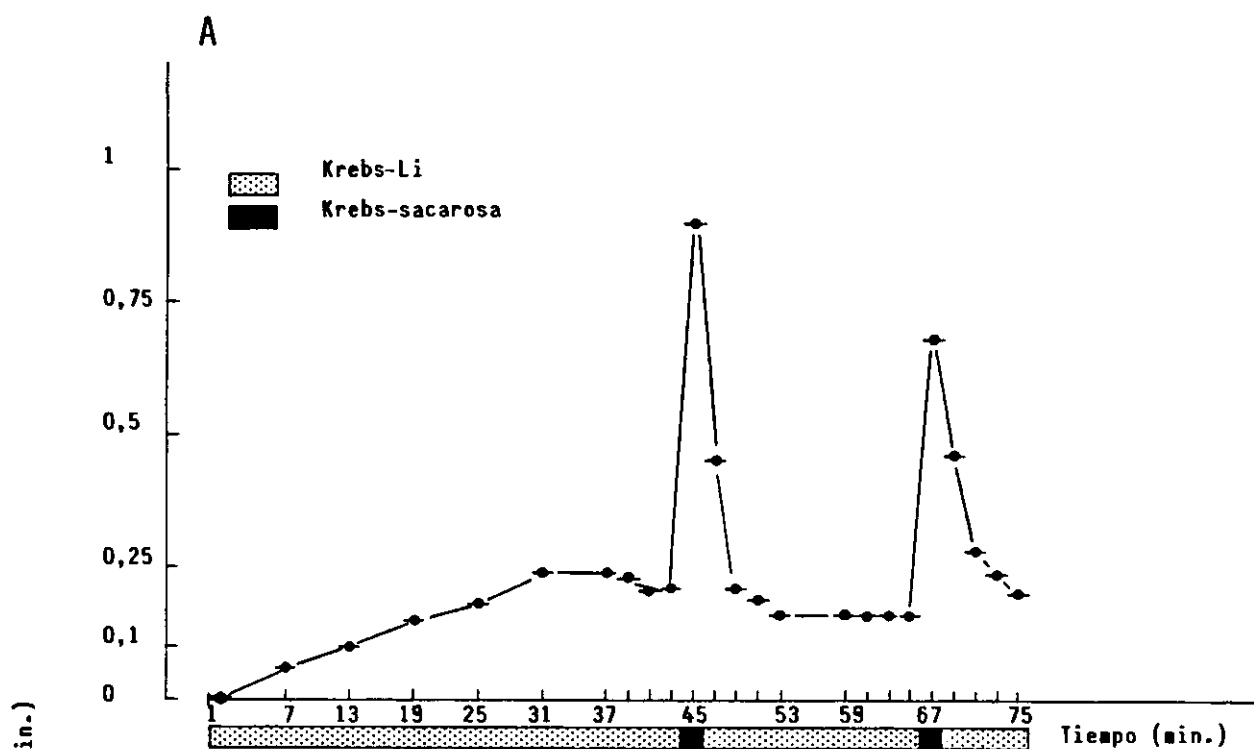
Con el fin de explorar esta posibilidad, en un grupo de experimentos pares, se perfundieron ambas glándulas con Krebs-Li y al cabo de 45 min. cuando la respuesta secretora había alcanzado la fase de meseta, se retiró el litio del líquido de perfusión. En la glándula (A) el cloruro de litio fue sustituido por cantidades isoosmolares de sacarosa, mientras que la glándula (B) fue perfundida con Krebs-normal (el cloruro de litio fue sustituido por cantidades equimoleculares de cloruro de sodio), en ambos

casos durante dos min; en la figura 7 se muestran los resultados de un experimento típico. En presencia de sacarosa la liberación neta de catecolaminas aumentó en $0,93 \pm 0,06$ mcg/2 min. (n=7) sobre el valor previo al cambio de líquido de perfusión. Este incremento fue significativamente mayor ($P < 0,001$) que el encontrado en glándulas preperfundidas con Krebs-Li cuando el líquido de perfusión (Krebs-Li) fue reemplazado por Krebs-normal. En este caso el incremento observado en la secreción de catecolaminas fue $0,08 \pm 0,03$ mcg/2 min. (n=7).

La secreción de catecolaminas inducida por la sustitución del litio por sacarosa fue estrictamente dependiente de la presencia de calcio en el medio extracelular y no puede explicarse por un efecto directo de la sacarosa, dado que la sustitución de 119 mM de Na en el Krebs-normal por sacarosa no modificó la secreción basal de catecolaminas, según puede verse en la figura 6.

Resultados similares se obtuvieron cuando se empleó cloruro de colina en lugar de sacarosa para reemplazar al litio presente en el Krebs que se utilizó para la perfusión.

FIGURA 7. Efecto de la sustitución del Li por Na o sacarosa en el líquido de perfusión sobre la liberación de catecolaminas (CA) inducida por Krebs-Li. Glándulas adrenales procedentes del mismo animal fueron perfundidas inicialmente con Krebs-Li durante 45 min. Transcurrido este periodo, el Li fue reemplazado por sacarosa en la glándula (A) y por Na en la glándula (B), en ambos casos durante 2 min. Veinte min. después el Li fue reemplazado por sacarosa (2 min.) en ambas glándulas. Cada punto corresponde a la secreción de catecolaminas contenida en el efluente recogido durante periodos de 2 min. Los datos que se muestran en la figura corresponden a uno de los siete experimentos realizados, todos con resultados similares.



5.- EFECTO DE LA SUSTITUCION DE Na POR Li o SACAROSA SOBRE LA SECRECION DE CATECOLAMINAS OBSERVADA EN GLANDULAS PRETRATADAS CON OUABAINA Y PERFUNDIDAS CON KREBS-NORMAL

De la misma forma que la sustitución del litio por sacarosa en el líquido utilizado para perfundir glándulas pretratadas con Krebs-Li ocasionaba una gran respuesta secretora (figura 7), se pensó que la sustitución del sodio por sacarosa en el Krebs-normal utilizado para perfundir glándulas pretratadas con ouabaina -una vez alcanzada la fase de meseta en la secreción de catecolaminas (García y col., 1980)- determinaría un importante incremento en dicha secreción. Además, se consideró interesante investigar si, del mismo modo que el sodio evitaba el gran aumento de la respuesta secretora evocada por la retirada del litio en glándulas preperfundidas con Krebs-Li, el litio podría prevenir la secreción evocada por la retirada de Na en glándulas pretratadas con ouabaina.

Los resultados de un experimento típico aparecen en la figura 8. Ambas glándulas adrenales (A y B) fueron pretratadas con ouabaina (10^{-4} M, 10 min.) y perfundidas desde el inicio del experimento con Krebs-normal. En estas condiciones, a los 40 min. de perfusión, la secreción de catecolaminas se había incrementado en $0,79 \pm 0,13$ mcg/2 min. (n = 22) con respecto a la secreción basal. La sustitución, en ese momento, de Na por sacarosa durante 2 min. provocó un brusco incremento ($4,03 \pm 0,64$ mcg/2 min., n = 12) en la liberación de catecolaminas que fue varias

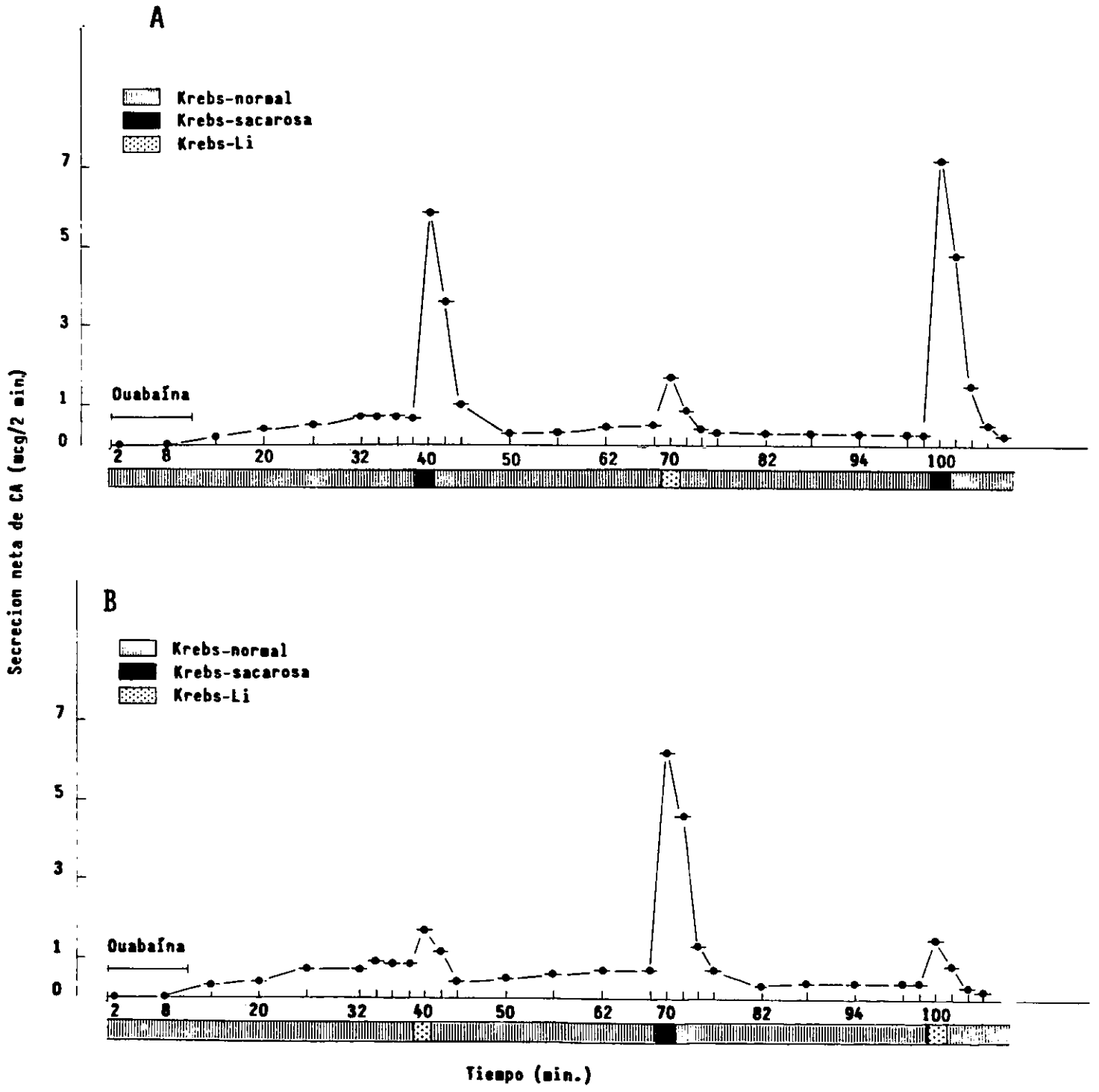
veces superior al observado cuando se empleó Li para reemplazar al Na en el líquido de perfusión ($0,93 \pm 0,11$ mcg/2 min., $n = 12$). La diferencia fue estadísticamente significativa ($P < 0,001$). Obsérvese que en este grupo de experimentos se sustituyeron 134 mM de Na, en lugar de 119 mM, por sacarosa o Li con el fin de favorecer en mayor medida el intercambio $Na_i - Ca_e$, manteniendo únicamente 10 mM de Na en el líquido de perfusión en ambos casos.

6.- EFECTO DE LA PERFUSION DE LAS GLANDULAS CON KREBS-Li SOBRE LA RESPUESTA SECRETORA EVOCADA POR LA REINTRODUCCION DE Ca

Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que la reintroducción de Ca en glándulas previamente perfundidas con Krebs-normal-0Ca conteniendo 1,2 mM de Mg ocasiona una importante liberación de catecolaminas, sólo en el caso de que las glándulas hayan sido previamente tratadas con ouabaína (Esquerro y col., 1980; García y col., 1980; 1981). Este tipo de secreción se atribuye, al menos en parte, a que la reducción del gradiente de Na debido al aumento de la concentración intracelular de este ion, favorece la entrada de Ca a través del sistema de intercambio Na-Ca.

En base a estos datos, se pensó que la acumulación intracelular de Li en glándulas perfundidas con Krebs-Li podría conducir a una distribución iónica similar en cierto modo a la obtenida mediante la inhibición de la

FIGURA 8. Diferencias en la secreción de catecolaminas (CA) observada durante la sustitución de Na (134 mM) por cantidades equiosmolares de Li o sacarosa en glándulas pretratadas con ouabaína (10^{-4} M, 10 min.) y perfundidas con Krebs-normal. Cuarenta min. después del pretratamiento con ouabaína, en la glándula (A) se sustituyeron 134 mM de Na por sacarosa, Li y sacarosa respectivamente, durante 2 min. a los 40, 70 y 100 min.; en la glándula (B) el Na fue reemplazado por Li, sacarosa y Li también durante 2 min. a los mismos tiempos. Cada punto corresponde a la secreción de catecolaminas contenida en el efluente recogido durante periodos de 2 min. Los datos que aparecen en la figura corresponden a uno de los cuatro experimentos realizados, todos con resultados similares. Obsérvese que la escala del eje de ordenadas es diferente de la de la figura 7.

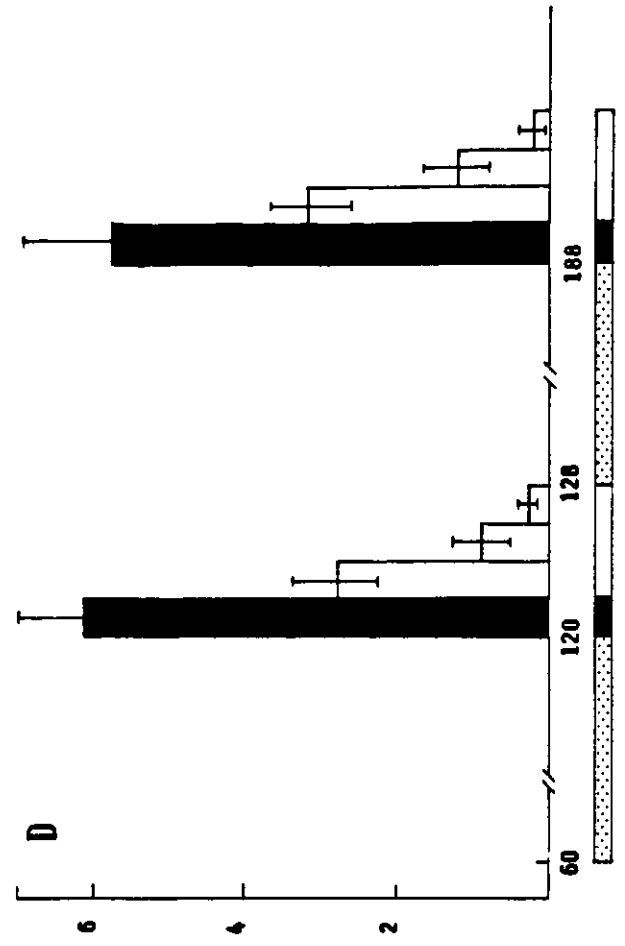
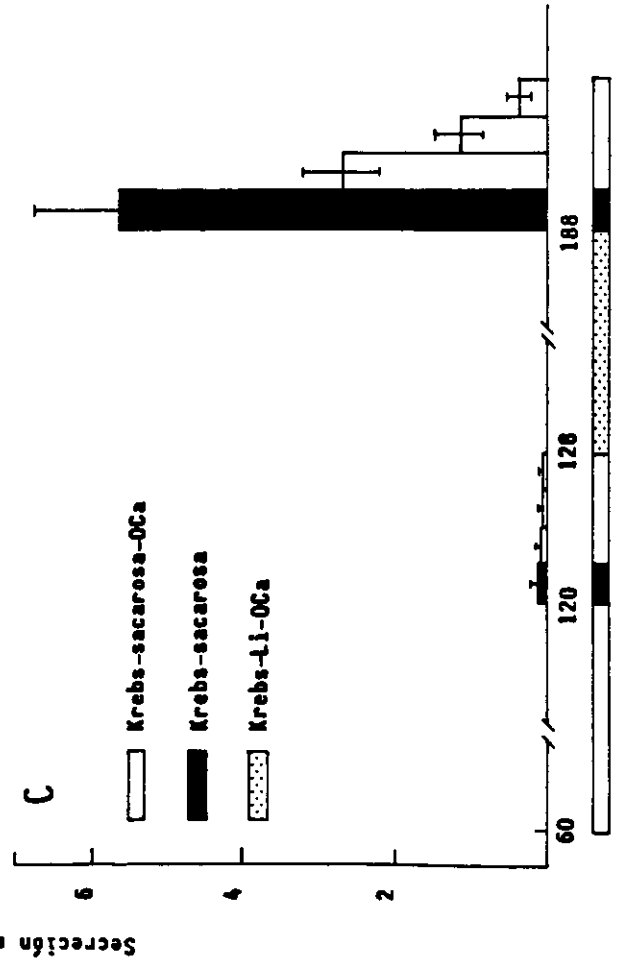
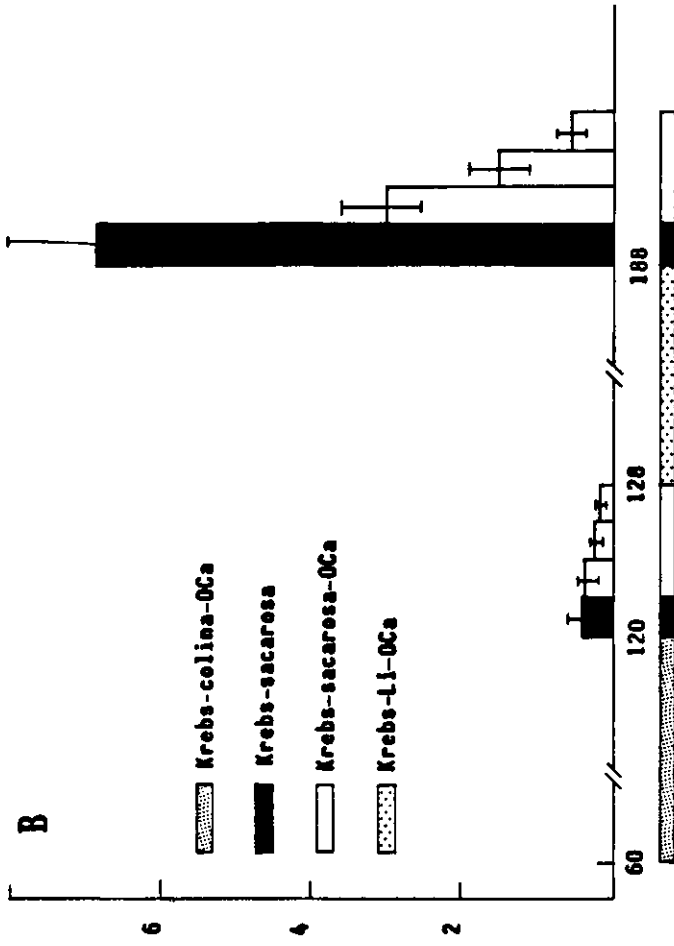
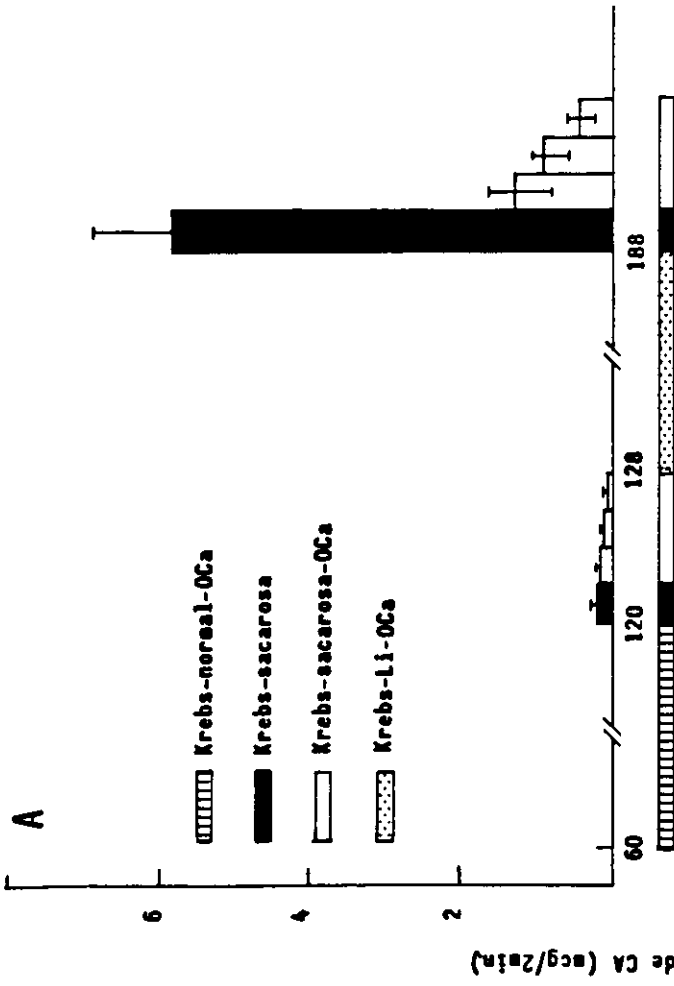


bomba de Na con ouabaína en glándulas adrenales perfundidas con Krebs-normal, siendo la única diferencia que el catión monovalente intracelular acumulado en este caso sería el Li en lugar del Na. Por tanto, nos pareció interesante investigar el efecto de la reintroducción de Ca (2,5 mM, 2 min.) sobre la liberación espontánea de catecolaminas en glándulas previamente perfundidas con Krebs-Li-0Ca durante 60 min.

Los resultados aparecen en la figura 9 y demuestran que la reintroducción de Ca en glándulas adrenales previamente perfundidas con Krebs-normal (A), Krebs-colina (B) o Krebs-sacarosa (C), todos ellos desprovistos de Ca, durante 60 min. no ocasionó modificación alguna en la secreción basal de catecolaminas. Sin embargo, la perfusión de las glándulas con Krebs-Li-0Ca (D) determinó una importante liberación de catecolaminas cuando el Krebs-Li-0Ca utilizado para la perfusión fue sustituido por Krebs-sacarosa que contenía Ca en una concentración 2,5 mM.

En un grupo adicional de experimentos la presencia de mecamilamina (10^{-4} M) más atropina (10^{-6} M), 10 min. antes, durante y 6 min. después de la reintroducción de calcio, no modificó significativamente esta respuesta secretora.

FIGURA 9. Diferencias en la secreción de catecolaminas (CA) evocada por la reintroducción de Ca (2,5 mM, 2 min.) en glándulas previamente perfundidas con (A) Krebs-normal-OCa, (B) Kbrebs-colina-OCa, (C) Krebs-sacarosa-OCa y (D) Krebs-Li-OCa durante 60 min. La reintroducción de Ca se hizo siempre en Krebs-sacarosa. En todos los casos el experimento finalizó con un periodo adicional de 60 min. de perfusión con Krebs-Li-OCa seguido de la reintroducción de Ca. Cada columna representa la secreción neta media de catecolaminas en seis experimentos y las líneas verticales representan el error estándar de la media.



Tiempo (min.)

7.- EFECTO DE LA DURACION DE LA PERFUSION CON KREBS-Li Y DE LA CONCENTRACION DE Li EN EL MISMO SOBRE LA RESPUESTA SECRETORA EVOCADA POR LA REINTRODUCCION DE Ca

Si la secreción de catecolaminas evocada por la reintroducción de Ca en glándulas previamente perfundidas con Krebs-Li-OCa estuviera mediada por la activación de un sistema de intercambio Li_i-Ca_e , cuanto mayor fuera la concentración de Li intracelular previa a la reintroducción de Ca, mayor debería ser el intercambio Li_i-Ca_e y por tanto también mayor la secreción de catecolaminas inducida como consecuencia del incremento ocasionado en la $[Ca]_i$.

Para explorar esta posibilidad se utilizaron dos procedimientos con el fin de modificar la concentración de Li intracelular:

- 1) Variar la duración del tiempo de perfusión con Krebs-Li-OCa.
- 2) Utilizar líquidos de perfusión con diferentes concentraciones de Li manteniendo constante el tiempo de perfusión.

7.1.- RELACION ENTRE LA DURACION DEL PERIODO DE PERFUSION CON KREBS-Li Y LA RESPUESTA SECRETORA EVOCADA POR LA REINTRODUCCION DE Ca

En el primer grupo de experimentos, la respuesta secretora a la reintroducción de calcio (2,5 mM, 2 min.) se obtuvo siempre en Krebs-sacarosa, con el fin de favorecer al máximo la salida de Li. Las glándulas fueron perfundidas previamente con Krebs-Li-0Ca y la única variable fue la duración de la perfusión con este medio: 5, 15, 30, 60 y 120 min. respectivamente. Los resultados, expresados en la figura 10, indican que la secreción de catecolaminas evocada por la reintroducción de Ca fue proporcional al tiempo de perfusión con Krebs-Li-0Ca durante los 30 primeros min. de perfusión. Cuando el periodo se incrementó hasta 60 o 120 min. la secreción de catecolaminas no se modificó de forma significativa.

7.2.- RELACION ENTRE LA RESPUESTA SECRETORA INDUCIDA POR LA REINTRODUCCION DE Ca Y LA CONCENTRACION DE Li DURANTE EL PERIODO DE PERFUSION CON KREBS-Li

En estos experimentos la respuesta secretora a la reintroducción de calcio fue obtenida también en Krebs-sacarosa y la única variable fue la concentración de litio presente en el líquido utilizado para la perfusión (Krebs-Li-0Ca). Se empleó un periodo de perfusión de 30 min. porque, como se demuestra en la

FIGURA 10. Efecto de la duración del periodo de perfusión con Krebs-Li sobre la respuesta secretora de catecolaminas (CA) evocada por la reintroducción de Ca. Las glándulas fueron perfundidas con Krebs-Li-0Ca durante diferentes tiempos (5, 15, 30, 60 y 120 min.) al final de los cuales se reintrodujo el Ca (2,5 mM, 2 min.). Cada columna representa el valor medio de la secreción neta de catecolaminas correspondiente al número de experimentos señalado entre paréntesis. Las líneas verticales indican el error estándar de la media. El resto de las condiciones experimentales fueron las mismas que se describen en el pie de la figura 9.

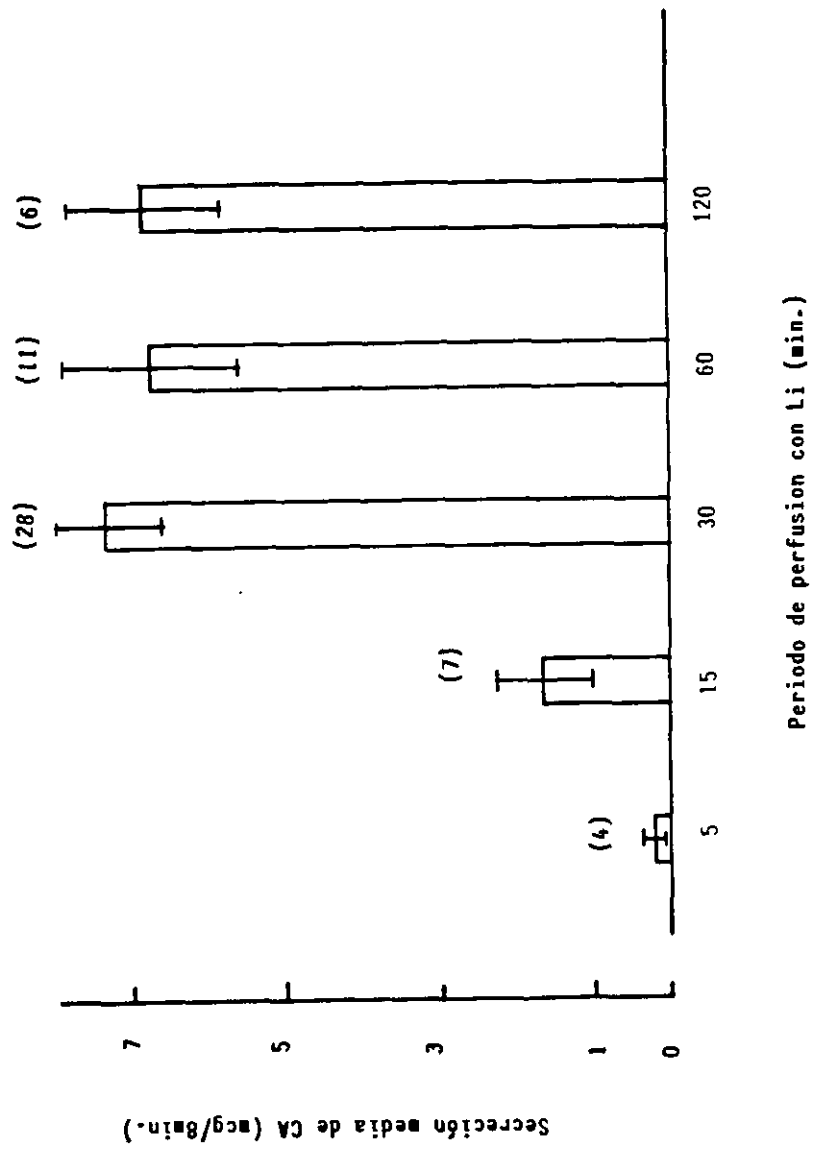


figura 10, tiempos más largos no modifican significativamente la secreción de catecolaminas evocada por la reintroducción de Ca.

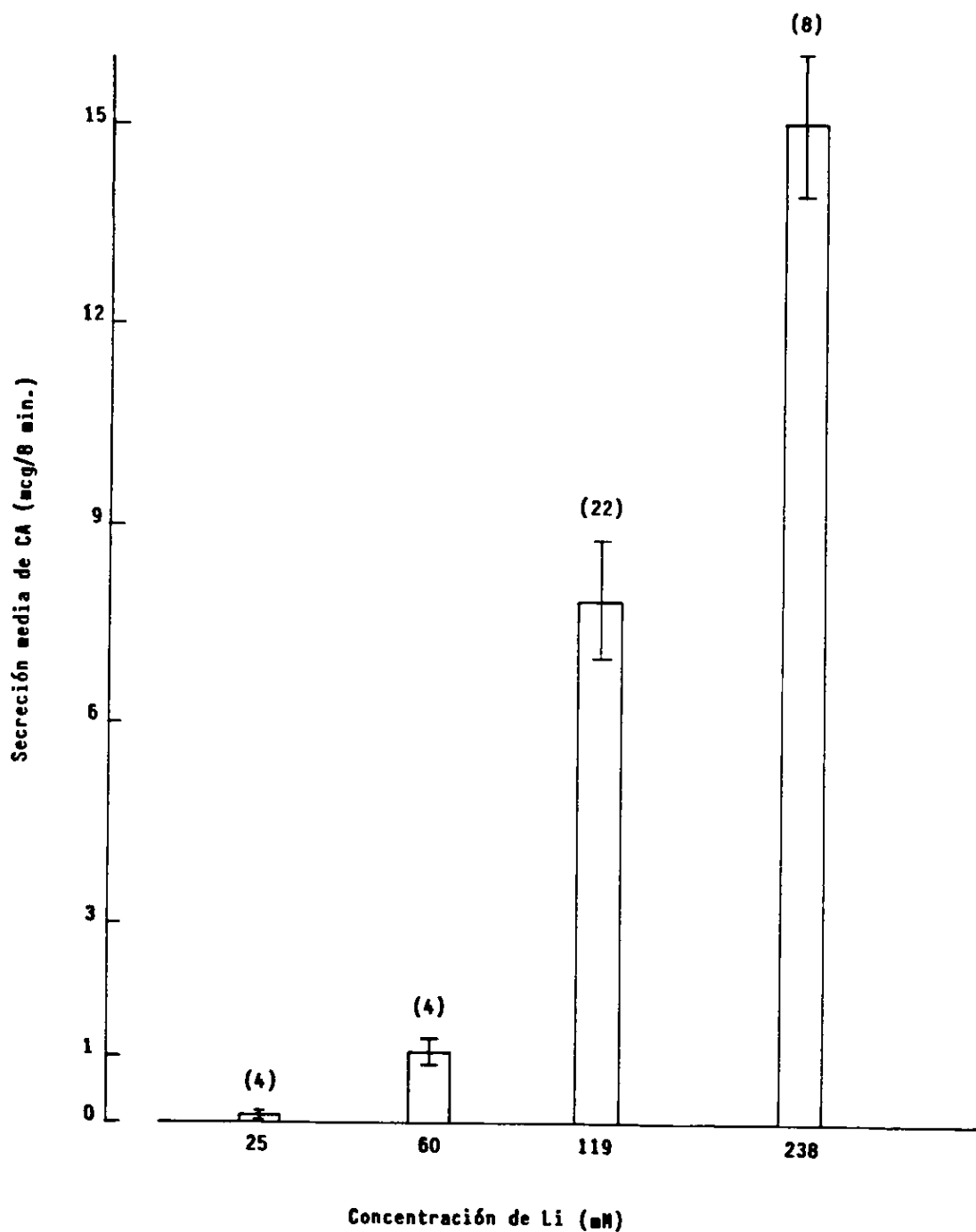
Los resultados aparecen en la figura 11 e indican que la respuesta secretora a la reintroducción de Ca es proporcional a la concentración de Li en el Krebs durante el periodo de perfusión y por tanto presumiblemente a la concentración de Li en el medio intracelular.

8.- EFECTO DE LA PRESENCIA DE Na, Li, Y SACAROSA DURANTE LA REINTRODUCCION DE Ca SOBRE LA SECRECION DE CATECOLAMINAS EVOCADA

Puesto que en todos los experimentos previamente descritos el Ca fue reintroducido en Krebs-sacarosa, nos pareció interesante estudiar el efecto de la presencia de Li y Na durante la reintroducción de Ca en la respuesta secretora evocada mediante dicho procedimiento en glándulas previamente perfundidas con Krebs-Li. Por ello, en los experimentos que se exponen a continuación se reintrodujo el Ca como Krebs-Li, Krebs-normal o Krebs-sacarosa.

Cuatro grupos de glándulas pares fueron perfundidos con Krebs-Li-0Ca. Una hora más tarde y desde entonces cada 20 min. se reintrodujo Ca (2,5 mM) durante periodos de 30 seg. (véase figura 12). En la glándula utilizada como control el Ca fue reintroducido siempre en Krebs-normal

FIGURA 11. Efecto de la concentración de Li sobre la respuesta secretora de catecolaminas (CA) inducida por la reintroducción de Ca. Las glándulas fueron perfundidas durante periodos de 30 min. con Krebs-Li-0Ca conteniendo diferentes concentraciones de Li (25, 60, 119 y 238 mM). Al final de cada periodo de perfusión se reintrodujo Ca (2,5 mM, 2 min.). Cada columna representa el valor medio de las catecolaminas secretadas correspondiente al número de experimentos señalado entre paréntesis. Las líneas verticales indican el error estándar de la media. Las demás condiciones experimentales fueron similares a las señaladas en el pie de la figura 9.

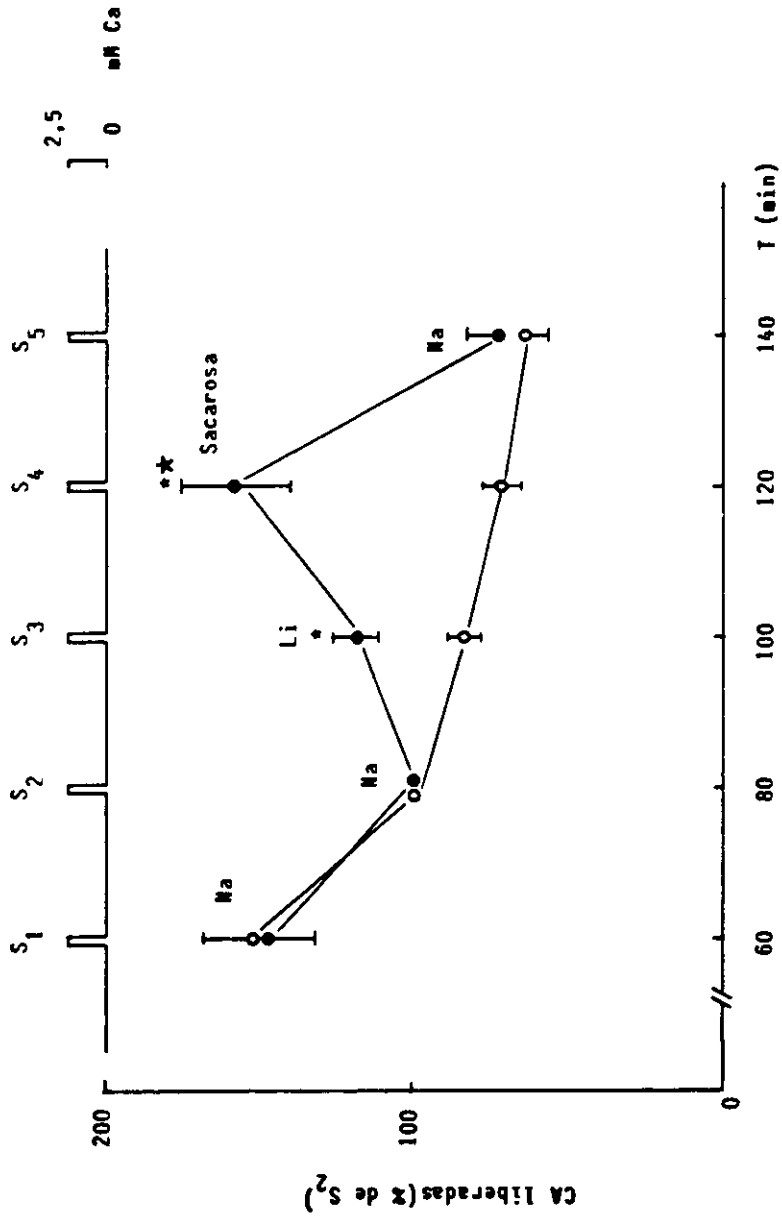


mientras que en la experimental la reintroducción de Ca en S_3 y S_4 fue realizada en Krebs-Li y Krebs-sacarosa respectivamente. Los resultados están expresados como porcentaje de la respuesta secretora obtenida durante la segunda reintroducción de Ca (S_2). Las diferencias encontradas entre la secreción de catecolaminas evocada por la reintroducción de Ca en Krebs-Li (S_3) y Krebs-sacarosa (S_4) con respecto a sus respectivos controles en Krebs-normal fueron estadísticamente significativas ($P < 0,01$). Las diferencias entre la secreción de catecolaminas evocada por la reintroducción de Ca en Krebs-Li y Krebs-sacarosa fueron asimismo estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

9.- EFECTO DE (+)-PN 200-110 SOBRE LA SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS EVOCADA POR Li

Se ha comprobado que la acumulación de Li en el interior de diferentes tipos de células excitables determina una reducción paralela en la $[Na]_i$ y sobre todo de $[K]_i$ proporcional al tiempo que permanece el tejido en el medio en que está presente el Li y a la concentración de éste en el mismo (Keynes y Swan, 1959; Carmeliet, 1964; Friedman, 1977). Esta redistribución iónica se asocia cuando es pronunciada a grados variables de despolarización (Gallego y Lorente de N6, 1947; Carmeliet, 1964).

FIGURA 12. Diferencias en la secreción de catecolaminas (CA) evocada por la reintroducción de Ca (2,5 mM) en Krebs-normal, Li o sacarosa. Glándulas procedentes de un mismo animal fueron perfundidas con Krebs-Li-0Ca. Después de 60 min. de perfusión se reintrodujo Ca durante periodos de 30 seg. cada 20 min. como se indica en la figura (S₁, S₂, S₃, S₄, S₅). En la glándula control, (○—○) el calcio siempre se reintrodujo en Krebs-normal, sin embargo en la glándula experimental (●—●) la reintroducción de Ca se realizó en Krebs-normal en los tiempos correspondientes a S₁, S₂ y S₅ y en Krebs-Li y Krebs-sacarosa en S₃ y S₄ respectivamente. Los resultados aparecen expresados como porcentaje de la liberación de catecolaminas obtenida en S₂. Los puntos representan la media de las catecolaminas liberadas y las líneas verticales el error estandar de la media de cuatro experimentos pares. * P < 0,001 comparado con el control. *P < 0,05 comparado con Krebs-Li.

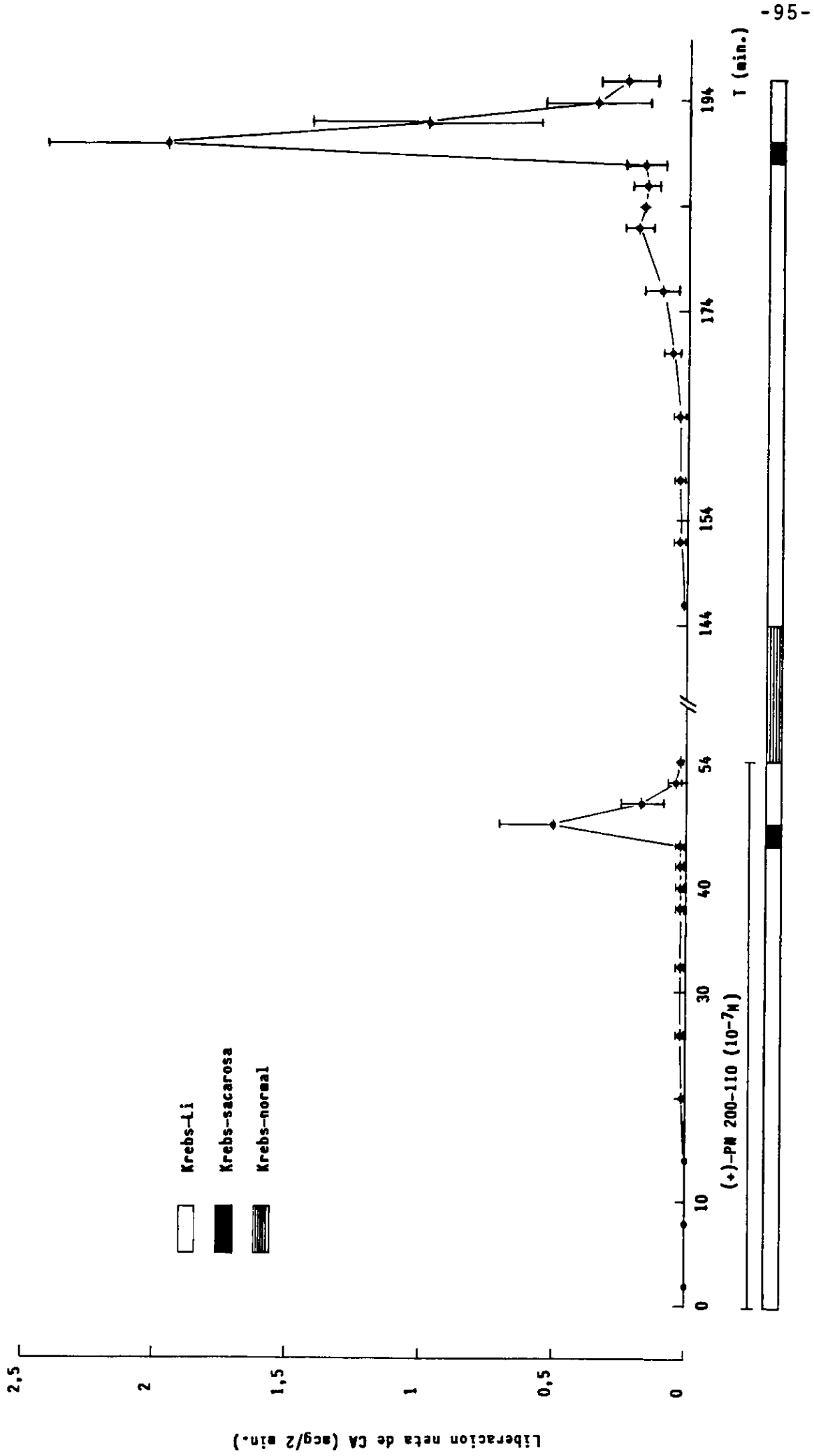


Si ocurriera este mismo fenómeno en la célula cromafín, el cambio en el potencial de membrana no sólo favorecería el funcionamiento en sentido inverso del posible intercambio Li-Ca sino que podría activar la entrada de Ca también a través de los canales de Ca sensibles a voltaje (CCSV).

Con el fin de valorar el grado de participación de estos canales en la respuesta secretora mediada por Li, decidimos estudiar el efecto de (+)-PN 200-110 -un antagonista del Ca de tipo dihidropiridínico-, tanto sobre la liberación espontánea de catecolaminas inducida por Li como sobre el incremento en la respuesta secretora motivado, una vez alcanzada la fase de meseta, por la sustitución del Li por sacarosa en el líquido de perfusión. Para ello, una misma glándula fue perfundida con Krebs-Li en ausencia y en presencia (desde 10 min. antes) de (+)-PN 200-110 (10^{-7} M). La elección de esta dihidropiridina se realizó en base a que en la glándula adrenal de gato se comporta como un potente inhibidor de la respuesta secretora evocada por alto K, un estímulo activador por excelencia de los CCSV (Gandía y col., 1987; Cárdenas y col., 1988).

En la figura 13 puede observarse como en presencia de (+)-PN 200-110 prácticamente desaparece el aumento gradual en la liberación de catecolaminas (evidente con la perfusión control); además, el incremento en la secreción de catecolaminas sobre el valor previo al cambio de

FIGURA 13. Efecto de (+)-PN 200-110 (10^{-7} M) sobre la secreción de catecolaminas (CA) evocada por Li. Los datos que aparecen en esta figura corresponden a dos periodos consecutivos de perfusión con Krebs-Li en una misma glándula. En ambos casos, 45 min. después de iniciada la perfusión con Krebs-Li, el Li fue sustituido durante 2 min. por sacarosa (tiempos 46 y 190). La exposición al (+)-PN 200-110 comenzó 10 min. antes y se mantuvo los 54 primeros min. de perfusión con Krebs-Li. Con el fin de evitar el efecto residual de esta dihidropiridina en el segundo periodo, entre ambos se intercalaron 90 min. de perfusión con Krebs-normal. Las muestras fueron recogidas durante periodos de 2 min. Los puntos representan la secreción media neta de catecolaminas en los tres experimentos realizados. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.



líquido de perfusión (sustitución del Krebs-Li por Krebs-sacarosa) es claramente inferior al observado en el control ($0,5 \pm 0,2$ vs. $1,8 \pm 0,4$ mcg/2 min., $n=3$), y equivale a un grado medio de inhibición del 68% (rango 42-85%).

El hecho de que este antagonista del Ca inhiba parcialmente la respuesta secretora inducida por Li sugiere que en estas condiciones experimentales, parte de la entrada de Ca a la célula cromafín tiene lugar a través de los CCSV.

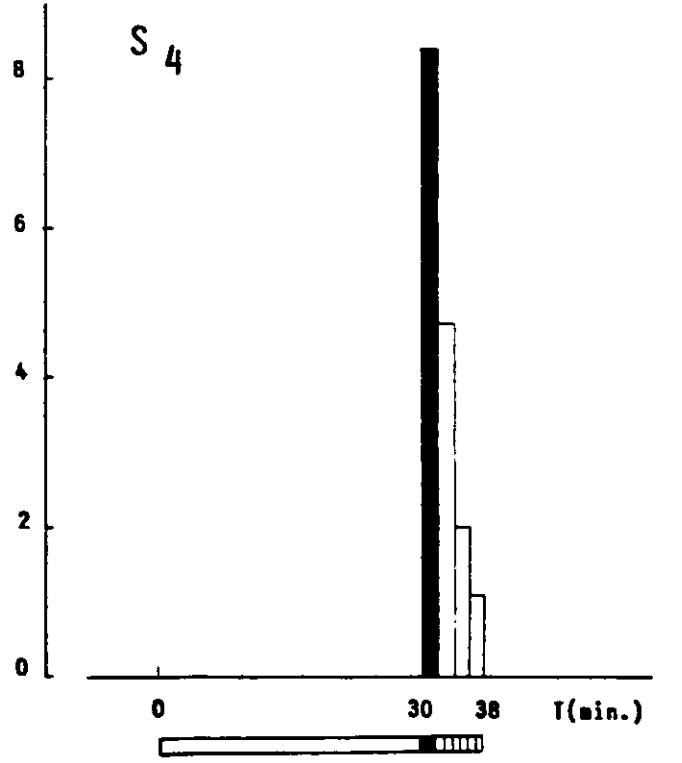
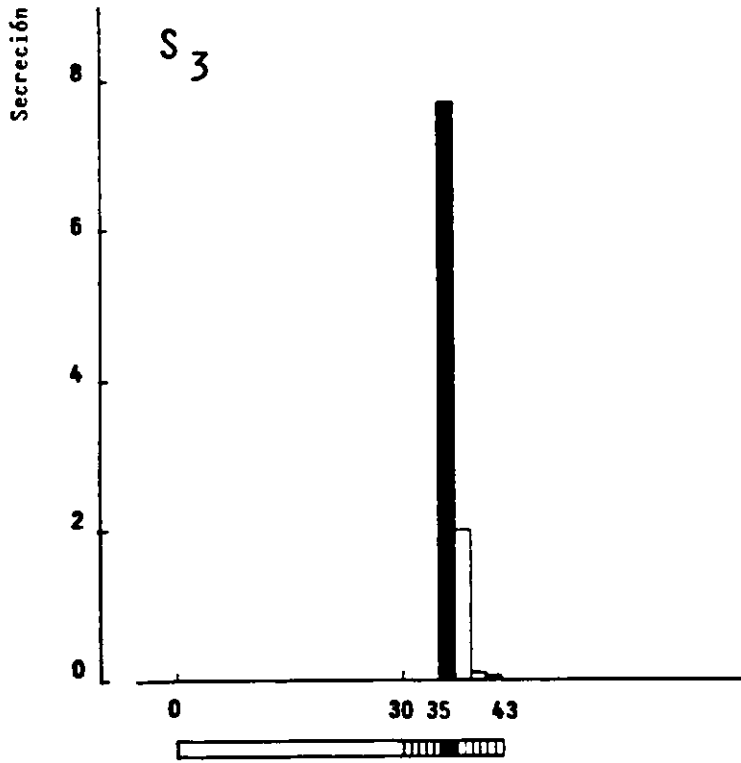
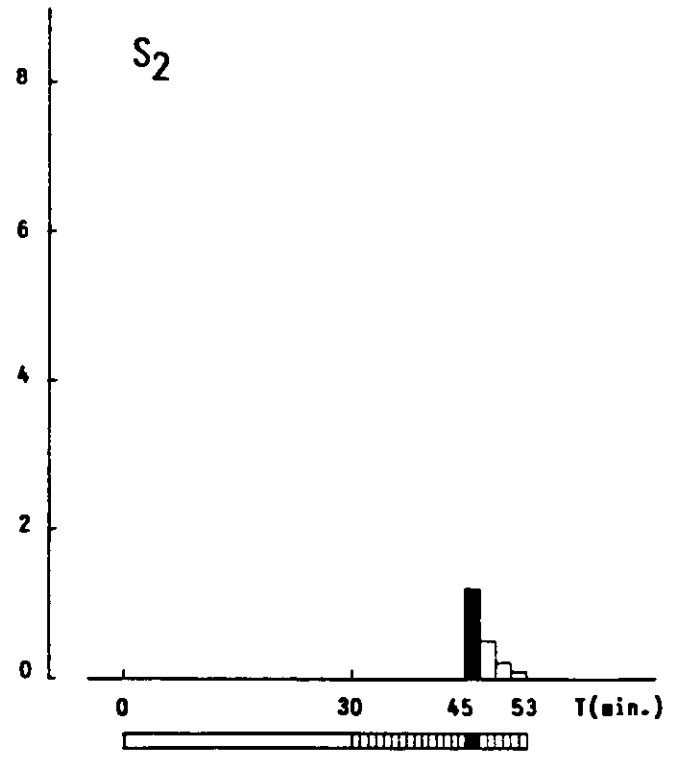
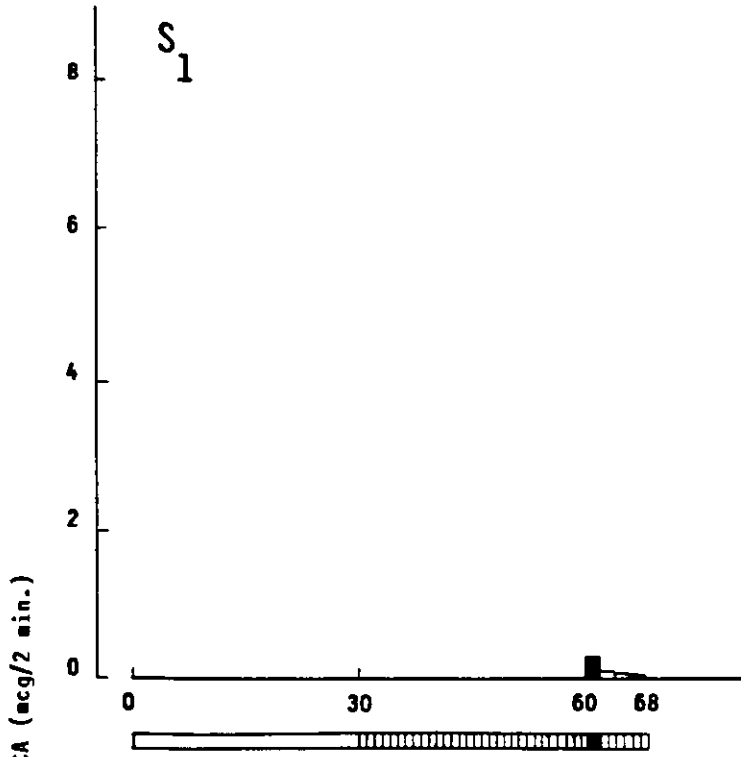
10.- REVERSIBILIDAD DE LA RESPUESTA SECRETORA DE CATECOLAMINAS INDUCIDA POR Li




Los datos presentados hasta este momento demuestran que el Li incrementa de manera gradual la secreción basal de catecolaminas en la glándula adrenal de gato (véase figura 6) y sugieren que tal efecto es debido a su acumulación intracelular. Probablemente el enorme gradiente de concentración extra/intracelular durante la perfusión de las glándulas con Krebs-Li y una débil capacidad de la bomba de Na para expulsar el Li de la célula cromafín (Keynes y Swan, 1959; Lastowecka y Trifaró, 1974) en contra de este gradiente electroquímico sean factores determinantes de tal incremento en la concentración de Li intracelular. Por tanto, cabría suponer que la retirada del Li del medio de perfusión, una vez que éste se hubiera acumulado en la célula, al invertir su

gradiente de concentración transmembrana permitiría una reducción progresiva de la concentración de Li intracelular. Esta debería traducirse en una reducción de la respuesta secretora de catecolaminas.

Para explorar esta posibilidad, se investigó cuál sería el efecto de un periodo de perfusión con Krebs-sacarosa-0Ca sobre la liberación de catecolaminas evocada por la reintroducción de Ca. Con este fin, en un grupo de experimentos se estudió la respuesta secretora a cuatro reintroducciones de Ca (2,5 mM, 2 min.) realizadas cada una de ellas después de haber perfundido una misma glándula con Krebs-Li-0Ca, 30 min., seguido de Krebs-sacarosa-0Ca. Cada uno de los cuatro periodos de perfusión sólo se diferenció en el momento de la reintroducción de Ca después de haber terminado la perfusión con Krebs-Li: S₁, 30; S₂, 15; S₃, 5 y S₄, 0 min. respectivamente. La reintroducción de Ca se realizó en todos los casos en Krebs-sacarosa. En la figura 14 se puede ver como la desaparición del efecto secretor evocado por el Li es progresiva, y está en relación directa al tiempo que este ion está ausente en el líquido de perfusión. Obsérvese como 30 min. de perfusión con Krebs-sacarosa-0Ca reducen casi completamente la respuesta secretora.

FIGURA 14. Influencia del periodo de lavado con Krebs-sacarosa-0Ca después de la perfusión de Krebs-Li-0Ca sobre la liberación de catecolaminas (CA) inducida por la reintroducción de Ca (2,5 mM, 2 min.). Los datos que aparecen en la figura corresponden a cuatro periodos de perfusión consecutivos en la misma glándula. En ellos la perfusión durante 30 min. de Krebs-Li-0Ca fue seguida de otra con Krebs-sacarosa-0Ca durante tiempos diferentes: S₁, 30; S₂, 15; S₃, 5 y S₄, 0 min. respectivamente. En todos los casos, finalizada la perfusión, se reintrodujo Ca (2,5 mM, 2 min.). Las barras señalan la secreción neta de catecolaminas correspondiente a muestras recogidas durante 2 min. Los datos representados en la figura corresponden a un experimento de tres realizados, todos ellos con resultados similares.



-  Krebs-Li-OCa
-  Krebs-Sacarosa-OCa
-  Krebs-sacarosa

11.- EFECTO DE LA INHIBICION DE LA BOMBA DE Na CON OUABAINA SOBRE LA SECRECION DE CATECOLAMINAS EVOCADA POR Li

El hecho de que la secreción de catecolaminas evocada por la reintroducción de Ca en glándulas adrenales previamente perfundidas con Krebs-Li disminuya de manera progresiva y proporcional al tiempo transcurrido desde la retirada del Li del medio de perfusión, (figura 14), indica que este ion puede salir de alguna manera de la célula cromafín.

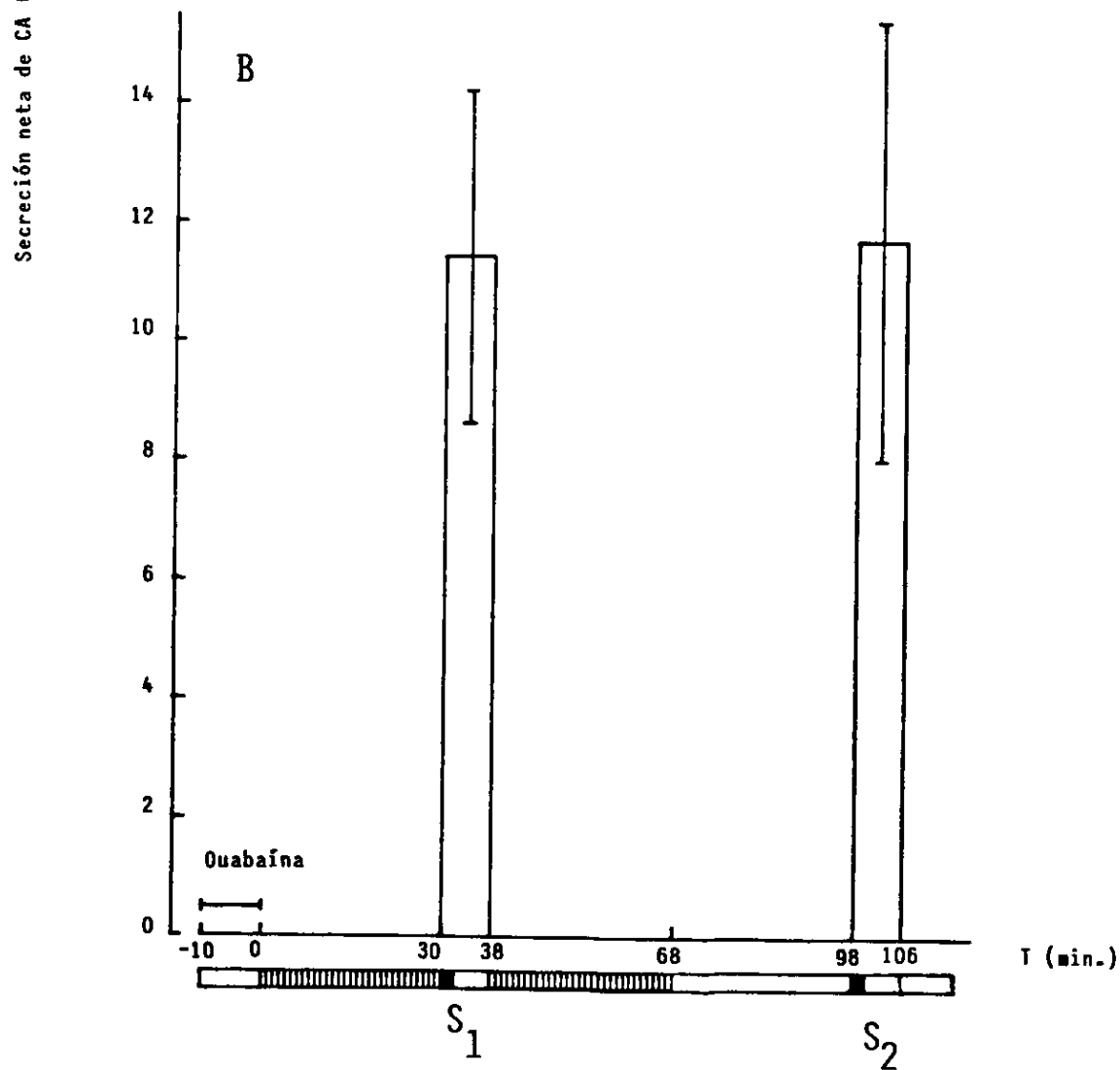
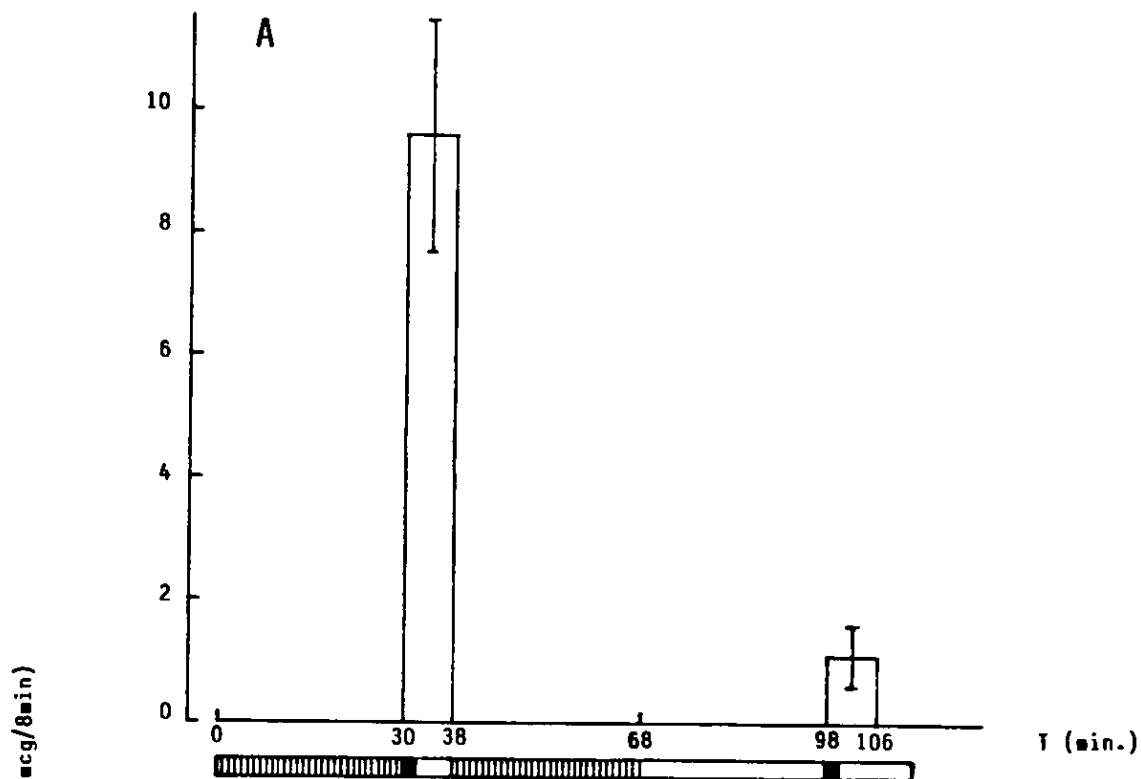
Aunque tanto en células musculares como en eritrocitos la bomba de Na parece ser un mecanismo con débil capacidad para expulsar el Li al espacio extracelular (Keynes y Swan, 1959; Beaugé, 1978), nos pareció interesante investigar hasta que punto la bomba de Na contribuye a la salida del Li de la célula cromafín. Con este fin se estudió la influencia de la inhibición de la ATPasa Na-K mediante ouabaína sobre la secreción de catecolaminas evocada por Li.

En un primer grupo de experimentos se evaluó si el tratamiento con ouabaína modificaba el efecto de 30 min. de lavado en Krebs-sacarosa-0Ca sobre la secreción de catecolaminas evocada por la reintroducción de Ca (2,5 mM, 2min.) en glándulas previamente perfundidas con Krebs-Li-0Ca.

Para ello en dos grupos de glándulas, uno de ellos tratado previamente con ouabaína (10^{-4} M, 10 min.), se determinó la respuesta secretora de catecolaminas evocada por dos reintroducciones de Ca consecutivas realizadas cada una de ellas tras un periodo de perfusión de 30 min. con Krebs-Li-0Ca seguido por Krebs-sacarosa-0Ca. En ambos casos el Ca se reintrodujo como Krebs-sacarosa, siendo la única variable la duración del periodo de perfusión con Krebs-sacarosa-0Ca: 0 min. en S_1 , y 30 min. en S_2 .

Los resultados se muestran en la figura 15. En las glándulas no tratadas con ouabaína (A) la liberación de catecolaminas ocasionada en S_2 fue considerablemente menor que la observada cuando la reintroducción de Ca siguió de forma inmediata a la perfusión con Krebs-Li-0Ca ($1,08 \pm 0,5$ vs $9,6 \pm 1,9$ mcg/8 min.; $n=7$); la diferencia entre ambas fue estadísticamente significativa ($P < 0,01$). Sin embargo, en las glándulas tratadas con ouabaína (B) el periodo de lavado con Krebs-sacarosa-0Ca no modificó de forma significativa la respuesta secretora (S_1 : $11,4 \pm 2,8$ vs S_2 : $11,7 \pm 3,7$ mcg/8 min.; $n=5$). Mientras que en las glándulas no tratadas la liberación de catecolaminas en S_2 fue el $11 \pm 8,8\%$ de la secreción obtenida en S_1 , en las glándulas tratadas con ouabaína fue el $99 \pm 29\%$. La diferencia observada entre las medias de la relación S_2/S_1 en ambos grupos de glándulas fue estadísticamente significativa ($P < 0,001$).

FIGURA 15. Efecto de la ouabaina sobre la secreción de catecolaminas (CA) evocada por la reintroducción de Ca realizada tras un periodo de lavado con Krebs-sacarosa-OCa en glándulas previamente perfundidas con Krebs-Li-OCa. Los datos que aparecen en la figura corresponden a dos periodos de perfusión consecutivos realizados en glándulas previamente no tratadas (A) o tratadas (B) con ouabaina (10^{-4} M, 10 min.). En S_2 la perfusión durante 30 min. con Krebs-Li-OCa fue seguida de otra también de 30 min. con Krebs-sacarosa-OCa. La reintroducción de Ca (2,5 mM, 2 min.) siempre se realizó en Krebs-sacarosa. Cada columna representa la secreción media de catecolaminas obtenida en 7 (A) y 5 (B) experimentos respectivamente, y las líneas verticales el error estándar de la media. (▨) Krebs-Li-OCa; (■) Krebs-sacarosa; (□) Krebs-sacarosa-OCa.

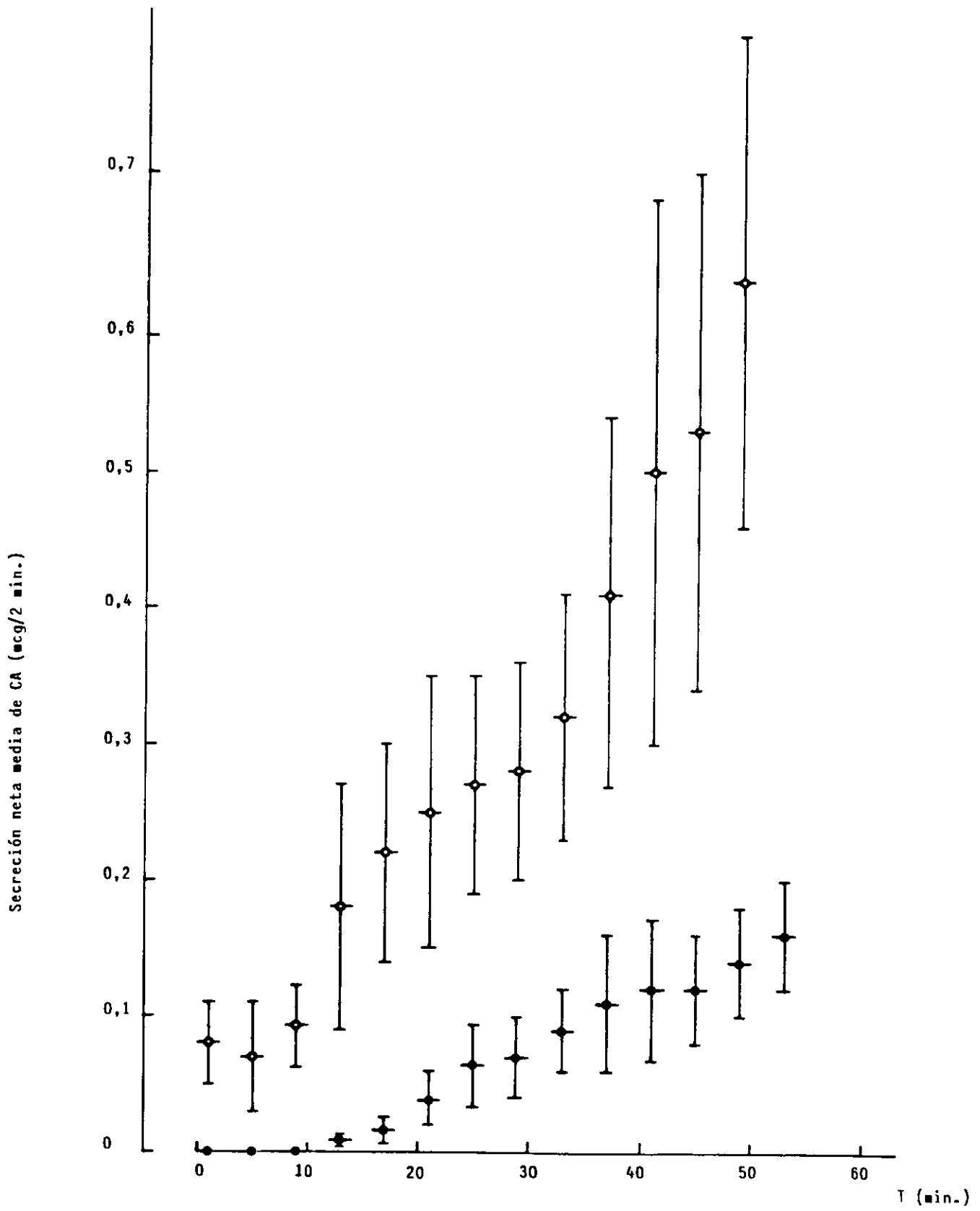


Estos datos sugieren que la bomba de Na puede contribuir de forma relevante a la salida de Li de la célula cromafín. Si esto fuera cierto la inhibición de este enzima debería favorecer un mayor incremento en la concentración intracelular de Li en glándulas perfundidas con Krebs-Li y por tanto podría esperarse una mayor secreción de catecolaminas.

Para explorar esta posibilidad un grupo de glándulas fueron perfundidas durante dos periodos consecutivos de 50 min. con Krebs-Li (antes y después de haber sido tratadas con ouabaína 10^{-4} M, 10 min.). Con el fin de evitar el efecto residual del Li acumulado en la primera perfusión, entre ambos periodos las glándulas fueron perfundidas durante 1 hora con Krebs-sacarosa.

En la figura 16 se puede ver que aunque la liberación de catecolaminas en ambos casos aumenta de forma gradual, empieza a ser evidente antes y es claramente superior en las perfusiones realizadas después del tratamiento de las glándulas con ouabaína.

FIGURA 16. Efecto de la ouabaína sobre la secreción de catecolaminas (CA) evocada por Krebs-Li. Los datos representados en esta figura corresponden a dos perfusiones consecutivas con Krebs-Li realizadas en una misma glándula antes (●—●) y después (○—○) del tratamiento con ouabaína (10^{-4} M, 10 min.). Con el fin de evitar el efecto residual del Li acumulado en el primer periodo, entre ambas perfusiones con Krebs-Li, las glándulas fueron perfundidas durante una hora con Krebs-sacarosa. Los puntos representan la secreción media de catecolaminas de cinco experimentos y las líneas verticales el error estándar de la media.



V.- DISCUSION

El litio al igual que la sacarosa, colina o tris-hidroxi-metil-amino-metano, entre otros, ha sido empleado con frecuencia como sustituyente osmótico del Na por numerosos investigadores para estudiar los fenómenos Na dependientes. Sin embargo, cuando el Na es retirado del medio extracelular el comportamiento de los tejidos varía según la naturaleza de los sustituyentes empleados. En tejidos excitables el reemplazamiento del Na por Li es el que ocasiona menos cambios a corto plazo con respecto a la situación en que existe una concentración de Na normal; esto pone en evidencia cierta similitud funcional entre ambos elementos. Así, la respuesta secretora de catecolaminas ocasionada por el reemplazamiento total de Na por sacarosa o colina fue total (glándula adrenal bovina) o parcialmente evitada (glándula adrenal de gato) cuando el Li fue el sustituyente osmótico empleado (Lastowecka y Trifaró, 1974; Nishimura y col., 1981).

La similitud entre Na y Li, debido a sus características fisico-químicas, no sólo se manifiesta en el ámbito extracelular; el Li atraviesa casi con la misma facilidad que el Na la membrana celular (Ehrlich y Diamond, 1980), y es el único catión inorgánico capaz de mantener la excitabilidad en ausencia de Na en distintos tipos celulares (Hodgkin y Katz, 1949; Carmeliet, 1964). Sin embargo se

acumula de forma gradual en el interior de algunas células excitables, probablemente debido a que es mal sustrato para la ATPasa Na-K (Keynes y Swan, 1959; Beaugé, 1978).

Teniendo en cuenta que el incremento en la concentración intracelular de Na es un factor determinante de la secreción de catecolaminas observada en glándulas adrenales tratadas con ouabaina (Esquerro y col., 1980; García y col., 1980; 1981), pensamos que en razón de su similitud con el Na el Li podría de igual manera activar el proceso secretor. Explorar esta posibilidad e intentar establecer los mecanismos implicados en dicho efecto ha sido el objetivo central de este trabajo. Para ello, el procedimiento utilizado ha sido la cuantificación de las catecolaminas liberadas en grupos de glándulas adrenales de gato perfundidas con medios conteniendo diferentes concentraciones iónicas. Los resultados indican que el Li incrementa la secreción espontánea de catecolaminas. La discusión de los mismos se ha estructurado en los siguientes apartados:

- 1.- El Li como elemento activador del proceso secretor de catecolaminas en la médula adrenal.
- 2.- Posibles mecanismos implicados en la secreción de catecolaminas inducida por Li.
- 3.- Contribución de la bomba de Na a la extrusión del Li en la célula cromafín.

1.- EL Li COMO ELEMENTO ACTIVADOR DEL PROCESO SECRETOR DE CATECOLAMINAS EN LA MEDULA ADRENAL

Los datos obtenidos en este trabajo demuestran que la presencia de Li (119 mM) en el líquido de perfusión da lugar a un aumento gradual en la secreción basal de catecolaminas de la glándula adrenal de gato. Dicho incremento alcanza una fase de meseta aproximadamente a los 45 min. de iniciada la perfusión y requiere la presencia de calcio en el medio extracelular (figura 6).

Este incremento de la secreción no puede ser atribuido a la reducción de la concentración de Na hasta 25 mM en la solución utilizada para perfundir la adrenal, puesto que el empleo de sacarosa o colina como sustituyentes osmóticos del Na en las mismas condiciones experimentales no modificó la liberación basal de catecolaminas.

El hecho de que la respuesta secretora obtenida no se modifique en glándulas pretratadas con mecamilamina y atropina, ambos en concentraciones suficientes para bloquear de forma eficaz los receptores nicotínicos y muscarínicos respectivamente, excluye un papel mediador de la acetilcolina liberada en las terminaciones colinérgicas del nervio esplácnico que inervan la médula adrenal e indica que se trata de un efecto directo del Li sobre la célula cromafín.

Aunque la liberación de catecolaminas evocada por el Krebs-Li es de menor magnitud que la inducida por ouabaína, el curso temporal en ambos casos es similar: aumenta de forma progresiva hasta alcanzar un máximo a los 35-45 min., y después declina lentamente aproximándose a los niveles basales 120 min. después de comenzada la perfusión. Además, la secreción de catecolaminas evocada por la reintroducción de Ca en glándulas previamente perfundidas con Krebs-Li-0Ca -en el que se encontraba presente el Mg (1,2 o 3,7 mM)- depende de la duración del periodo de perfusión con Krebs-Li (Figura 10) y de la concentración de este ion en el líquido de perfusión (Figura 11) y es gradualmente reversible una vez que se ha suprimido la presencia del Li en la solución utilizada para la perfusión (Figura 14). Todo ello indica que la acumulación de Li en el interior de la célula es el factor crítico que determina la respuesta secretora evocada por este ión, de la misma manera que la acumulación de Na lo es para la liberación de catecolaminas evocada por ouabaína (Esquerro, 1980; García y col., 1980; 1981).

2.- POSIBLES MECANISMOS IMPLICADOS EN LA SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS INDUCIDA POR LITIO

La elevación de la concentración de calcio iónico en el citoplasma celular es un requisito indispensable para que tenga lugar la secreción de catecolaminas en la médula adrenal (Douglas y Rubin, 1961; 1963). En nuestros

experimentos, sólo cuando el calcio estaba presente en el líquido de perfusión fué evidente la influencia del Li sobre el proceso secretor (Figura 9). Esta circunstancia descarta que la liberación de Ca intracelular sea el mecanismo responsable e indica que este ion facilita de alguna manera el acceso del calcio al interior de la célula cromafín. Una vez demostrada la no participación del ionóforo asociado al receptor colinérgico en este efecto, quedan dos posibles vías de entrada de calcio conocidas: 1) el sistema de intercambio Na/Ca y 2) los canales de Ca sensibles a voltaje.

2.1.- EL SISTEMA DE INTERCAMBIO Na-Ca EN LA RESPUESTA SECRETORA DE CATECOLAMINAS EVOCADA POR Li

La caracterización del sistema de intercambio Na-Ca como vía de acceso para el Ca en la membrana celular tuvo lugar en base a dos observaciones realizadas inicialmente en el axón gigante de calamar: 1) el incremento en la concentración de Na_i promovía la entrada de Ca en la célula y 2) en axones tratados con ouabaina la salida de Na dependía de la presencia de Ca en el medio extracelular (Baker y col., 1969a).

Tanto en células cromafines cultivadas como en la glándula adrenal perfundida, los procedimientos que conducen a un incremento en la relación $[Na]_i/[Na]_e$ tales como la retirada del Na extra-

celular o la inhibición de la ATPasa Na-K determinan un aumento en la liberación de catecolaminas proporcional al grado de reducción del gradiente de Na extra-intracelular y a la concentración de Ca en el líquido de perfusión (Esquerro y col., 1980; García y col., 1980; 1981; Nishimura y col., 1981; Sorimachi y Nishimura, 1984; Nishimura y Sorimachi, 1984). Estos hechos apoyan la existencia de un sistema de intercambio Na-Ca en la membrana plasmática de la célula cromafín que participaría en la modulación del proceso secretor de catecolaminas.

La marcada similitud entre las respuestas secretoras inducidas por Li y ouabaína, sugiere que el intercambio $[Li]_i - [Ca]_e$ podría ser un mecanismo involucrado en la liberación de catecolaminas evocada por Li.

En vesículas de sarcolema cardiaco se ha demostrado que los movimientos de Ca dependientes de Na son inhibidos cuando el Na está presente en el mismo lado de la membrana que el Ca; este hallazgo es compatible con la existencia de un antagonismo competitivo entre Na y Ca por un lugar de unión común en el transportador de carácter divalente (Reeves y Sutko, 1983). Por tanto, la respuesta secretora de catecolaminas inducida al reemplazar 134 mM de Na por sacarosa en glándulas previamente tratadas con ouabaína y perfundidas con Krebs-normal (Figura 8)

podría interpretarse como la consecuencia de la inversión instantánea del gradiente electroquímico para el Na, que activaría el intercambio Na_i-Ca_e , y también como el resultado de la menor competencia entre Na y Ca por el transportador. La respuesta secretora evocada por la sustitución del Li por sacarosa en glándulas adrenales perfundidas con Krebs-Li (Figura 7) podría ser interpretada de manera similar.

Cuando el litio se utilizó como sustituyente del Na en glándulas pretratadas con ouabaína y perfundidas con Krebs-normal o se empleó el Na para reemplazar al Li en glándulas previamente perfundidas con Krebs-Li, el incremento en la liberación de catecolaminas fue considerablemente menor que el obtenido cuando el sustituyente osmótico empleado fue la sacarosa. Estos hallazgos son compatibles con la idea de que el Li comparte en cierta medida las propiedades funcionales del Na en el sistema de intercambio Na-Ca presente en la membrana de las células cromafines. Que el reemplazamiento del Na por Li en glándulas tratadas con ouabaína y perfundidas con Krebs-normal no evite totalmente el incremento en la secreción de catecolaminas ocasionado por la reducción de la $[Na]_e$ puede indicar que la afinidad del Li por el transportador es menor que la del Na. Por otra parte, el hecho de que la reintro-

ducción de Ca en Krebs-Li cause una mayor respuesta secretora que en Krebs-normal (Figura 12) también apoya esta sugerencia.

Esta interpretación de nuestros resultados concuerda con los datos publicados por otros autores, según los cuales cuando el Li sustituyó a todo el Na extracelular el eflujo de Ca-Na dependiente se mantuvo en una proporción que varió entre el 33% en láminas de médula adrenal bovina (Rink, 1977), y el 88% en células cromafines bovinas cultivadas (Sorimachi y Nishimura, 1984). Probablemente la inexistencia de isótopos de Li con una vida media suficientemente larga es el motivo de que no se hayan publicado hasta el momento estudios sobre la capacidad del Li acumulado en células excitables integras para ocupar el lugar del Na_i y permitir el funcionamiento en sentido inverso del sistema de intercambio Na-Ca.

2.2.- LOS CANALES DE Ca SENSIBLES A VOLTAJE (CCSV) EN LA RESPUESTA SECRETORA DE CATECOLAMINAS EVOCADA POR Li

Aunque en experimentos de corta duración (hasta aproximadamente 30 min.) el potencial de membrana se suele ver poco afectado por la sustitución de Na por Li en el medio, cuando la exposición al Li es prolongada, en diferentes tipos de células musculares y nerviosas se observa una progresiva despolarización

(Schou, 1957; Keynes y Swan, 1959; Carmeliet, 1964); quizás debido a que la acumulación gradual de Li en las células excitables conlleva una pérdida fundamentalmente de K pero también de Na intracelular (Keynes y Swan, 1959; Carmeliet, 1964; Friedman, 1977). Si la perfusión mantenida de las glándulas adrenales con Krebs-Li ocasionara cierto grado de despolarización en las células cromafines, este fenómeno no solo favorecería el funcionamiento en sentido inverso del sistema de intercambio Na-Ca, sino también la apertura de CCSV.

Es bien conocido que la respuesta secretora inducida por la activación de los CCSV en las células cromafines disminuye con el tiempo a pesar de ser mantenido el estímulo (Baker y Rink, 1975; Schiavone y Kirpekar, 1982). Aunque existe cierta polémica al respecto, la reducción de la permeabilidad para el Ca inducida por el propio Ca (inactivación de los canales) parece ser el factor responsable (Fenwick y col., 1982; Artalejo y col., 1987). El hecho de que la liberación de catecolaminas evocada por Li, al igual que por ouabaína, (Figuras 6 y 8) se mantenga largo tiempo con escasa inactivación, a primera vista parece ir en contra de que los CCSV jueguen un papel importante. Sin embargo, es necesario tener en cuenta en ambos casos las diferencias del estímulo secretor. Mientras en el primero el estímulo (alto K) se mantiene con

igual intensidad en el tiempo, en el segundo, como consecuencia de la redistribución iónica gradual (incremento en la [Li] y reducción de la [K] intracelulares), la despolarización se produciría de manera progresiva. En esta última circunstancia, el predominio del proceso de activación de los CCSV sobre el de inactivación podría ser suficientemente prolongado como para mantener la secreción.

Más difícil de atribuir a la despolarización es el incremento en la liberación de catecolaminas observado cuando el ClLi es retirado del Krebs-Li y reemplazado por sacarosa (Figura 7) o cloruro de colina, teniendo en cuenta que la sustitución de Na por sacarosa en células cromafines de jerbo ocasiona tan solo una discreta hiperpolarización (Douglas y col., 1967), y que dicho fenómeno es evitado por la presencia de Na en el mismo experimento. El hallazgo de que las diferencias en la magnitud de la respuesta secretora evocada por la reintroducción de Ca dependa de la presencia de Na, Li o sacarosa en el Krebs (Figura 12) tampoco concuerda con la hipótesis de que la activación de los CCSV sea el único mecanismo involucrado, a menos que el Na y el Li puedan interferir con la entrada de Ca a través de estos canales con diferente eficacia.

En este sentido, cabe destacar que en nuestro Laboratorio se ha demostrado recientemente la participación de los CCSV en el efecto potenciador de la respuesta secretora de catecolaminas inducida por 17,7 mM de K en la glándula adrenal de gato, cuando se reduce simultáneamente la concentración de sodio en el líquido de perfusión manteniendo la osmolaridad con sacarosa o colina (Abajo y col., 1989b). La mayor actividad de los CCSV en presencia de bajas concentraciones de Na podría ser interpretada como la pérdida de un efecto antagónico habitual del Na sobre la captación de Ca por los CCSV. Tal antagonismo podría ejercerse bien obstaculizando de forma pasiva la entrada de Ca al canal, o a nivel de la propia membrana participando en los procesos que regulan su permeabilidad. Algunos autores (Rubin, 1982; Sorimachi y Nishimura, 1982; Sorimachi y col., 1986) han sugerido que los cationes monovalentes podrían fijarse lo mismo que el Ca y Mg, aunque con menor eficacia, a los lugares aniónicos presentes en la superficie de la membrana que son responsables del potencial de superficie negativo (potencial zeta); dicho potencial regula la relación entre los cambios de voltaje en la membrana y las corrientes iónicas generadas en los canales sensibles a voltaje (Rubin, 1982). Si esta hipótesis fuera cierta, el efecto facilitador de la secreción observado al reducir la $[Na]_e$ sería debido a que la reducción de las cargas negativas neutralizadas, in-

crementando el potencial de superficie, determinaría un aumento en el grado de permeabilidad de los CCSV que habitualmente les corresponde para un determinado potencial de membrana.

Según esta teoría, una menor afinidad de los grupos aniónicos por el Li con respecto al Na explicaría las diferencias observadas en la secreción de catecolaminas ocasionada al reintroducir el Ca en presencia de ambos elementos, así como el hecho de que el Li no sea capaz de evitar totalmente el incremento en la liberación de catecolaminas observado en glándulas adrenales tratadas con ouabaína y perfundidas con Krebs-normal cuando parte del Na es reemplazado por sacarosa (Figura 8). Que la colina, a pesar de ser un catión, tenga un comportamiento como sustituto del Na similar al de la sacarosa podría indicar que su tamaño molecular muy superior al de los iones Na y Li no le permite acceder a los lugares de unión aniónica en la superficie de la membrana por lo que su efecto a este nivel sería equivalente al de una molécula neutra.

A la luz de los argumentos esgrimidos hasta el momento, la secreción de catecolaminas evocada por Li en nuestras condiciones experimentales podría ser debida a la entrada de Ca en la célula cromafín tanto por los CCSV como por el sistema de intercambio Na-Ca que en este caso, funcionando en sentido inverso, permitiría un intercambio

Li_i - Ca_e . Ante la inexistencia de agentes que bloqueen de modo específico el sistema de intercambio Na-Ca, decidimos evaluar el efecto de los antagonistas del Ca sobre dicho fenómeno secretor para comprobar si realmente ambos mecanismos estaban implicados.

El antagonista del calcio utilizado fue (+)-PN 200-110 (10^{-7} M), una dihidropiridina que a la concentración empleada se comporta como un potente inhibidor de los CCSV en la médula adrenal de gato (Gandía y col., 1987; Cárdenas y col., 1988). Tanto el aumento gradual de la secreción espontánea de catecolaminas determinado por el Krebs-Li como el incremento motivado en la misma -una vez alcanzada la fase de meseta- por la sustitución del litio por sacarosa en el líquido de perfusión fueron inhibidos por (+)-PN 200-110 (Figura 13), siendo el grado de reducción de la respuesta secretora observado en torno al 70%.

Estos resultados, junto con los datos anteriormente discutidos, permiten concluir que en la secreción de catecolaminas evocada por Li la entrada de Ca a través de los CCSV contribuye al incremento ocasionado en la concentración de Ca intracelular y que el sistema de intercambio Na-Ca funcionando en sentido inverso -en este caso permitiría un intercambio Li_i - Ca_e - podría ser el mecanismo responsable del aporte de Ca adicional.

3.- CONTRIBUCION DE LA BOMBA DE Na A LA EXTRUSION DE Li EN LA CELULA CROMAFIN

Si bien el Li entra en las células excitables de manera similar al Na, mediante difusión pasiva y a través de los canales de Na sensibles a voltaje, existen diferencias en la relación entre las concentraciones intra y extracelulares de ambos elementos una vez alcanzado el estado estacionario. Mientras que el Na predomina claramente en el espacio extracelular ($[Na]_i/[Na]_e$ 0,1-0,2), cuando el Li está presente en el medio en que está inmerso un tejido muscular o nervioso, la relación $[Li]_i/[Li]_e$ varía entre 1,5-2 en miocardio y músculo liso (Carmeliet, 1964; Friedman, 1977) y 4 en células de neuroblastoma cultivadas (Richelson, 1977). Aun así, el grado de acumulación intracelular observado es inferior al que cabría esperar si este catión se distribuyera de forma pasiva a través de la membrana de estas células (Ehrlich y Diamond, 1980); por ello es necesario admitir que existe una forma de transporte activo que permite la salida de Li al espacio extracelular.

La secreción de catecolaminas evocada por la reintroducción de Ca en glándulas adrenales previamente perfundidas con Krebs-Li disminuye progresivamente en relación directa al periodo transcurrido entre la retirada del Li del medio de perfusión y la reintroducción de Ca; treinta min. fueron suficientes para reducir casi totalmente la respuesta secretora (Figura 14). Este hecho

indica que el Li puede de alguna manera salir de la médula adrenal, y es coherente con los resultados obtenidos en otros tipos de tejidos, ya que el tiempo necesario para reducir a la mitad la $[Li]_i$ en preparaciones tisulares en que se había incrementado previamente la concentración intracelular de este ion fue 30 min. en el ventrículo de gato (Carmeliet, 1964) y 60 min. en el músculo liso vascular de rata (Friedman, 1977).

La bomba de Na a nivel de la membrana plasmática es el sistema encargado de transportar Na y K de forma sincronizada en contra de sus respectivos gradientes electroquímicos. Sin embargo, la salida de Li de las fibras musculares estriadas tiene lugar a una velocidad entre 10 y 25 veces menor que la del Na (Keynes y Swan, 1959) y en eritrocitos solo se ha demostrado un eflujo de Li sensible a ouabaina con niveles de Na intracelular inferiores a 1 mM (Dunham y Senyk, 1977; Beaugé, 1978); además, se ha sugerido que en las células excitables el sistema de intercambio Na-Li sería el principal mecanismo implicado en la salida de Li al espacio extracelular (Ehrlich y Diamond, 1980). Ante la falta de datos relativos al comportamiento de las células nerviosas, nos pareció interesante conocer si la bomba de Na contribuye en alguna medida a la salida de Li de la célula cromafín.

Aceptando que la respuesta secretora evocada por Li depende de la cantidad de Li acumulado en la célula, si parte del Li intracelular saliera ocupando el lugar para

el Na en la ATPasa Na-K, la inhibición de este enzima mediante ouabaína debería ocasionar un incremento en la liberación de catecolaminas observada. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el pretratamiento de la glándula adrenal con ouabaína permite que la respuesta secretora de catecolaminas evocada por la reintroducción de Ca 30 min. después de finalizada una perfusión de 30 min. con Krebs-Li-0Ca sea similar a la observada antes de realizar el periodo de lavado (Figura 15).

Estos datos sugieren que cuando existe una acumulación de Li en la célula, la retirada de este catión del medio extracelular favorece su salida a través de la ATPasa Na-K. Que esto ocurra no es sorprendente, si se tiene en cuenta que la menor concentración de cationes monovalentes en el líquido de perfusión favorece la actividad de este enzima; el Na del espacio periaxonal reduce la afinidad de la bomba de Na por el K extracelular y el Li se comporta de manera similar (Baker y col., 1969b).

Con el fin de evaluar si la salida de Li mediada por la ATPasa Na-K limita de alguna manera su acumulación en la célula cromafín, se estudió el efecto de la ouabaína sobre el incremento de la secreción espontánea de catecolaminas observado en glándulas perfundidas con Krebs-Li. En estas condiciones la liberación de catecolaminas, aunque también aumenta de forma gradual, aparece con más rapidez y es claramente mayor en las perfusiones realizadas después del tratamiento de las glándulas con ouabaína

(Figura 16). Dado que en glándulas tratadas con ouabaína la perfusión con Krebs-sacarosa durante una hora no ocasionó modificación alguna en la secreción basal de catecolaminas (datos no presentados), no es posible atribuir el cambio en el perfil secretor a una posible acumulación de Na en la célula cromafín; por ello cabe pensar que sea el efecto de una acumulación más rápida y mayor de Li en la misma. En este sentido, es interesante señalar que en células cromafines cultivadas se ha observado un desplazamiento similar hacia la izquierda en la curva de secreción de catecolaminas cuando se incrementa el grado de inhibición de la bomba de Na aumentando las dosis de ouabaína desde 10^{-6} M hasta 10^{-4} M (Aunis y García, 1981).

Por tanto, aunque la cuantificación de la secreción de catecolaminas es únicamente un indicador indirecto de los flujos iónicos responsables de los cambios observados en dicha secreción, los resultados obtenidos sugieren que, en nuestras condiciones experimentales, la ATPasa Na-K contribuye en alguna medida a la salida de Li de la célula cromafín.

VI.- CONCLUSIONES

- 1.- La perfusión de la glándula adrenal de gato con Krebs-Li determina un incremento gradual en la secreción espontánea de catecolaminas que empieza a ser evidente a los 10 min. de perfusión y alcanza una fase de meseta aproximadamente 35 min. después. Esta respuesta secretora es calcio dependiente y atribuible a un efecto directo del litio sobre la célula cromafín, ya que no se observa cuando el sodio es reemplazado por sacarosa o colina.
- 2.- En glándulas perfundidas con Krebs-Li durante 45 min. la sustitución del litio por sacarosa o colina ocasiona un brusco incremento en la secreción de catecolaminas que no se observa cuando el litio es reemplazado por sodio.
- 3.- La sustitución parcial del sodio por sacarosa en glándulas tratadas con ouabaina y perfundidas con Krebs-normal también ocasiona un súbito aumento de la secreción catecolaminérgica, y cuando se utiliza litio como sustituyente osmótico dicho efecto secretor es considerablemente menor.
- 4.- La reintroducción de calcio (2,5 mM; 2min) en glándulas previamente perfundidas con Krebs-Li-0Ca ocasiona un brusco incremento en la liberación de catecolaminas, que es proporcional a la duración del periodo de

perfusión con Krebs-Li y a la concentración de este ion en el líquido de perfusión. Este efecto es gradualmente reversible una vez retirado el litio del Krebs, y no aparece tras la perfusión con Krebs-normal, sacarosa o colina, todos ellos sin calcio.

- 5.- El carácter progresivo de la respuesta secretora evocada por litio tanto en su aparición como en su desaparición, y el hecho de que la liberación de catecolaminas evocada por la reintroducción de calcio esté directamente relacionada con la duración del periodo de perfusión con Krebs-Li-OCa y con la concentración de litio en el mismo, indica que la acumulación de litio en la célula cromafín debe ser el factor crítico determinante de la entrada de calcio en la misma y por tanto del efecto secretor.

- 6.- Tanto el incremento gradual de la secreción espontánea de catecolaminas evocada por la perfusión de la glándula adrenal con Krebs-Li como el aumento observado al sustituir el litio por sacarosa o colina, una vez alcanzada la fase de meseta, son inhibidos parcialmente por (+)-PN 200-110 (10^{-7} M), un bloqueante orgánico de los CCSV. Este hecho indica que la entrada de calcio a través de los CCSV contribuye al incremento en la concentración de Ca_i necesario para que tenga lugar dicho fenómeno secretor.

7.- En resumen, la perfusión de la glándula adrenal de gato con Krebs en el que el sodio ha sido sustituido por litio da lugar a un incremento progresivo de la secreción espontánea de catecolaminas que depende de la presencia de calcio extracelular. Las características de este fenómeno secretor sugieren que es debido a la acumulación de litio en la célula cromafín y en él se ven implicadas dos vías de entrada de calcio: a) los CCSV y b) el sistema de intercambio Na-Ca, que en este caso permitiría un intercambio Li_j-Ca_e .

VII.- RESUMEN

El litio ha sido empleado con frecuencia como sustituyente osmótico del sodio para estudiar los fenómenos sodio dependientes. Esto ha permitido poner de manifiesto cierta similitud funcional de ambos elementos en los tejidos excitables. Se sabe que este ion atraviesa la membrana celular casi con la misma facilidad que el sodio, pero se acumula de forma gradual en su interior, probablemente debido a que es mal sustrato para la ATPasa Na-K.

Teniendo en cuenta que el incremento en la concentración intracelular de sodio es el factor determinante de la liberación de catecolaminas evocada por ouabaína en la médula adrenal, se pensó que si el litio pudiera acumularse y se comportara de manera similar al sodio en la célula cromafín, también sería capaz de ocasionar un efecto secretor.

En este trabajo, utilizando como sistema experimental la glándula adrenal de gato perfundida "in vitro", se ha investigado la influencia del litio sobre el proceso secretor de catecolaminas. Los resultados demuestran que la sustitución parcial del sodio por litio en el líquido de perfusión ocasiona un incremento gradual en la secreción de catecolaminas que depende de la presencia de calcio extracelular. Las características de este efecto secretor sugieren que es debido a la acumulación de litio en la célula cromafín, y que en él se ven implicadas dos vías de entrada de calcio: los CCSV y el sistema de intercambio Na-Ca que en este caso permitiría un intercambio Li_i-Ca_e .

VIII.- BIBLIOGRAFIA

- ABAJO FJ, CASTRO MAS, LOPO CR, GARIJO B, SANCHEZ-GARCIA P and GARCIA AG. (1989a). Sodium-dependent and sodium-independent nicotine-evoked catecholamine release from cat adrenals. *Neurosci. Lett.*, 101: 101-106.
- ABAJO FJ, CASTRO MAS and SANCHEZ-GARCIA P. (1989b). The key role of sodium in the ouabain-mediated potentiation of potassium-evoked catecholamine release in cat adrenal glands. *Br. J. Pharmacol.*, in press.
- AMY C and KIRSHNER N. (1982). $^{22}\text{Na}^+$ uptake and catecholamine secretion by primary cultures of adrenal medulla cells. *J. Neurochem.*, 39: 132-142.
- ANTON AH and SAYRE DF. (1962). A study of the factors affecting the aluminum oxide-trihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 138: 360-374.
- ARTALEJO AR, GARCIA AG, MONTIEL C and SANCHEZ-GARCIA P. (1985). A Dopaminergic receptor modulates catecholamine release from the cat adrenal gland. *J. Physiol.*, 362: 359-368.
- ARTALEJO CR and GARCIA AG. (1986). Effects of Bay K 8644 on cat adrenal catecholamine secretory responses to A23187 or ouabain. *Br. J. Pharmacol.*, 88: 757-765.
- ARTALEJO CR, GARCIA AG and AUNIS D. (1987). Chromaffin cell calcium channel kinetics measured isotopically through fast calcium, strontium and barium fluxes. *J. Biol. Chem.*, 262: 915-926.

- ARTALEJO CR, LOPEZ MG, MORO MA, CASTILLO CF, DE PAS-CUAL R and GARCIA AG. (1988). Voltage-dependence of nitrendipine provides direct evidence for dihydropyridine receptor coupling to calcium channels in intact cat adrenals. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 153: 912-918.
- AUNIS D and GARCIA AG. (1981). Correlation between catecholamine secretion from bovine isolated chromaffin cells and ³H-Ouabain binding to plasma membranes. *Br. J. Pharmac.*, 72: 31-40.
- BAKER PF and ALLEN TJA. (1984). The voltage-sensitivity of Na-Ca exchange in the squid axon. En: *Epithelial calcium and phosphate transport: molecular and cellular aspects*. Ed. Alan R Liss, pp. 89-94.
- BAKER PF, BLAUSTEIN MP, HODGKIN AL and STEINHARDT RA. (1969a). The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. *J. Physiol.*, 200: 431-458.
- BAKER PF, BLAUSTEIN MP, KEYNES RD, MANIL J, SHAW TI and STEINHARDT RA. (1969b). The ouabain-sensitive fluxes of sodium and potassium in squid giant axons. *J. Physiol.*, 200: 459-496.
- BAKER PF, HODGKIN AL and RIDGEWAY EB. (1971). Depolarization and calcium entry in squid giant axons. *J. Physiol.*, 218: 709-755.
- BAKER PF and KNIGHT DE. (1978). Calcium dependent exocytosis in bovine adrenal medullary cells with leaky plasma membranes. *Nature*, 276: 620-622.
- BAKER PF and RINK TJ. (1975). Catecholamine release from bovine adrenal medulla in response to maintained depolarization. *J. Physiol.*, 253: 593-620.

- BANKS P and HELLE K. (1965). The release of protein from the stimulated adrenal medulla. *Biochem. J.*, 97: 40-41c.
- BEAUGE L. (1978). Activation by lithium ions of the inside sodium sites in $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{-ATPase}$. *Biochem. Biophys. Acta*, 527: 472-484.
- BIALES B, DICHTER M and TISCHLER A. (1976). Electrical excitability of cultured adrenal chromaffin cells. *J. Physiol.*, 262: 743-753.
- BIRCH NJ. (1974). Lithium and magnesium dependent enzymes. *Lancet* ii: 965-966.
- BLASCHKO H, COMLINE RS, SCHNEIDER FH, SILVER M and SMITH AD. (1967). Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splachnic stimulation. *Nature*, 215: 58-59.
- BLASCHKO H and WELCH AD. (1953). Localization of adrenaline in cytoplasmatic particles of the bovine adrenal medulla. *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, 219: 17-22.
- BLAUSTEIN MP and RUSSELL JM. (1975). Sodium-calcium exchange and calcium-calcium exchange in internally dialyzed squid giant axons. *J. Membrane Biol.*, 22: 285-312.
- BORGES R, BALLESTA JJ and GARCIA AG . (1987). M_2 muscarinoceptor-associated ionophore at the cat adrenal medulla. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 144: 965-972.

- BRADING AF. (1978). Calcium-induced increase in membrane permeability in the guinea-pig taenia coli: evidence for involvement of a sodium-calcium exchange mechanism. *J. Physiol.*, 275: 65-84.
- 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.
- CAMPBELL KP, LEUNG AT and SHARP AH. (1988). The biochemistry and molecular biology of the dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Trends Neurosci.*, 11: 425-430.
- CARAFOLI E. (1987). Intracellular calcium homeostasis. *Ann. Rev. Biochem.*, 56: 395-433.
- CARAFOLI E and LEHNINGER AL. (1971). A survey of the interactions of calcium ions with mitochondria from different tissues and species. *Biochem. J.*, 122: 681-690.
- CARDENAS AM, MONTIEL C, ARTALEJO AR, SANCHEZ-GARCIA P and GARCIA AG. (1988). Sodium dependent inhibition by PN200-110 enantiomers of nicotinic adrenal catecholamine release. *Br. J. Pharmacol.*, 95: 9-14.
- CARLSSON A, LINDQVIST M, MAGNUSSON T and WALDECK B. (1958). On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science*, 127: 471.
- CARMELIET EE. (1964). Influence of lithium ions on the transmembrane potential and cation content of cardiac cells. *J. Gen. Physiol.*, 47: 501-530.

- CARMICHAEL SW. (1986). Stimulus-secretion coupling: intracellular proteins and nucleotides. En: The Adrenal medulla. New York, Cambridge University Press, vol. 4, pp. 34-49.
- CARMICHAEL SW and WINKLER H. (1985). The adrenal chromaffin cell. Sci. Am., 253: 30-39.
- CARONI P and CARAFOLI E. (1981). The Ca-pumping ATPase of heart sarcolemma-characterization, calmodulin-dependence and partial purification. J. Biol. Chem., 256: 3263-3270.
- CEÑA V, NICOLAS GP, SANCHEZ-GARCIA P, KIRPEKAR SM and GARCIA AG. (1983). Pharmacological dissection of receptor-associated and voltage-sensitive ionic channels involved in catecholamine release. Neuroscience, 10: 1445-1462.
- CRITCHLEY JAJH, MACLEAN MR and UNGAR A. (1988). Inhibitory regulation by co-released peptides of catecholamine secretion by the canine adrenal medulla. Br. J. Pharmacol., 98: 383-386.
- CROMPTON M, KUNZI M and CARAFOLI E. (1977). The calcium-induced and sodium-induced effluxes of calcium from heart mitochondria. Eur. J. Biochem., 79: 549-558.
- CRYER PE. (1980). Physiology and pathophysiology of the human sympathoadrenal neuroendocrine system. N. Engl. J. Med., 303: 436-444.
- CHANDLER WK and MEVES H. (1965). Voltage clamp experiments on internally perfused giant axons. J. Physiol., 180: 788-820.

- DE ROBERTIS E and VAZ FERREIRA A. (1957). Electron microscopic study of the excretion of catechol-containing droplets in the adrenal medulla. *Exptl. Cell. Res.*, 12: 568-574.
- DIPOLO R and BEAUGE L. (1983). The calcium pump and sodium-calcium exchange in squid axons. *Ann. Rev. Physiol.*, 45: 313-324.
- DIPOLO R and BEAUGE L. (1988). Ca^{2+} transport in nerve fibers. *Biochem. Biophys. Acta*, 947: 549-569.
- DIXON WR, GARCIA AG and KIRPEKAR SM. (1975). Release of catecholamines and dopamine-beta-hydroxylase from the perfused adrenal gland of the cat. *J. Physiol.*, 244: 805-824.
- DOUGLAS WW, KANNO T and SAMPSON SR. (1967). Influence of the ionic environment on the membrane potential of adrenal chromaffin cells and on the depolarizing effect of acetylcholine. *J. Physiol.*, 191: 107-121.
- DOUGLAS WW and POISNER AM. (1962). On the mode of action of acetylcholine in evoking adrenal medullary secretion: Increased uptake of calcium during the secretory response. *J. Physiol.*, 162: 385-392.
- DOUGLAS WW, POISNER AM and RUBIN RP. (1965). Efflux of adenine nucleotides from perfused adrenal glands exposed to nicotine and other chromaffin stimulants. *J. Physiol.*, 179: 130-137.
- DOUGLAS WW and RUBIN RP. (1961). The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J. Physiol.*, 159: 40-57.

- DOUGLAS WW and RUBIN RP. (1963). The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling. *J. Physiol.*, 167: 288-310.
- DUNHAM PB and SENYK O. (1977). Lithium efflux through the Na/K pump in human erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74 (7) 3099-3103.
- EDWARDS C, ENGLERT D, LOTSHAW D and YE HZ. (1984). Light microscopic observations on the release of vesicles by isolated chromaffin cells. *Cell. Motil.*, 4: 297-303.
- EHRLICH BE and DIAMOND JM. (1980). Lithium, membranes, and manic-depressive illness. *J. Membrane Biol.*, 52: 187-200.
- ESQUERRO E, GARCIA AG, HERNANDEZ M, KIRPEKAR, SM and PRAT JC. (1980). Catecholamine secretory response to calcium reintroduction in the perfused cat adrenal gland treated with ouabain. *Biochem. Pharmacol.*, 29: 2669-2673.
- FENWICK EM, MARTY A and NEHER E. (1982). Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.*, 331: 599-635.
- FRIEDMAN SM. (1977). The effects of external sodium substitution on cell sodium and potassium in vascular smooth muscle. *J. Physiol.*, 270: 195-208.
- FUJITA T. (1988). What are paraneurons?. En: Fujita T, Kanno T and Kobayashi S, Eds. *The Paraneuron*. Tokyo, Springer-Verlag, pp. 6-12.

- FUJITA T and KOBAYASHI S. (1975). Paraneurons, the new brothers of neuron. *Igakuno Ayumi*. Tokio, 94: 638-640.
- GALLEGO A and LORENTE DE NO R. (1947). On the effect of several monovalent ions upon frog nerve. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 29: 189-206.
- GANDIA L, LOPEZ MG, FONTERIZ RI, ARTALEJO CR and GARCIA AG. (1987). Relative sensitivities of chromaffin cell calcium channels to organic and inorganic calcium antagonists. *Neurosci. Lett.*, 77: 333-338.
- GARCIA AG, ARTALEJO CR, BORGES R, REIG JA and SALA F. (1986). Pharmacological properties of the chromaffin cell calcium channel. En: Atwater I, Rojas E and Soria B, Eds. *Biophysics of the pancreatic B-cell*. Plenum Publishing Corporation, pp. 139-157.
- GARCIA AG, GARCIA-LOPEZ E, MONTIEL C, NICOLAS GP and SANCHEZ-GARCIA P. (1981). Correlation between catecholamine release and sodium pump inhibition in the perfused adrenal gland of the cat. *Br. J. Pharmac.*, 74: 665-672.
- GARCIA AG, HERNANDEZ M, HORGA JF and SANCHEZ-GARCIA P. (1980). On the release of catecholamines and dopamine-beta-hydroxylase evoked by ouabain in the perfused cat adrenal gland. *Br. J. Pharmac.*, 68: 571-583.
- GARCIA AG, SALA F, REIG JA, VINIEGRA S, FRIAS J, FONTERIZ R and GANDIA L. (1984). Dihydropyridine BAY-K-8644 activates chromaffin cell calcium channels. *Nature*, 309: 69-71.

- GOETZ CG, OLANOV CW, KOLLER WC et al. (1989). Multi-center study of autologous adrenal medullary transplantation to the corpus striatum in patients with advanced Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.*, 320: 337-341.
- HAGIWARA S and BYERLY L. (1983). The calcium channel. *Trends Neurosci.*, 6: 189-193.
- HALE CC, SLAUGHTER RS, AHRENS DC and REEVES JP. (1984). Identification and partial purification of the cardiac sodium-calcium exchange protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81: 6569-6573.
- HELLE KB, REED RK, PIHL KE and SERCK-HANSSSEN G. (1985). Osmotic properties of the chromogranins and relation to osmotic pressure in catecholamine storage granules. *Acta Physiol. Scand.*, 123: 21-33.
- HILLARP NÅ, LAGERSTEDI S and NILSON B. (1953). The isolation of a granular fraction from the suprarenal medulla containing the sympathomimetic catecholamines. *Acta Physiol. Scand.*, 29: 251-263.
- HODGKIN AL and HUXLEY AF. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.*, 117: 500-544.
- HODGKIN AL and KATZ B. (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol.*, 108: 37-77.
- HORNYKIEVICZ O. (1973). Dopamine in the basal ganglia. *Br. Med. Bull.*, 29: 172-178.

- HOSEY MM and LAZDUNSKI M. (1988). Calcium channels: molecular pharmacology, structure and regulation. *J. Membrane Biol.* 104: 81-105.
- HURWITZ L. (1986). Pharmacology of calcium channels and smooth muscle. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 26: 225-258.
- ITO S, NAKAZATO Y and OHGA A. (1978). Pharmacological evidence for the involvement of Na channels in the release of catecholamines from perfused adrenal glands. *Br. J. Pharmac.*, 62: 359-361.
- KEYNES RD and SWAN RC. (1959). The permeability of frog muscle fibres to lithium ions. *J. Physiol.*, 147:626-638.
- KILPATRICK DL, SLEPETIS RJ, CORCORAN JJ and KIRSHNER N. (1982). Calcium uptake and catecholamine secretion by cultured bovine adrenal medulla cells. *J Neurochem.*, 38: 427-435.
- KIRPEKAR SM and PRATT JC. (1979). Release of catecholamines from perfused cat adrenal gland by veratridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76: 2081-2083.
- KNIGHT DE and KESTEVEN NT. (1983). Evoked transient intracellular free Ca^{2+} changes and secretion in isolated bovine adrenal medullary cells. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 218: 177-199.
- KRIEGER-BRAUER HI and GRATZL M. (1983). Effects of monovalent and divalent cations on Ca^{2+} fluxes across chromaffin secretory membrane vesicles. *J. Neurochem.*, 41: 1269-1276.

- LACKOWIC Z and NEFF NH. (1980). Evidence for the existence of peripheral dopaminergic neurons. *Brain Res.*, 193: 289-292.
- LASTOWECKA A and TRIFARO JM. (1974). The effect of sodium and calcium ions on the release of catecholamines from the adrenal medulla: sodium deprivation induces release by exocytosis in the absence of extracellular calcium. *J. Physiol.*, 236: 681-705.
- LEDVORA RF and HEGYVARY C (1983). Dependence of Na-Ca exchange and Ca-Ca exchange on monovalent cations. *Biochim. Biophys. Acta*, 729: 123-126.
- LEE CO. (1985). 200 years of digitalis: the emergin central role of sodium ion in the control of cardiac force. *Am. J. Physiol.*, 249: C367-C378.
- LEE CO, ABETE P, PECKER M, SONN JK and VASSALLE M. (1985). Strophantidin inotropy: role of intracellular sodium ion activity and sodium-calcium exchange. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 17: 1043-1053.
- LEVER JD. (1955). Electron microscopic observations on the normal and denervated adrenal medulla of the rat. *Endocrinology*, 57: 621-635.
- LÜTTGAU HC and NIEDERGERKE R. (1958). The antagonism between Ca and Na ions on the frog's heart. *J. Physiol.*, 143: 486-505.
- MARTY A and NEHER E. (1985). Potassium channels in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *J. Physiol.*, 367: 117-141.
- MELTZER HY. (1976). The dopamine hypothesis of schizophrenia: a review. *Schizophr. Bull.*, 2: 19-76.

- MONTIEL C, ARTALEJO AR, BERMEJO PM and SANCHEZ-GARCIA P. (1986). A dopaminergic receptor in adrenal medulla as a possible site of action for the droperidol-evoked hypertensive response. *Anesthesiology*, 65: 474-479.
- MULLINS LJ. (1979). The generation of electric currents in cardiac fibers by Na/Ca exchange. *Am. J. Physiol.*, 263: C103-C110.
- MULLINS LJ. (1981). Depolarization and calcium entry. In: Adelman WJ, Jr. and Goldman DE, Eds. *The biophysical approach to excitable systems*. Plenum Publishing Corporation, pp. 151-163.
- MULLINS LJ and BRINLEY FJ, JR. (1975). Sensitivity of calcium efflux from squid axons to changes in membrane potential. *J. Gen. Physiol.*, 65: 135-152.
- NARASHI T, MOORE JV and SCOTT WR. (1964). Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. *J. Gen. Physiol.*, 47: 965-974.
- NISHIMURA S and SORIMACHI M. (1984). Mechanism of calcium efflux from isolated bovine adrenal chromaffin cells. *Jap. J. Physiol.*, 34: 731-745.
- NISHIMURA S, SORIMACHI M and YAMAGAMI K. (1981). Exocytotic secretion of catecholamines from the cat adrenal medulla by sodium deprivation: involvement of calcium influx mechanism. *Br. J. Pharmac.*, 72: 305-317.
- NOWYCKY MC, FOX AP and TSIEN RW. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, 316: 440-443.

- OZAKI H and URAKAWA N. (1979). Na-Ca exchange and tension development in guinea-pig aorta. *Naunyn-Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.*, 309: 171-178.
- PAPAHA DJOPOULOS D, PORTIS A and PANGBORN W. (1978). Calcium-induced lipid phase transitions and membrane fusion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 308: 50-59.
- PHILLIPS JH, BURRIDGE K, WILSON SP and KIRSHNER N. (1983). Visualization of the exocytosis/endocytosis secretory cycle in cultured adrenal chromaffin cells. *J. Cell. Biol.*, 97: 1906-1917.
- PINTO JEB and TRIFARO JM. (1976). The different effects of D-600 (methoxyverapamil) on the release of adrenal catecholamines induced by acetylcholine, high potassium or sodium deprivation. *Br. J. Pharmac.*, 57: 127-132.
- POCOCK G. (1983a). Ionic and metabolic requirements for stimulation of secretion by ouabain in bovine adrenal medullary cells. *Mol. Pharmacol.*, 23: 671-680.
- POCOCK G. (1983b). Ion movements in isolated bovine adrenal medullary cells treated with ouabain. *Mol. Pharmacol.*, 23: 681-697.
- POWIS DA. (1983). Cardiac glycosides and autonomic neurotransmission. *J. Auton. Pharmac.*, 3: 127-154.
- REEVES JP and SUTKO JL. (1983). Competitive interactions of sodium and calcium with the sodium-calcium exchange system of cardiac sarcolemmal vesicles. *J. Biol. Chem.*, 258: 3178-3182.

- REUTER H and SEITZ N. (1968). The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J. Physiol.*, 195: 451-470.
- RICHELSON E. (1977). Lithium ion entry through the sodium channel of cultures mouse neuroblastoma cells: a biochemical study. *Science*, 196: 1001-1002.
- RINK TJ. (1977). The influence of sodium on calcium movements and catecholamine release in thin slices of bovine adrenal medulla. *J. Physiol.*, 266: 297-325.
- RUBIN RP. (1982). Calcium and cellular secretion (chapter 1). New York, Plenum Press, pp. 1-43.
- SAAVEDRA JM, PALKOVITS M, BROWNSTEIN MJ and AXELROD J. (1974). Localization of phenyl-ethanolamine-N-methyl-transferase in the rat brain nuclei. *Nature*, 248: 695-696.
- SANCHEZ-ARMASS S and BLAUSTEIN MP. (1987). Role of sodium-calcium exchange in regulation of intracellular calcium in nerve terminals. *Am. J. Physiol.*, 252: C595-C603.
- SANCHEZ GARCIA P (1987). El ciclo secretor en la médula adrenal y sus implicaciones farmacológicas. Discurso de ingreso en La Real Academia Nacional de Medicina. Instituto de España. Madrid.
- SCHIAVONE MT and KIRPEKAR SM. (1982). Inactivation of secretory responses to potassium and nicotine in the cat adrenal medulla. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 223: 743-749.
- SCHOU M. (1957). Biology and Pharmacology of the lithium ion. *Pharmacol. Rev.*, 9: 17-57.

- SHATZMAN HJ. (1966). ATP-dependent Ca extrusion from human red cells. *Experientia*, 22: 264-265.
- SHEU SS, SHARMA VK and UGLESITY A. (1986). Na-Ca exchange contributes to increase of cytosolic Ca concentration during depolarization in heart muscle. *Am. J. Physiol.*, 250: C651-C656.
- SINGER I and ROTENBERG D. (1973). Mechanisms of lithium action. *N. Engl. J. Med.*, 2: 254-260.
- SKOU JC. (1957). The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochem. Biophys. Acta*, 23: 394-401.
- SKOU JC. (1960). Further investigations on a Mg-Na-activated adenosin-triphosphatase possibly related to the active, linked transport of Na and K across the nerve membrane. *Biochem. Biophys. Acta*, 42: 6-23.
- SORIMACHI M and NISHIMURA S. (1981). Calcium-dependent secretion of catecholamines from the perfused bovine adrenal medulla by sodium deprivation. *Jap. J. Physiol.*, 31: 753-756.
- SORIMACHI M and NISHIMURA S. (1982). Possible involvement of surface charges in modifying the adrenomedullary secretion induced by high K depolarization. *Brain Res.*, 246: 150-153.
- SORIMACHI M and NISHIMURA S. (1984). Operation of internal Na-dependent Ca influx mechanism associated with catecholamine secretion in the adrenal chromaffin cells. *Jap. J. Physiol.*, 34: 19-39.

- SORIMACHI M, NISHIMURA S and YAMAGAMI K. (1981). Possible occurrence of Na-dependent Ca influx mechanism in isolated bovine chromaffin cells. *Brain Res.*, 208: 442-446.
- SORIMACHI M, NISHIMURA S and YANO K. (1986). Possible role of surface potential in the gating mechanism of Ca channels concerned with catecholamine secretion in the adrenal. *Jap. J. Physiol.*, 36: 321-337.
- SPEDDING M. (1985). Calcium antagonist subgroups. *Trends Pharmacol. Sci.*, 6: 109-114.
- SPEDDING M and MIDDLEMISS DN. (1985). Central effects of Ca antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* 6: 309-310.
- STALLCUP WB. (1979). Sodium and calcium fluxes in a clonal nerve cell line. *J. Physiol.*, 266: 525-540.
- TROSPER TL and PHILIPSON KD. (1983). Effects of divalent and trivalent cations on Na-Ca exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. *Biochem. Biophys. Acta*, 731: 63-68.
- UNGAR A and PHILLIPS JH. (1983). Regulation of the adrenal medulla. *Physiol. Rev.*, 63: 787-843.
- 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.
- WEINKOVE C and ANDERSON DC. (1985). Interactions between the adrenal cortex and medulla. En: Anderson DC and Winter JDS, Eds. *Adrenal cortex*. London, Butterworth and Co, pp. 208-234.

- WINKLER H and WESTHEAD EW. (1980). The molecular organization of adrenal chromaffin granules. *Neuroscience*, 5: 1803-1823.
- WISE BC and COSTA E. (1985). Ca and phospholipid-dependent protein kinase activity and phosphorylation of endogenous proteins in bovine adrenal medulla. *J. Neurochem.*, 45: 227-233.
- WONG DL and CIARANELLO RD. (1982). Regulation of synthesis and degradation of catecholamine synthesizing enzymes in the adrenal medulla. En: Izumi F et al., Eds. *Advances in Biosciences*. vol. 36, New York, Pergamon Press, pp. 233-241.
- WOOD AJ and GOODWIN GM. (1987). A review of the biochemical and neuropharmacological actions of lithium. *Psychological Medicine*, 17: 579-600.

RECEIVED
BIBLIOTECA
DE MADRID
110 DE MARZO
1988