

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento
Departamento de Farmacología y Terapéutica

***Regulación de la neurotransmisión por
receptores nicotínicos***

Memoria de tesis para optar al grado de Doctor presentada por

Juan José Arnáiz Cot

Madrid, 2008

¡Querer es poder!

A mi Madre
y a mi Padre

A mis ABUELOS,
*porque para mí sus vidas han sido ejemplares en todos los aspectos y gran parte de lo que
soy se fraguó en cada minuto que pasaron conmigo
Y, abuela, ¡NO, no me voy a dar con un canto en los dientes!*

A mis hermanas,
*porque espero que cada día se les abran nuevos horizontes en sus vidas y porque, por suerte
o por desgracia, somos hermanos*

A Mari Carmen,
por todo el cariño y el apoyo que siempre me ha dado

Quisiera agradecer en primer lugar al **Instituto Teófilo Hernando** por haberme concedido una beca que ha permitido que en estos momentos pueda estar aquí escribiendo estos agradecimientos y me haya aceptado en lo que no se puede considerar como un simple Instituto de investigación.

Quisiera mostrar mi más profundo agradecimiento al **Prof. Antonio García** por haberme escuchado siempre, incluso cuando no tenía por qué haberlo hecho, y motivarme desde mi juventud a seguir el camino del esfuerzo “porque subir la colina con la bicicleta todos los días para llegar a la escuela, merece la pena”.

A “**Don Pedro**” por su apoyo incondicional y porque al igual que mis abuelos, me ha enseñado lo que quizá es más importante en la vida y que no se encuentra en ningún libro.

Al Prof. Luis Gandía Juan, por su siempre crítica constructiva y por ponerme los pies en la tierra en más de una ocasión.

Al Dr. Jesús Miguel Hernández Guijo, por toda la ayuda que he recibido durante este tiempo de formación y por su apoyo en los momentos difíciles.

A Antonio Miguel G. de Diego por haber sido mi guía desde mis inicios en el laboratorio hasta la finalización de la parte experimental de esta Tesis Doctoral, habiendo tenido la paciencia necesaria para conseguir que yo aprendiese a manejar adecuadamente las diferentes metodologías empleadas, a analizar e interpretar con rigurosidad los resultados obtenidos, a aplicar métodos estadísticos y, en definitiva, a sobrevivir en el mundo de la investigación.

A mis compañeros de laboratorio Ricardo, Josefina, Laura, Juan, Lorena, José Carlos (los dos), Marta, Santos, Juliana, Inés, Regiane, Jaime, Vanesa, Alberto, y tantos otros con los que he trabajado codo con codo y me han aportado su ayuda, su paciencia, sus soluciones, su sonrisa y un larguísimo etcétera; sin vosotros tampoco estaría aquí

A todos los miembros del ITH y del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Universidad Autónoma de Madrid porque de una u otra forma (ayudando o poniendo pegas) han contribuido a que este trabajo experimental vea la luz en forma de esta Tesis Doctoral.

A todos mis amigos, porque son uno de los motivos por los que me considero una persona afortunada en esta vida, ya que siempre han estado presentes en los momentos difíciles, que como ellos bien saben y por desgracia, no han sido pocos. Porque por mucho tiempo que pase sin comunicarnos, nada cambia

A todos los que de alguna manera han contribuido a formarme desde niño, tanto de forma positiva como negativa, y especialmente a Agustín Montero y por su confianza, porque también gracias ellos estoy ahora aquí.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS | 1 |
| MARCO DE LA TESIS | 3 |
| INTRODUCCIÓN | 6 |
| 1.-LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS NEURONALES | 7 |
| 1.1.-Subtipos de receptores nicotínicos neuronales | 7 |
| 1.2.-Funciones fisiológicas de los receptores nicotínicos neuronales | 8 |
| 1.3.-Localización de los receptores nicotínicos neuronales..... | 10 |
| 1.3.1.- <i>Receptores nicotínicos presinápticos</i> | 10 |
| 1.3.2.- <i>Receptores nicotínicos axonales</i> | 11 |
| 1.3.3.- <i>Receptores nicotínicos postsinápticos</i> | 12 |
| 1.4.-Receptores nicotínicos y señales intracelulares de calcio | 14 |
| 2. LA CÉLULA CROMAFÍN DE LA MÉDULA SUPRARRENAL | 15 |
| 2.1.-Las glándulas suprarrenales | 16 |
| 2.2.-La célula cromafín como modelo celular | 17 |
| 2.3.-Los receptores nicotínicos neuronales de la célula cromafín | 18 |
| 3.-EL HIPOCAMPO | 19 |
| 3.1.-Estructura del hipocampo | 21 |
| 3.2.-Receptores nicotínicos neuronales en el hipocampo | 22 |
| 4.-LIGANDOS NICOTÍNICOS | 24 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 27 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 31 |
| 1. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS..... | 32 |
| 2.-AISLAMIENTO Y CULTIVO DE NEURONAS DE HIPOCAMPO DE RATA | 34 |
| 3.-REGISTRO DE CORRIENTES IÓNICAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE <i>PATCH-CLAMP</i> | 36 |
| 4.- MEDIDA DE LA EXOCITOSIS MEDIANTE EL ESTUDIO DE LA VARIACIÓN DE LA CAPACIDAD ELÉCTRICA DE LA MEMBRANA CELULAR (ΔC_m) | 39 |
| 5.- MEDIDA DE LA EXOCITOSIS CON TÉCNICAS AMPEROMÉTRICAS | 40 |
| 6.-INMUNOTRANSFERENCIA (“Western-blot”) | 41 |

| | |
|---|-----------|
| 7.-SOLUCIONES EXPERIMENTALES EMPLEADAS | 42 |
| 7.1.-Registros en células cromafines bovinas | 42 |
| 7.2.-Registros en neuronas de hipocampo de rata | 43 |
| 7.3.-Ligandos nicotínicos | 44 |
| 8.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS | 44 |
| RESULTADOS | 45 |
| 1.- MODULACIÓN POR ACETILCOLINA DE LA LIBERACIÓN DE CATECOLAMINAS POR CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS | 46 |
| 1.1.-La acetilcolina modula la I_{Ca} y la secreción de catecolaminas | 48 |
| 1.2.-Naturaleza nicotínica de la modulación por ACh | 52 |
| 1.3.-Efecto de otros agonistas del receptor nicotínico | 55 |
| 1.4.-La potenciación de la secreción inducida por ACh es dependiente de calcio | 58 |
| 2.- MODULACIÓN DE LA NEUROTRANSMISIÓN EN CULTIVOS DE HIPOCAMPO DE RATA | 61 |
| 2.1.-La expresión del receptor $\alpha 7$ varía en función de los días en cultivo de las neuronas de hipocampo | 61 |
| 2.2.-Aumento de la transmisión sináptica inducida por colina | 63 |
| 2.3.-Potenciación de la transmisión sináptica inducida por colina por el modulador alostérico $\alpha 7$ 5-OH-indol | 65 |
| 2.4.-El antagonista nicotínico MLA bloquea la respuesta inducida por colina | 67 |
| 2.5.-Localización presináptica del receptor $\alpha 7$ | 69 |
| 2.6.-La bicuculina suprime el efecto modulador de la estimulación del receptor nicotínico $\alpha 7$, cosa que no hace el ácido kinurénico | 71 |
| 2.7.-La bicuculina y el ácido kinurénico bloquean las corrientes nicotínicas $\alpha 7$ | 74 |
| 2.8.-El receptor nicotínico $\alpha 7$ puede inducir también una supresión de la activación sináptica en el hipocampo | 76 |
| 3.- CULTIVOS DE NEURONAS DE HIPOCAMPO DE RATA COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS LIGANDOS NICOTÍNICOS | 78 |
| 3.1.-Modificaciones metodológicas para la selección de las corrientes GABAérgicas | 78 |
| 3.2.-Modulación nicotínica de la transmisión sináptica GABAérgica por nuevos moduladores alostéricos del receptor nicotínico | 81 |

| | |
|--|------------|
| DISCUSIÓN | 83 |
| 1.-MODULACIÓN POR RECEPTORES NICOTÍNICOS DE LA LIBERACIÓN DE CATECOLAMINAS ADRENOMEDULARES | 85 |
| 1.1.-La estimulación nicotínica reduce la I_{Ca} y potencia la exocitosis | 85 |
| 1.2.-La potenciación de la exocitosis depende de la entrada de Ca^{2+} por el receptor nicotínico | 86 |
| 1.3.-Un modelo que explica el papel dual de la acetilcolina | 87 |
| 2.- MODULACIÓN DE LA NEUROTRANSMISIÓN EN CULTIVOS DE NEURONAS DE HIPOCAMPO DE RATA | 89 |
| 2.1.-La activación de los receptores $\alpha 7$ aumenta la liberación de GABA | 89 |
| 2.2.-Ubicación presináptica y/o axonal de los receptores $\alpha 7$ | 91 |
| 2.3.-Supresión “paradójica” de la actividad sináptica en el hipocampo por estimulación de los receptores nicotínicos | 91 |
| 3.-EL CULTIVO DE NEURONAS DE HIPOCAMPO COMO MODELO PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS LIGANDOS NICOTÍNICOS | 92 |
| CONCLUSIONES | 94 |
| BIBLIOGRAFÍA | 96 |
| ANEXOS | 104 |
| Publicación 1 | 105 |
| Publicación 2 | 113 |

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

| | |
|-----------------------------|--|
| ACh | Acetilcolina (del inglés “acetylcholine”) |
| AMPA | Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico |
| ATP | Trifosfato de adenina |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| CCB | Célula cromafin bovina |
| CCDV | Canales de calcio dependientes de voltaje |
| DIV | Días en cultivo (del inglés “days in vitro”) |
| DMEM | Medio de Eagle modificado por Dulbecco (del inglés “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”) |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EE | Error estándar de la media |
| EGTA | Ácido etilenglicol-bis- (β -aminoetil éter)-N, N, N’, N’-tetraacético |
| GABA | Ácido γ -aminobutírico |
| GTP | Trifosfato de guanina |
| HEPES | Ácido (N-[2-hidroxietil]-piperacino-N’-[2-etanosulfónico] |
| HP | Potencial de fijación (del inglés “Holding Potencial”) |
| 5-HT₃ | Receptor del subtipo 3 para la serotonina (5-hidroxi-triptamina) |
| HVA | CCDV de alto umbral de activación (del inglés “ <i>high-voltage activated</i> ”) |
| I_{ACh} | Corriente de entrada a través de nAChR inducida por ACh |
| I_{Ca} | Corriente de entrada de calcio a través de CCDV |
| LVA | CCDV de bajo umbral de activación (del inglés “ <i>low-voltage activated</i> ”) |
| MLA | Metilcaconitina |
| nAChR | Receptor nicotínico neuronal para acetilcolina (del inglés “nicotinic Acetylcholine Receptor”) |
| n | Número de datos |
| NMDA | N-metil-D-aspartato |
| eCPS | Corrientes postsinápticas espontáneas |
| RE | Retículo Endoplásmico |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| TEA | Tetraetilamonio |
| TTX | Tetrodotoxina |

MARCO DE LA TESIS

La presente Tesis Doctoral se ha desarrollado en el Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento (ITH) de la Universidad Autónoma de Madrid. El ITH ha cultivado a lo largo de los últimos 30 años una sólida línea en el campo de la comunicación interneuronal y de los mecanismos de muerte neuronal por apoptosis y necrosis, procesos que regula el catión calcio (Ca^{2+}).

El Ca^{2+} es un segundo mensajero universal. Casi todo lo que hacemos está controlado por calcio, desde la fecundación del ovocito en el origen de la vida hasta la muerte de la célula por apoptosis o necrosis, ya que este ión participa en la formación de memoria y en el procesamiento de la información en el cerebro. Es uno de los mediadores intracelulares más versátiles de todo el cuerpo. Interviene en procesos tan diversos como la contracción muscular, la secreción hormonal y de neurotransmisores, la coagulación de la sangre, el metabolismo celular, el control de canales iónicos, la expresión de genes o la inmunidad.

El calcio interviene, entre otros procesos, en la regulación de la comunicación interneuronal, esto es, en la neurotransmisión. La elevación rápida y transitoria de la concentración citosólica de calcio (hasta 100 y más veces por encima de su concentración basal) va a ser la señal que dispara la secreción por exocitosis de los diferentes neurotransmisores. A lo largo de los últimos 30 años, nuestro grupo ha realizado diversos estudios encaminados al esclarecimiento del papel del calcio como mediador de los procesos de neurotransmisión (García *et al.*, 1984; Michelena *et al.*, 1993; Montero *et al.*, 2000), ver revisión reciente de (García *et al.*, 2006).

Para el estudio de los procesos neurosecretores, nuestro grupo ha utilizado como modelo experimental la célula cromafín de la médula suprarrenal y la secreción de catecolaminas por las mismas. Este proceso se ha estudiado en el grupo utilizando varias técnicas entre las que cabe destacar la amperometría en poblaciones celulares y en célula única, la amperometría en parche y la medida de la variación de la capacidad eléctrica de la membrana. A partir de dichos resultados se han publicado también numerosos artículos (Ceña *et al.*, 1983; Cárdenas *et al.*, 1988; Gandía *et al.*, 1990; Gárcez-Do-Carmo *et al.*, 1993; Michelena *et al.*, 1993; López *et al.*, 1994a; López *et al.*, 1994b; Vega *et al.*, 1995; Albillos *et al.*, 1997; Lara *et al.*, 1997; Lara *et al.*, 1998; Cuchillo-Ibáñez *et al.*, 1999; Hernández-Guijo *et al.*, 1999; Villarroja *et al.*, 1999; García-Palomero *et al.*, 2000; García *et al.*, 2000b; Aldea *et al.*, 2002; Cuchillo-Ibáñez *et al.*, 2004).

También el ITH ha cultivado durante la última década una línea de investigación relacionada con el calcio y la muerte neuronal (Cano-Abad *et al.*, 2000; Cano-Abad *et al.*, 2001; Cano-Abad *et al.*, 2002; Sobrado *et al.*, 2003; Egea *et al.*, 2007).

En relación al doble papel neurotóxico-neuroprotector del calcio, en los últimos años el ITH se ha embarcado en un nuevo proyecto relacionado con la búsqueda de nuevos fármacos neuroprotectores que ha sintetizado en colaboración con grupos de químicos del CSIC, según se ilustra en las siguientes patentes:

Título: **Síntesis y evaluación farmacológica de nuevos derivados de tacrina que modulan canales de calcio y receptores nicotínicos neuronales**

Inventores: M. Villarroya, J.L. Marco, C. de los Rios y A.G. García

N. de solicitud: P200200937; País de prioridad: España; Fecha de prioridad: 22/4/2002

Entidad titular: Universidad Autónoma de Madrid y CSIC

Título: **Síntesis y evaluación biológica de nuevos análogos de tacrina que bloquean canales de calcio neuronales e inhiben acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa potenciales agentes neuroprotectores para las enfermedades de Alzheimer y Parkinson**

Inventores: J.L. Marco, C. de los Rios, M. Villarroya y A.G. García

N. de solicitud: P200200936; País de prioridad: España; Fecha de prioridad: 22/4/2002

Entidad titular: CSIC y Universidad Autónoma de Madrid

Título: **Derivados de [1]benzopirano[2,3-b]quinolin-1(2H)-ona**

Inventores: J.L. Marco, R. León, A.G. García y M. Villarroya

N. de solicitud: P200601196; País de prioridad: España; Fecha de prioridad: 10/05/2006

Entidad titular: CSIC y Universidad Autónoma de Madrid

La presente Tesis está basada principalmente en dos de las líneas de investigación del ITH, a saber, la regulación de la liberación de neurotransmisores y la modulación producida por el receptor nicotínico. Parte de los resultados que presento en esta Tesis han aparecido en las dos publicaciones siguientes (ver Anexo):

- 1.-Arnáiz-Cot, J.J., García-de-Diego, A.M., Hernández-Guijo, J.M., Gandía, L. y García, A.G.. **A two-step model for acetylcholine control of exocytosis via nicotinic receptors**. Biochemical and Biophysical Research Communications 365: 413–419, 2008.
- 2.-Arnáiz-Cot, J.J., González, J.C., Sobrado, M., Baldelli, P., Carbone, E., Gandía, L., García, A.G. y Hernández-Guijo, J.M. **Allosteric modulation of alpha7 nicotinic receptors selectively increase GABAergic synaptic transmission in hippocampal neurons**. European Journal of Neuroscience 27: 1097-1110, 2008.

INTRODUCCIÓN

Esta Tesis Doctoral contiene un estudio de la modulación por receptores nicotínicos neuronales de la neurotransmisión. Para ello, se han utilizado dos modelos experimentales, a saber:

1. La modulación de la exocitosis en la célula cromafín aislada de la médula suprarrenal bovina
2. La modulación de la actividad postsináptica neuronal en cultivos de neuronas de hipocampo de rata.

Describiré a continuación los protagonistas que intervienen en este estudio: los receptores nicotínicos y los dos modelos celulares utilizados.

1.-LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS NEURONALES

El receptor nicotínico neuronal (nAChR), al igual que su homólogo de la placa motora, pertenece a la gran superfamilia de receptores ionotrópicos, en la que también se integran los receptores de glicina, GABA_A, 5-HT₃ para serotonina y NMDA y AMPA para glutamato. La activación de todos ellos por el correspondiente agonista conduce a cambios conformacionales en su estructura, y la consiguiente apertura de un canal iónico (Changeux *et al.*, 1992; Unwin, 1993), generalmente de baja selectividad, que permite el paso de cationes a su través, fundamentalmente cloruro (receptor GABA), sodio y calcio (receptores nicotínicos y NMDA). La despolarización que sigue a estos cambios iónicos genera señales rápidas en la neurona postsináptica (potenciales de acción) o lentas (elevación de la concentración citosólica del catión calcio y de otros segundos mensajeros) (Dani, 2001; Dani y Bertrand, 2007).

El receptor nicotínico neuronal se localiza en neuronas del sistema nervioso autónomo, en células cromafines de la glándula suprarrenal y en muchas neuronas del sistema nervioso central, particularmente en el hipocampo y en la corteza prefrontal.

1.1.-Subtipos de receptores nicotínicos neuronales

Los receptores nicotínicos neuronales son proteínas oligoméricas constituidas por la combinación de cinco subunidades que atraviesan la membrana formando un pentámero. En los últimos años, gracias a las técnicas de biología molecular se han podido identificar hasta 11 genes que codifican otras tantas subunidades del receptor

nicotínico neuronal en rata y pollo. De todos estos genes, ocho (α_2 - α_9) codifican para las subunidades α , mientras que las tres restantes subunidades se denominan β_2 - β_4 en rata (Figura 1). A diferencia del receptor nicotínico de músculo esquelético, que está constituido por 4 subunidades diferentes (α_1 , β_1 , γ y δ) formando un pentámero de estequiometría conocida (2:1:1:1), la combinación y estequiometría entre las subunidades del pentámero que configuran el receptor nicotínico neuronal nativo no ha podido ser aún esclarecida *in vivo*; es razonable pensar en la existencia de varias combinaciones posibles entre las distintas subunidades, dando lugar a diversos subtipos de nAChRs. De hecho, se conocen al menos 8 combinaciones posibles entre distintas subunidades del nAChR, que han sido ya transfectadas y expresadas eficientemente en diversos sistemas de expresión; ello ha dado lugar a distintos subtipos de nAChRs, algunos de los cuales presentan propiedades fisiológicas y farmacológicas similares a las de los receptores nativos encontrados en el SNC.

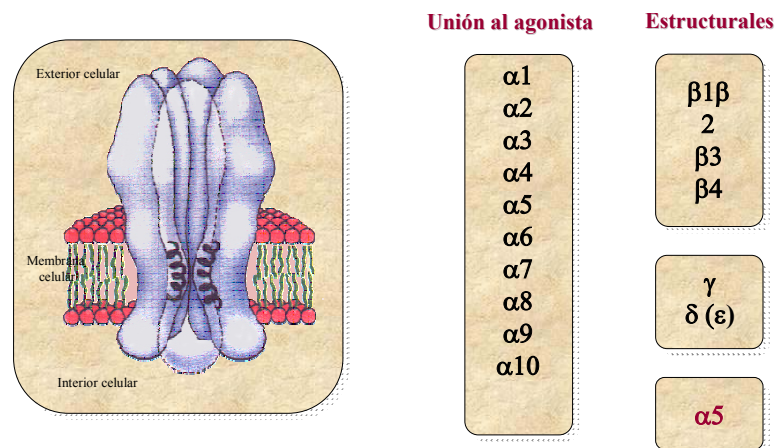


Figura 1: Esquema representativo de la estructura pentamérica de un receptor nicotínico neuronal insertado en la membrana plasmática, y listado de las distintas subunidades identificadas hasta el momento.

1.2.-Funciones fisiológicas de los receptores nicotínicos neuronales

A pesar de la gran variabilidad de los nAChR, el mecanismo por el que la activación de éstos conduce a un determinado efecto a nivel celular es bastante común.

Así, sabemos que la activación de los receptores por agonistas nicotínicos favorece la apertura del canal iónico formado por el receptor, permitiendo así el paso prioritario de cationes monovalentes (entrada de Na^+ y salida de K^+) y minoritariamente entrada de Ca^{2+} . Algunos subtipos de receptores nicotínicos presentan una marcada permeabilidad al Ca^{2+} , particularmente los que contienen subunidades $\alpha 7$; lógicamente, esta permeabilidad al Ca^{2+} tendrá importantes consecuencias funcionales. La entrada masiva de Na^+ a la célula a través de los nAChR va a provocar la despolarización de la misma, conduciendo en última instancia a la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) (Figura 2)

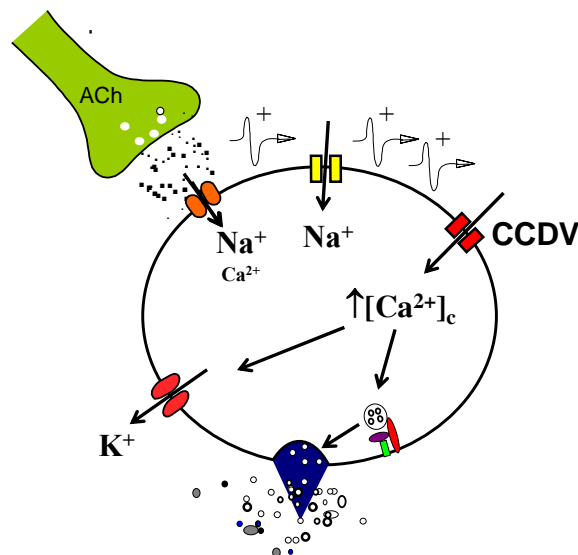


Figura 2: Esquema representativo de los eventos que median entre la activación de un receptor nicotínico por el neurotransmisor fisiológico acetilcolina y la liberación de un neurotransmisor por la neurona postsináptica.

Esta activación celular puede influir de dos maneras diferentes sobre la función cerebral, a saber: 1) mediando una transmisión sináptica, responsable de la propagación de impulsos de neurona a neurona; o 2) regulando la liberación de otros neurotransmisores (como acetilcolina, dopamina, serotonina, glicina, glutamato). En este sentido, se ha descrito que la activación de receptores presinápticos potencia la liberación de GABA y dopamina, así como la liberación evocada de glutamato,

habiéndose implicado fundamentalmente a los receptores que contienen la subunidad $\alpha 7$, con una alta permeabilidad al Ca^{2+} , en este tipo de efectos (Séguéla *et al.*, 1993).

1.3.-Localización de los receptores nicotínicos neuronales

Se sabe que en una misma neurona se pueden expresar varios subtipos de receptor nicotínico, por lo que surge la pregunta de si dichos subtipos pueden localizarse en diferentes regiones de una neurona y desarrollar funciones celulares específicas. Revisaremos a continuación las posibles ubicaciones de éstos receptores y cómo se afecta la liberación de neurotransmisores en función de la localización de los receptores nicotínicos.

1.3.1.-Receptores nicotínicos presinápticos

Hasta 1961, el modelo aceptado de transmisión sináptica era que un neurotransmisor liberado desde la terminación nerviosa en respuesta a un potencial de acción atravesaba la sinapsis para actuar con su receptor postsináptico en la neurona receptora. Este concepto fue modificado por Koelle (1961) quien propuso que la acetilcolina, aparte de su papel postsináptico, facilita su propia liberación desde ganglios simpáticos. Desde entonces, el término receptor presináptico se usa para definir a aquellos receptores presentes en terminaciones nerviosas donde sus correspondientes neurotransmisores facilitan o inhiben la liberación del mismo, contribuyendo a una fina regulación de la señal química que se origina desde la terminación nerviosa.

Los receptores nicotínicos constituyen uno de los mejores ejemplos de la existencia de esos receptores presinápticos con funciones moduladoras, ya que se ha visto que la estimulación de éstos produce un incremento de prácticamente todos los sistemas de neurotransmisores que han sido estudiados. Así, se sabe que la aplicación exógena de agonistas de los receptores nicotínicos pueden aumentar, y que los antagonistas de los receptores nicotínicos pueden disminuir la liberación de acetilcolina, dopamina, noradrenalina, serotonina, glutamato y GABA (Dani, 2001; Dani y Bertrand, 2007).

Uno de los mejores ejemplos de modulación de la neurotransmisión se produce a nivel del hipocampo, donde la activación de un receptor $\alpha 7$, altamente permeable a

calcio (Séguéla *et al.*, 1993), va a favorecer la entrada de este catión a través del propio receptor, con lo que se va a producir un incremento de calcio en la terminación presináptica que favorecerá la liberación de glutamato desde terminaciones glutamatérgicas (McGehee *et al.*, 1995; Gray *et al.*, 1996), o de GABA, desde terminaciones GABAérgicas (Figura 3).

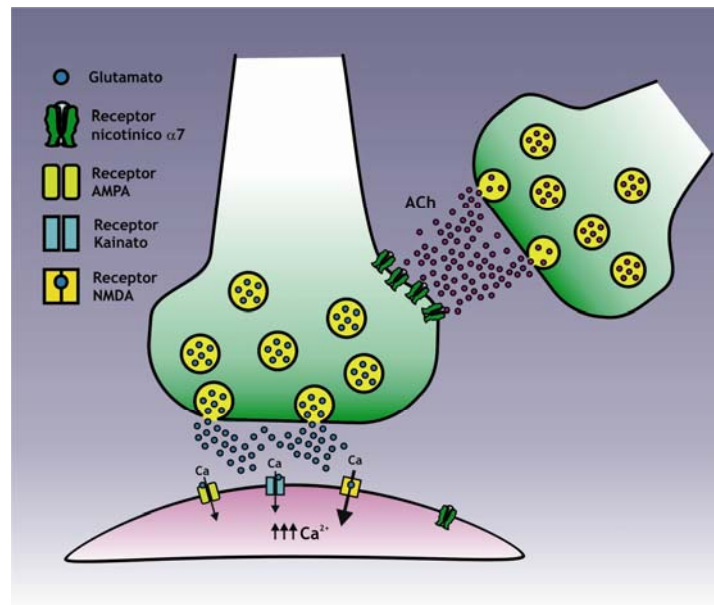


Figura 3: Representación esquemática de los receptores nicotínicos presinápticos. El receptor se localiza en la terminación presináptica, localizado de tal forma que puede modular la liberación a la hendidura sináptica del neurotransmisor almacenado en la terminación nerviosa. Tomado de Hernández-Guijo y Gandía (2006).

Es de destacar que en estos casos de modulación de la liberación de neurotransmisores, el calcio que entra en la terminación presináptica vía receptores nicotínicos, no va a actuar directamente liberando el neurotransmisor sino que va a ejercer un papel de segundo mensajero, favoreciendo una variada actividad enzimática a nivel intracelular (activación de quinasas y fosfatasa) que modifica la sinapsis y favorece indirectamente la liberación del neurotransmisor (Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004).

1.3.2.-Receptores nicotínicos axonales

Los receptores nicotínicos también pueden ubicarse en el axón de la neurona, en sitios alejados de la terminación sináptica, y modular así, de forma simultánea, la liberación de varios neurotransmisores (Dani, 2001; Dani y Bertrand, 2007)(Figura 4).

Así, en el caso de neuronas GABAérgicas, por ejemplo a nivel del hipocampo, la activación de estos receptores “axonales” va a producir una despolarización local de la membrana de la neurona, lo que lleva a la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje a nivel de la terminación sináptica, entrada de calcio a través de estos canales y liberación del neurotransmisor (Lena *et al.*, 1993; Alkondon *et al.*, 1997a).

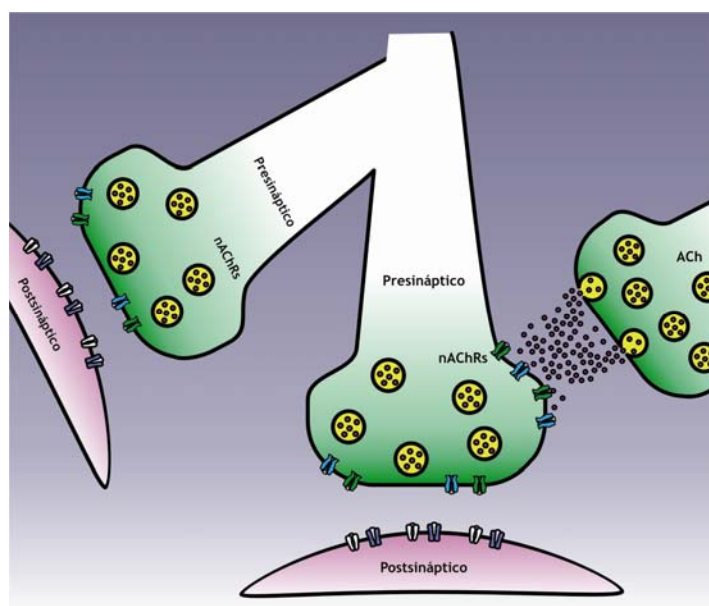


Figura 4: Representación esquemática de receptores nicotínicos “preterminales”, localizados a nivel del axón neuronal. La activación de estos receptores axonales podría favorecer la activación (y consecuente liberación del neurotransmisor) de unas terminaciones y no de otras, pertenecientes a una misma neurona. Tomado de Hernández-Guijo y Gandía (2006).

En este tipo de modulación “axonal”, a diferencia de lo que ocurre en el caso de los receptores ubicados en la terminación sináptica, el efecto facilitador de la liberación de neurotransmisores se bloquea por TTX, una toxina que bloquea canales de sodio y, por ende, bloquea la despolarización de la terminación sináptica, no produciéndose la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje (Lena *et al.*, 1993).

1.3.3.-Receptores nicotínicos postsinápticos

La ubicación de receptores nicotínicos a nivel postsináptico se va a relacionar con un proceso de neurotransmisión rápida (mediada por acetilcolina), pero que a su vez puede servir para modular la actividad de otras neuronas. Así, se ha descrito que este

tipo de neurotransmisión colinérgica puede producirse sobre interneuronas GABAérgicas del hipocampo (Alkondon *et al.*, 1998; Frazier *et al.*, 1998a; Frazier *et al.*, 1998b; Hefft *et al.*, 1999) y corteza visual, o en células piramidales de corteza visual (Roerig *et al.*, 1997)(Figura 5).

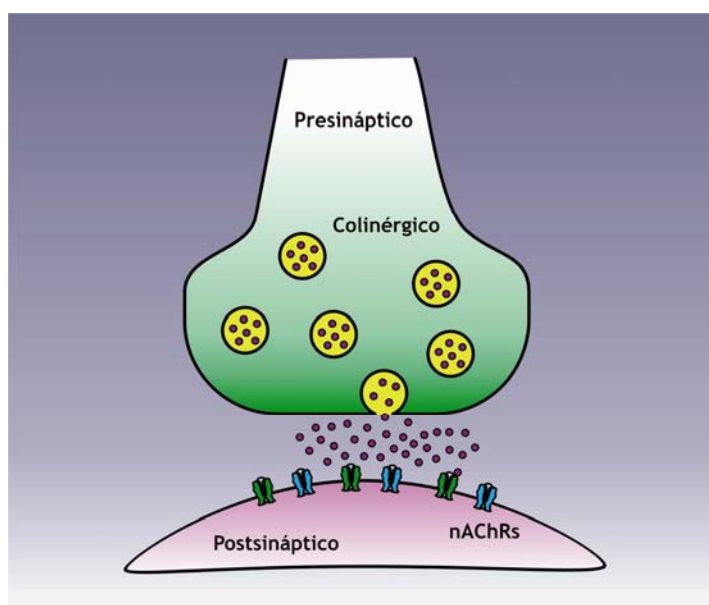


Figura 5: Representación esquemática de la transmisión nicotínica rápida. Los receptores nicotínicos se ubican en la terminación postsináptica. Tomado de Hernández-Guijo y Gandía, (2006).

Este tipo de actividad nicotínica puede dar lugar a curiosos mecanismos de modulación de la actividad neuronal. Pongamos de nuevo el ejemplo del hipocampo, en el que la aplicación de agonistas nicotínicos sobre interneuronas del área CA1 puede dar lugar tanto a una actividad inhibitoria como a una desinhibición (Ji y Dani, 2000).

Esta aparente paradoja se explica por el hecho de que cuando se activan receptores nicotínicos presentes en interneuronas que establecen sinapsis con neuronas piramidales, se va a producir una inhibición de éstas. Si por el contrario la interneurona activada por los agonistas nicotínicos establece sinapsis con otras interneuronas inhibitorias, se produce justo el efecto contrario, una desinhibición, con lo que algunas neuronas piramidales perderán temporalmente la inhibición inducida por las interneuronas. La consecuencia final de esta compleja trama de actividad inhibitoria y desinhibidora va a ser que la activación de los receptores nicotínicos contribuye a modular la actividad eléctrica del hipocampo y otras regiones cerebrales. Esta actividad eléctrica del

hipocampo está directamente relacionada con procesos de plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria (Ji y Dani, 2000; Dani, 2001; Dani y Bertrand, 2007).

1.4.-Receptores nicotínicos y señales intracelulares de calcio

Los nAChR van a poder ejercer, por tanto, distintos tipos de modulación de la señal celular del calcio y, por ende, de los procesos dependientes de calcio, entre ellos la liberación de neurotransmisores, o la regulación de los procesos de muerte celular programada (apoptosis).

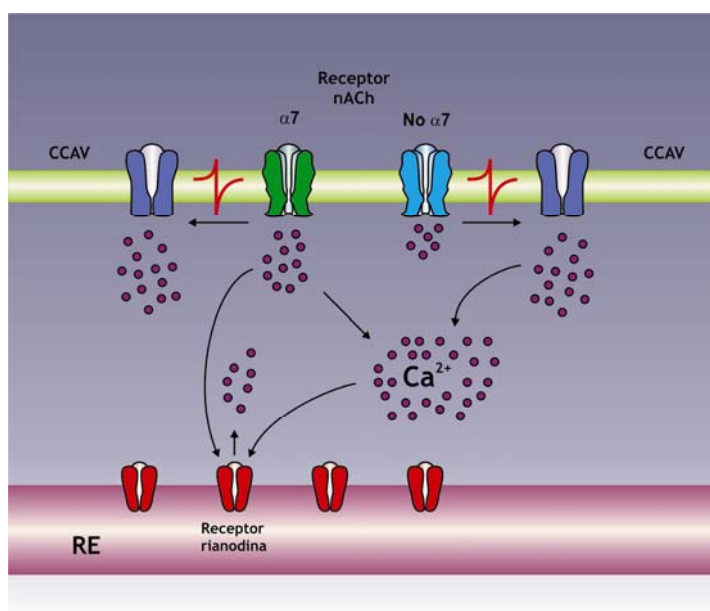


Figura 6: Esquema representativo de las posibles vías de entrada de calcio en la célula en las que podría estar implicado un receptor nicotínico neuronal. El calcio puede elevarse directamente por la entrada de calcio a través de un receptor nicotínico $\alpha 7$, o bien indirectamente por la entrada de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje (CCAV), activados a su vez por la despolarización generada tras la activación de receptores nicotínicos. El calcio citosólico elevado puede además favorecer la liberación de calcio desde el retículo endoplásmico (RE) mediante la activación del receptor de rianodina. Tomado de Hernández-Guijo y Gandía (2006)

Como puede apreciarse en la figura 6, la estimulación de un receptor nicotínico puede incrementar los niveles intracelulares de calcio, bien directamente gracias a la entrada del catión a través del receptor nicotínico (lo que es particularmente importante en el caso de los receptores del subtipo $\alpha 7$), o bien indirectamente, a través del reclutamiento de canales de calcio dependientes de voltaje (la entrada de iones Na^+ y Ca^{2+} a través de receptores nicotínicos va a producir la despolarización de la membrana

neuronal necesaria para la apertura de estos canales)(Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004).

Independientemente de la vía por la que entre el calcio, la activación de los receptores nicotínicos neuronales puede dar lugar a complejas señales intracelulares de calcio, que a su vez pueden influenciar la actividad de complejos sistemas de señalización intracelular. La capacidad de los receptores nicotínicos para regular diversas funciones neuronales (exocitosis de neurotransmisores, procesos de aprendizaje, muerte celular por apoptosis) va a depender de que se active selectivamente una u otra vía de señalización intracelular (ver figura 7) (Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004).

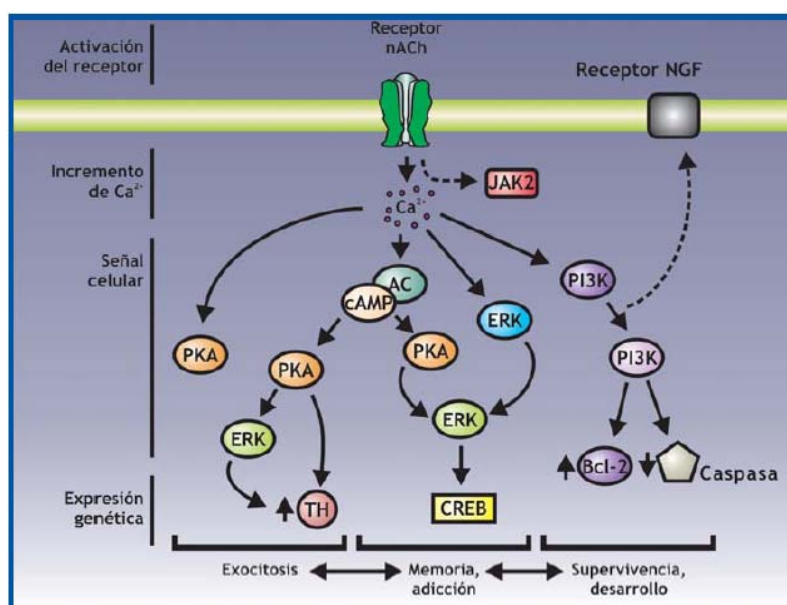


Figura 7: Representación esquemática de las vías de señalización intracelular implicadas en la regulación de diversas funciones neuronales por los receptores nicotínicos. El incremento de los niveles citosólicos de calcio puede activar la enzima adenilato ciclasa (AC), la proteína cinasa A (PKA), la proteína cinasa dependiente de calcio y calmodulina (CaMK) o la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), regulando así las rutas metabólicas que regulan los procesos de exocitosis de neurotransmisores, memoria y aprendizaje o muerte celular por apoptosis. Tomado de Hernández-Guijo y Gandía (2006)

2.-LA CELULA CROMAFIN DE LA MÉDULA SUPRARRENAL

Como hemos mencionado anteriormente, uno de los modelos experimentales que hemos utilizado para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral es la célula cromafín de la médula de la glándula suprarrenal. Este tipo celular constituye un excelente modelo

para el estudio de la síntesis, el almacenamiento y la liberación por exocitosis de neurotransmisores, de la modulación de canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) y de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} , entre otros.

2.1 Las glándulas suprarrenales

La glándula suprarrenal, también conocida como glándula adrenal, está encerrada en una cápsula de tejido conjuntivo vascularizado. Posee una corteza y una médula, que a pesar de tener un origen filogenético diferente y funciones diversas, forman un órgano homogéneo. La rica irrigación vascular de la glándula es conducida hacia el interior a través de los elementos de tejido conectivo derivados de la cápsula (Figura 8).

La corteza, derivada del epitelio mesodérmico, está subdividida en tres regiones o zonas concéntricas; la zona glomerular, la más externa y angosta ubicada justo por debajo de la cápsula; la zona fasciculata, la más extensa, cuyas células parenquimáticas habitualmente denominadas espongocitos, se ubican por debajo de la zona glomerular y se organizan en cordones o columnas y la zona reticular, la más interna, se dispone en cordones anastomosados de células formando un tejido laxo en forma de malla que limita con la médula. La corteza suprarrenal produce tres tipos de hormonas, mineralcorticoides (zona glomerular), glucocorticoides (zona fasciculata y parte de la zona reticular) y andrógenos (zona fasciculata y zona reticular).

La médula de la glándula suprarrenal deriva embriológicamente de la cresta neural, teniendo por tanto un origen común con las neuronas simpáticas (Euler, 1972). Las células de la médula suprarrenal son poliédricas, exhiben una granulación muy fina y están distribuidas en cordones rodeados por redes capilares que las nutren y, a la vez, recogen sus productos de secreción (Figura 8B). A causa de su afinidad por las sales de cromo, las células médulo-suprarrenales se bautizaron con el nombre de células cromafines. Son células conocidas como paraneuronas (Fujita *et al.*, 1988), ya que no siendo neuronas, su origen, estructura, función y metabolismo son muy similares (Winkler, 1976,1977; Livett, 1984; Carmichael y Winkler, 1985; Winkler *et al.*, 1987).

2.2.-La célula cromafín como modelo celular

La principal función de las células cromafines es la de liberar a la circulación sistémica las catecolaminas (dopamina, adrenalina y noradrenalina) como respuesta ante una situación de estrés.

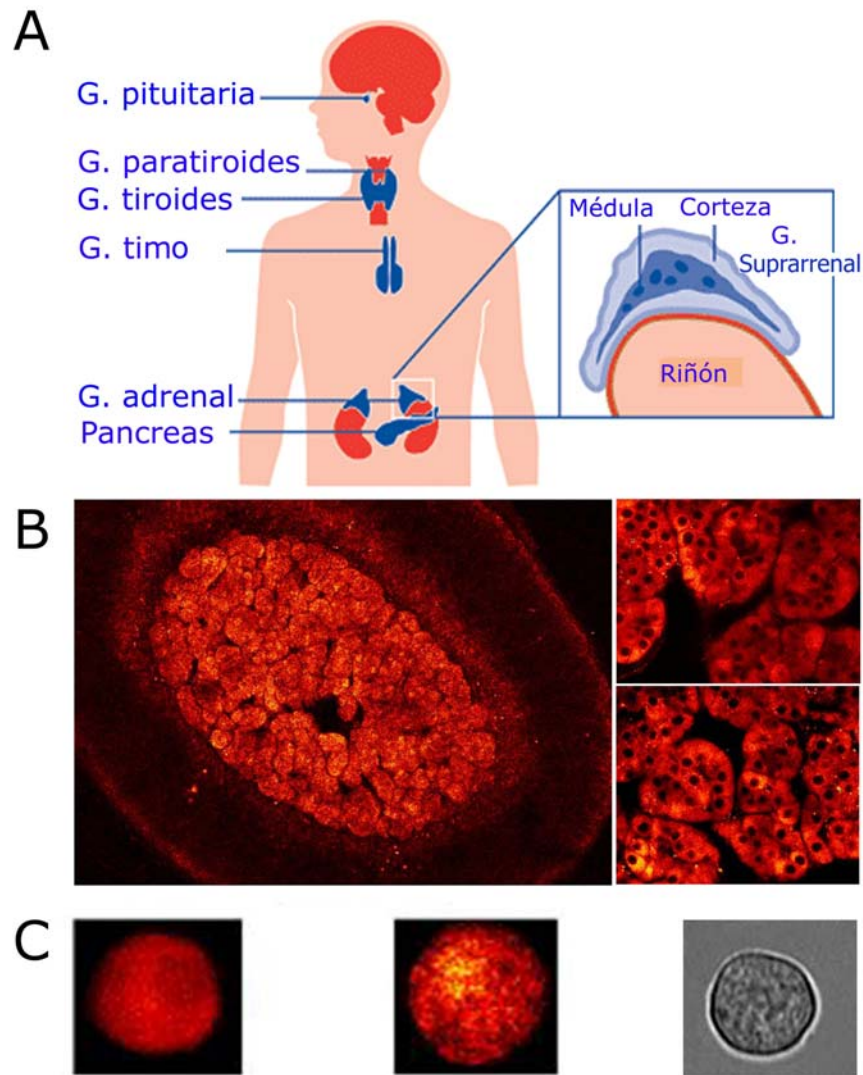


Figura 8. Panel A: Ubicación de la glándula suprarrenal en el organismo humano. **Panel B:** Imagen confocal de una rodaja de glándula adrenal de ratón de 150 μm de grosor, marcada con la sonda fluorescente Lysotracker Red que permite visualizar las vesículas de secreción. A la derecha, detalles de la organización en “acinos” o racimos de las células cromafines. Nótese su forma poliédrica. **Panel C:** células cromafines de ratón en cultivos primarios marcadas con la sonda fluorescente Lysotracker Red. A la derecha, imagen de transmisión de las células. Nótese aquí la diferencia con las células en el tejido intacto (Panel B) y su forma esférica, con un diámetro aproximado de 15 μm . Adaptada de Fuentealba (2004).

La acetilcolina liberada por las terminaciones del nervio esplácnico, va a actuar sobre diferentes subtipos de receptores nicotínicos ubicados en la membrana de la célula cromafín, activando así una pléyade de eventos que terminan con la liberación de las catecolaminas, que a su vez, activarán una respuesta de alerta en el sujeto (que implica un aumento del tono muscular, una redistribución del volumen sanguíneo y un aumento de la frecuencia cardíaca), que desencadenará la respuesta de lucha ó huída ante una amenaza o situación de estrés.

La célula cromafín constituye un excelente modelo de estudio de determinados fenómenos por una serie de características propias, como por ejemplo el cambio morfológico que experimenta cuando se mantiene en cultivos primarios, pasando de una forma poliédrica que es posible observar cuando se encuentra en la médula adrenal (Figura 8B), a una forma completamente esférica cuando se mantiene en cultivos primarios (Figura 8C). Estas características, además de considerar su origen, su similitud con las neuronas (canales, receptores) y su capacidad de disparar potenciales de acción espontáneos (Brandt *et al.*, 1976; Kidokoro y Ritchie, 1980), la convierten en un excelente modelo de estudio tanto para los fenómenos de exocitosis de neurotransmisores, como de señales de Ca^{2+} intracelulares acopladas a diferentes estímulos. Además, en la célula cromafín se ha descrito la existencia de una amplia gama de estructuras capaces de regular muy finamente los movimientos de Ca^{2+} intracelular. Así, posee una serie de vías para la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular, como son los CCDV (García *et al.*, 2000) y los receptores nicotínicos (Douglas y Rubin, 1961b; Wilson y Kirshner, 1977; Zhou y Neher, 1993) e indudablemente unas organelas intracelulares como la mitocondria y el retículo endoplásmico (RE), fundamentales en el control de los cambios transitorios de los niveles intracelulares de Ca^{2+} .

2.3.-Los receptores nicotínicos neuronales de la célula cromafín

Fisiológicamente, las células cromafines de la médula suprarrenal de los mamíferos están inervadas por terminaciones procedentes de los nervios esplácnicos mayores. El neurotransmisor a nivel de la sinapsis esplácnico-cromafín es la acetilcolina

La ACh liberada en la hendidura sináptica va a activar receptores colinérgicos de tipo nicotínico, presentes en la membrana de la célula cromafín (componente postsináptico), generando diferentes respuestas. La activación del receptor (o

receptores) nicotínico/os va a favorecer la apertura de un canal iónico no selectivo por el que entra mayoritariamente Na^+ , sirviendo esta entrada masiva de Na^+ para despolarizar la célula cromafín y provocar la apertura de canales iónicos dependientes de voltaje, entre los que cabe destacar a los CCDV. La entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular a través de los CCDV va a generar una elevación transitoria de la concentración citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) que, en última instancia, será la responsable de la activación de los procesos dependientes de calcio, como por ejemplo la exocitosis rápida de catecolaminas.

Paralelamente la activación de los receptores muscarínicos inducirá la producción de IP_3 , y la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares (Fisher *et al.*, 1981). Durante este proceso de activación celular, la mitocondria y el retículo endoplásmico participan ejerciendo un riguroso control de los niveles de Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) generados durante este proceso. La terminación del proceso cuenta con la hidrólisis de la ACh en el espacio sináptico, y en la célula, la activación de los canales de K^+ dependientes de calcio que ayudarán a la restitución del potencial de reposo de la célula.

En relación a los receptores nicotínicos neuronales presentes en la membrana de la célula cromafín, gracias a los estudios de biología molecular, se han podido identificar y caracterizar los diferentes subtipos de receptores nicotínicos neuronales existentes, habiéndose descrito en la célula cromafín bovina la existencia de receptores formados por subunidades $\alpha 3$ (Criado *et al.*, 1992), $\alpha 5$ (Campos-Caro *et al.*, 1997) y $\alpha 7$ (García-Guzmán *et al.*, 1995). La participación relativa de estos subtipos de receptores nicotínicos neuronales no está totalmente esclarecida.

3.-EL HIPOCAMPO

Para Don Santiago Ramón y Cajal, el hipocampo ó "Asta de Ammón" o "Hipocampo mayor", es una circunvolución cerebral adelgazada y simplificada, cuyo borde libre aparece rodeado y guarnecido por un trozo de circunvolución más simplificado, que se llama "fascia dentada" o "cuerpo abollonado", que constituyen dos formaciones distintas y discontinuas de la corteza cerebral primitiva (corteza primitiva: allocortex o arquipalio) y que se continua por medio de una zona de corteza transicional (subículum) con la circunvolución parahipocámpica o 5ª circunvolución temporal de Broca. Pertenece al lóbulo límbico de Broca, corresponde al fondo de la cisura o surco

del hipocampo y constituye el suelo del cuerno inferior o temporal del ventrículo lateral, en el que imprime una marcada impronta.

Solamente es visible en los cortes coronales practicados a su nivel (Figura 9A), ofreciendo la característica forma en un "*caballito de mar*" (de aquí el nombre de "hipocampo") y una marcada analogía con el "*cuerno de un carnero*" (por lo que se denomina "asta de Ammón").

El hipocampo forma una parte del sistema límbico y participa en importantes procesos cerebrales como el aprendizaje, la consolidación de la memoria y la orientación espacial.

Debido a su arquitectura y organización muy simples, el hipocampo constituye un modelo ideal para estudiar la transmisión sináptica en cerebro de mamíferos. A finales de la década de los sesenta, se descubrió que el hipocampo en realidad podía extraerse del cerebro (en animales de experimentación) y cortarse en finas rodajas de tejido que podían conservarse vivas *in vitro* durante muchas horas. En una preparación de este tipo, los tractos de fibras pueden ser estimulados eléctricamente y registrarse las respuestas sinápticas.

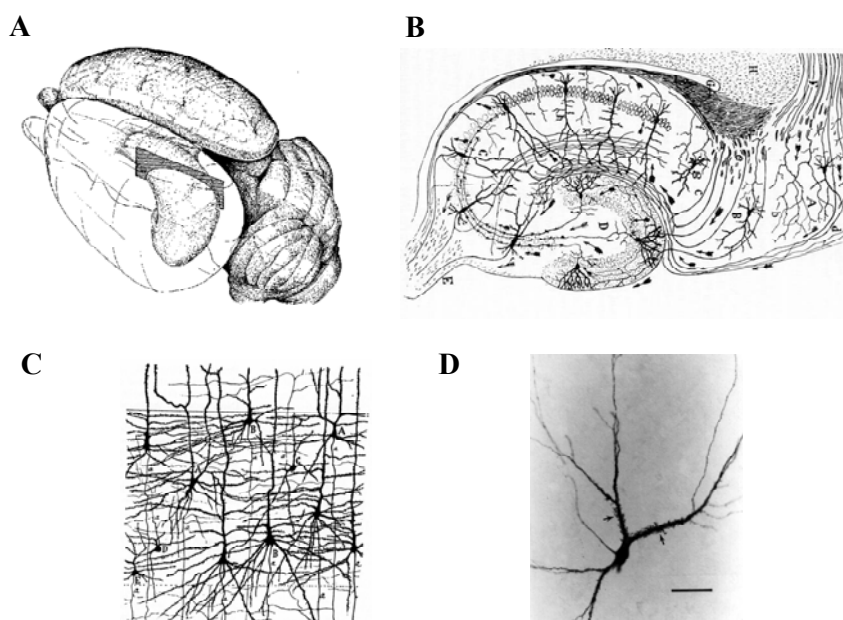


Figura 9. Panel A: Dibujo original de D. Santiago Ramón y Cajal en el que se aprecia la posición del hipocampo en el encéfalo de la rata. **Panel B:** Ampliación del corte mostrado en el panel A, en el que se puede observar la macroestructura del hipocampo. **Panel C:** Detalle de la microarquitectura del giro dentado. **Panel D:** Detalle de una célula musgosa del giro dentado. Adaptado de Ramón y Cajal (1911).

3.1.-Estructura del hipocampo

La estructura del hipocampo la tipificó originalmente Don Santiago Ramón y Cajal, identificando hasta 7 zonas: 1) Capa Ependimaria; 2) Alveus; 3) Stratus Oriens (plexiforme); 4) Pirámides amónicas (piramidal); 5) Stratum radiatum; 6) Stratum Lacunosum; 7) Molecular. Esta estructura se puede simplificar en 3 capas: plexiforme, piramidal y molecular. Lorente de No, discípulo de Don Santiago, delimitó en 1934 los campos CA1, CA2, CA3 y CA4 del asta de Ammón, con lo que quedó definitivamente cerrado el tema de la anatomía del hipocampo (Figura 10).

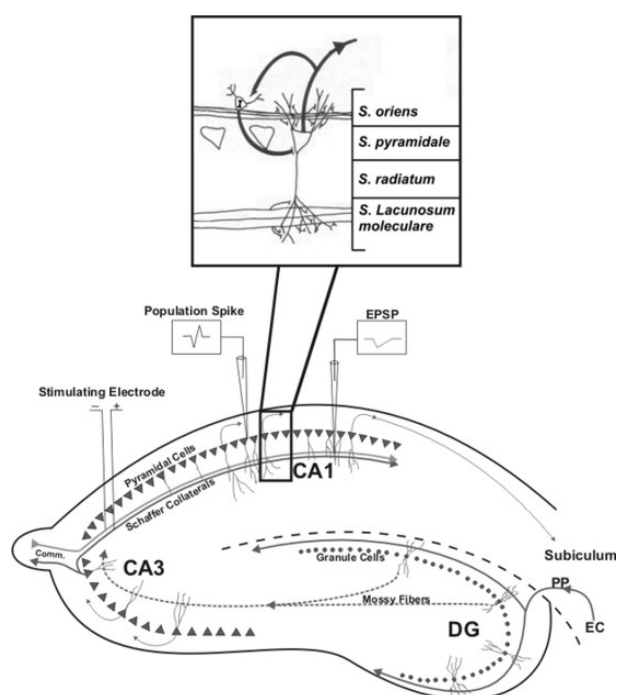


Figura 10. Estructura en capas de las diversas áreas del hipocampo. Las neuronas piramidales se encuentran ubicadas principalmente en la capa piramidal, mientras que las interneuronas se localizan fundamentalmente en el S. radiatum, donde interactúan con las dendritas apicales de las neuronas piramidales.

Las principales neuronas del hipocampo son las células piramidales alineadas en forma de dos a cuatro hileras en el interior de la capa piramidal. Las principales dendritas (apicales) de dichas células se extienden hacia la capa molecular; los axones llegan al alveus a través de la capa polimorfa.

Los axones de las células piramidales conducen impulsos eferentes desde el hipocampo. Estos axones ascienden por el alveus y, al menos en el caso de las células de CA1 y CA2, cada uno se bifurca en dos ramas principales. Una rama se dirige hacia

el interior de la fimbria para formar el fornix. La segunda rama se proyecta en dirección opuesta, hacia las áreas corticales transicionales adyacentes, es decir, hacia la corteza subicular y entorrinal y más allá de estas. Antes de entrar a la fimbria y al fornix, los axones de las células piramidales en CA3, aportan colaterales de Schaffer que se proyectan sobre células piramidales en CA2 y CA3.

3.2.-Receptores nicotínicos neuronales en el hipocampo

Los nAChRs parecen estar implicados en varias funciones neuronales como la atención, el aprendizaje y procesos de memoria; por ello, parecen particularmente relevantes los receptores localizados en distintas regiones del cerebro, como el hipocampo (Wood et al., 1999), el cual recibe un gran número de terminaciones colinérgicas; las interneuronas GABAérgicas son las principales dianas de las terminaciones colinérgicas que llegan al hipocampo (Nemoto *et al.*, 1995). Adicionalmente, se conoce la existencia de sinapsis intrínsecas colinérgicas entre interneuronas de esta región del cerebro (Freund y Buzsaki, 1996).

En el hipocampo existen distintos subgrupos de interneuronas, según la expresión de nAChRs en las mismas (McQuiston y Madison, 1999). Se ha demostrado la presencia en estas células de receptores $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 3\beta 4$ (Staley y Mody, 1992; Alkondon *et al.*, 1997b; Khiroug *et al.*, 2002) y de la subunidad $\alpha 5$ (Winzer-Serhan y Leslie, 2005).

En cultivos neuronales, son principalmente las interneuronas inhibitoras GABAérgicas las que parecen expresar tres subtipos diferentes de receptores de ACh (Freedman *et al.*, 1993; Alkondon *et al.*, 1997b; Frazier *et al.*, 1998b; Adams *et al.*, 2001; Alkondon y Albuquerque, 2004), mientras que las células piramidales no parecen expresar nAChRs en su membrana (Frazier *et al.*, 1998b), raramente muestran respuestas nicotínicas y cuando la presentan son mucho menores que las registradas en las interneuronas (McQuiston y Madison, 1999).

Entre los distintos subtipos de nAChR presentes en las interneuronas del hipocampo debemos destacar el receptor $\alpha 7$, que parece ejercer un papel como un modulador de la secreción de varios neurotransmisores, incluido el glutamato (McGehee y Role, 1995; Gray *et al.*, 1996), GABA (Alkondon *et al.*, 1997b; Alkondon y Albuquerque, 2004), dopamina (Schilstrom et al., 1998) y noradrenalina (Li et al.,

1998). A los receptores $\alpha 7$ expresados en las células del hipocampo se les ha atribuido un papel importante en la regulación de la transmisión sináptica GABAérgica (Hilmas *et al.*, 2001; Maggi *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2002); sin embargo, otros autores apuntan que este receptor puede modular la secreción de neurotransmisores tanto en sinapsis GABAérgicas como glutamatérgicas (Alkondon *et al.*, 1999; Mansvelder y McGehee, 2000), y otros sugieren que el $\alpha 7$ así como el resto de nAChRs no tienen suficiente potencia para modular la secreción de glutamato bajo el control de una sinapsis simple (Kanno *et al.*, 2005).

Para intentar entender, de una forma simplificada, la integración de todos estos elementos, podríamos decir brevemente que las neuronas piramidales del hipocampo reciben sinapsis excitadoras glutamatérgicas procedentes de las colaterales de Schaffer, así como sinapsis inhibitoras GABAérgicas procedentes de interneuronas locales (Figura 11). La estimulación de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ presentes en la terminación sináptica de interneuronas podría modular la liberación de GABA, que ejercería un efecto inhibitor sobre la neurona piramidal. Por otro lado, los receptores nicotínicos $\alpha 7$ presentes en el árbol dendrítico de las neuronas piramidales pueden modular la liberación de glutamato desde éstas (por ejemplo desde las colaterales de Schaffer), que ejercerá una acción estimuladora sobre una segunda neurona piramidal (Figura 11).

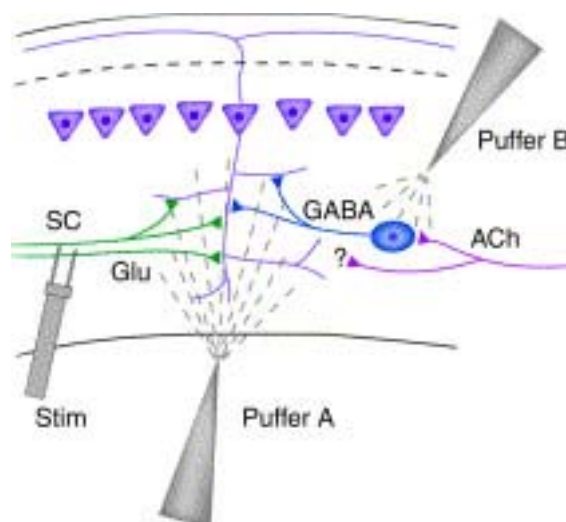


Figura 11. Representación esquemática de los elementos celulares implicados en la modulación nicotínica de la transmisión sináptica en el hipocampo. Adaptado de (McGehee, 2002).

4.-LIGANDOS NICOTÍNICOS

Los receptores nicotínicos presentan un sitio de unión para la acetilcolina (2 moléculas de acetilcolina deben unirse a subunidades α para que el canal se abra), sitio en el que también se van a unir los fármacos con capacidad agonista, así como los antagonistas de tipo competitivo. Pero estos receptores también presentan otros sitios de unión para fármacos de tipo no competitivo, tanto agonistas como antagonistas, y otras sustancias moduladoras. Gracias a las técnicas de biología molecular y de mutagénesis dirigida, combinadas con experimentos de tipo electrofisiológico, ha sido posible la identificación de determinados aminoácidos de los receptores nicotínicos implicados en los procesos de reconocimiento de los diferentes fármacos (Figura 12).

Las posibles combinaciones de subunidades presentes en un determinado subtipo de receptor nicotínico va a determinar sus características funcionales y su característico perfil farmacológico.

La mayoría de los agonistas nicotínicos actualmente disponibles (entre otros la acetilcolina, la nicotina, la epibatidina o el dimetil-fenil-piperazinio; Tabla 1) se caracterizan por no poseer selectividad receptorial, esto es, son capaces de activar todos los subtipos de receptores nicotínicos, por lo que se trabaja activamente en el desarrollo de nuevos ligandos con selectividad receptorial.

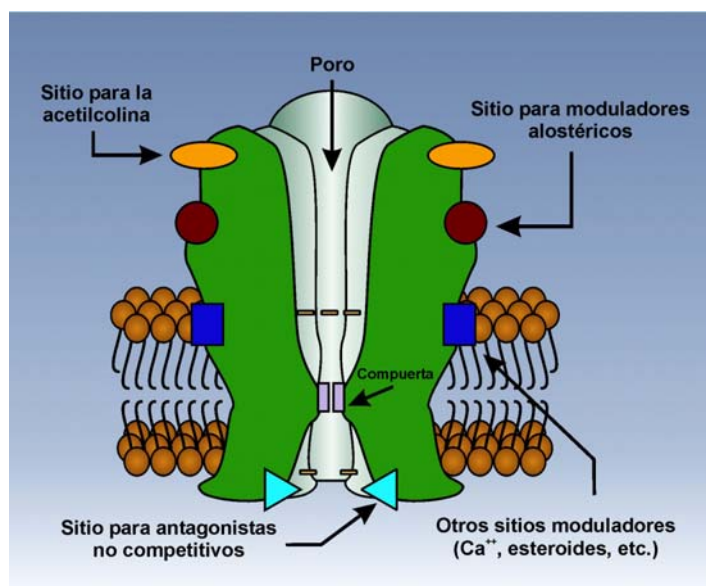


Figura 12. Sitios de unión para diferentes ligandos. Representación esquemática de la estructura de un receptor nicotínico neuronal y los posibles sitios de unión para ligandos con capacidad agonista, antagonista competitivo, antagonista no competitivo y moduladores alostéricos. Tomada de Gandía (2006)

Parece lógico pensar que en un campo nuevo como el de los receptores nicotínicos neuronales, de los que se han identificado nueve subunidades alfa ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) y tres beta ($\beta 2$ - $\beta 4$) el esfuerzo deba canalizarse a la consecución de compuestos lo más selectivos posibles; y no sólo pensando en su eventual aplicabilidad terapéutica, sino también en su utilización como herramientas farmacológicas para conocer la implicación de cada subtipo de receptor en una determinada función fisiológica o fisiopatológica (conducta, memoria, atención, dolor, convulsiones, neurodegeneración, apoptosis, neuroprotección).

| <u>Agonistas no-selectivos</u> | <u>Antagonistas no-selectivos</u> | <u>Moduladores alostéricos</u> |
|---|--|--------------------------------|
| 5-I-A85380 | α -conotoxina MII | Codeína |
| ABT-418 / ABT-089 | Clorisondamina | Fisostigmina |
| Acetilcolina | Dihidro- β -eritroidina | Galantamina |
| Anabaseína | Erisodina | 5-OH-Indol |
| Anatoxina | Hexametonio | Ivermectina |
| Carbacol | Mecamilamina | PNU120596 |
| DMPP | Trimetafán | |
| Epibatidina | D-Tubocurarina | |
| Lobelina | | |
| Nicotina | | |
| | | |
| <u>Agonistas selectivos $\alpha 7$</u> | <u>Antagonistas selectivos $\alpha 7$</u> | |
| AR-R17779 | α -bungarotoxina | |
| Colina | α -conotoxina ImI (?) | |
| 4-OH-GTS21 | MLA | |
| PNU282987 | | |

Tabla 1. Ligandos de receptores nicotínicos neuronales.

Mención especial merecen los nuevos ligandos con capacidad moduladora alostérica de los receptores nicotínico neuronales. Un modulador alostérico no es capaz de activar por sí mismo al receptor pero sí se une a él, aunque en un lugar distinto al de la acetilcolina, de ahí el apellido alostérico (Figura 12). Dicha unión produce una modificación conformacional que provoca una hipersensibilidad del receptor nicotínico neuronal a su neurotransmisor natural acetilcolina, de tal forma que cuando la acetilcolina se libera en la sinapsis colinérgica y se une a un receptor “sensibilizado”

por el modulador alostérico, el receptor en cuestión responde con más viveza para transmitir la señal que le indica el neurotransmisor.

En este nuevo campo farmacológico se trabaja sobre la posibilidad de sintetizar tres tipos de moduladores alostéricos con diferentes efectos sobre la desensibilización del receptor nicotínico $\alpha 7$ (Figura 13), características farmacológicas, y por ende sus potenciales ventajas y/o usos terapéuticos todavía están por esclarecer. Con el desarrollo experimental de la presente Tesis Doctoral hemos querido contribuir a esta caracterización farmacológica, ensayando el efecto de nuevos moduladores alostéricos del receptor $\alpha 7$, en el marco de una colaboración científica con los laboratorios Johnson & Johnson (Beerse, Bélgica).

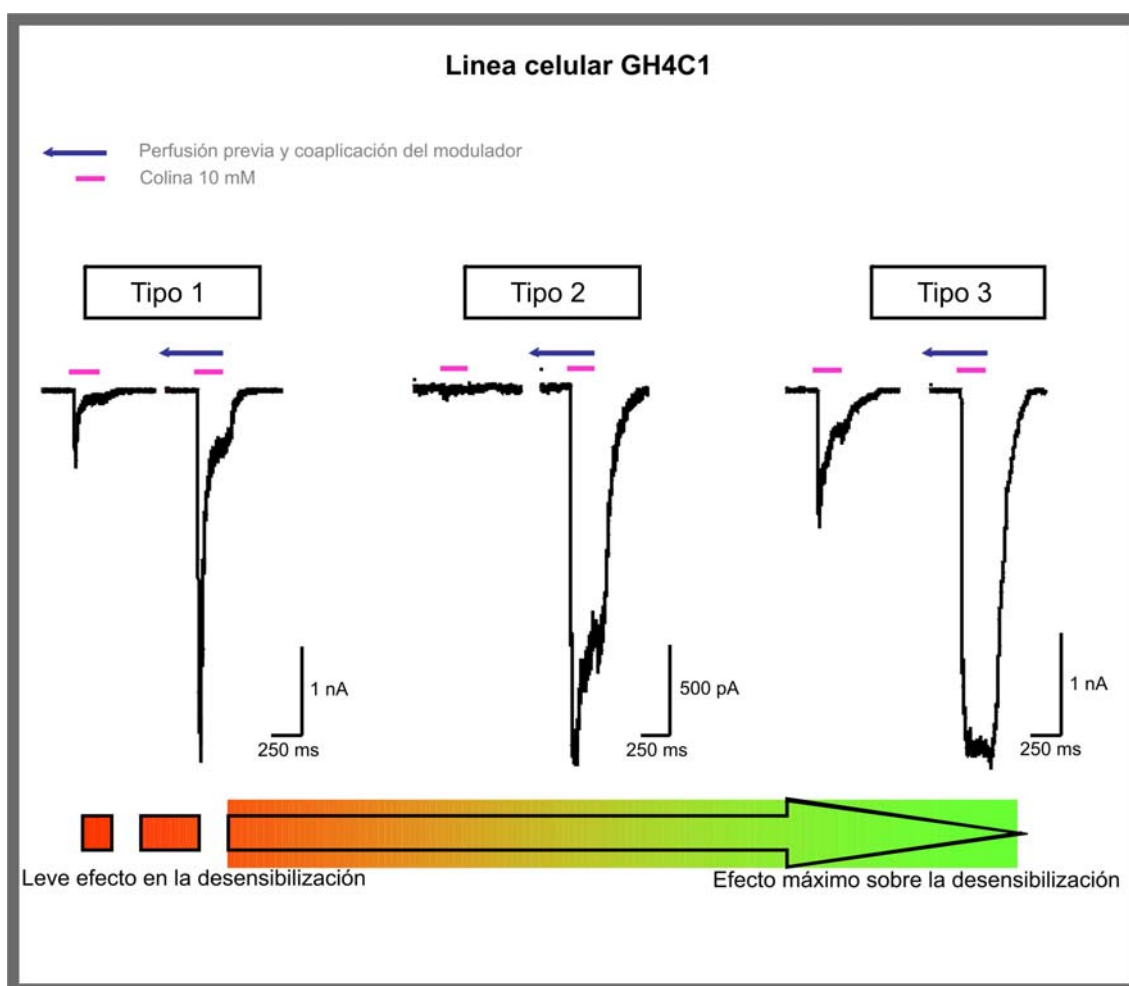


Figura 13. Tipos de moduladores alostéricos del receptor nicotínico $\alpha 7$. La figura muestra los efectos sobre las corrientes de entrada registradas en células GH4C1 transfectadas con el receptor $\alpha 7$ humano de tres tipos de moduladores alostéricos con diferentes efectos sobre la cinética de inactivación de éste.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es examinar los efectos de la activación de los nAChR sobre la neurotransmisión, considerando aquellos mecanismos celulares implicados en la conexión entre la activación nicotínica y la iniciación y/o la modulación del proceso exocitótico, y sus implicaciones en el funcionamiento sináptico.

Como hemos comentado anteriormente, dicho estudio lo abordaremos empleando dos tipos de modelos celulares, a saber:

- **Cultivo primario de células cromafines bovinas**
- **Cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata embrionaria.**

En lo que respecta al *cultivo primario de células cromafines bovinas*, en este modelo celular los nAChR ejercen un papel de receptor postsináptico, interviniendo en la génesis y en la modulación del proceso secretor de catecolaminas.

En la célula cromafín de la médula adrenal, el proceso que se lleva a cabo desde el estímulo hasta la secreción incluye la despolarización provocada por la ACh (Douglas *et al.*, 1967), capaz de generar el disparo de potenciales de acción (Brandt *et al.*, 1976), que van a conducir a la apertura de distintos subtipos de CCDV (García *et al.*, 2006), con lo que se produce una entrada masiva de Ca^{2+} (Douglas y Rubin, 1961b), y el consiguiente incremento de las concentraciones de Ca^{2+} libre en el citosol ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) (Baker y Knight, 1978) activa la maquinaria exocitótica (Neher, 1998) liberándose las catecolaminas al medio extracelular.

En ausencia de despolarización de la membrana, el Ca^{2+} que entra a través de los nAChRs es también capaz de producir exocitosis en la célula cromafín de gato (Douglas y Rubin, 1963) y bovino (Gandia *et al.*, 1991; Mollard *et al.*, 1995), así como en células PC12 (Harkins y Fox, 1998). Esto se ha interpretado como una entrada de Ca^{2+} a través de dos vías las cuales contribuyen, indistinta e igualmente, al proceso de exocitosis en la célula cromafín. Contrariamente a ésta visión, los experimentos realizados en células cromafines de la médula adrenal de bovino que se presentan en esta Tesis, sugieren distintas funciones fisiológicas para el Ca^{2+} que entra a través de los receptores nicotínicos y el Ca^{2+} que entra a través de los CCDV tras una despolarización producida por ACh.

En cuanto al *cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata embrionaria*, en este modelo experimental coexisten diferentes tipos neuronales (neuronas

piramidales e interneuronas GABAérgicas y glutamatérgicas) que establecen interconexiones entre sí, contando con nAChRs que representan un papel de receptor presináptico y/o axonal, ejerciendo así un papel modulador de la liberación de GABA y/o glutamato, con respuestas postsinápticas complejas.

En estos complejos cultivos neuronales se han llegado a identificar tres tipos diferentes de nAChRs: $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 3\beta 4$ (Alkondon y Albuquerque, 2004); estos receptores parecen estar expresados mayoritariamente en subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas (Freedman *et al.*, 1993; Adams *et al.*, 2002). En cuanto a las células piramidales pueden carecer de receptores nicotínicos (Frazier *et al.*, 1998b), o raramente mostrar respuestas nicotínicas, pero cuando esto sucede dichas corrientes son mucho más pequeñas que las que se registran en las interneuronas (McQuiston y Madison, 1999).

Entre estos subtipos de receptores nicotínicos destaca el $\alpha 7$, pues modula la liberación de varios neurotransmisores. Existen ciertas discrepancias sobre el posible papel funcional de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ expresados en células GABAérgicas de hipocampo, por lo que intentaremos caracterizar el papel funcional de este receptor.

El conocimiento de los posibles mecanismos en los que están implicados los receptores nicotínicos regulando la actividad sináptica permitirá la comprensión de la fisiología del hipocampo, además de poder identificar posibles implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas. Se sabe que el hipocampo es el centro del aprendizaje, y de la memoria, por lo que los receptores nicotínicos pueden jugar un papel importante en estos procesos. Igualmente, se ha observado que hay una clara implicación del receptor nicotínico en los efectos fisiológicos del tabaco, en la adicción al tabaco, y en algunas enfermedades mentales, como en la esquizofrenia y en la epilepsia, además de su implicación en el deterioro cognitivo en la enfermedad de Alzheimer (Wood *et al.*, 1999).

Objetivos concretos

Basándonos en estos antecedentes, en este estudio pretendemos caracterizar el papel de los receptores nicotínicos presinápticos, axonales y postsinápticos como iniciadores y/o moduladores de los procesos de neurotransmisión, utilizando para ello un sistema experimental sencillo (la célula cromafín de la médula suprarrenal) y un

sistema experimental más complejo (el cultivo primario de hipocampo de rata). Para ello nos hemos propuesto los siguientes objetivos concretos:

1. Caracterizar un posible papel modulador de la secreción de catecolaminas de los receptores nicotínicos neuronales presentes en la membrana de la célula cromafín.
2. Caracterizar el posible papel iniciador y/o modulador de la liberación de neurotransmisores (GABA y glutamato) de los receptores nicotínicos neuronales presentes en la membrana de neuronas en cultivos de hipocampo de rata embrionaria.
3. Establecer las condiciones experimentales idóneas para el uso del cultivo de neuronas de hipocampo de rata como un modelo experimental para la caracterización farmacológica de nuevos ligandos nicotínicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.-Aislamiento y cultivo de células cromafines bovinas

Las células cromafines de la médula adrenal se aislaron a partir de glándulas de terneros (Figura 14), extraídas de los animales en un matadero local y transportadas hasta el laboratorio en una solución de Locke sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} compuesta por (en mM): 154 NaCl, 5,6 KCl, 3,6 NaHCO_3 , 5,6 glucosa, 5 HEPES, pH 7,2, además de antibióticos (50 UI/ml de penicilina y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin).

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

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

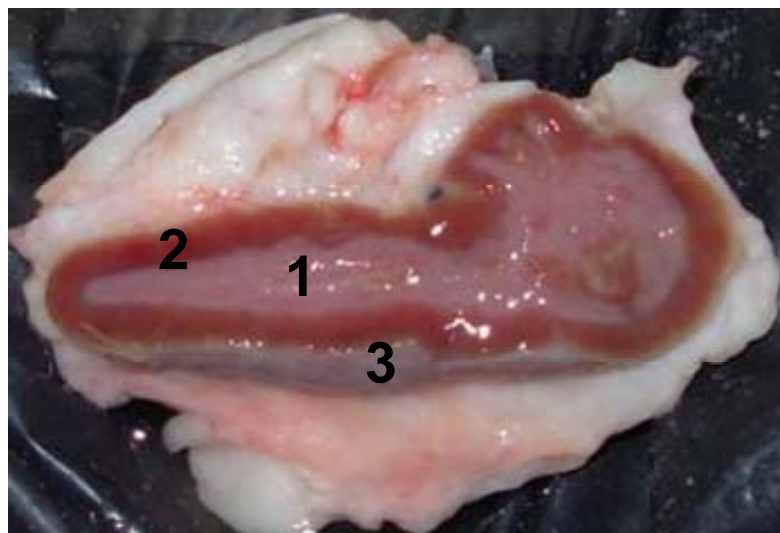


Figura 14. Fotografía de una glándula adrenal de ternero seccionada en la que se pueden apreciar las tres capas de la glándula: 1) la médula adrenal; 2) la corteza; y 3) la cápsula.

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

A continuación se separan y purifican las células mediante un gradiente de Percoll, para lo cual se añade una mezcla estéril de Percoll y Locke concentrado (10x) (pH=5) a la suspensión celular y se centrifuga (20.000xg, 20 min, 15°C). Tras esta centrifugación se observan varias bandas en el gradiente, entre las que destacan una superior con una mezcla de células cromafines adrenérgicas y noradrenérgicas y una inferior de cromafines principalmente adrenérgicas. Se recogen las células comprendidas entre estas dos capas y se realiza un primer lavado del Percoll añadiendo grandes cantidades de Locke y centrifugando (120xg, 10 min, temperatura ambiente). Se elimina el sobrenadante y se resuspende el precipitado en medio DMEM (se realiza así un segundo lavado del Percoll) al que se le han añadido: 5% de suero bovino fetal, inhibidores de fibroblastos (10 μM de arabinósido de citosina y 10 μM de fluorodeoxiuridina) y antibióticos (50 UI/ml de penicilina y 50 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina).

Las células (Figura 15) se sembraron en cubreobjetos de vidrio de 1 cm de diámetro (previamente tratados con polilisina para facilitar la adhesión de las mismas) a una densidad de 5×10^4 células/ml para los experimentos de *patch-clamp*. Las células se mantuvieron a 37°C en un incubador con atmósfera saturada de agua y 5% de CO₂. El medio de cultivo se reemplazó por un DMEM libre de suero 24 h tras la siembra. Las células se emplearon 24-48 h tras la siembra.

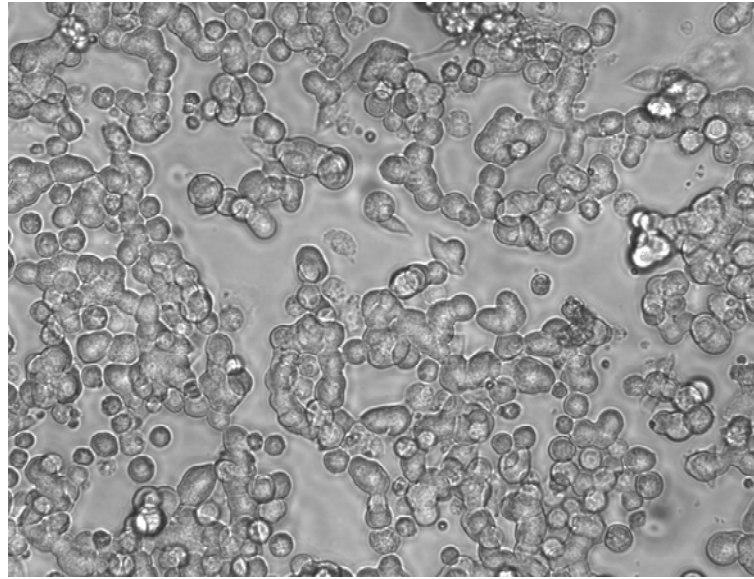


Figura 15. Microfotografía de células cromafines en cultivo. Obsérvese la apariencia redondeada y la tendencia de las células a agruparse en forma de pequeños racimos, imitando la situación que ocurre fisiológicamente en la médula suprarrenal.

2.-Aislamiento y cultivo de neuronas de hipocampo de rata

Estos experimentos en los que se utilizan animales de laboratorio se llevaron a cabo siguiendo estrictamente las normas para la manipulación de animales establecidas por el Comité Ético Nacional para el manejo de animales de experimentación y por el Comité Local de protección de animales de la Universidad Autónoma de Madrid.

Se utilizaron ratas gestantes (18 días de gestación) de la especie Sprague-Dawley que se sacrificaron mediante decapitación, y los embriones se extrajeron mediante cesárea. Se disecaron los cerebros de los fetos y se pusieron en medio PBS en frío (4°C), disecándose rápidamente los dos hipocampos con la ayuda de un estereomicroscopio.

Los tejidos se digirieron con una solución que contenía 0,5 mg/ml de papaína y 0,25 mg/ml de ADNasa. Los enzimas se disolvieron en PBS carente de Ca^{2+} y Mg^{2+} , en presencia de 1 mg/ml de BSA y 10 mM de glucosa a 37°C durante 20 min. La solución de papaína se reemplazó con 5 ml de medio DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS). El tejido digerido se disgregó mecánicamente mediante el uso de una pipeta Pasteur de vidrio con la punta flameada, con el fin de causar el menor daño posible a las células.

La suspensión celular resultante se centrifugó durante 4 min a 120xg. Una vez retirado el sobrenadante, las células se volvieron a resuspender en 5 ml de DMEM y se sembraron a una densidad de 100.000 células/ml en placas Petri de 4 cm de diámetro (2 ml por placa) cuyo fondo se había cubierto con polilisina (0,1 mg/ml). Las células se sembraron con DMEM suplementado con 10% FBS, 60 mg/ml de L-glutamina, 100 µg/ml de estreptomicina y 100 UI/ml de penicilina G.

Las células se mantuvieron en un incubador en una atmósfera con 5% CO₂ a 37°C. Un día después, el medio se reemplazó con una solución similar pero carente de suero, para evitar así la proliferación de fibroblastos, y suplementada con medio B27 (suplemento esencial para la supervivencia de neuronas de hipocampo *in vitro*). En éstas condiciones, la supervivencia celular es de 4 semanas.

Los experimentos se realizaron en neuronas que se mantuvieron en cultivo durante 10-15 días (Figura 16). Para seleccionar las neuronas en las que se realizó el registro de corrientes iónicas, utilizamos los siguientes criterios: 1) la adhesión al cubreobjetos; 2) el diámetro del soma, de 15-30 µm; 3) la presencia de extensiones dendríticas; 4) ausencia de vacuolas intracelulares; y 5) cuerpos celulares birrefringentes, con los límites plasmalemales oscuros.

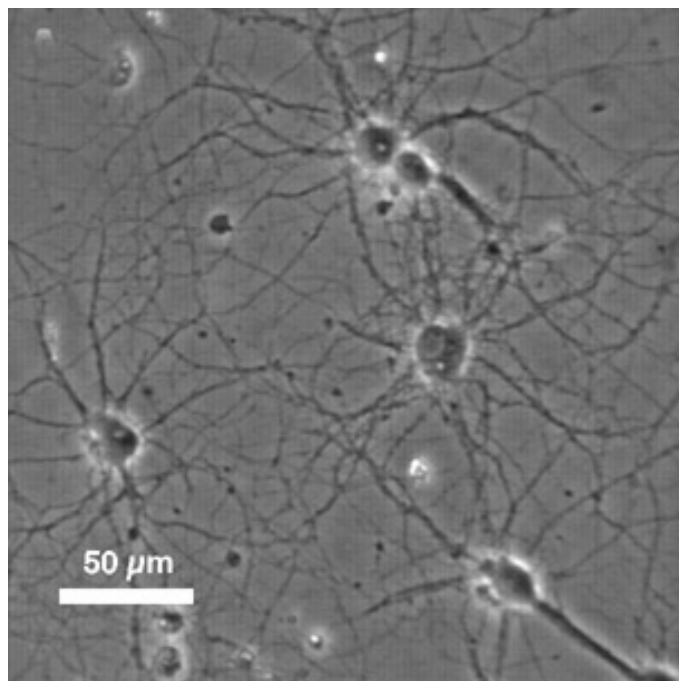


Figura 16. Microfotografía de un cultivo de neuronas embrionarias de hipocampo de 10 días en cultivo.

3.-Registro de corrientes iónicas mediante la técnica de *patch-clamp*

Las corrientes nicotínicas generadas por la estimulación de una célula mediante la aplicación del agonista fisiológico ACh ($100 \mu\text{M}$), I_{ACh} , se registraron mediante la técnica de *patch-clamp* (Hamill *et al.*, 1981) en su modalidad de fijación de voltaje y configuración de parche perforado (Korn y Horn, 1989; Gillis *et al.*, 1991).

La técnica de *patch-clamp* en su modalidad de fijación de voltaje consiste en mantener fija la diferencia de potencial de un parche de membrana de la célula (Figura 17) con ayuda de un amplificador; de este modo, si en respuesta a un determinado estímulo se produce alguna corriente de entrada o de salida de iones a través de los canales y/o receptores ionotrópicos presentes en dicho parche de membrana (p. ej: se abren nAChRs de la célula en respuesta a ACh y principalmente fluyen iones Na^+ y Ca^{2+} hacia el interior celular), la medición de la corriente que es necesario inyectar para mantener fijo el potencial de membrana será equivalente al flujo de iones que se ha producido a través del parche de membrana de la célula.

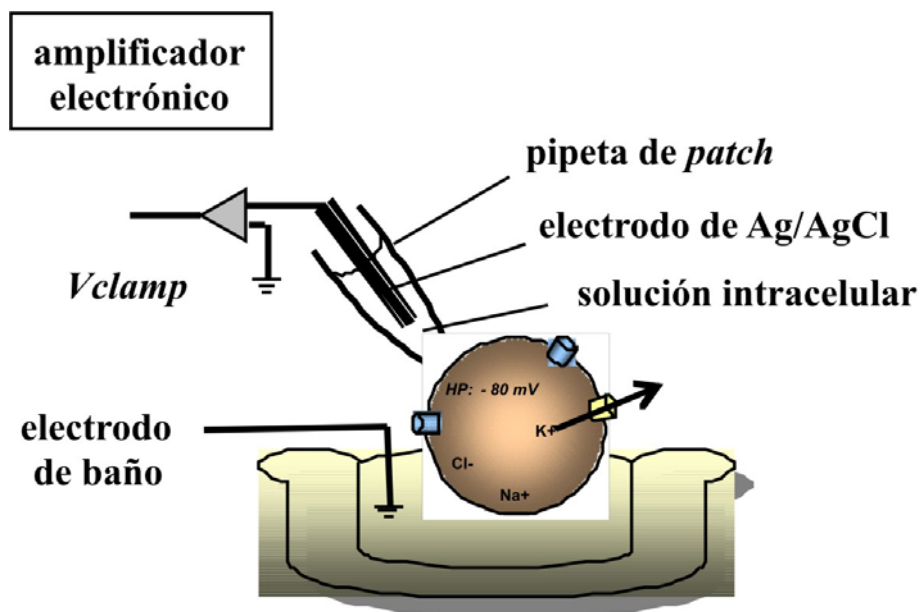


Figura 17. Técnica de *patch-clamp*. Representación esquemática de la técnica de *patch-clamp* en su modalidad de fijación de voltaje (*voltage clamp*).

Esta técnica emplea un único electrodo que simultanea a elevada frecuencia el registro de voltaje (potencial de membrana de la célula) y el registro de corriente (la inyectada para mantener fijo el potencial de membrana).

Para ejecutar la técnica se debe formar un sello de alta resistencia eléctrica entre la membrana celular y el electrodo de registro, para lo cual éste se introduce en el interior de una micropipeta de vidrio cuya punta se pule al fuego hasta poseer un diámetro de aproximadamente 1 μm (equivalente a una resistencia entre 2-5 $\text{M}\Omega$). La micropipeta se aproxima a la membrana de la célula y se presiona contra ella y mediante la aplicación de una ligera succión o presión negativa en su interior permite conseguir sellos de resistencia aún mayor, del orden de 10-100 $\text{G}\Omega$, conocidos como *giga-sellos*, que reducen el ruido del registro y evitan el flujo de corriente entre la pipeta y el baño, por lo que se puede fijar el potencial del parche de membrana. Se adquiere así la configuración de parche *in situ* (*cell attached*). Estos sellos son además mecánicamente muy estables, por lo que permiten diversas manipulaciones mecánicas que originarán las distintas configuraciones de la técnica (parche *in situ*, célula entera, parche escindido dentro-fuera, parche escindido fuera-dentro).

Para el estudio de las corrientes en el caso de las células cromafines bovinas se utilizó una variación de la configuración de célula entera que es el llamado “parche perforado”, mientras que la configuración que se utilizó para el estudio de las corrientes postsinápticas espontáneas y las corrientes nicotínicas en neuronas de hipocampo es la de “célula entera”. En ambos casos se pueden registrar las corrientes que fluyen a través de todos los canales y/o receptores abiertos de la membrana celular. La configuración de parche perforado (Korn y Horn, 1989; Gillis *et al.*, 1991) es una variación de la configuración de célula entera que se obtiene por inclusión de un antifúngico (anfotericina B) en la solución del interior de la pipeta de *patch*; los antifúngicos formarán poros en el parche de membrana que queda atrapado bajo la punta de la pipeta y permitirán así el acceso eléctrico al interior celular.

Para conseguir esta configuración (Figura 18) se parte de la configuración de célula adherida y se espera a que el antifúngico forme los poros en la membrana sin aplicar succión alguna. Los antifúngicos forman canales en las membranas celulares que contienen colesterol o ergosterol que van a ser permeables a cationes monovalentes y a Cl^- (hasta nueve veces más permeables a cationes monovalentes que a Cl^-) e

impermeables a iones multivalentes como el Ca^{2+} o el Mg^{2+} y a moléculas no electrolíticas de tamaño igual o superior al de la glucosa.

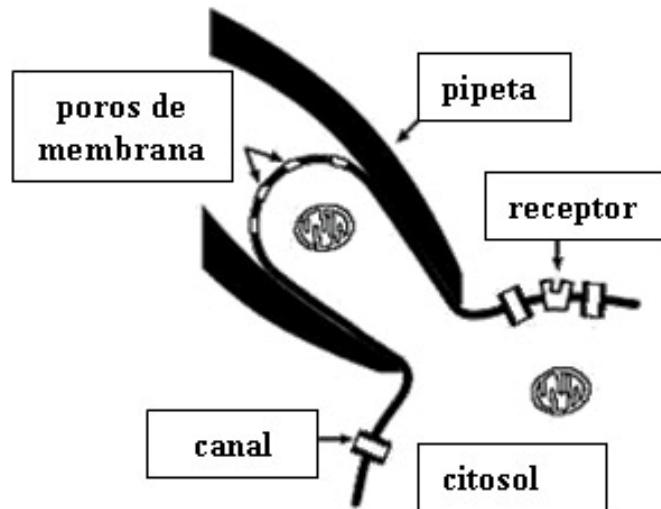


Figura 18. *Patch-clamp, configuración de parche perforado.* Esquema de la obtención de la configuración de parche perforado.

Con respecto a la configuración de célula entera, la configuración de parche perforado presenta la desventaja de no permitir el control de la composición intracelular por parte del investigador; pero la ventaja de que resulta menos invasiva para la célula (se evita la succión para romper el parche de membrana), por lo que el sello y la resistencia de acceso al interior celular son mucho más estables. El parche perforado permite obtener registros de hasta 1 h de duración en una misma célula. Además, esta configuración resulta de especial utilidad para estudiar procesos celulares que sean dependientes de componentes intracelulares pues éstos no sufren un proceso de “lavado” o diálisis.

En todos los experimentos, las células se colocaron en una pequeña cámara de metacrilato situada en la plataforma de un microscopio invertido Nikon Eclipse T2000. Una vez en la placa, las células se profundieron con una solución de Tyrode control, con un flujo basal de 1-2 ml/min.

Los registros electrofisiológicos se realizaron a temperatura ambiente ($22\pm 2^\circ\text{C}$) con las pipetas de patch montadas sobre el preamplificador de un amplificador de *patch-*

clamp EPC-10 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemania), que permite la supresión de los transitorios capacitivos y la compensación electrónica de las resistencias en serie.

Para la estimulación celular y la adquisición de datos se empleó el programa PULSE (HEKA Elektronik) y un ordenador PC. Los registros se adquirieron con una frecuencia de muestreo de 5-10 kHz y se filtraron a 1-2 kHz. Los registros con una corriente de fuga superior a 100 pA, en el caso de células de hipocampo, o 30 pA, en la célula cromafín se descartaron. También se descartaron aquellas células en las que la resistencia de acceso del transitorio capacitivo alcanzaba valores $> 20 \text{ M}\Omega$.

Las pipetas de registro empleadas se fabricaron a partir de capilares de vidrio de borosilicato con ayuda de un estirador vertical de vidrio (PP-830, Narishige, Tokio, Japón) en dos pasos, puliéndose posteriormente la punta con ayuda de una microforja (MF-830, Narishige) hasta alcanzar un diámetro de aproximadamente $1 \mu\text{m}$ y una resistencia de 2-5 $\text{M}\Omega$ una vez rellenas con la correspondiente solución intracelular.

Las soluciones extracelulares que superfunden a las células se intercambiaron mediante un sistema de válvulas excluyentes controladas electrónicamente, acopladas a una pipeta de perfusión cuya punta se posicionaba a menos de $100 \mu\text{m}$ de la célula en experimentación. La velocidad de este sistema de perfusión es consecuencia de la presión por gravedad ejercida sobre el líquido, siendo de aproximadamente 1 ml/min , permitiendo el completo recambio de las soluciones experimentales en unos 50 ms.

El análisis de las corrientes se llevó a cabo mediante los programas MiniAnalysis (Synaptosoft, Leonia, NJ), IgorPro (Wavemetrics Inc., Oregon, USA) y PULSE.

4.- Medida de la exocitosis mediante el estudio de la variación de la capacidad eléctrica de la membrana celular (ΔC_m)

La medida de la capacidad eléctrica de la membrana celular nos proporciona de forma indirecta la medida de la secreción debido a la propiedad de la membrana de actuar como un condensador. De esta forma podemos registrar cambios en el tamaño de la superficie celular al producirse la exocitosis, ya que la membrana de las vesículas pasa a formar parte de la membrana plasmática, lo que conlleva un incremento en la superficie de la misma.

Para estimar estos cambios, utilizamos la técnica desarrollada por Lindau y Neher (Lindau y Neher, 1988), basada en la aplicación de una onda sinusoidal de voltaje a la membrana celular, para lo que utilizamos también el amplificador de *patch clamp*, lo que además nos va a permitir simultanear el registro de los cambios de capacidad con los registros de corrientes iónicas (Figura 19).

En los experimentos presentados en esta Tesis Doctoral hemos utilizado un protocolo experimental en el que se registraba la capacidad de la membrana antes de aplicar el protocolo despolarizante y/o el pulso con agonistas nicotínicos y durante 8 s después de la aplicación del pulso despolarizante.

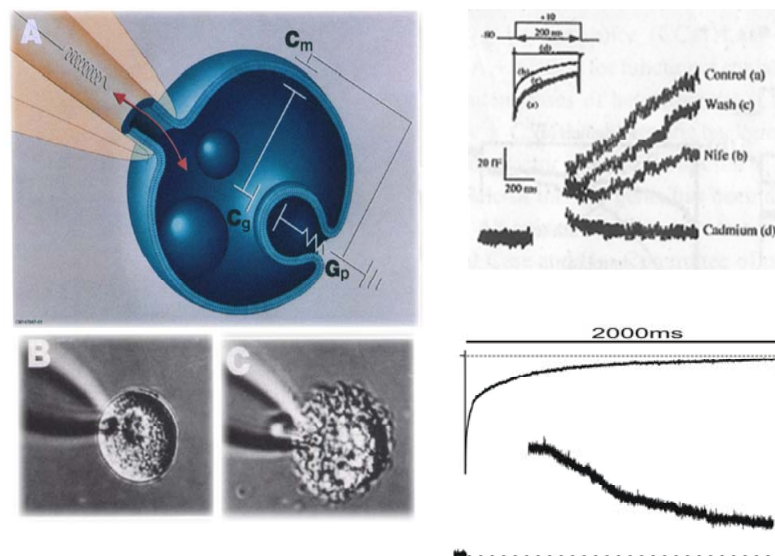


Figura 19. Técnica de registro de la capacidad de la membrana celular como una medida de la exocitosis. El panel A muestra la representación esquemática del comportamiento de la membrana celular como un condensador eléctrico. Los paneles B y C muestran el aspecto de un mastocito de rata antes (B) y después (C) de producirse la exocitosis masiva de histamina. Los paneles de la derecha muestran registros originales del incremento de la capacidad de la membrana en respuestas a pulsos despolarizantes de distinta duración (50-2000 ms). Adaptado de Monck y Fernández (1992).

5.- Medida de la exocitosis con técnicas amperométricas

Las técnicas amperométricas también nos permiten la detección y/o cuantificación de la liberación por exocitosis de determinados neurotransmisores contenidos en las vesículas secretoras y que se caracterizan por su capacidad para

oxidarse rápidamente al ser expuestos a un determinado campo eléctrico, como sería el caso de la adrenalina, noradrenalina, dopamina y serotonina, entre otros.

En nuestro caso, el proceso de oxidación de las catecolaminas se produce al entrar en contacto éstas con una fibra de carbono a la que se aplica un potencial de +700 mV. La fibra de carbono se situará muy próxima a la célula (Figura 20), con lo que al producirse un proceso exocitótico por el que una o varias vesículas liberan su contenido al exterior celular, las catecolaminas liberadas se pondrán en contacto con el electrodo oxidándose rápidamente, lo que será registrado como una corriente de oxidación (Zhou y Mislser, 1996).

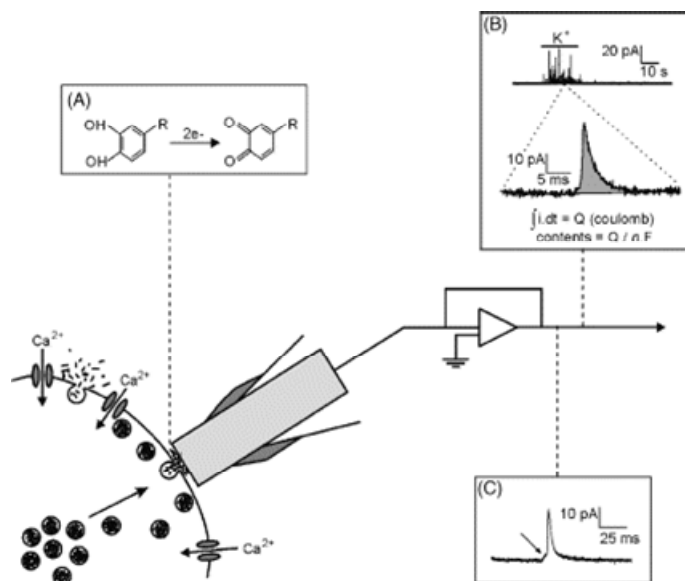


Figura 20. Técnica de registro amperométrico como medida de la exocitosis. La exposición de las catecolaminas liberadas por la célula a un campo eléctrico de +650 mV favorece la oxidación de éstas, liberándose 2 electrones que serán registrados por el amplificador de *patch* en forma de corriente de oxidación.

6.-Inmunotransferencia (“western-blot”)

Los experimentos de inmunotransferencia se llevaron a partir de neuronas de hipocampo de diferentes días en cultivo. Para obtener las proteínas de membrana, las neuronas se lisaron en frío, en 5 volúmenes de tampón de lisis u homogeneización RIPA conteniendo (en mM): 50 Tris-HCl, 150 NaCl, 1 EDTA, 1% Triton-x100, 1% deoxicolato sódico, 0.1% SDS (pH 7.4), conteniendo además 1 mM de dithiothreitol y

un cóctel de inhibidores de proteasas (complete Mini, Roche) para evitar la degradación proteica. Para estimar la concentración proteica en los extractos se utilizó un kit comercial (BCA Protein Assay; Pierce).

Una vez determinada la concentración proteica en cada muestra, se procedió a separar (por tamaño) las proteínas presentes en las muestras mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE). Posteriormente se electrotransfirió el gel a una membrana de poli fluoruro de vinilideno (PVDF). Posteriormente para detectar la presencia de subunidades $\alpha 7$ del nAChR en nuestras muestras, se incubó la membrana con anticuerpo frente dicha proteína (mAb306; 1:3000) y después se incubaron con el anticuerpo secundario (anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano; dilución 1:15.000). Como control de carga se utilizó el marcaje con anticuerpos para β -actina (1:10000).

Más tarde las membranas, se incubaron con la solución de revelado “ECL Plus” (Amersham, Uppsala, Sweden). Para el análisis densitométrico de las bandas se utilizó el programa informático Imagen (software libre proporcionado por los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los EE.UU.).

7.-Soluciones experimentales empleadas

7.1.-Registros en células cromafines bovinas

Para la superfusión de las células en el caso de los registros realizados en células cromafines bovinas se empleó una solución de Tyrode con la siguiente composición (en mM): 137 NaCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES (pH 7.2). En el apartado de Resultados se describen las posibles variaciones de la composición de esta solución extracelular en función del protocolo experimental aplicado.

La solución intracelular que se empleó en los experimentos realizados en la configuración de parche perforado contenía (en mM): 135 CsGlutamato, 10 HEPES, 9 NaCl, (pH 7.2); a la que se le añadió, con el fin de obtener la configuración de parche perforado, anfotericina B (0,5 mg/ml).

La anfotericina se añadía a partir de una solución madre de anfotericina B que se preparaba nueva en el día en dimetilsulfóxido (DMSO), a la concentración de 50 mg/ml, sonicándola hasta su completa solubilización protegida de la luz. La concentración final

de anfotericina se obtenía añadiendo 10 μ l de esta solución madre a 1 ml de solución intracelular y sonicándola también protegida de la luz y del calentamiento hasta su completa homogenización; esta solución se mantenía en frío, se agitaba con frecuencia con vortex para evitar la adhesión del antifúngico a las paredes del recipiente contenedor (una jeringa) y se empleaba en el plazo de unas 3 h para asegurar que no se hubiese perdido la actividad del antifúngico.

Las pipetas de registro se sumergían brevemente (unos segundos) por la punta en solución intracelular sin anfotericina y a continuación se rellenaban por detrás con solución intracelular con anfotericina. De este modo se podía conseguir la configuración de célula adherida antes de que el antifúngico hubiese difundido hacia la punta de la pipeta para empezar a formar los poros en la membrana (esto dificultaría la obtención del sello). El proceso de perforación (hasta alcanzar una resistencia en serie $<20 \text{ M}\Omega$) tardaba unos 5-15 min.

7.2.-Registros en neuronas de hipocampo de rata

En el caso de los cultivos de neuronas de hipocampo de rata se registraron las corrientes postsinápticas (excitadoras y/o inhibitoras) mediante la superfusión del cultivo de hipocampo con una solución de Tyrode, cuya composición fue (en mM): 150 NaCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 Glucosa, 4 KCl, 10 HEPES (pH 7,4).

En los experimentos orientados a caracterizar la naturaleza glutamatérgica o GABAérgica de las corrientes postsinápticas, se añadió a la solución de Tyrode ácido kinurénico (1 mM; que actúa como antagonista inespecífico de los receptores para el glutamato) o bicuculina (40 μ M; antagonista del receptor para el GABA).

En los experimentos orientados a caracterizar la localización presináptica o postsináptica del receptor nicotínico, las células se superfundieron con tetrodotoxina (5 μ M), a fin de bloquear la generación y propagación de los potenciales de acción espontáneos en el caso de la activación de receptores presinápticos.

La solución intracelular empleada para registrar las corrientes sinápticas en cultivos de hipocampo contenía (en mM): 90 CsCl, 20 TEA.Cl, 10 EGTA, 10 Glucosa, 1 MgCl₂, 4 ATP, 0,5 GTP, 20 HEPES/CsOH (pH 7,3). Para registrar las corrientes nicotínicas, las células se dializaron con una solución intracelular cuyo contenido fue

(en mM): 10 NaCl, 100 ClCs, 20 TEA.Cl, 5 Mg.ATP, 0.3 Na.GTP, 14 EGTA, 20 HEPES/CsOH (pH 7,3).

7.3.-Ligandos nicotínicos

En el desarrollo experimental de esta Tesis Doctoral hemos empleado mayoritariamente acetilcolina, el ligando fisiológico de los receptores nicotínicos neuronales y, en los experimentos orientados a caracterizar la implicación de los receptores del subtipo $\alpha 7$ en la comunicación interneuronal a nivel del hipocampo, recurrimos a un ligando selectivo para este subtipo de receptor nicotínico, la colina (Alkondon *et al.*, 1997b; Alkondon *et al.*, 1999). Con este mismo objetivo hemos utilizado un clásico modulador alostérico de los receptores $\alpha 7$, el 5-hidroxi-indol (Zwart *et al.*, 2002).

Finalmente, una vez tipificado el modelo experimental del cultivo de neuronas de hipocampo como un buen modelo para estudiar el efecto de nuevos ligandos sobre la neurotransmisión GABAérgica inhibitoria a nivel del SNC, hemos caracterizado en este modelo el efecto de nuevos moduladores alostéricos del receptor $\alpha 7$, en el marco de una colaboración científica con los laboratorios Johnson & Johnson (Beerse, Bélgica).

8.-Análisis estadístico de los resultados

A lo largo de la descripción de los resultados éstos se han representado generalmente como la media \pm EE del número de datos obtenidos, habiéndose utilizado siempre células de al menos 3 cultivos.

En los estudios realizados en células cromafines bovinas, para la comparación de las medias de diferentes grupos de datos se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, seguido de un test de Tukey. Se consideró un valor de p menor de 0.05 como límite para considerar una diferencia significativa.

En los estudios realizados con neuronas de hipocampo se utilizó el test de la t de Student para determinar las diferencias estadísticas entre grupos. Igualmente se consideró el valor de $p < 0,05$ como el límite para considerar una diferencia significativa.

RESULTADOS

1.- MODULACIÓN POR ACETILCOLINA DE LA LIBERACIÓN DE CATECOLAMINAS POR CELULAS CROMAFINES BOVINAS

Los experimentos de liberación de catecolaminas se han llevado a cabo en CCB de 3-4 días en cultivo, que han sido estimuladas para secretar mediante la aplicación de un pulso despolarizante cuadrado (PD), generalmente a 0 mV, de 100 ms de duración, cuantificándose la secreción mediante la medida de los cambios de la capacidad de la membrana (ΔC_m). En estos experimentos, el potencial de membrana (HP) de las CCB se fijó en un valor de -80 mV. Estas condiciones experimentales nos van a permitir realizar experimentos de larga duración en los que podemos aplicar de forma repetida (a intervalos de 5 min) los pulsos despolarizantes (Figura 21), con lo que podremos registrar la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV y los consiguientes incrementos en la capacidad de la membrana (Rosa *et al.*, 2007), en condiciones control y en presencia de posibles moduladores de la secreción, en nuestro caso, el efecto modulador de la ACh, que se induce mediante la aplicación de un pulso de 100 μM de ACh de 10 s de duración.

La figura 21 muestra un experimento representativo de este tipo de protocolo. El panel **A** muestra un ejemplo de corriente de entrada producido por la aplicación de un pulso despolarizante (PD) (100 ms a 0 mV), como se indica en el esquema de la parte superior. Como puede apreciarse, el registro se caracteriza por mostrar un componente inicial, rápidamente inactivante, que correspondería a la entrada de Na^+ (I_{Na}), seguido de un componente con una inactivación más lenta, correspondiente a la entrada de Ca^{2+} (I_{Ca}). El panel **B** muestra un ejemplo de registro del ΔC_m producido por la I_{Ca} del panel A. Se observa una ligera endocitosis durante los 8 s de registro. El panel **C** muestra los resultados cuantitativos del pico de I_{Ca} (pA), el área de I_{Ca} (Q_{Ca} ; pC), y pico de la ΔC_m (fF) (medias \pm EE de 83 PD, aplicados a 58 células de 20 cultivos diferentes). El panel **D** muestra el registro de corriente de entrada producido por la aplicación de 100 μM de ACh durante 10 s (I_{ACh}), que muestra una rápida inactivación inicial seguida de un componente inactivante más lento. El panel **E** muestra el ΔC_m medido desde la basal, anterior al pulso de ACh (E1), hasta 2 s después del final del pulso (E2). El panel **F** muestra la media de los resultados del pico de I_{ACh} (pA), el área de la I_{ACh} (Q_{ACh}), y el ΔC_m (fF); los datos son la media \pm EE de 67 pulsos de ACh aplicados en 49 células de 15 cultivos diferentes.

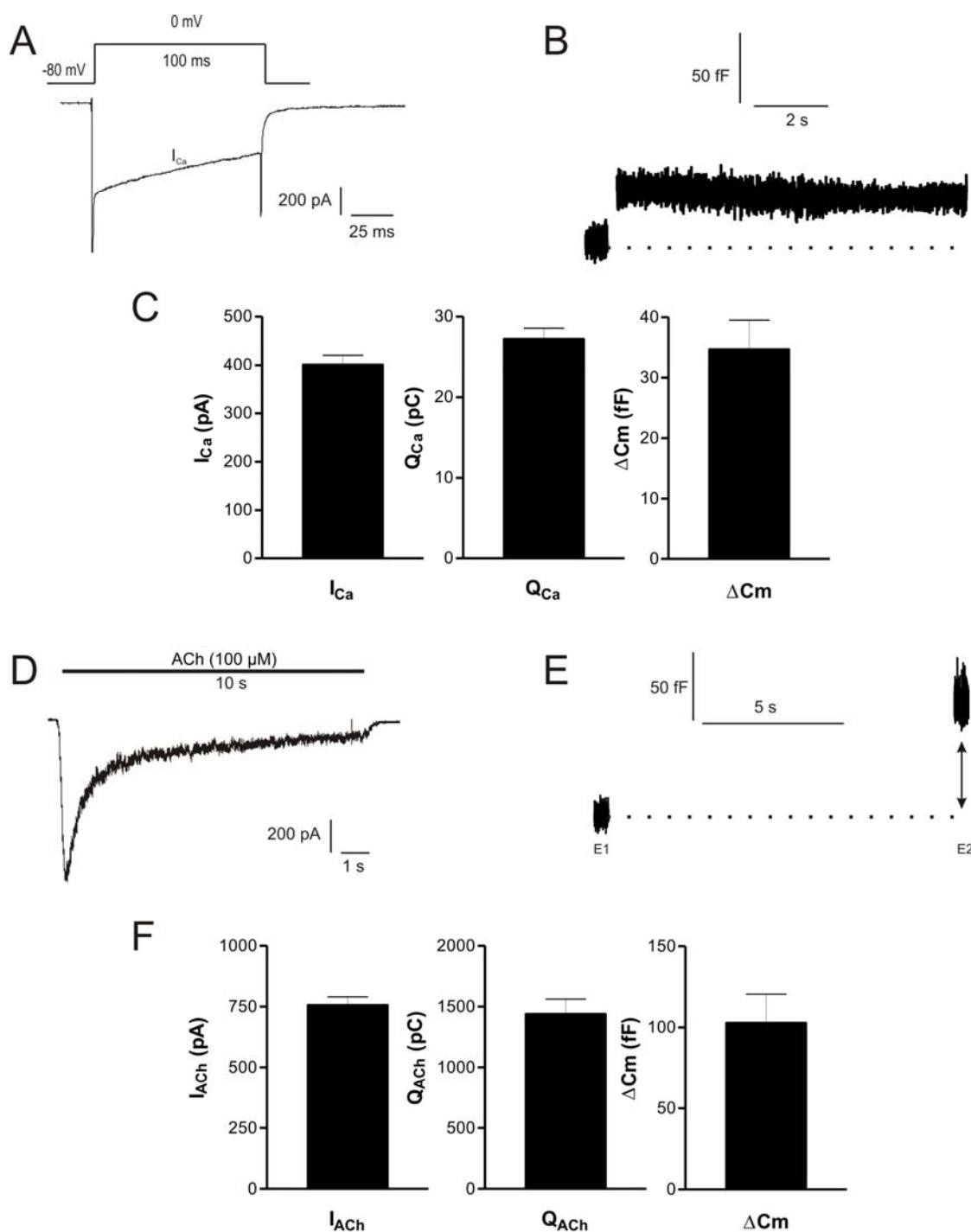


Figura 21. Corrientes de entrada e incrementos en la capacidad de la membrana (ΔC_m) producidos por pulsos despolarizantes (PDs) o por la aplicación de pulsos largos de ACh en células cromafines bovinas. El panel *A* muestra un ejemplo de corriente de entrada de Ca^{2+} (I_{Ca}) producido por un PD control de 100 ms a 0 mV. El panel *B* muestra un ejemplo de registro del ΔC_m producido por la I_{Ca} del panel *A*. El panel *C* muestra los resultados cuantitativos del pico de I_{Ca} (pA), el área de I_{Ca} (Q_{Ca} , pC), y pico de la ΔC_m (fF) (medias \pm EE de 83 PD obtenidos de 58 células de 20 cultivos diferentes). El panel *D* muestra el registro de corriente de entrada producido por la aplicación de 100 μ M de ACh durante 10 s. El panel *E* muestra el ΔC_m producido por el pulso de ACh. El panel *F* muestra la media de los resultados del pico de I_{ACh} (pA), el área (Q_{ACh}), y el ΔC_m (fF); los datos son la media \pm EE de 67 pulsos de ACh realizados en 49 células de 15 cultivos diferentes.

1.1.-La acetilcolina modula la I_{Ca} y la secreción de catecolaminas

Para valorar el posible efecto modulador de la ACh sobre la I_{Ca} y sobre la secreción de catecolaminas (ΔC_m), diseñamos un protocolo experimental consistente en la aplicación de dos PD a 0 mV, de 100 ms de duración (PD1 y PD2), aplicados a intervalos de 5 min. En las células en las que se estudió el posible efecto modulador del agonista nicotínico se aplicó un pulso de 10 s de ACh (100 μ M) desde 12,5 s antes de la aplicación del segundo pulso despolarizante (PD2) (Figura 22). En algunos casos se aplicó un tercer pulso despolarizante (PD3), 5 min después del PD2, para valorar el grado de recuperación de los efectos producidos por el prepulso de ACh sobre el PD2.

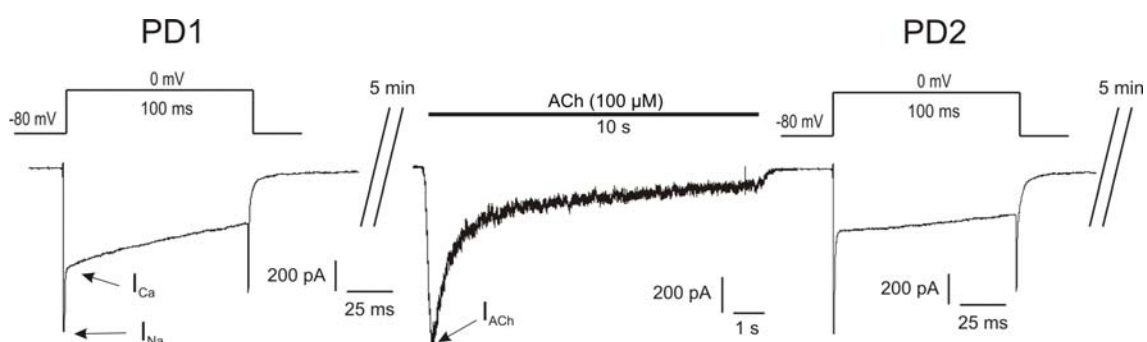


Figura 22. Protocolo de estimulación aplicado a las células cromafines bovinas para valorar el posible efecto modulador de la ACh.

La figura 23 muestra los efectos producidos por el prepulso de ACh sobre la I_{Ca} y el ΔC_m producido por los PD. Como puede apreciarse, el prepulso de ACh reduce la magnitud de la I_{Ca} producida por el PD2 y reduce su inactivación (Figura 23B). La I_{Ca} recuperó los valores iniciales en el PD3, lo que indica que el efecto modulador producido por la ACh tiene un carácter reversible. En la figura 23C se muestran los cambios en la medida de la capacidad producidos por los tres PDs. Los PD1 y PD3 producen un incremento similar en la medida de la capacidad de la membrana, con una pequeña endocitosis a lo largo de los 8 s de registro. El PD2, precedido del prepulso de ACh, produjo un mayor incremento en la ΔC_m , que fue seguido de una mayor endocitosis.

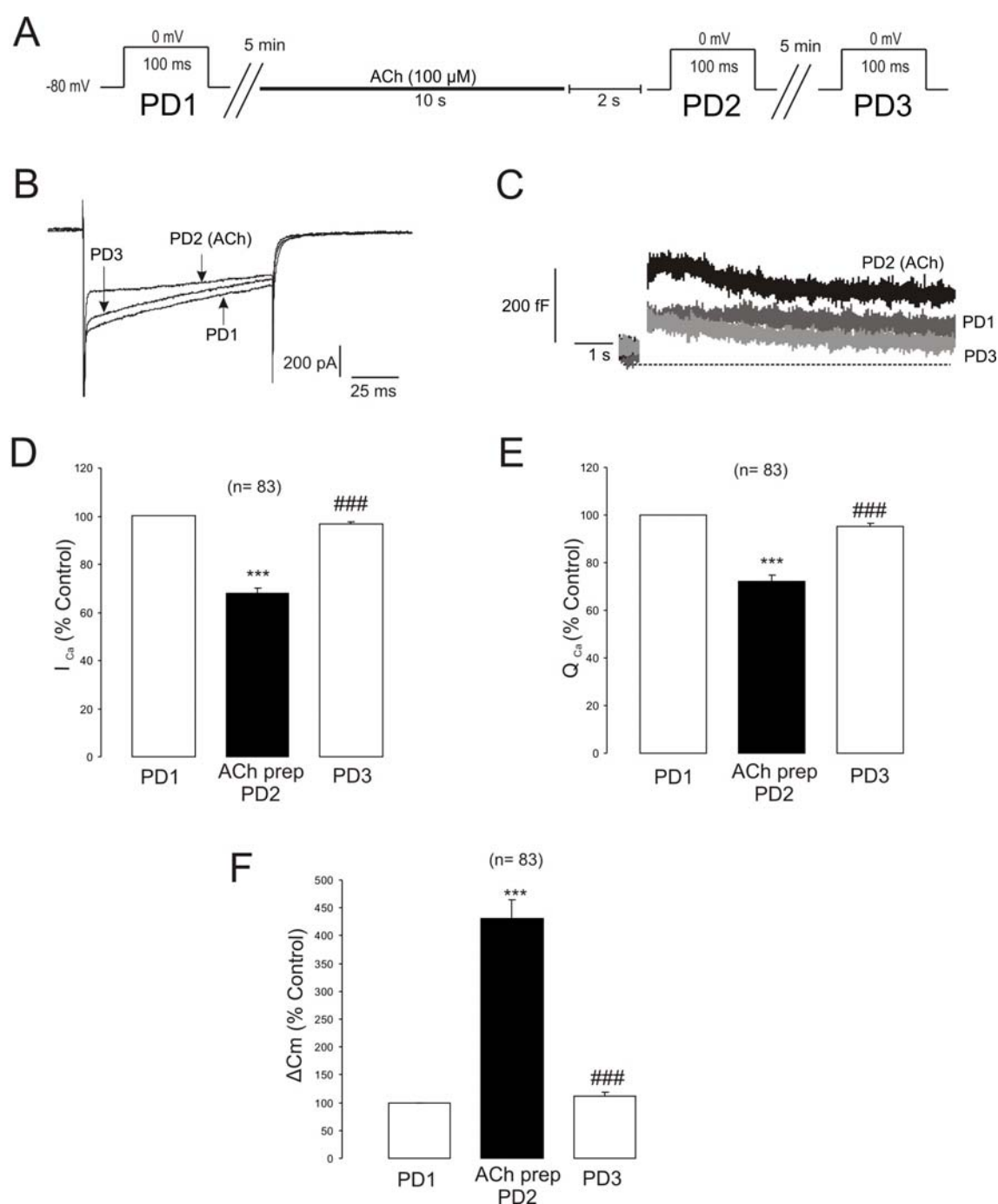


Figura 23. Un prepulso de ACh produjo una ligera reducción de la I_{Ca} y la Q_{Ca} pero aumentó drásticamente la ΔC_m , producida por el PD. El panel **A** muestra el protocolo experimental consistente en la aplicación de tres PD (desde -80 mV hasta 0 mV, durante 100 ms) a intervalos de 5 min en la misma célula. El PD2 estuvo precedido de un prepulso de ACh (100 μ M, 10 s). El panel **B** muestra los registros de la I_{Ca} producidas por PD1, PD2 y PD3. Se observa la inhibición del pico de I_{Ca} producido por el prepulso de ACh antes del PD2, y el enlentecimiento en la inactivación de dicha corriente. Además se observa la reversibilidad del efecto de ACh (PD3). El panel **C** muestra los ΔC_m registrados después de los tres PDs. Los paneles **D-F** muestran los datos medios normalizados (% con respecto a los valores obtenidos en PD1 para cada una de las células) del pico de I_{Ca} , Q_{Ca} y la ΔC_m , respectivamente. Los datos son las medias \pm EE de 83 protocolos aplicados en 58 células de 20 cultivos diferentes. *** $p < 0.001$ con respecto a PD1; ### $p < 0.001$ con respecto a PD2 utilizando el análisis estadístico ANOVA.

Los datos normalizados (calculados como %PD1, para cada célula) muestran que el prepulso de ACh bloqueó la I_{Ca} (Figura 23D) y la Q_{Ca} (Figura 23E) aproximadamente un 30%; siendo este efecto reversible, como indica la recuperación observada en el PD3 en ambos parámetros. Por el contrario, el prepulso de ACh aumentó el ΔC_m unas 4,5 veces (Figura 23F); dicho incremento también es reversible, ya que la respuesta exocitótica en el pulso 3 recuperó los valores del PD1 (Figuras 23C y 23F).

En este punto quisiéramos destacar que si bien el ΔC_m es un indicador indirecto de la exocitosis de catecolaminas, este parámetro no aporta información directa sobre las catecolaminas almacenadas en las vesículas y que se liberan al espacio extracelular durante la exocitosis. Por otro lado, esta metodología experimental presenta el inconveniente de que durante la aplicación del pulso de ACh no es posible medir de forma continua los cambios de la capacidad de la membrana, ya que para poder registrar la corriente de entrada inducida por la ACh es necesario fijar el voltaje de la preparación a -80 mV, siendo incompatible con la aplicación de la onda sinusoidal de voltaje necesaria para la medida de los cambios de capacidad. Ante esta situación, decidimos medir simultáneamente la corriente de entrada a través de los receptores nicotínicos, la liberación cuantál de catecolaminas mediante el uso de técnicas amperométricas con un microelectrodo de carbono y los ΔC_m después de aplicar la ACh y los PD.

Estos últimos experimentos se muestran en la figura 24. Como puede apreciarse, la aplicación del PD1 indujo una I_{Ca} de unos 400 pA (panel A) que produjo un ΔC_m de 42 fF (panel B; 33 ± 4 fF, media de 4 células). De acuerdo a cálculos teóricos, la fusión de una sola vesícula cromafín con la membrana celular contribuye con un ΔC_m de unos 2,5 fF, por lo que podemos calcular que el PD1 produjo la exocitosis de unas 21 vesículas. Teniendo en cuenta la forma circular y el radio (5 μm) del microelectrodo de grafito y de la célula cromafín (10 μm), se puede calcular que la fibra de carbono está registrando tan solo lo que ocurre en el 6% de la superficie de la célula. Asumiendo que las vesículas cromafínes se liberan con igual probabilidad en cualquier lugar de la membrana, solo el 6% de las 21 vesículas secretadas, lo que correspondería a 1,26 vesículas, serían registradas por el electrodo de carbono, lo que corrobora la única espiga amperométrica detectada durante la aplicación del PD1 (Figura 24C).

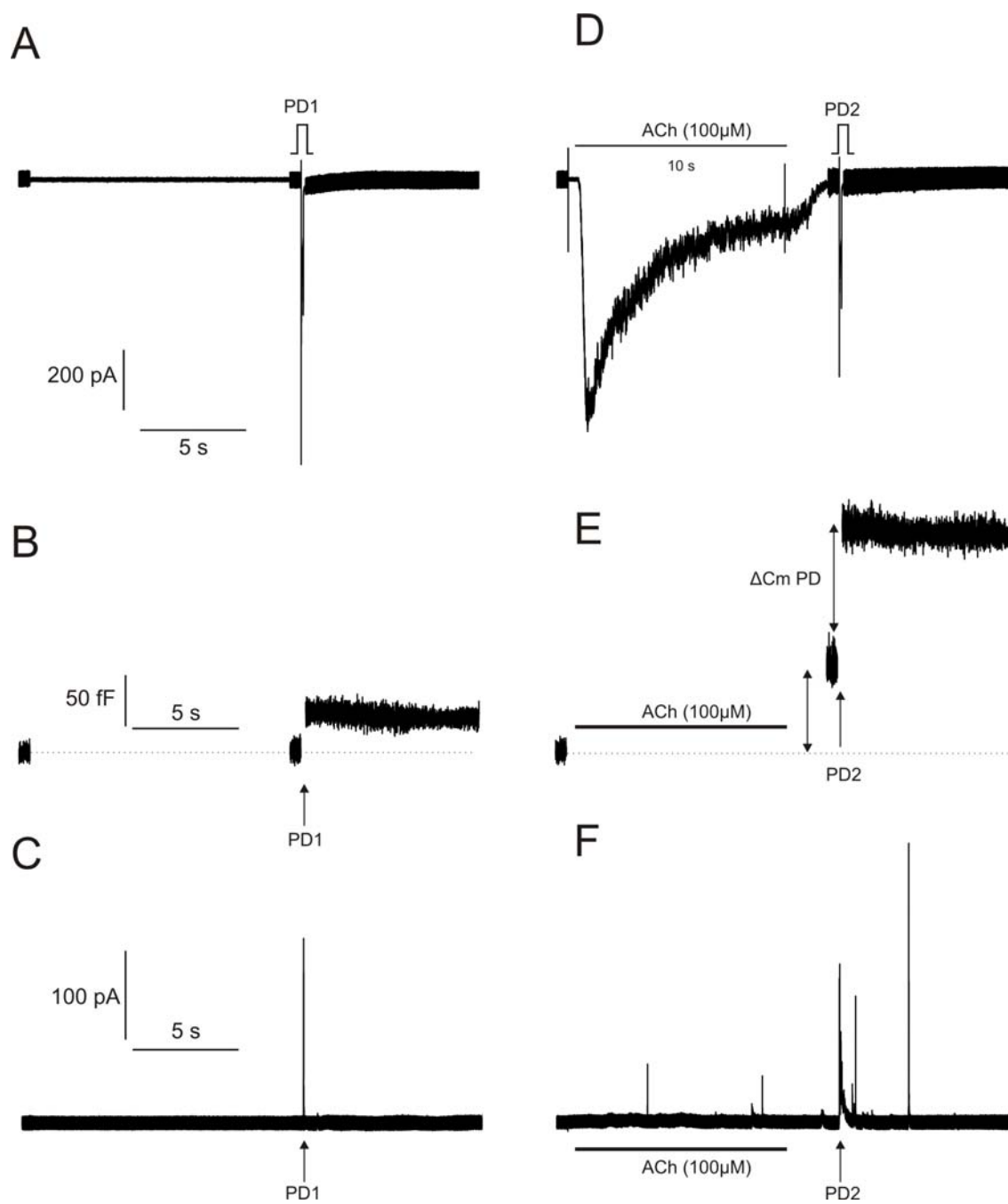


Figura 24. Un prepulso de ACh aumentó drásticamente la liberación cuantál de catecolaminas producida por el PD. Los paneles *A* y *D* muestran los registros de la I_{Ca} producida por la aplicación de dos PD (PD1 y PD2) y la I_{ACh} producida por el pulso de ACh. Los paneles *B* y *E* muestran los correspondientes ΔC_m producidos por PD1 y PD2 y por la ACh, pudiéndose observar el marcado incremento del ΔC_m durante el PD2. Los paneles *C* y *F* muestran los registros de espigas amperométricas de secreción correspondientes a la aplicación de PD1, pulso de ACh y PD2, respectivamente. Nótese el marcado incremento en el número de vesículas cromafines liberadas durante el PD2.

Durante los prepulsos de ACh (I_{ACh} trazado de Figura 24D), se puede observar un pequeño ΔC_m previo al PD2 (80 fF, en el ejemplo de la Figura 24E, indicado con la primera flecha de doble sentido) donde se registraron paralelamente varias espigas (Figura 24F). Este número de espigas coincide con las medidas realizadas previamente, esto es: la ACh produjo un ΔC_m (80 fF) que es equivalente a la liberación de unas 32 vesículas aproximadamente; como el microelectrodo de carbono solo detecta el 6% de las vesículas, son unas 2 vesículas las que se liberarían en la zona del electrodo, lo que se corresponde con las 2-3 espigas que aparecen en el registro de amperometría de la Figura 24F.

Tras el prepulso de ACh, el PD2 produjo un ΔC_m de 136 fF (Figura 24E, segunda flecha de doble sentido) al mismo tiempo que se registraban numerosas espigas amperométricas (Figura 24F, espigas sobre la flecha de PD2). Es de destacar el escaso número de eventos exocitóticos (espigas) que se registran durante los 10 s de perfusión del pulso de ACh, en comparación con la liberación que se produce durante la aplicación de los PD en un breve espacio de tiempo (100 ms), lo que sugiere que se está produciendo una liberación más rápida y mayor de catecolaminas al medio extracelular con la aplicación de los PD, en comparación con lo que ocurre con la ACh.

1.2.-Naturaleza nicotínica de la modulación por ACh

Para comprobar si los efectos del prepulso con ACh sobre las I_{Ca} , Q_{Ca} , y ΔC_m estaban asociados a la activación de receptores nicotínicos y/o de receptores muscarínicos, se realizaron experimentos similares a los descritos en el apartado anterior pero en presencia de bloqueantes selectivos de ambos subtipos de receptores para la ACh.

Cuando se aplicó el prepulso de ACh en presencia del bloqueante inespecífico de los receptores nicotínicos mecamilamina, a una concentración de 10 μM , se abolieron completamente los efectos moduladores del prepulso de ACh (Figura 25). Como puede apreciarse en la figura, el tratamiento de las células con mecamilamina abolió la I_{ACh} , lo que se acompañó de la supresión de los efectos moduladores del pulso de ACh sobre los tres parámetros estudiados (I_{Ca} , Q_{Ca} y ΔC_m).

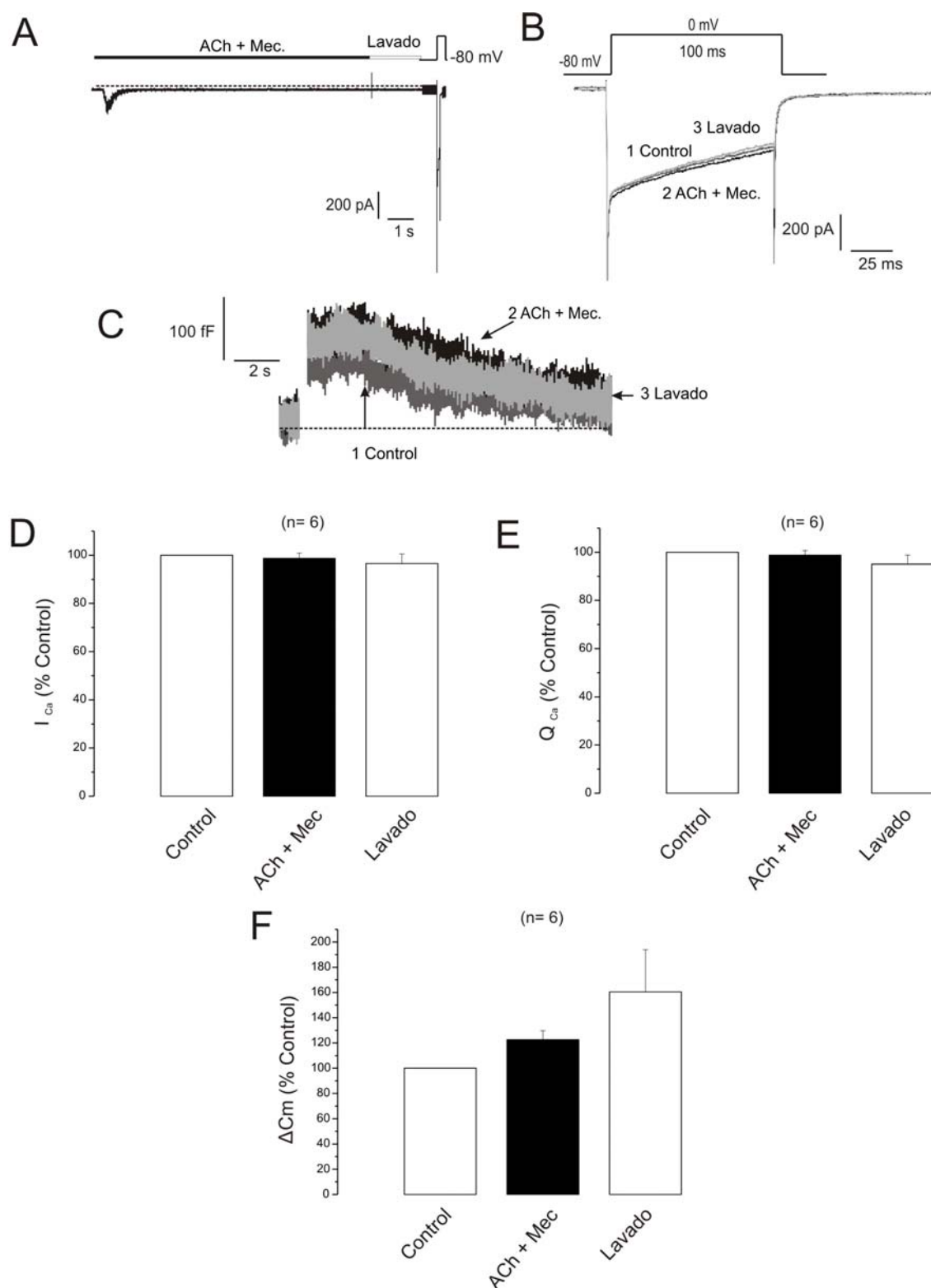


Figura 25. El bloqueante de receptores nicotínicos mecamilamina abole los efectos moduladores de la ACh sobre la I_{Ca} , la Q_{Ca} y el ΔC_m , producida por el PD. El panel *A* muestra el registro de la I_{ACh} y la I_{Ca} (correspondiente al PD2) en una célula tratada con mecamilamina (Mec; 10 μM). El panel *B* muestra la I_{Ca} (PD2) a una menor escala temporal. El panel *C* muestra los ΔC_m inducidos por la aplicación del prepulso de ACh en condiciones control y en presencia de mecamilamina. Los paneles *D-F* muestran los datos de I_{Ca} , Q_{Ca} y ΔC_m registrados en estas condiciones experimentales. Los datos corresponden a la media ± EE correspondientes a 6 células procedentes de 3 cultivos diferentes.

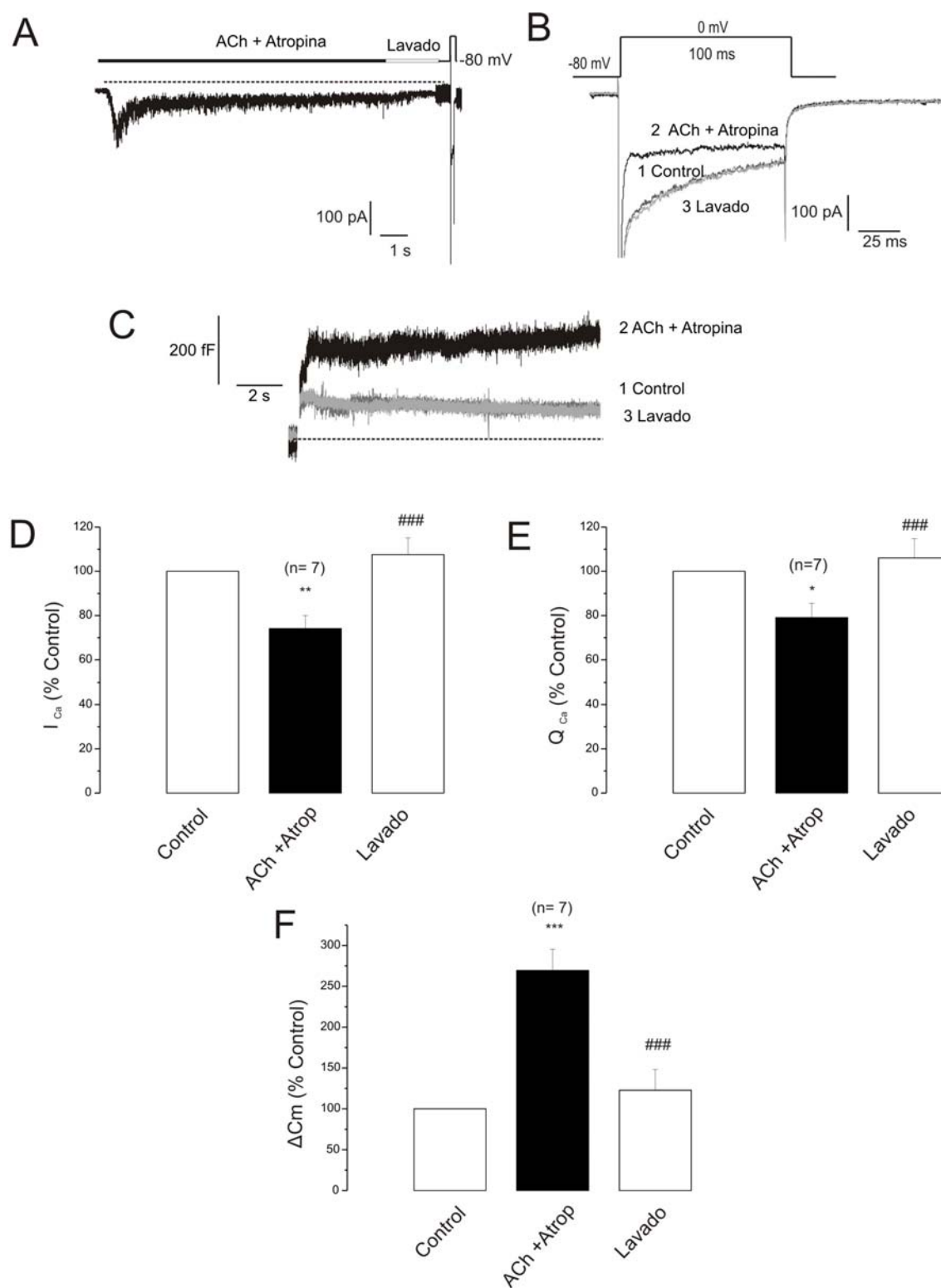


Figura 26. El bloqueante de receptores muscarínicos atropina no afecta a los efectos moduladores de la ACh sobre la I_{Ca} , la Q_{Ca} y el ΔC_m , producida por el PD. El panel **A** muestra el registro de la I_{ACh} y la I_{Ca} (correspondiente al PD2) en una célula tratada con atropina (1 μ M). El panel **B** muestra la I_{Ca} (PD2) a una menor escala temporal. El panel **C** muestra los ΔC_m inducidos por la aplicación del prepulso de ACh en condiciones control y en presencia de atropina. Los paneles **D-F** muestran los datos de I_{Ca} , Q_{Ca} y ΔC_m registrados en estas condiciones experimentales. Los datos corresponden a la media \pm EE correspondiente a 7 células procedentes de 3 cultivos diferentes.

Por el contrario, cuando se coaplicó la ACh con el antagonista de los receptores muscarínicos atropina 1 μM ($n=7$ células), no se afectó de manera significativa el efecto modulador de la ACh sobre la I_{Ca} , la Q_{Ca} y el ΔCm producidos en respuesta al PD2 (Figura 26).

1.3.-Efecto de otros agonistas del receptor nicotínico

Como una prueba adicional de la naturaleza nicotínica de la potenciación de la exocitosis de catecolaminas producida por la ACh, decidimos estudiar con este mismo protocolo experimental, los efectos de otros agonistas de los receptores nicotínicos, eligiendo para ello la nicotina, un agonista que carece de efectos sobre los receptores muscarínicos, y la oxotremorina-M, un fármaco clásicamente descrito como agonista de los receptores muscarínicos pero que en nuestro laboratorio hemos descubierto recientemente que también actúa como un agonista parcial de los receptores nicotínicos.

La figura 27 muestra los efectos de la aplicación de un prepulso de nicotina (30 μM , 10 s) sobre las corrientes de entrada de Ca^{2+} (I_{Ca} y Q_{Ca}) y sobre la secreción de catecolaminas (ΔCm). Como puede apreciarse en la figura, la pre-aplicación de nicotina produjo una pequeña reducción de la I_{Ca} y la Q_{Ca} (aproximadamente un 20%), siendo estos cambios menos manifiestos que los observados previamente al aplicar el pulso de ACh (compárense las figuras 23B y 27B). Sin embargo, el prepulso de nicotina sí que produjo una marcada potenciación de la secreción de catecolaminas, unas 2,5 veces mayor que el ΔCm producido por el prepulso con ACh (Figura 27F).

En la figura 28 se muestra un experimento similar pero aplicando un prepulso de 10 s con oxotremorina-M (300 μM). La oxotremorina-M produjo una corriente de entrada a través de receptores nicotínicos (I_{Oxo}) de menor magnitud que la producida por ACh. De forma similar a lo observado con nicotina, los cambios en los parámetros de actividad de los CCDV (I_{Ca} y Q_{Ca}) fueron menos manifiestos que la potenciación de la secreción (ΔCm).

Estos datos sugieren que la potenciación de la exocitosis producida por el PD que aparece tras la aplicación de un prepulso con ACh está vinculada a la activación de los receptores nicotínicos presentes en la membrana de la célula cromafin, estando estos efectos moduladores posiblemente relacionados con la entrada de Ca^{2+} a través de los receptores nicotínicos.

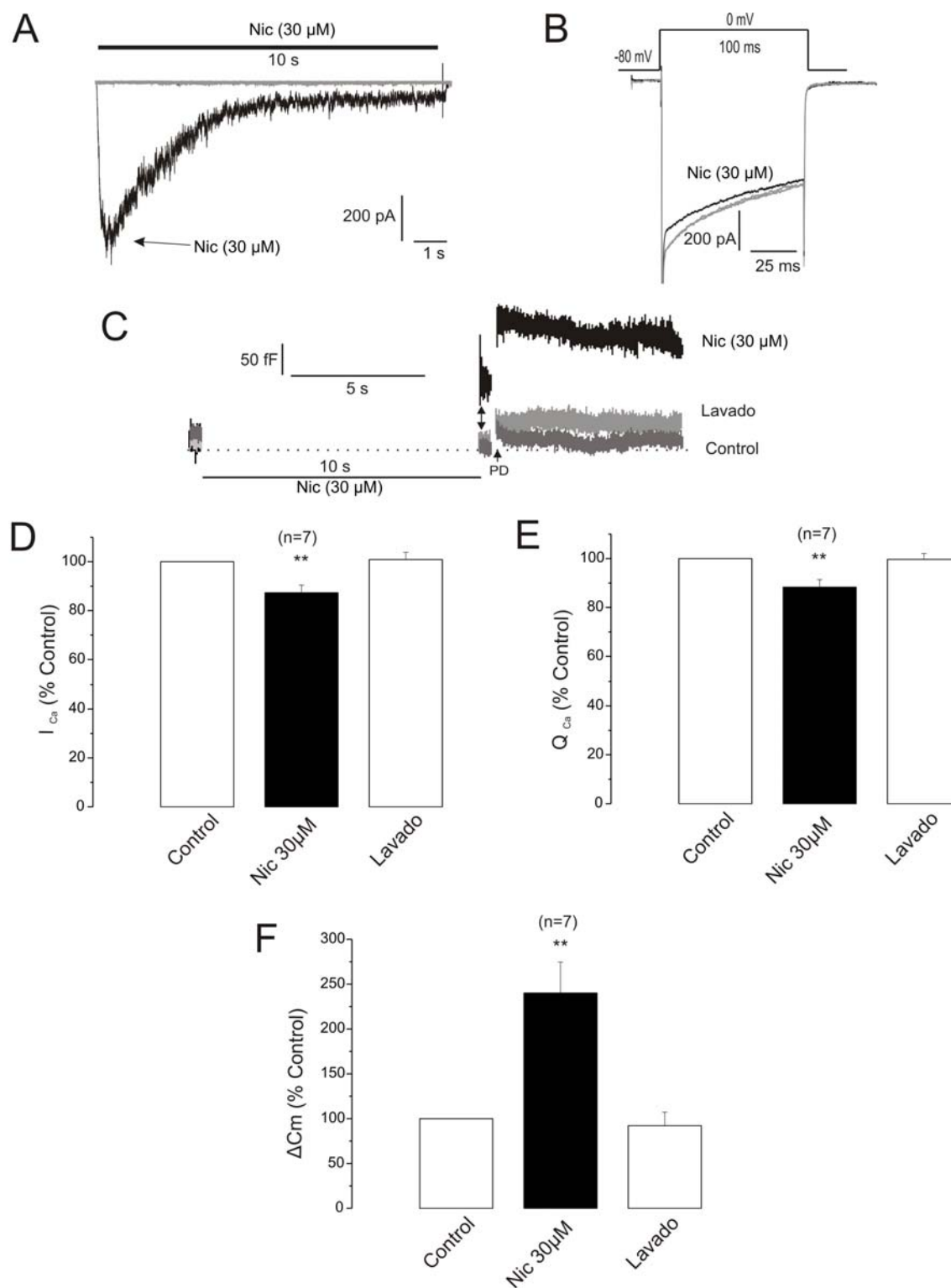


Figura 27. La nicotina, un agonista de los receptores nicotínicos, mimetiza los efectos moduladores de la ACh sobre la I_{Ca} , la Q_{Ca} y el ΔC_m , producida por el PD. El panel *A* muestra el registro de la I_{Nic} y la I_{Ca} (correspondiente al PD2) en una célula a la que se ha aplicado un pulso de nicotina (30 μ M, 10 s). El panel *B* muestra la I_{Ca} (PD2) a una menor escala temporal. El panel *C* muestra los ΔC_m inducidos por la aplicación del prepulso de nicotina (Nic). Los paneles *D-F* muestran los datos de I_{Ca} , Q_{Ca} y ΔC_m registrados en estas condiciones experimentales. Los datos corresponden a la media \pm EE correspondiente a 7 células procedentes de 3 cultivos diferentes.

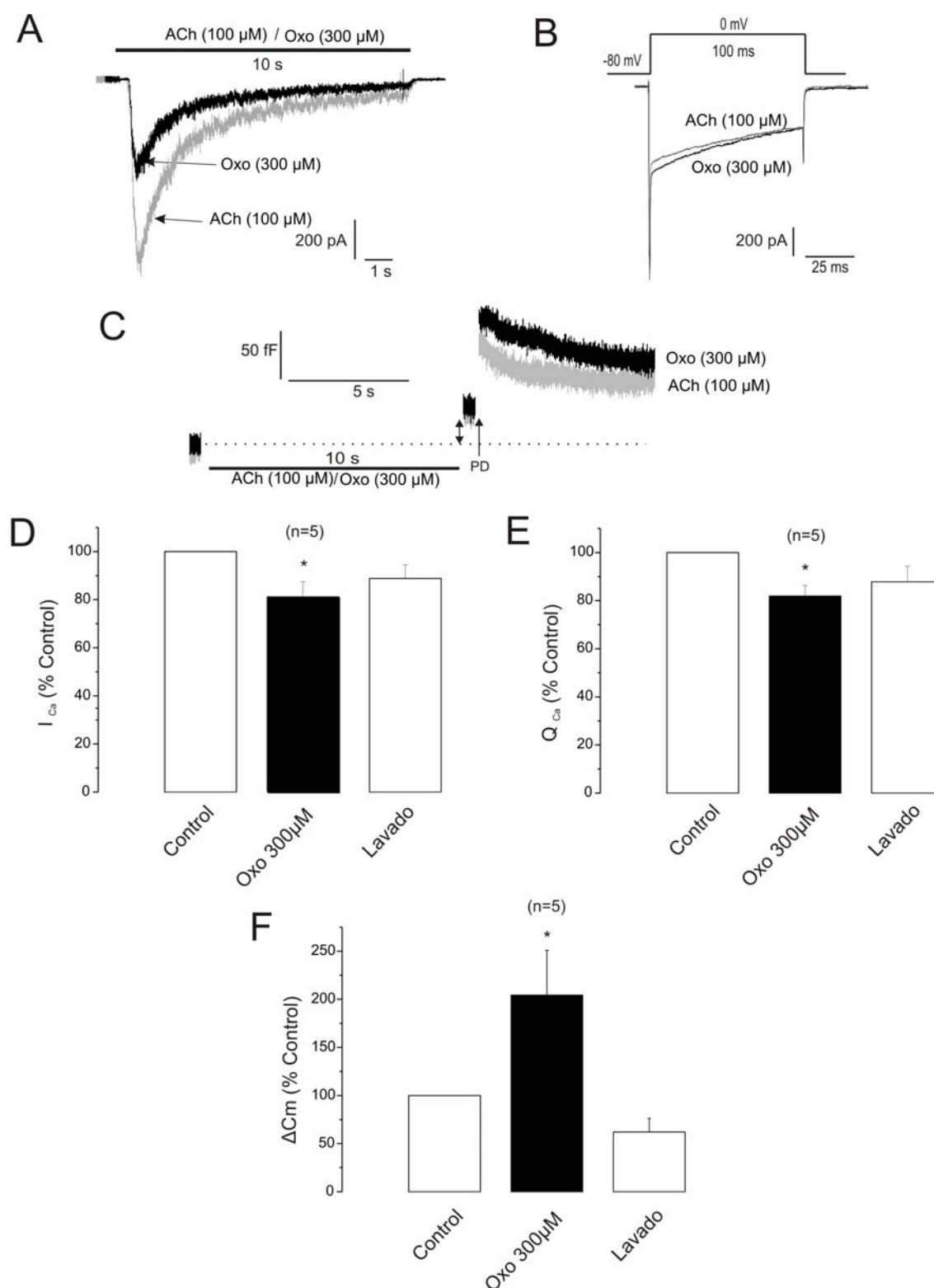


Figura 28. La oxotremorina-M mimetiza los efectos moduladores de la ACh sobre la I_{Ca} , la Q_{Ca} y el ΔC_m , producida por el PD. El panel **A** muestra el registro de la I_{Oxo} y la I_{Ca} (correspondiente al PD2) en una célula a la que se ha aplicado un pulso de oxotremorina-M (300 μ M, 10 s). El panel **B** muestra la I_{Ca} (PD2) a una menor escala temporal. El panel **C** muestra los ΔC_m inducidos por la aplicación del prepulso de oxotremorina-M (Oxo). Los paneles **D-F** muestran los datos de I_{Ca} , Q_{Ca} y ΔC_m registrados en estas condiciones experimentales. Los datos corresponden a la media \pm EE correspondiente a 5 células procedentes de 3 cultivos diferentes.

1.4.-La potenciación de la secreción inducida por ACh es dependiente de calcio

Se ha descrito que aproximadamente el 97,5% de la corriente total de entrada a través de receptores nicotínicos producida por la aplicación de pulsos de ACh en células cromafines bovinas con el potencial de membrana fijado en -80 mV corresponde a la entrada de Na^+ , y tan solo un 2,5% del total de la corriente correspondería a entrada de Ca^{2+} (Zhou y Neher, 1993), estimándose que esta entrada de Ca^{2+} puede llegar a generar pequeños incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ del orden de 50 nM.

A nivel del subplasmalema se podrían llegar a alcanzar concentraciones mayores, lo que explicaría el doble efecto de los prepulsos de ACh que hemos descrito en los apartados anteriores, esto es: (i) un 30% de bloqueo de la I_{Ca} (Figura 23B), que podría explicarse por una inactivación dependiente de calcio de los CCDV; y (ii) la lenta liberación de catecolaminas producida durante el prepulso de ACh (Figura 24F).

Para intentar esclarecer la implicación del calcio que entra a través de los receptores nicotínicos durante el prepulso con ACh en los efectos moduladores, diseñamos una serie de experimentos en los que se varió en 10 veces la concentración extracelular de calcio durante el prepulso, comparándose así los efectos moduladores del pulso de ACh en presencia de 0,2, 2 y 20 mM de Ca^{2+} extracelular.

En los experimentos realizados en presencia de 0,2 mM de Ca^{2+} durante la aplicación del pulso de ACh (Figura 29) observamos que en estas condiciones, la corriente de entrada de Ca^{2+} apenas se ve modificada por la aplicación del prepulso con ACh (Figura 29A; se observa aproximadamente un 10% de reducción en la I_{Ca} y la Q_{Ca} , siendo estas diferencias no significativas). Tampoco se observó un efecto significativo sobre el ΔC_m cuando el prepulso de ACh se aplicó en presencia de una baja concentración de calcio extracelular (Figuras 29B y 29E).

En la serie de experimentos en los que se estudió el efecto de 20 mM de Ca^{2+} obtuvimos resultados confusos ya que si bien se observó una marcada reducción de la I_{Ca} y la Q_{Ca} (Figuras 30A, 30C y 30D), los mayores niveles de calcio producen un perfil secretor muy característico con una marcada endocitosis (Figura 30B), lo que hace difícil la cuantificación del proceso excitotóxico, obteniéndose aparentemente una menor potenciación de la secreción (180%) al utilizar 20 mM de Ca^{2+} extracelular que al utilizar 2 mM de Ca^{2+} (compárese con el 450% observado en la figura 23F).

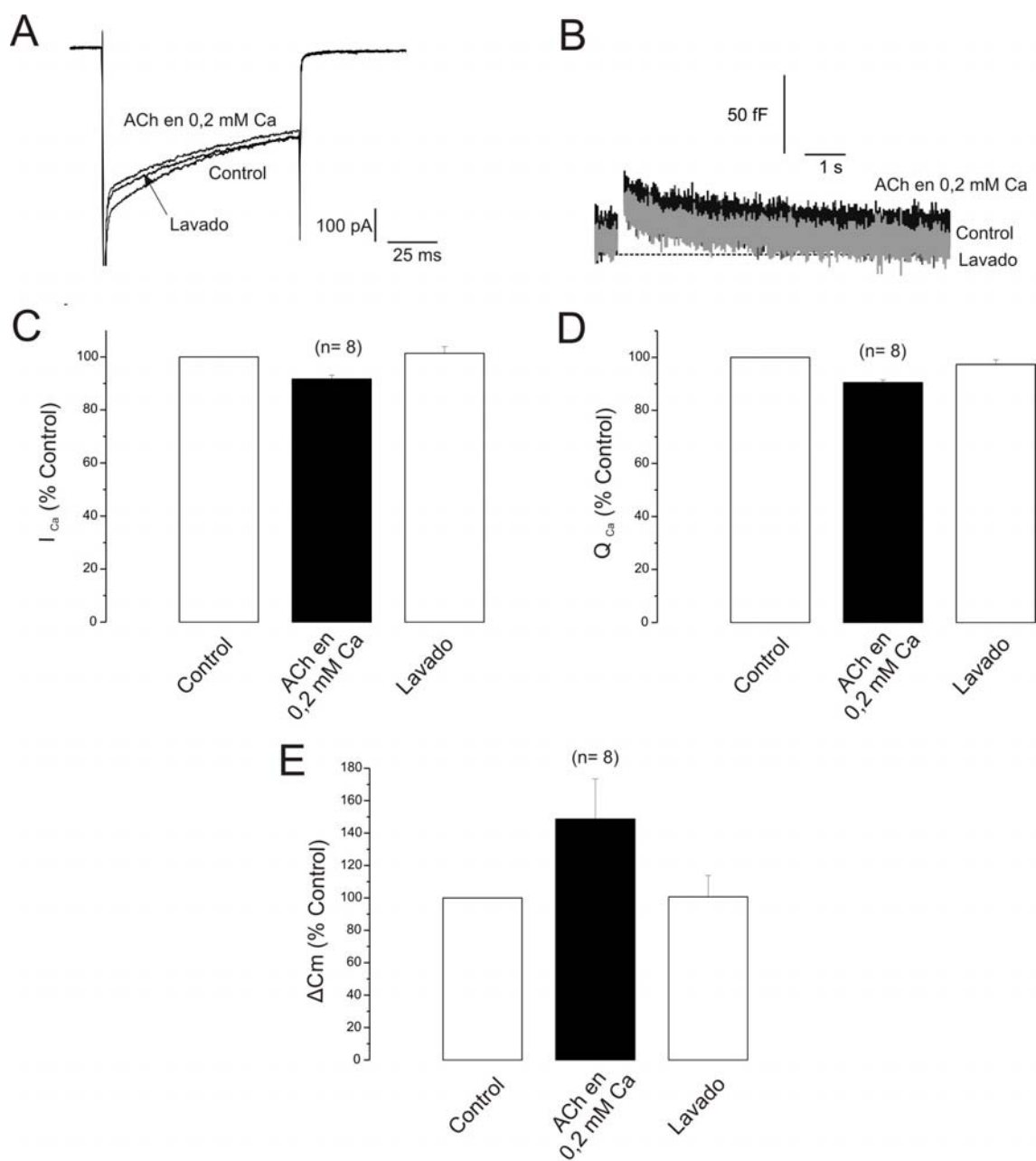


Figura 29. Los efectos moduladores de la ACh sobre la I_{Ca} , la Q_{Ca} y el ΔC_m , se atenúan al reducir la concentración extracelular de calcio. El panel *A* muestra los registros de la I_{Ca} producidas por PD2 antes y después de la aplicación de un prepulso de ACh en presencia de 0,2 mM de Ca^{2+} . El panel *B* muestra los ΔC_m registrados en estas condiciones experimentales. Los paneles *C-E* muestran los datos medios normalizados (% con respecto a los valores obtenidos en PD1 para cada una de las células) del pico de I_{Ca} , Q_{Ca} y la ΔC_m , respectivamente. Los datos son las medias \pm EE de los registros obtenidos en un total de 8 células de 3 cultivos diferentes.

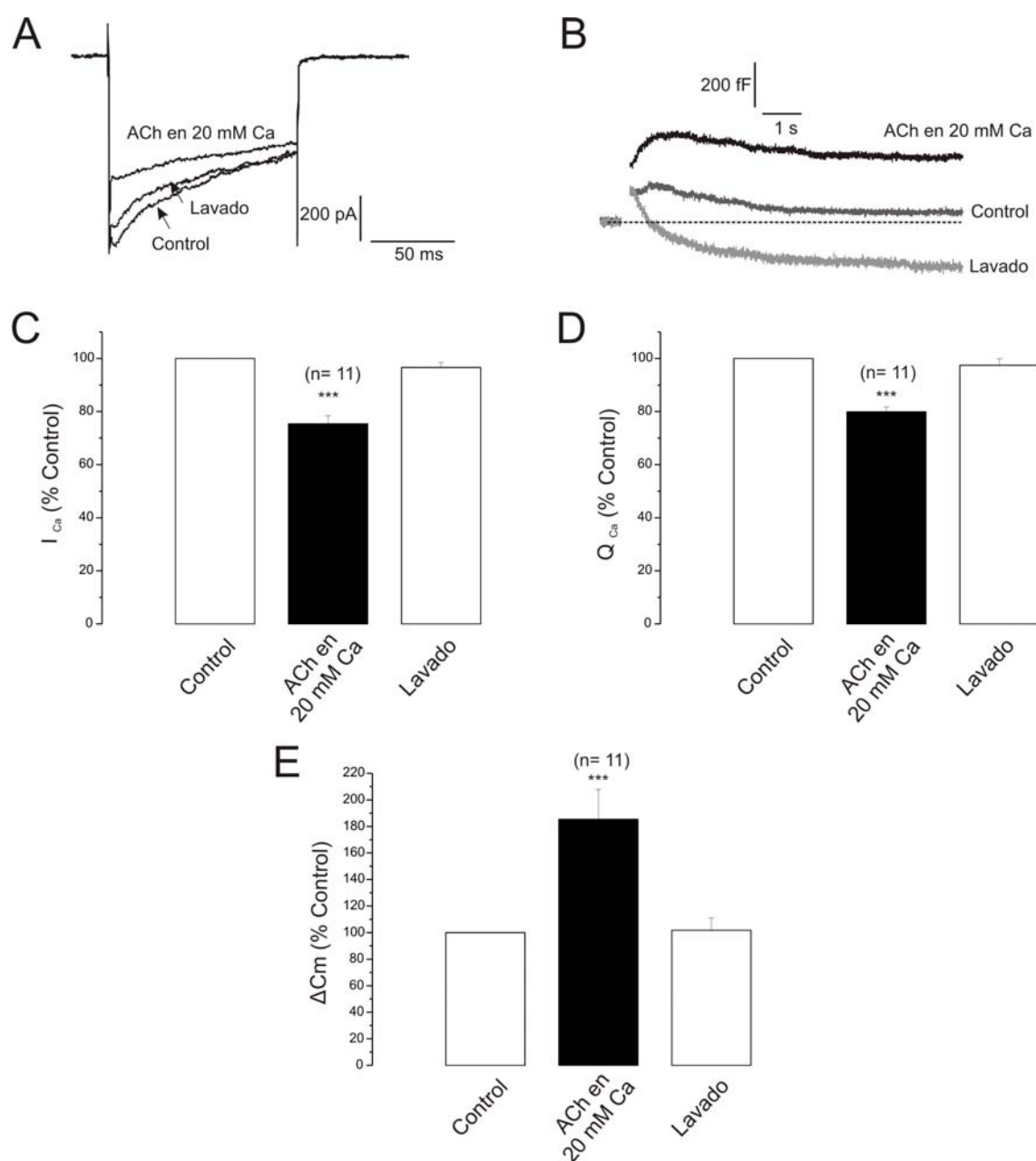


Figura 30. Efectos moduladores de la ACh sobre la I_{Ca} , la Q_{Ca} y el ΔC_m en presencia de 20 mM de calcio extracelular. El panel *A* muestra los registros de la I_{Ca} producidas por PD2 antes y después de la aplicación de un prepulso de ACh en presencia de 20 mM de Ca^{2+} . El panel *B* muestra los ΔC_m registrados en estas condiciones experimentales. Los paneles *C-E* muestran los datos medios normalizados (% con respecto a los valores obtenidos en PD1 para cada una de las células) del pico de I_{Ca} , Q_{Ca} y la ΔC_m , respectivamente. Los datos son las medias \pm EE de los registros obtenidos en un total de 11 células de 3 cultivos diferentes.

2.- MODULACIÓN DE LA NEUROTRANSMISIÓN EN CULTIVOS DE HIPOCAMPO DE RATA POR RECEPTORES NICOTÍNICOS $\alpha 7$

A pesar que una sola neurona pueda expresar más de un subtipo de receptor nicotínico funcional (Alkondon *et al.*, 1997b; Alkondon y Albuquerque, 2004) son los receptores nicotínicos del subtipo $\alpha 7$ los que parecen jugar un papel importante en la transmisión sináptica (Gray *et al.*, 1996; Hilmas *et al.*, 2001; Maggi *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2002; Alkondon y Albuquerque, 2004). Por ello, decidimos centrar este estudio en este subtipo de receptor utilizando células de cultivos de hipocampo, en las cuales fijamos el HP en -80 mV, y activamos los receptores nicotínicos $\alpha 7$ con el agonista selectivo, colina (Pereira *et al.*, 2002), en combinación con moduladores alostéricos de los receptores $\alpha 7$ como el 5-OHi-indol (Zwart *et al.*, 2002).

2.1.-La expresión del receptor $\alpha 7$ varía en función de los días en cultivo de las neuronas de hipocampo

Mediante el empleo combinado de técnicas inmunohistoquímicas y registros electrofisiológicos de “patch-clamp” se ha descrito que en los cultivos de neuronas de hipocampo de rata embrionaria la expresión del receptor $\alpha 7$ en la membrana neuronal es baja y, por consiguiente, las corrientes nicotínicas son pequeñas o están ausentes en neuronas jóvenes (1-7 días en cultivo) mientras que, en cultivos de entre 20 a 30 días las neuronas expresan ya corrientes nicotínicas $\alpha 7$ (Zarei *et al.*, 1999); sin embargo en estos días existe una compleja conexión sináptica que dificulta el análisis de los numerosos eventos eléctricos que se producen. Para evitar estos problemas, realizamos inicialmente un estudio tendente a caracterizar el nivel de expresión de este subtipo de receptor en nuestros cultivos de hipocampo.

Con éste propósito, realizamos un estudio inmunocitoquímico de dicho receptor en distintos días de un mismo cultivo: 0, 7, 14 y 21 días. La figura 31 muestra un ejemplo de un “western-blot” cuantificando la expresión del receptor $\alpha 7$ en los distintos días del cultivo (panel A) y las medias obtenidas de cuatro experimentos independientes (panel B). Como puede apreciarse claramente en la figura, el nivel de expresión del receptor $\alpha 7$ se incrementó significativamente a medida que transcurría el tiempo en cultivo de las neuronas, alcanzando los mayores niveles de expresión al cabo de unos 21 días del cultivo.

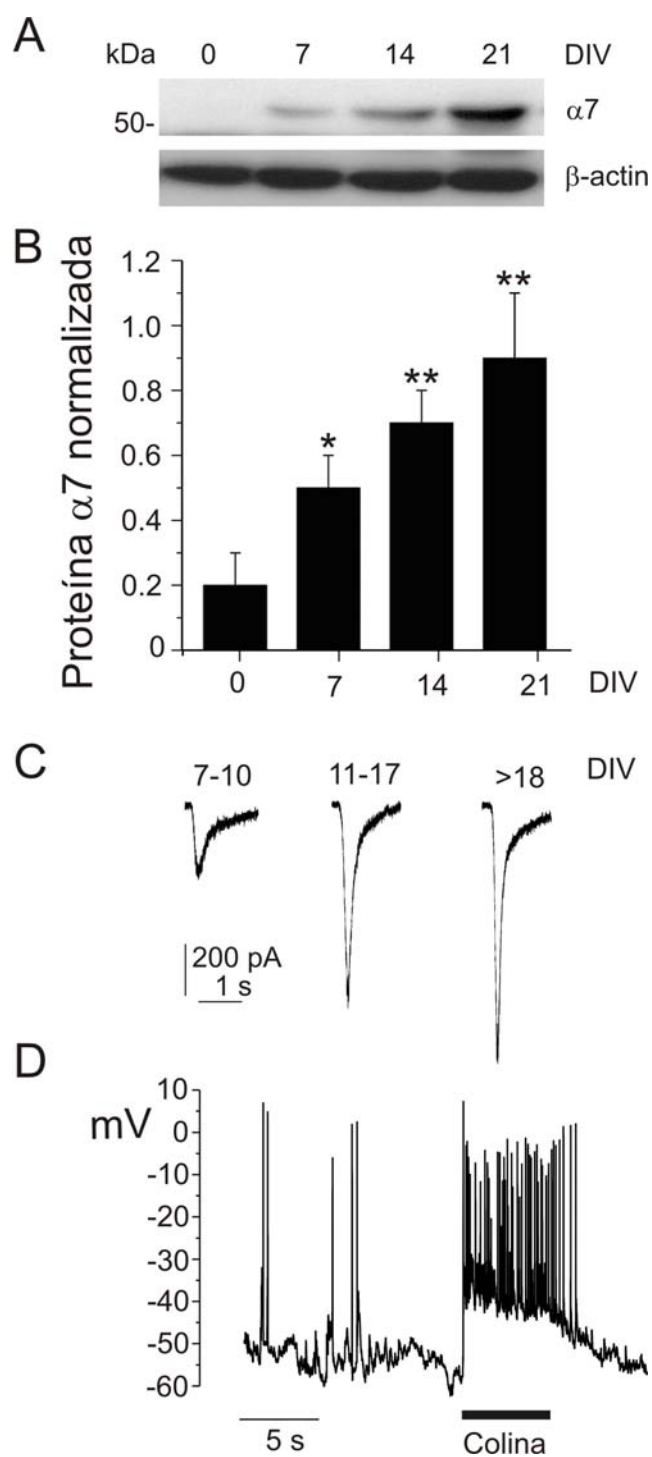


Figura 31. La expresión del nAChR $\alpha 7$ en cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata varía con los días en cultivo. **A** Inmunoblot representativo de la variación de la expresión del nAChR $\alpha 7$ en neuronas de hipocampo de rata con los días en cultivo (DIV 0, 7, 14, 21). Se midieron también los niveles de expresión de β -actina y sirvió para normalizar la expresión de los nAChR $\alpha 7$. **B** Cuantificación densitométrica de los receptores nAChR $\alpha 7$. Los datos representan la media \pm EE de 4 experimentos independientes de diferentes cultivos celulares). * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$, con respecto a DIV 0. **C** Registros originales de corrientes de entrada generadas por la aplicación de colina (1 mM) en cultivos de diferentes DIV según se indica en la figura. **D** Registros de potencial de membrana y potenciales de acción espontáneos en condiciones control e inducidos por la aplicación de colina (10 mM) en neuronas de 14 DIV.

Tras siete días de cultivo ya se observó un incremento significativo en el nivel de expresión del receptor $\alpha 7$ con respecto al cultivo con 0 días de incubación (2,7 veces; $p < 0,05$), aumentándose la expresión del nAChR $\alpha 7$ a los 14 y 21 días de cultivo hasta 4 y 5,5 veces, respectivamente ($p < 0,01$).

El incremento en la expresión en membrana de los receptores $\alpha 7$ se correlacionó con un aumento en la respuesta funcional de estos receptores a la estimulación por colina (Figura 31C). Así, la aplicación de pulsos de colina (1 mM) a neuronas de 7-10, 11-17 y >18 DIV produjo corrientes de entrada a través de los receptores nicotínicos de 335 ± 24 , 834 ± 128 y 1290 ± 230 pA, respectivamente.

A la vista de estos resultados, decidimos realizar los experimentos electrofisiológicos que se describen en esta Tesis en neuronas de 14 días en cultivo, las cuales presentaban una alta expresión de receptores $\alpha 7$ y una buena conectividad neuronal. En estas neuronas, la aplicación de pulsos de colina (10 mM) produjo un incremento en la frecuencia de disparo de potenciales de acción (Figura 31D), lo que constituye un signo indirecto de la viabilidad y conectividad del cultivo neuronal.

2.2.-Aumento de la transmisión sináptica inducida por colina

Una neurona con el voltaje fijado a -80 mV recibe constantemente señales espontáneas de las neuronas vecinas. Dichas señales se traducen en la generación de corrientes postsinápticas (CPS) que pueden ser registradas en la neurona en la que tenemos fijado el voltaje.

Un ejemplo representativo de esta actividad espontánea se muestra en el trazado 1 de la figura 32; las corrientes de entrada tienen una escasa regularidad en la frecuencia y una amplitud variable, desde 100 hasta 400 pA, aunque esporádicamente se registra alguna corriente de mayor intensidad.

Para caracterizar la posible implicación de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ en la transmisión sináptica utilizamos colina, un ligando poco potente pero con una alta selectividad por el receptor nicotínico $\alpha 7$ (Pereira *et al.*, 2002). La aplicación de un pulso de colina (10 mM; 5 s) produjo un marcado incremento tanto en la frecuencia como en la amplitud de las corrientes postsinápticas registradas (trazado 2), siendo este efecto reversible, recuperándose la actividad espontánea inicial tras el lavado de la colina (trazado 3).

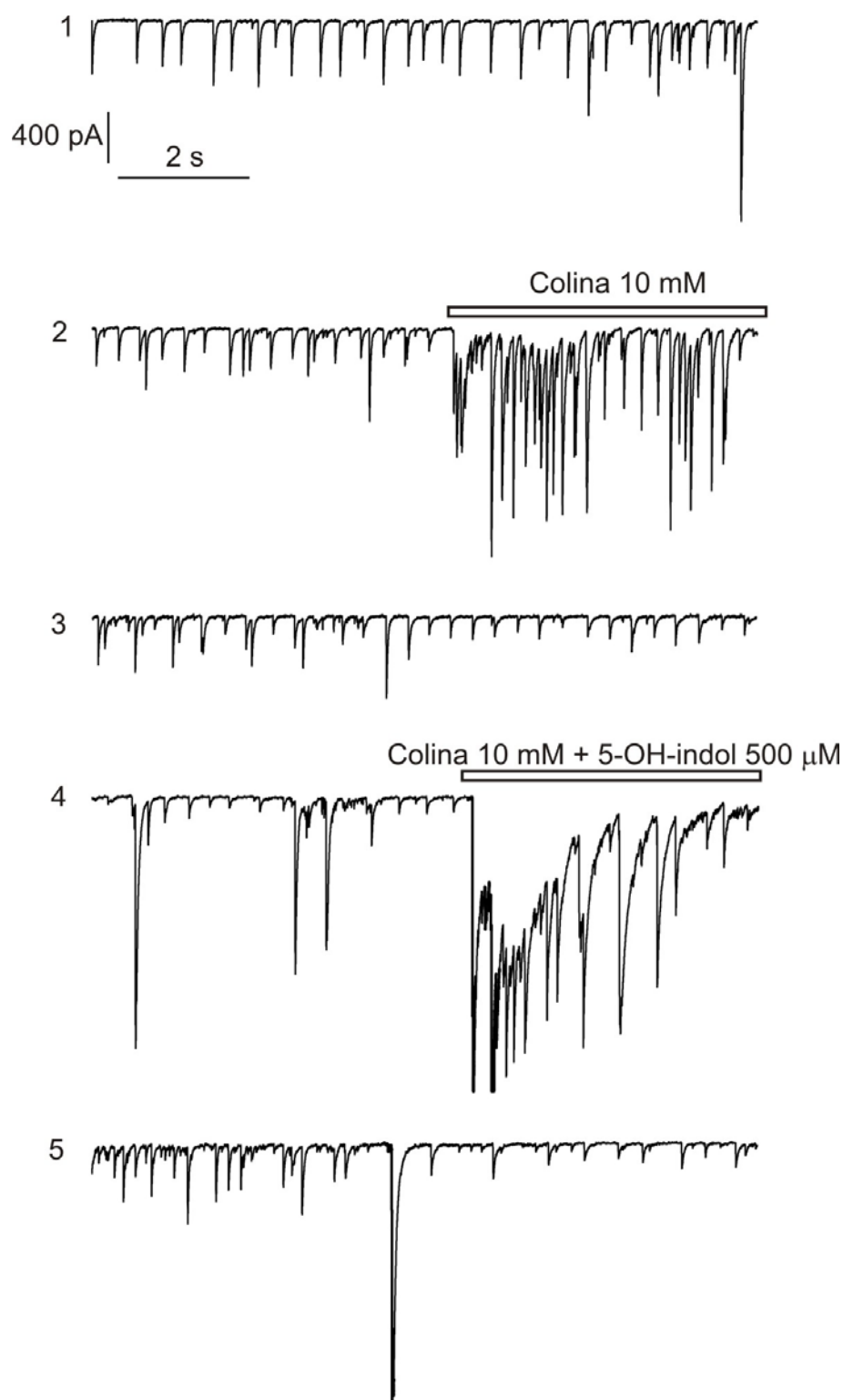


Figura 32. La activación de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ por colina produjo un incremento en la transmisión sináptica espontánea. La figura muestra una serie de registros representativos de la actividad sináptica (eCPS) obtenidos en células de hipocampo en cultivo (HP -80 mV) en condiciones control (trazado 1), durante la aplicación de un pulso de colina (10 mM, 5 s) (barra horizontal) (trazado 2), tras el lavado de la colina (trazado 3), al coaplicarse la colina (10 mM) con 5-OH-indol (500 μ M) durante 5 s (trazado 4) y tras el lavado de ambos (trazado 5). Los trazados mostrados representan 10 s de un registro continuo de eCPS; entre cada uno de los trazados existe un intervalo de 1 min.

Las respuestas inducidas por colina muestran una amplia variabilidad debido a que el número de conexiones entre las distintas neuronas también es variable. Sin embargo, en 88 de 114 (77,2%) de las neuronas analizadas, la colina incrementó la respuesta media de las corrientes postsinápticas (CPS); en las otras 26 neuronas (22,8%), la colina no produjo ningún cambio en la frecuencia, pico y/o la amplitud de las corrientes de entrada.

El efecto producido por la colina parece ser independiente de la concentración; no encontramos diferencias significativas en la respuesta tras variar las concentraciones de colina entre 1, 3 y 10 mM; por lo tanto, la colina parece tener un efecto de tipo “todo o nada”. Dependiendo del número de conexiones neuronales, la colina a bajas concentraciones no producía respuesta, a pesar de que a altas concentraciones se incrementó la actividad espontánea.

2.3.-Potenciación de la transmisión sináptica inducida por colina por el modulador alostérico $\alpha 7$ 5-OH-indol

Para corroborar que este efecto sobre la transmisión sináptica observado estaba vinculado a la activación de receptores $\alpha 7$ por la colina, decidimos estudiar los efectos del modulador alostérico de estos receptores, el 5-OH-indol (Zwart *et al.*, 2002) sobre la transmisión sináptica. En estos experimentos observamos que el 5-OH-indol (500 μ M) no tenía un efecto significativo *per se* sobre las eCPS. Sin embargo, la coaplicación del 5-OH-indol con colina produjo una marcada potenciación tanto de la frecuencia como de la amplitud de las CPS (ver trazado 4 en la figura 32).

Esta drástica potenciación se vio también en la elevación de la corriente basal del registro observada, que es debida al solapamiento de las CPS producidas a elevadas frecuencias. Este efecto potenciador del 5-OH-indol fue también reversible, recuperándose la actividad espontánea del registro tras el lavado.

Los resultados obtenidos en 19 células se muestran en la figura 33. Para calcular la contribución relativa de los receptores nicotínicos a la transmisión sináptica, hemos calculado la carga neta de las CPS registradas durante los 5 s en los que aplicamos la colina (normalizándose ésta como 100% de respuesta) y la comparamos con la carga total de las eCPS registradas durante los 5 s previos (basal). El mismo tipo de cálculo se realizó cuando se aplicó la combinación de colina y 5-OH-indol. Se integraron las áreas

de las corrientes y se expresaron en μC (carga total de entrada, Q). Los datos obtenidos se representan en la figura 33. Como puede observarse, la respuesta (CPS) producida por la aplicación de colina (100%) fue unas 6 veces mayor que la registrada en condiciones basales, y ésta se vio potenciada por el 5-OH-indol unas 7,5 veces cuando se coaplicó junto a 1 mM de colina y unas 5 veces cuando usamos 10 mM de colina.

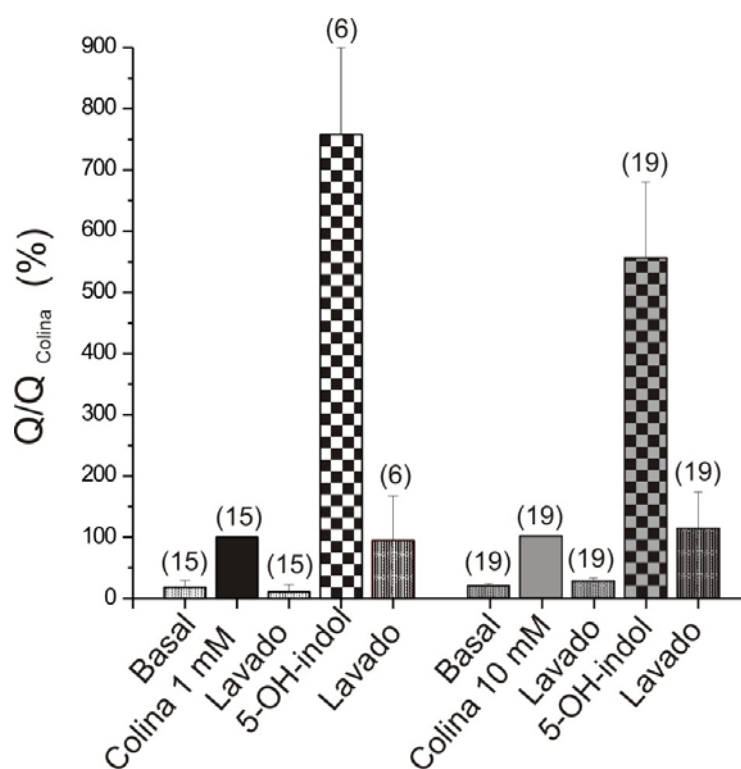


Figura 33. Potenciación de la transmisión sináptica inducida por colina por el modulador alostérico $\alpha 7$ 5-OH-indol. La figura muestra los datos normalizados con respecto a la respuesta producida por colina del área total de las corrientes registradas en cada una de las condiciones experimentales indicadas. Los datos representan la media \pm EE del número de datos representados en paréntesis sobre cada columna para cada condición experimental.

Las aplicaciones secuenciales de colina y colina con 5-OH-indol muestran de manera consistente la potenciación del efecto de la colina sobre la transmisión sináptica durante la coaplicación de ambos compuestos. De hecho, el efecto modulador del 5-OH-indol fue claramente reproducible tras repetidas aplicaciones de los compuestos sobre la misma neurona, como se muestra en el ejemplo de la figura 34.

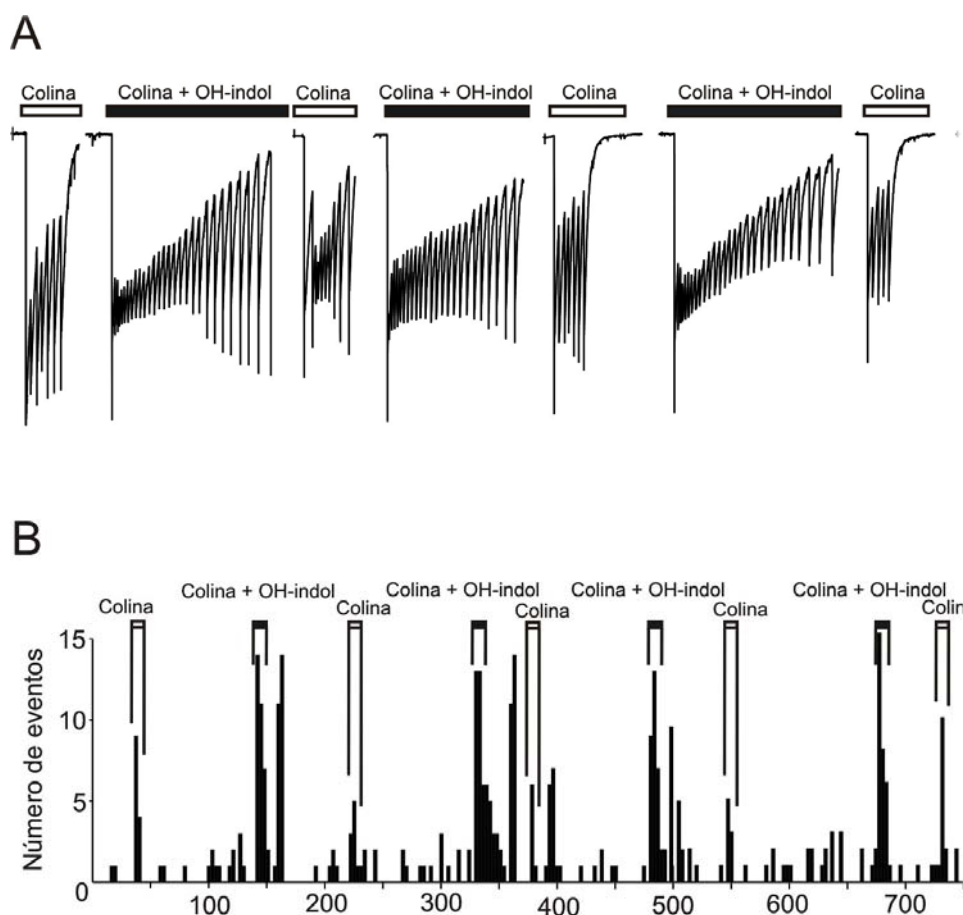


Figura 34. Reproducibilidad de los efectos de colina y 5-OH-indol sobre las CPS. *A* Ejemplos de CPS registradas en neuronas de hipocampo en cultivo durante la aplicación de pulsos de 5 s de colina (10 mM; barra horizontal) y durante la coaplicación de colina (10 mM) y 5-OH-indol (500 μ M). Las aplicaciones se repitieron alternativamente como se muestra en las barras horizontales superiores. *B* Histograma de frecuencias de la actividad de las CPS en condiciones control y en presencia de colina o coaplicación de colina y 5-OH-indol como se indica. HP -80 mV

2.4.-El antagonista nicotínico MLA bloquea la respuesta inducida por colina

En los experimentos previos hemos demostrado la propiedad de la colina de inducir la modulación de la transmisión sináptica. Con el fin de corroborar la implicación del receptor nicotínico del subtipo $\alpha 7$ en la modulación de la transmisión sináptica registramos las eCPS tanto en presencia como en ausencia del antagonista selectivo del receptor $\alpha 7$ metilcaconitina (MLA) (Pereira *et al.*, 2002).

Como se representa en la figura 35, la activación del nAChRs $\alpha 7$ por colina, especialmente cuando ésta se coaplicó junto al 5-OH-indol, produjo un marcado incremento de las CPS registradas. Esta potenciación se suprimió totalmente mediante

el pretratamiento del cultivo neuronal con MLA (1 nM; trazado superior), o cuando el antagonista se aplicó agudamente en combinación con la mezcla de colina y 5-OH-indol (trazado inferior), siendo este bloqueo reversible.

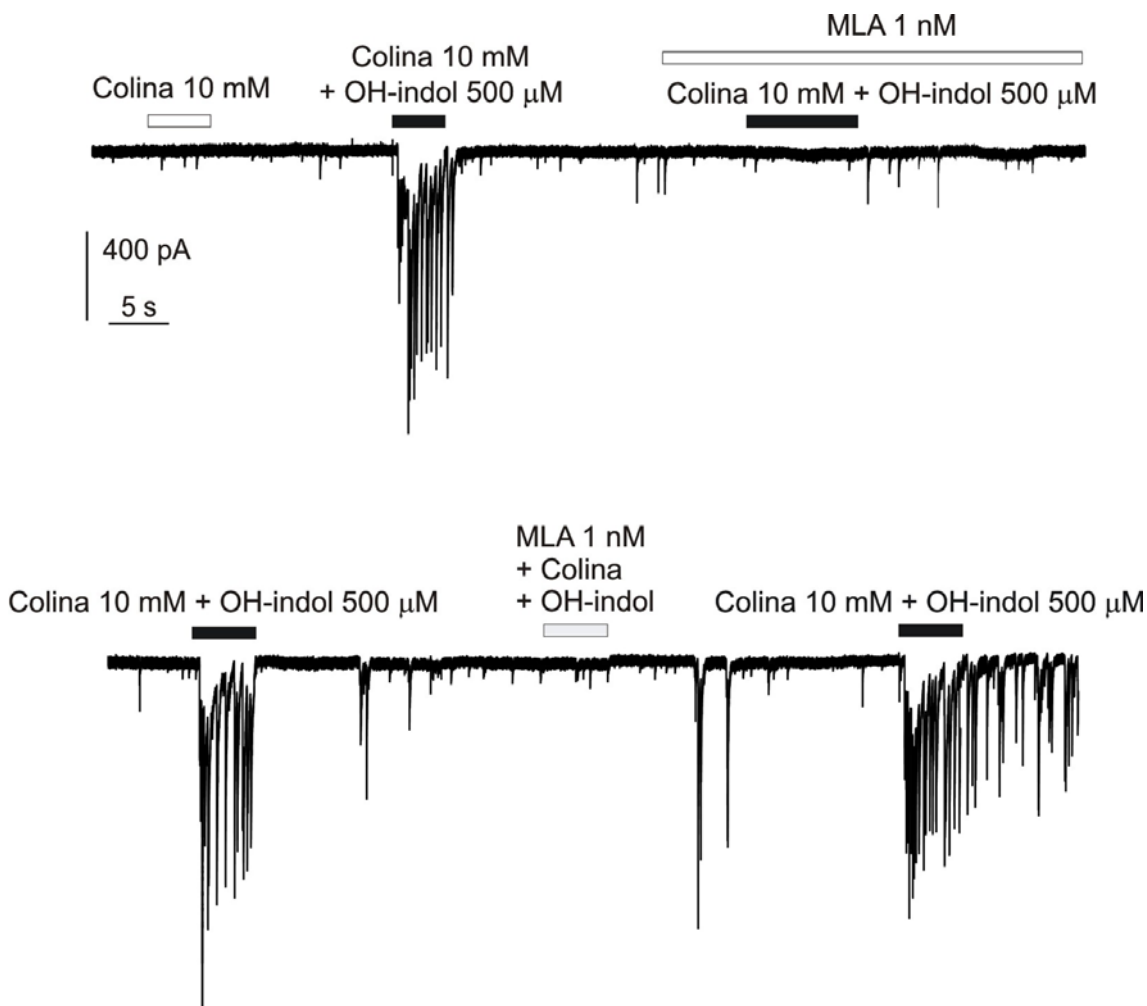


Figura 35. La metilicacitonina (MLA), un bloqueante selectivo de los nAChRs $\alpha 7$, inhibió el efecto producido por colina sobre las CPS. La respuesta producida por la activación de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ en una neurona, se bloqueó mediante el pretratamiento con MLA (1 nM) de forma reversible. La figura representa un registro original (separado en dos trazados) de la actividad sináptica espontánea, que se incrementó por colina, con o sin coaplicación de 5-OH-indol. HP -80 mV.

Con estos experimentos hemos demostrado que una exposición al antagonista selectivo $\alpha 7$ MLA elimina totalmente el efecto de la colina, incluso cuando estos receptores están modulados alostéricamente por el 5-OH-indol, confirmándose así la implicación de los receptores $\alpha 7$ en la potenciación de las CPS producida por colina.

2.5.-Localización presináptica del receptor $\alpha 7$

En este y otros trabajos se indica que el papel del receptor $\alpha 7$ es modular la liberación de neurotransmisores. Cuando se activan los receptores nicotínicos por su agonista, se producen corrientes de entrada de cationes que pueden despolarizar la membrana y abrir así los CCDV, induciendo la entrada de Ca^{2+} a través de dichos canales.

La alta permeabilidad relativa al Ca^{2+} de los receptores $\alpha 7$ (Séguéla *et al.*, 1993) incrementa la posibilidad de que éstos puedan ejercer directamente un efecto sobre la maquinaria exocitótica para promover la liberación de neurotransmisores. De este modo, la estimulación a nivel presináptico de los receptores nicotínicos podría producir una liberación de neurotransmisores sin ser necesaria la generación de un potencial de acción en la terminación presináptica.

Para probar esta hipótesis hemos estudiado los efectos de la tetrodotoxina (TTX) sobre las acciones de colina en las CPS. Como se muestra en la figura 36A, la potenciación de la actividad sináptica producida en respuesta a la coaplicación de colina y 5-OH-indol (trazado 1) se suprimió completamente al añadir TTX (5 μM), como se puede ver en los trazados 3 y 4 de la figura 36. La actividad espontánea (trazado 5), así como el efecto modulador producido por la activación de los receptores nicotínicos, se recuperó tras el lavado de la TTX (datos no mostrados).

El conjunto de los resultados obtenidos siguiendo este protocolo experimental se muestran en la figura 36B. La carga neta de las CPS inducidas por colina (10 mM) se calculó durante los 5 s de aplicación y se comparó con los 5 s de registro obtenido en las diferentes condiciones experimentales mostradas en la parte inferior de cada una de las columnas del histograma. La respuesta secretora (CPS) producida por la colina (100%) fue unas 5 y 6 veces mayor que la actividad basal (eCPS) y se incrementó marcadamente por la coaplicación de colina y 5-OH-indol (7,5 veces). La TTX suprimió tanto la respuesta a colina como la potenciación por el 5-OH-indol. Tras el lavado de la TTX, la colina volvió a producir una actividad sináptica similar a la observada en condiciones control (previo a la aplicación de TTX).

Este conjunto de experimentos sugieren que el reclutamiento de canales de Na^+ sensibles a TTX es condicionante de la acción moduladora de los receptores nicotínicos $\alpha 7$, siendo el Ca^{2+} que entra a través de estos receptores insuficiente para generar una actividad sináptica significativa.

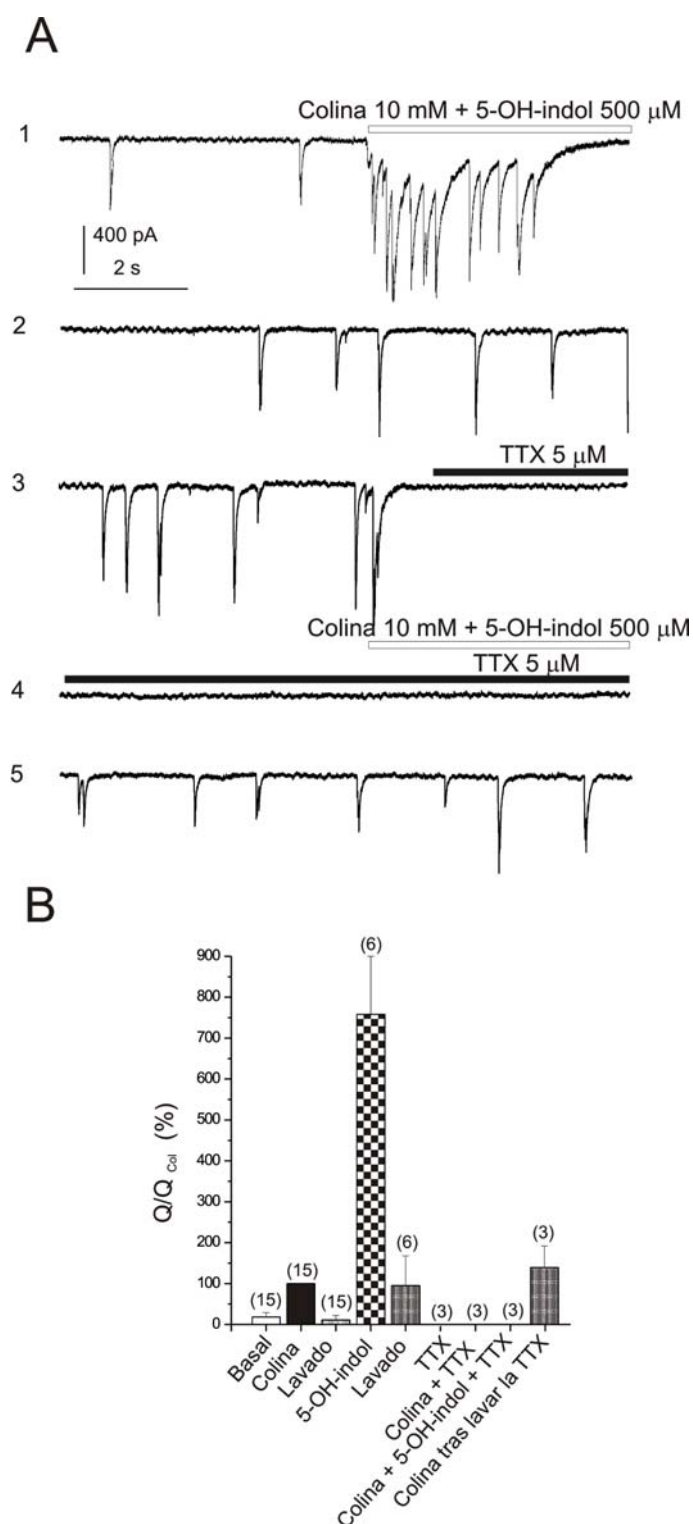


Figura 36. Las CPS producidas por colina fueron sensibles a TTX. **A** Registros representativos de las eCPS registradas en una neurona de hipocampo (HP -80 mV) y CPS registradas en respuesta a la coaplicación de colina (10 mM) y 5-OH-indol (500 μ M) (barra horizontal) en ausencia (trazados 1-3) y en presencia de TTX (5 μ M; trazado 4). Los distintos trazados representan 10 s de registro obtenido del registro continuado de actividad sináptica. Los trazados representados se obtuvieron con 1 min de intervalo entre ellos. **B** Medias \pm EE de las áreas de la corriente registrada durante los 5 s de aplicación del agonista+modulador, normalizadas con respecto al efecto de colina sola, en las diferentes condiciones experimentales para el número de células indicadas entre paréntesis.

2.6.- La bicuculina suprime el efecto modulador de la estimulación del receptor nicotínico $\alpha 7$, cosa que no hace el ácido kinurénico

La reducción significativa de la frecuencia y de la amplitud de CPS, producida por MLA y TTX que hemos descrito en los apartados anteriores, podría explicar la reducción presináptica en la liberación de neurotransmisor atribuible al bloqueo de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ presentes en las interneuronas que hacen sinapsis sobre las neuronas en las que registramos. Llegados a este punto, la pregunta que nos surge es qué tipo de transmisión sináptica (GABAérgica y/o glutamatérgica) está siendo modulada por la activación del receptor nicotínico $\alpha 7$.

Para determinar qué tipo de neurotransmisor está siendo liberado por la colina, responsable de las CPS, estudiamos los efectos del ácido kinurénico, un antagonista de los receptores de glutamato, sobre las CPS evocadas por colina. También estudiamos el efecto de la bicuculina, un antagonista de los receptores de GABA_A. Ambos compuestos inhiben la transmisión glutamatérgica y la GABAérgica, respectivamente.

En el experimento mostrado en la figura 37, se puede observar que la colina produce su típico efecto facilitador sobre la neurotransmisión (trazado 1) y que tras la adición de bicuculina (40 μ M) la colina no fue capaz de producir dicho efecto facilitador (trazado 2). Por el contrario, la bicuculina no afectó a las eCPS, lo que indica que éstas probablemente se deben a la liberación de glutamato. En el trazado 4 puede observarse que la colina vuelve a incrementar la actividad sináptica tras el lavado de la bicuculina.

Los resultados obtenidos de 7 neuronas se muestran en la figura 37B, donde se muestran las medias \pm EE de la carga total de la corriente en ausencia y en presencia de bicuculina (40 μ M). La carga total se calculó durante los 5 s de aplicación de la colina y se compararon con los 5 s previos a la adición de colina (basal). Los datos muestran que la colina produjo un incremento de la respuesta basal de unas 5 veces. Como puede observarse, la colina no produjo el incremento característico de la actividad sináptica cuando se aplicó en presencia de bicuculina, lo que nos sugiere un efecto selectivo de la colina sobre la liberación de GABA.

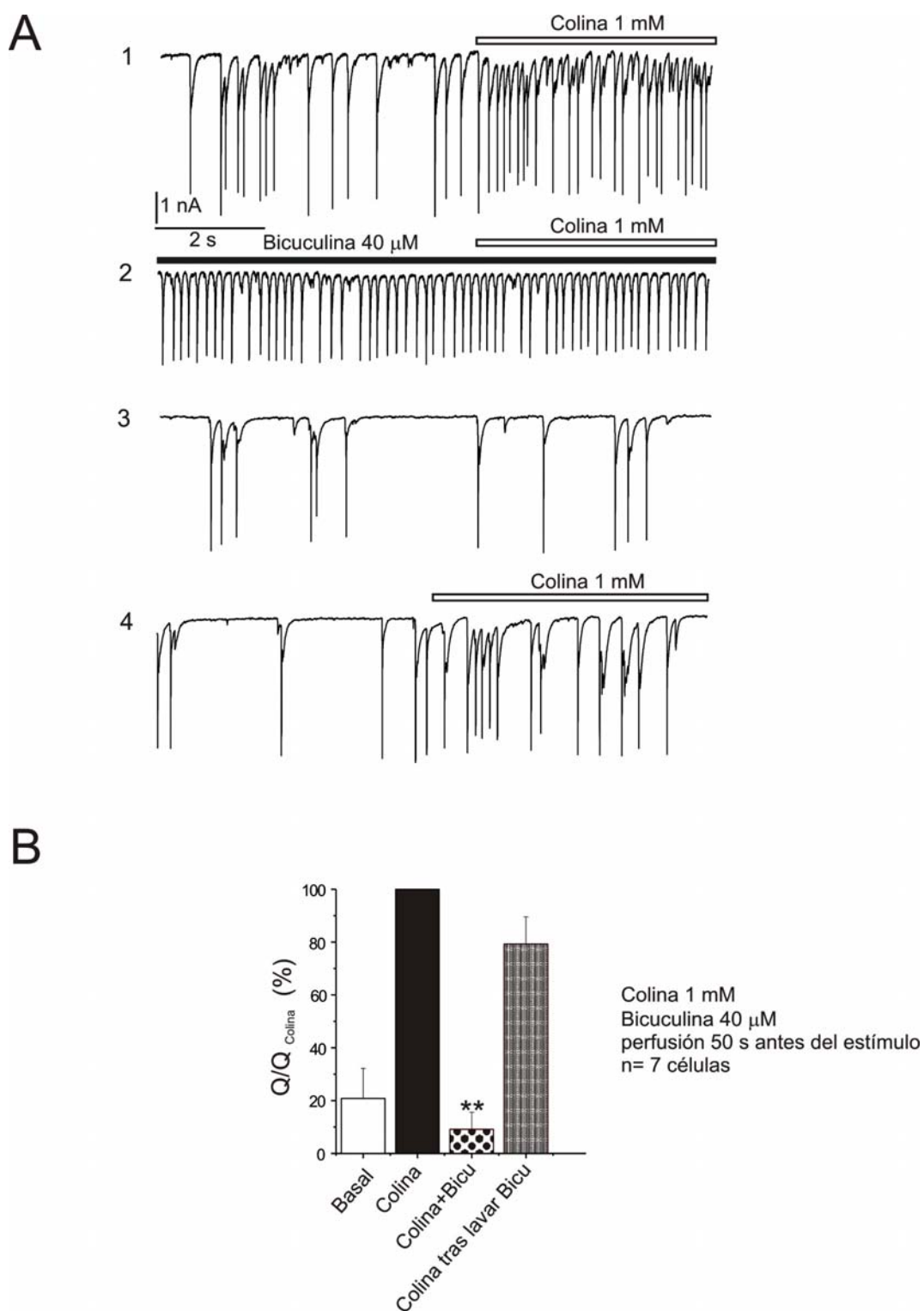


Figura 37. La colina no modificó la transmisión sináptica espontánea producida por glutamato. **A** Registros representativos de las eCPS en neuronas de hipocampo (HP -80 mV). La colina (1 mM) se aplicó durante el tiempo mostrado por la barra horizontal superior. Se muestra el efecto producido por colina antes (trazado 1), durante (trazado 2) y después (trazado 4) de la aplicación de bicuculina. Los distintos trazados representan 10 s de registro obtenido del registro continuado de CPS. Los trazados representados se obtuvieron con 1 min de intervalo. **B** Representación del área de las CPS durante los 5 s (normalizada con respecto a colina) en las distintas condiciones experimentales. Media \pm EE de 7 células (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

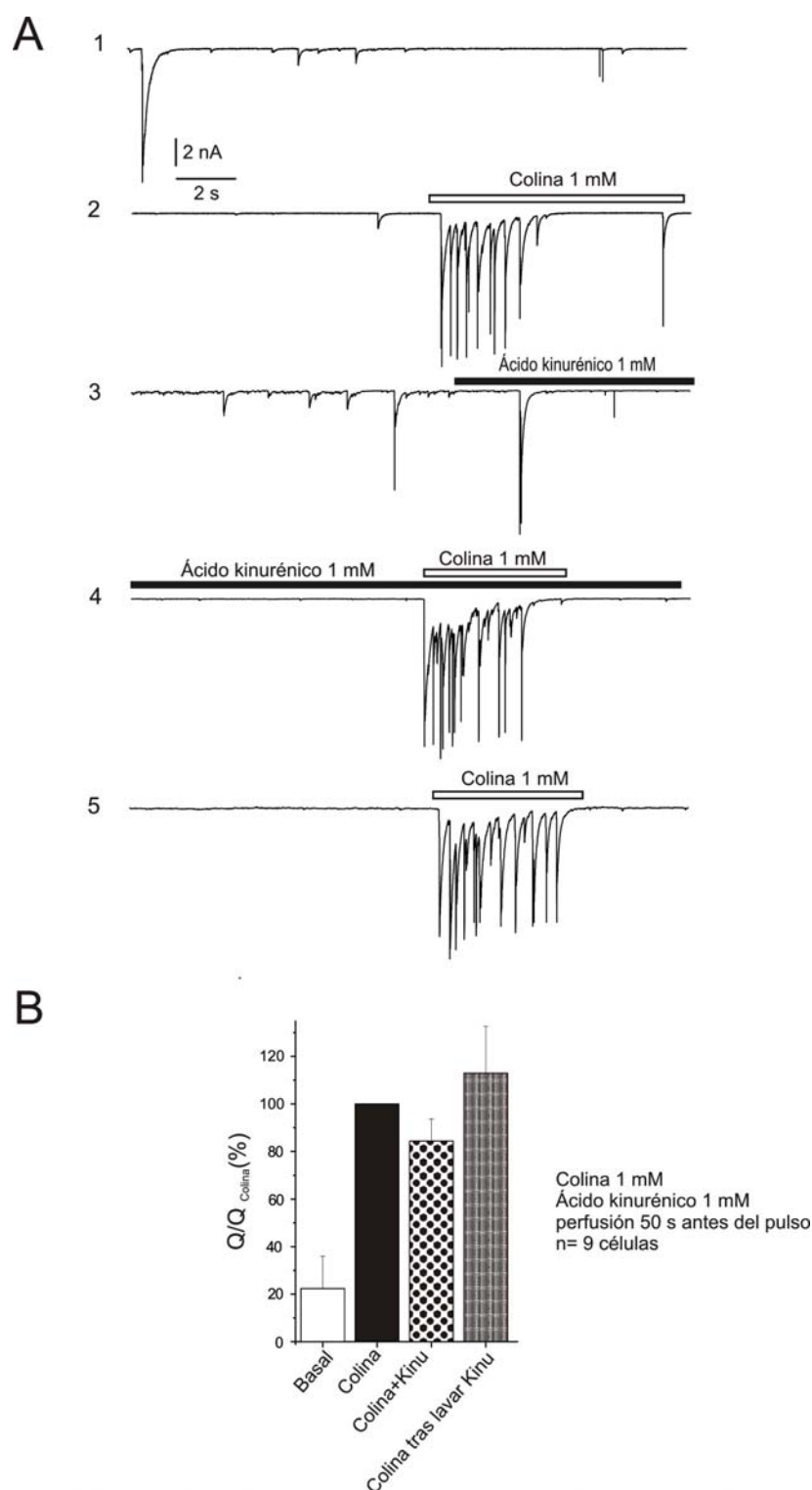


Figura 38. El efecto modulador de la colina no se afecta en presencia de ácido kinurénico. *A* Registros representativos de las CPS registradas en neuronas de hipocampo (HP -80 mV), en condiciones control (trazado 1), después de la aplicación de un pulso de colina (1 mM; trazado 2), y durante (trazado 4) y después (trazado 5) de bloquear la transmisión glutamatérgica mediante la adición de ácido kinurénico (1 mM). Los distintos trazados representan 10 s de registro obtenido del registro continuado de CPS. Los trazados representados se obtuvieron con 1 min de intervalo. *B* Representación del área de las CPS registradas durante los 5 s de aplicación del agonista (normalizada con respecto a la respuesta a colina) en las distintas condiciones experimentales. Los datos representan la media \pm EE de 9 células.

En otra serie de experimentos (Figura 38) se exploró la posibilidad de que la colina estuviese facilitando la liberación de glutamato, utilizando en este caso ácido kinurénico (1 mM), como bloqueante inespecífico de los receptores para el glutamato.

En la figura 38 se muestran los registros de eCPS y las corrientes sinápticas inducidas por la aplicación de un pulso de colina (1 mM), antes (trazado 2), durante (trazado 4) y después (trazado 5) de la superfusión de la preparación experimental con ácido kinurénico. Como puede observarse, se produjo un incremento comparable de las CPS evocado por la colina en todas las condiciones experimentales empleadas, independientemente del bloqueo de la transmisión glutamatérgica por el ácido kinurénico. En el panel B de la figura se representan los datos obtenidos en 9 células. Se observa que la colina produjo un incremento de las CPS de hasta un 500% y que dicho efecto no se afectó de manera significativa por el ácido kinurénico.

Estos datos (bloqueo de la respuesta a colina en presencia de bicuculina y no efecto en presencia de ácido kinurénico) sugieren que el efecto modulador de la colina se produce sobre la transmisión GABAérgica.

2.7.-La bicuculina y el ácido kinurénico bloquean las corrientes nicotínicas $\alpha 7$

Existen algunos trabajos en la literatura que describen que los bloqueantes de los receptores de glutamato tipo ácido kinurénico podrían comportarse como antagonistas no competitivos de los receptores nicotínicos, produciendo un pequeño bloqueo de las respuestas inducidas por ACh (35% de bloqueo, CI_{50} 7 μM ; Hilmas *et al.*, 2001). Por otra parte, también con respecto a la bicuculina se ha descrito un efecto bloqueante de las corrientes producidas por ACh con una IC_{50} de 12-35 μM , de tipo competitivo ó no competitivo para distintos subtipos de receptor nicotínico (Demuro *et al.*, 2001). Por lo tanto, creímos conveniente estudiar las posibles interacciones entre los receptores nicotínicos $\alpha 7$ en las neuronas de hipocampo y la bicuculina o el ácido kinurénico.

Para registrar las corrientes de entrada a través del receptor nicotínico las células se superfundieron con 5 μM de TTX, se fijó el voltaje a -80 mV y se les aplicó pulsos de colina (1 mM, 2 s), a intervalos de 30 s, mediante una pipeta de perfusión rápida, con el fin de evitar la desensibilización del receptor nicotínico.

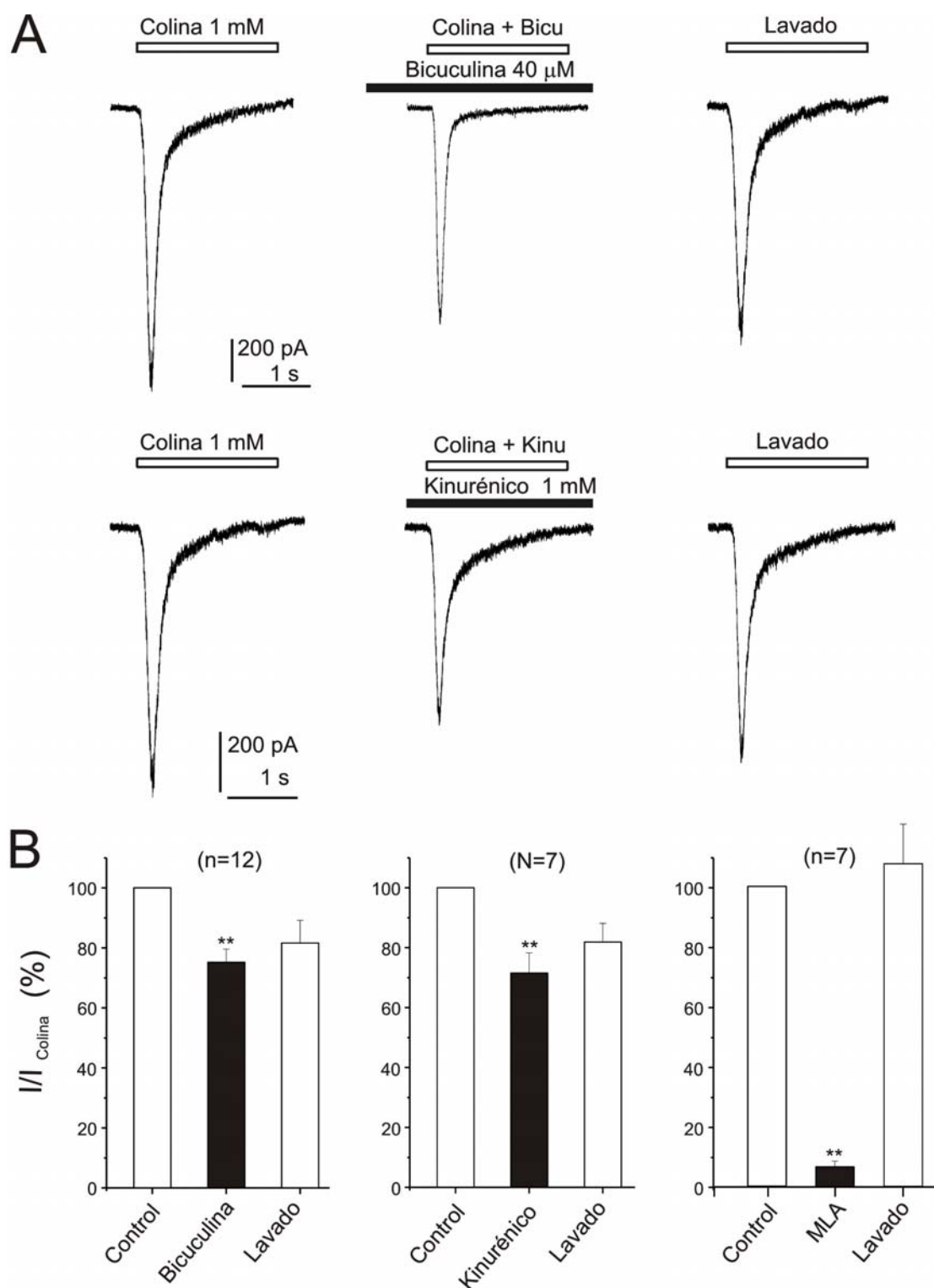


Figura 39. Efecto de la bicuculina y el ácido kinurénico sobre las corrientes nicotínicas $\alpha 7$. La I_{Colina} se indujo mediante la aplicación de pulsos de colina (1 mM; 2 s) a intervalos de 30 s en neuronas de hipocampo (HP -80 mV). **A** Trazados originales de corriente inducidos por colina, tanto en condiciones control (izquierda), como en presencia de bicuculina (40 μ M; centro) y tras el lavado de la bicuculina (derecha). Los paneles de la parte inferior muestran los experimentos realizados con ácido kinurénico (1 mM). **B** Datos cuantitativos de la I_{Colina} obtenidos en las diferentes condiciones experimentales indicadas. El histograma de la derecha corresponde a los experimentos realizados para caracterizar la contribución de los receptores nicotínicos del subtipo $\alpha 7$ sobre la corriente total producida por colina; para ver dicha contribución se bloqueó el receptor $\alpha 7$ con el antagonista selectivo de dicho receptor MLA (1 nM). Los datos representan la medias \pm EE del número de neuronas indicado en paréntesis. ** $p < 0,01$.

Como puede apreciarse en la figura 39, la aplicación de pulsos de colina (1 mM, 2 s) a intervalos de 30 s produjo corrientes de entrada (I_{Colina}) reproducibles sin que se observara una desensibilización significativa del receptor nicotínico.

En aproximadamente el 44% de las neuronas de hipocampo estudiadas (17 de 38 células), la colina produjo corrientes de entrada (I_{Colina}) que se caracterizaron por una rápida cinética de activación y una rápida cinética de inactivación. La media del pico de la corriente de colina fue de $725,8 \pm 66$ pA.

En la figura 39A se muestra un registro original de I_{Colina} obtenido bajo las condiciones experimentales que se indican mediante las barras horizontales. La bicuculina (40 μM) y el ácido kinurénico (1 mM) se aplicaron antes y durante el pulso de colina. La mayor parte del bloqueo producido por estos fármacos se observó ya durante la aplicación del primer pulso de colina en presencia de bicuculina ($25,8 \pm 4\%$, $n=12$ células) y lo mismo sucedió con el ácido kinurénico ($29,8 \pm 6\%$, $n=7$ células); el grado de bloqueo inducido por bicuculina o ácido kinurénico no aumentó durante los siguientes pulsos.

Para valorar el grado de contribución de los receptores $\alpha 7$ a las respuestas registradas, al final del experimento se superfundió MLA (1 nM). La I_{Colina} fue muy sensible al bloqueo por MLA ($93,1 \pm 4\%$, $n=7$ células), siendo este bloqueo reversible tras el lavado del compuesto.

La media normalizada del pico de I_{Colina} justo antes de la aplicación de bicuculina, ácido kinurénico ó MLA se usó como respuesta control para calcular el grado de bloqueo producido por cada uno de los compuestos; las medias de los datos se muestran en la figura 39B.

2.8.-El receptor nicotínico $\alpha 7$ puede inducir también una supresión de la actividad sináptica en el hipocampo.

Durante la mayor parte de este estudio hemos realizado los registros de actividad sináptica en neuronas que mostraban una baja actividad espontánea, con el fin de que la potenciación por la colina fuese más evidente. Como hemos descrito en los apartados anteriores, bajo estas condiciones experimentales, el efecto mayoritario de la estimulación de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ se ejerció sobre la transmisión sináptica

GABAérgica, de tipo inhibitor. Sin embargo, en un bajo porcentaje de neuronas registramos un efecto inhibitor de las eCPS (en 8 de 114 células).

La figura 40A muestra un ejemplo de neurona con una alta actividad espontánea en la cual la colina produjo una reducción drástica de las eCPS. Esta disminución en la actividad fue mayor cuando se co-aplicó la colina con el 5-OH-indol (500 μ M). Este efecto inhibitor de la estimulación de los receptores $\alpha 7$ se aprecia mejor en la figura 40B, donde se representa el número de eventos (eCPS) frente al tiempo. Como puede apreciarse, la actividad espontánea se recuperó en pocos segundos tras el lavado de la colina.

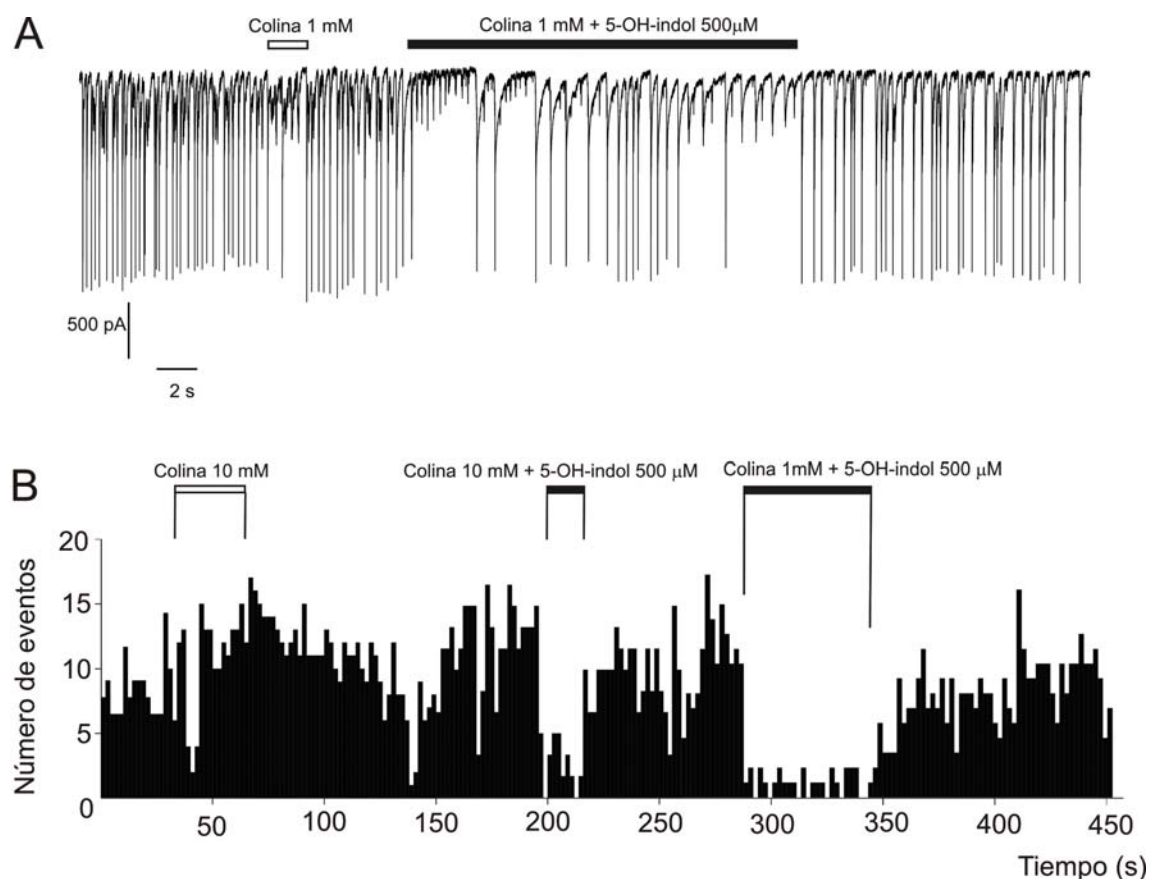


Figura 40. Efecto inhibitor de la colina sobre la actividad sináptica. *A* Actividad sináptica espontánea (eCPS) registrada de forma continuada en neuronas de hipocampo. La superfusión con colina (10 mM) produjo una marcada reducción de las eCPS. Este efecto inhibitor fue más manifiesto al coaplicar colina con 5-OH-indol (ver las barras horizontales). *B* Histograma de las frecuencias de las eCPS en condiciones control, en presencia de colina y tras la coaplicación de colina y 5-OH-indol, como se muestra en las barras horizontales de la parte superior. HP -80 mV.

3.- CULTIVOS DE NEURONAS DE HIPOCAMPO DE RATA COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS LIGANDOS NICOTÍNICOS

Los resultados que hemos mostrado en el capítulo anterior muestran que en el cultivo de neuronas de hipocampo existe un receptor $\alpha 7$ funcional que regula la neurotransmisión de tipo GABAérgica. Por ello consideramos que este podría ser un buen modelo experimental para la caracterización de nuevos agonistas y/o moduladores del receptor $\alpha 7$. En este sentido, durante el desarrollo de la parte experimental de esta Tesis Doctoral tuvimos ocasión de llevar a cabo una colaboración científica con los laboratorios Johnson & Johnson (Beerse, Bélgica), orientada a la caracterización del efecto sobre la neurotransmisión GABAérgica de nuevos fármacos moduladores alostéricos de receptores nicotínicos $\alpha 7$. Expondremos a continuación un ejemplo representativo de este tipo de experimentos de investigación aplicada.

3.1.-Modificaciones metodológicas para la selección de las corrientes GABAérgicas

Si bien nuestros datos obtenidos en los cultivos de neuronas de hipocampo apoyan la idea de que la modulación inducida por la colina está relacionada principalmente con la neurotransmisión GABAérgica, hemos sido conscientes de dos limitaciones de los protocolos experimentales hasta ahora desarrollados.

En primer lugar, los protocolos experimentales utilizados hasta ahora nos permiten el registro simultáneo de corrientes glutamatérgicas y GABAérgicas. Por ello nos propusimos buscar las condiciones experimentales que nos permitiesen registrar principalmente, ó únicamente, las corrientes GABAérgicas pero prescindiendo de herramientas farmacológicas (bloqueantes de los receptores de glutamato), al haber observado que los bloqueantes actualmente disponibles producen cierto grado de bloqueo de los receptores nicotínicos (Demuro *et al.*, 2001; Hilmas *et al.*, 2001).

En segundo lugar, la actividad nicotínica intrínseca presente en algunas de las células estudiadas, puede dificultar el registro de la actividad postsináptica GABAérgica. Por ello nos planteamos buscar unas condiciones experimentales que minimicen la contribución de dicha corriente nicotínica endógena.

Como estrategia experimental se nos ocurrió la posibilidad de modificar el potencial de fijación de las neuronas desde -80 mV a 0 mV, en un intento de modificar el sentido de las corrientes GABAérgicas (al trabajar por encima del potencial de equilibrio del cloruro) (Figura 41).

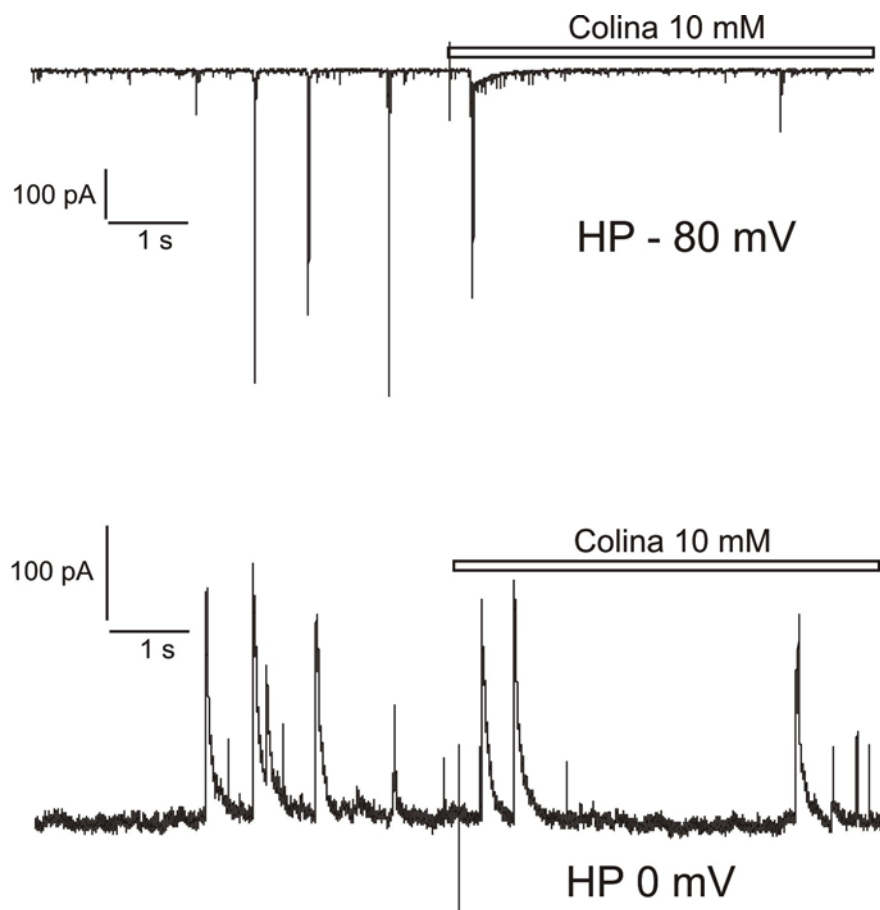


Figura 41. Efectos de la colina (10 mM) sobre la liberación de neurotransmisores en neuronas de hipocampo en cultivo. El panel superior muestra las corrientes de entrada (glutamatérgicas y GABAérgicas) registradas a HP -80 mV. El panel inferior muestra las corrientes de salida (GABAérgicas) registradas a HP 0 mV.

Como se muestra en la figura 41, con un HP de -80 mV sólo se registran corrientes de entrada (tanto espontáneas como en respuesta a la aplicación de un pulso de 10 mM de colina), correspondiendo éstas a la respuesta inducida tanto por vía glutamatérgica como GABAérgica; mientras que al cambiar el HP a 0 mV, tan solo observamos corrientes de salida, correspondientes únicamente a las corrientes de tipo GABAérgico. Estas corrientes de salida se bloquean parcialmente por bicuculina

(Figura 42), confirmando la naturaleza GABAérgica de las mismas. El hecho de que no se haya producido un bloqueo completo por la bicuculina podría explicarse por una posible dependencia del voltaje para el bloqueo por bicuculina (siendo este bloqueo menos efectivo cuando se utilizan potenciales de fijación más positivos) (Demuro et al., 2001). Por otro lado, el registro de dichas corrientes de salida a potenciales positivos no se ve afectado por la aplicación de ácido kinurénico (datos no mostrados).

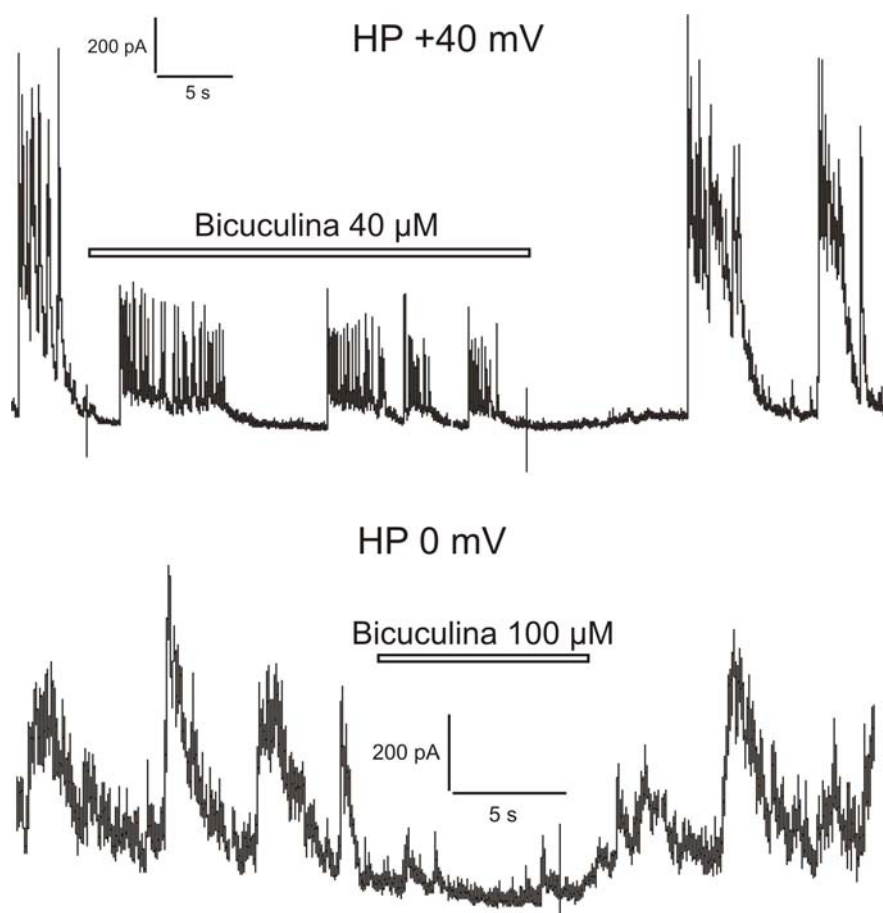


Figura 42. Bloqueo producido por bicuculina sobre las corrientes de salida (GABAérgicas) en neuronas de hipocampo en cultivo. Parte superior: la bicuculina (40 μM) se aplicó durante el tiempo indicado. Como se muestra, el efecto del bloqueo por bicuculina fue reversible una vez se lavó el compuesto. HP +40 mV. **Parte inferior:** efectos de la bicuculina (100 μM) sobre la liberación de neurotransmisores en neuronas de hipocampo en cultivo. HP 0 mV. Los experimentos se realizaron en presencia de 2 mM de calcio extracelular.

3.2.-Modulación nicotínica de la transmisión sináptica GABAérgica por nuevos moduladores alostéricos del receptor nicotínico.

Este nuevo protocolo experimental, en cultivo de neuronas de hipocampo de rata, lo hemos utilizado para caracterizar el posible papel como moduladores alostéricos de diversas moléculas sintetizadas por los laboratorios Johnson y Johnson. Los problemas derivados de la confidencialidad de los datos nos impiden mostrar los resultados obtenidos con todas las moléculas estudiadas, por lo que procederemos a mostrar tan solo los datos obtenidos con la molécula que fue comercializada con el nombre de PNU120596 (Hurst *et al.*, 2005). La figura 43 muestra un ejemplo representativo de esta serie de experimentos.

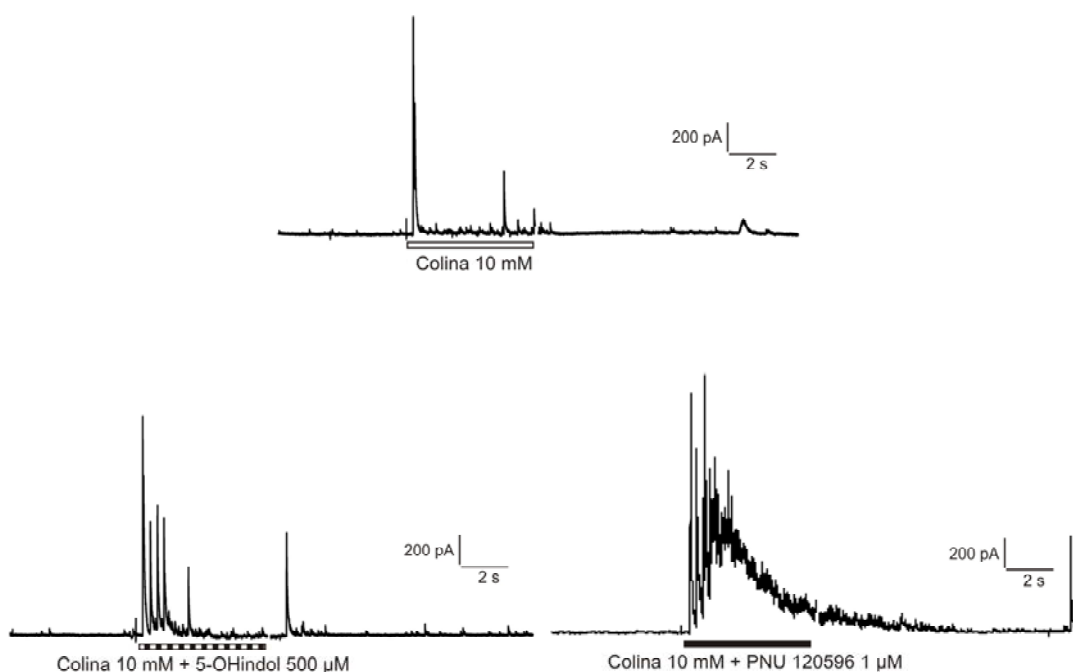


Figura 43. Potenciación de la transmisión sináptica GABAérgica por 5-OH-indol y PNU120596. La figura muestra tres registros de actividad sináptica inducida por la aplicación de un pulso de colina (10 mM; panel superior), la coaplicación de colina y 5-OH-indol (500 μM) y la coaplicación de colina y PNU120596 (1 μM). HP 0 mV.

Como puede apreciarse en la figura 43, la aplicación de un pulso de colina (10 mM) produjo un pequeño incremento en la transmisión sináptica GABAérgica (registrada como corrientes de salida cuando se aplica un HP de 0 mV y una solución intracelular carente de iones Cl^-), que se ve moderadamente potenciado cuando la colina se coaplica junto al modulador alostérico 5-OH-indol (500 μM). Cuando a esta preparación se le aplicó un pulso de colina junto con PNU120596, se observó una marcada potenciación de la respuesta GABAérgica, siendo esta potenciación superior a la observada con el 5-OH-indol. En la figura 44 se representan los datos cuantitativos obtenidos tras la superfusion de las neuronas con PNU120596 (1 μM) y 5-OH-indol (500 μM) en coaplicación con colina (10 mM; 5 s), pudiéndose observar el marcado incremento de la actividad sináptica tras la perfusión de los compuestos durante 1 min. El efecto potenciador del compuesto PNU120596 es rápidamente reversible, como muestra el pulso de colina aplicado tras el lavado, en el cual ya no se observa casi potenciación.

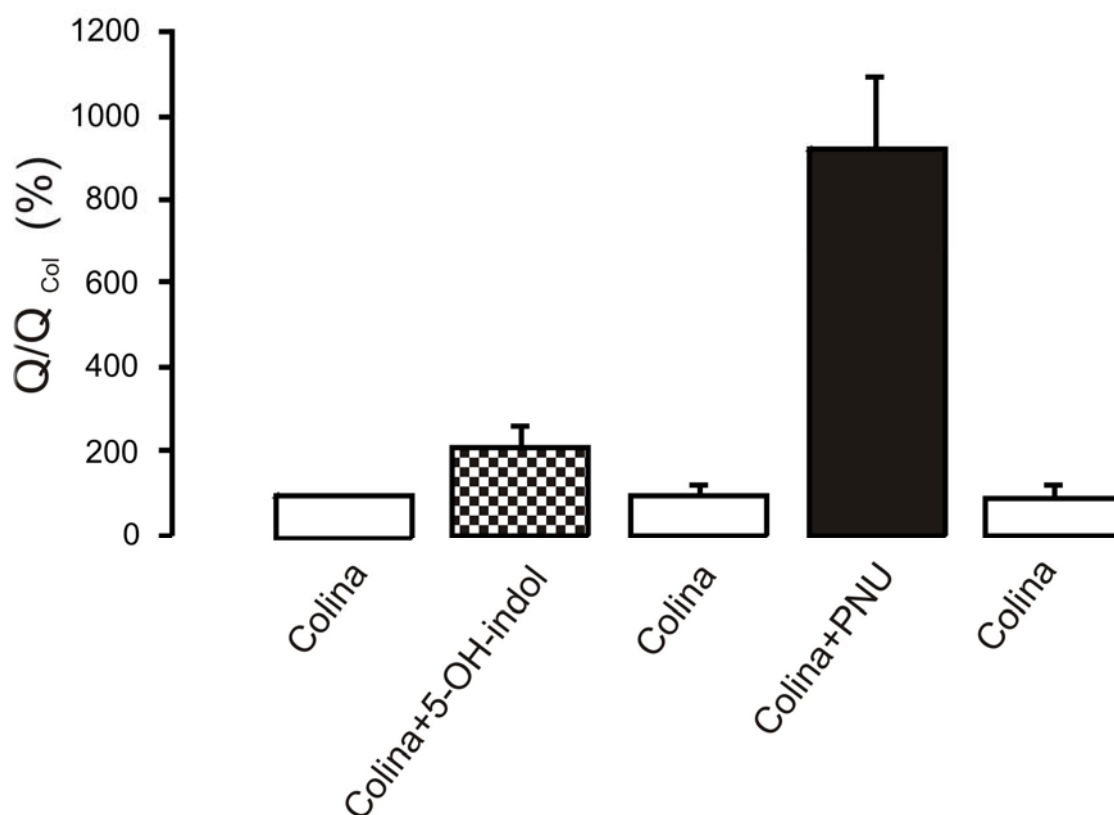


Figura 44. Potenciación de la transmisión sináptica GABAérgica por 5-OH-indol (500 μM) y PNU120596 (1 μM) aplicados en superfusion continua. La figura representa el área de la corriente GABAérgica registrada en las condiciones experimentales indicadas, normalizada con respecto a la obtenida tras la aplicación del primer pulso de colina (10 mM). HP 0 mV; n=7.

DISCUSIÓN

La presente Tesis está basada en dos de las líneas de investigación que actualmente se desarrollan en el ITH, a saber, la regulación de la liberación de neurotransmisores y la modulación producida por el receptor nicotínico neuronal sobre esta liberación.

Con respecto a los posibles mecanismos implicados en la modulación nicotínica de la exocitosis de neurotransmisores, se sabe que la activación de los receptores nicotínicos por su agonista fisiológico, la acetilcolina, favorece la apertura del canal iónico del receptor, permitiendo el paso de cationes a su través (principalmente una entrada de Na^+ y minoritariamente entrada de Ca^{2+}). La entrada masiva de Na^+ a la célula a través de los receptores nicotínicos va a provocar la despolarización de la misma, conduciendo en última instancia a la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) (Figura 2) por los que entrará masivamente el Ca^{2+} que servirá como señal para disparar el proceso secretor.

En este punto, debemos destacar que algunos subtipos de receptores nicotínicos presentan una marcada permeabilidad al Ca^{2+} , particularmente los que contienen subunidades $\alpha 7$. Esta elevada permeabilidad al Ca^{2+} puede tener importantes consecuencias funcionales, ya que podría ser suficiente para disparar *per se* el proceso secretor o, como veremos en esta Tesis Doctoral, para modular el mismo.

Esta Tesis Doctoral contiene un estudio de la modulación por receptores nicotínicos neuronales de la neurotransmisión. Para ello, se han utilizado dos modelos experimentales, a saber:

- 1.- **Células cromafines bovinas en cultivo primario:** en este modelo celular los nAChR ejercen un papel de receptor postsináptico, interviniendo en la génesis y en la modulación del proceso secretor de catecolaminas.
- 2.- **Cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata embrionaria:** en este modelo experimental coexisten diferentes tipos neuronales que establecen interconexiones entre sí, contando con receptores nicotínicos presinápticos y/o axonales, que ejercen un papel modulador de la liberación de GABA y/o glutamato, con respuestas postsinápticas complejas.

Discutiremos a continuación los principales hallazgos que hemos obtenido al estudiar la modulación de la secreción de neurotransmisores en estos dos modelos experimentales, y su significado fisiológico.

1.-MODULACION POR RECEPTORES NICOTÍNICOS DE LA LIBERACIÓN DE CATECOLAMINAS ADRENOMEDULARES

En la célula cromafín de la médula adrenal, el proceso que se lleva a cabo desde el estímulo hasta la secreción incluye la despolarización provocada por la ACh (Douglas *et al.*, 1967), capaz de generar el disparo de potenciales de acción (Brandt *et al.*, 1976), que van a conducir a la apertura de distintos subtipos de CCDV (García *et al.*, 2006), con lo que se produce una entrada masiva de Ca^{2+} (Douglas y Rubin, 1961b), y el consiguiente incremento de las concentraciones de Ca^{2+} libre en el citosol ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) (Baker y Knight, 1978), que activa la maquinaria exocitótica (Neher, 1998) liberándose las catecolaminas al medio extracelular. En ausencia de despolarización de la membrana, el Ca^{2+} que entra a través de los nAChRs es también capaz de producir exocitosis en la célula cromafín de gato (Douglas y Rubin, 1963) y bovino (Gandía *et al.*, 1991; Mollard *et al.*, 1995), así como en células PC12 (Harkins y Fox, 1998). Esto se ha interpretado como una entrada de Ca^{2+} a través de dos vías las cuales contribuyen, indistinta e igualmente, al proceso de exocitosis en la célula cromafín.

Contrariamente a ésta visión, los experimentos realizados en células cromafines de la médula adrenal de bovino que se presentan en esta Tesis Doctoral, sugieren distintas funciones fisiológicas para el Ca^{2+} que entra a través de receptores nicotínicos y el Ca^{2+} que entra a través de los CCDV tras una despolarización producida por ACh.

1.1.-La estimulación nicotínica reduce la I_{Ca} y potencia la exocitosis

Para valorar los efectos de la estimulación nicotínica sobre el proceso exocitótico de catecolaminas utilizamos un protocolo experimental consistente en la estimulación de la exocitosis mediante la aplicación de un pulso despolarizante (100 ms de duración, a un potencial de 0mV, desde un HP de -80 mV). Este pulso despolarizante produjo una corriente de entrada de Ca^{2+} en la célula con un máximo de intensidad de 402 ± 18 pA, con una entrada de carga total en la célula de $27,3 \pm 1,3$ pC. Esta entrada de Ca^{2+} en la célula cromafín produjo una exocitosis de catecolaminas que fue cuantificada en forma de variación en la capacidad eléctrica de la membrana, alcanzándose valores medios de $34,8 \pm 4,7$ fF.

Cuando la aplicación del pulso despolarizante estuvo precedida por la aplicación de un pulso de ACh (100 μM , 10 s), se observó que este prepulso de ACh redujo la

magnitud de la I_{Ca} producida por el pulso despolarizante. La I_{Ca} recuperó los valores iniciales en respuesta a la aplicación de un nuevo pulso despolarizante (PD3 en Fig. 23), lo que indica que el efecto modulador producido por la ACh tiene un carácter reversible. En lo que respecta al efecto del prepulso de ACh sobre la exocitosis de catecolaminas, como puede apreciarse en la figura 23C se produjo un mayor ΔC_m tras la aplicación del prepulso, efecto que también fue reversible, alcanzándose valores similares a los obtenidos en el primer pulso despolarizante control al aplicar un tercer pulso despolarizante en ausencia de prepulso con ACh.

Un efecto modulador similar al descrito en esta Tesis Doctoral había sido descrito previamente por Klepper *et al.* (1990). En este estudio previo, la I_{Ca} , en células cromafín bovinas, se bloqueó por ACh un 30% asociándose dicho bloqueo al receptor nicotínico. A pesar de que estos autores no estudiaron la exocitosis, sí que sugirieron que la inhibición de la I_{Ca} mediante la ACh podría actuar como un sistema de retroalimentación negativo en la secreción de catecolaminas. Es interesante que al igual que Klepper *et al.*, nosotros vemos también un bloqueo del 30% en la I_{Ca} por el prepulso de ACh que contrariamente a lo que cabría esperar, produjo un incremento en la exocitosis de 4,5 veces respecto a la producida por el pulso despolarizante control, lo que nos sugiere que el aumento en la liberación de catecolaminas no se debió al aumento de la entrada de calcio a través de los CCDV abiertos mediante el pulso despolarizante ya que la entrada de calcio a través de ellos se encontraba reducida.

1.2.-La potenciación de la exocitosis depende de la entrada de Ca^{2+} por el receptor nicotínico

Con respecto al posible mecanismo implicado en este efecto modulador de la exocitosis de catecolaminas, en un estudio realizado por Zhou y Neher (1993) en células cromafines bovinas en las que se fijó el voltaje y se perfundieron con una solución conteniendo 2 mM de Ca^{2+} , se observó que aproximadamente el 97,5% de la corriente total de entrada producida por pulsos de ACh correspondía a la entrada de Na^+ , y que tan solo el 2,5% correspondía a la entrada de Ca^{2+} ; dichas corrientes producidas por ACh produjeron pequeños incrementos de la $[Ca^{2+}]_c$ de 50 nM.

Aunque esto podría parecer poco, a nivel del subplasmalema se podrían alcanzar concentraciones mayores, lo que podría explicar el doble efecto de los prepulsos de

ACh en nuestros experimentos: (i) 30% de bloqueo de I_{Ca} , el cual puede deberse a la inactivación dependiente de calcio de los CCDV (Hernández-Guijo *et al.*, 2001) por su dependencia de la concentración del calcio citosólico; y (ii) la lenta liberación de catecolaminas producida durante el prepulso de ACh (Figura 24).

1.3.-Un modelo que explica el papel dual de la acetilcolina

Mollard *et al.* (1995) observaron que la perfusión rápida durante 200 ms de concentraciones altas de nicotina (50-200 μ M) producía un marcado incremento en la medida de la capacidad de la membrana, equivalente a la liberación de unas 200 vesículas; mientras que un tren de 10 pulsos despolarizantes desde un HP de -90 mV hasta un potencial test de +20 mV produjo la secreción de 500 vesículas (1000 fF). Los autores de este estudio concluían que “*la activación de los receptores nicotínicos producía la exocitosis por medio de una vía adicional a los CCDV la cual coexistía con esta última*”. A una conclusión similar llegaron también Gandía *et al.* (1991), en células cromafines bovinas y lo mismo les ocurrió a Harkins y Fox en células PC12 (Harkins y Fox, 1998).

Los protocolos usados en nuestro estudio difieren drásticamente de los usados en estos tres estudios precedentes. Así, nosotros hemos seleccionado una concentración media del neurotransmisor fisiológico ACh, y lo aplicamos durante un prepulso de larga duración, con el fin de separar claramente la respuesta asociada a los receptores nicotínicos (los cuales en nuestras condiciones experimentales produjeron una respuesta lenta y pequeña; ver figura 24) en contraste con la producida por los pulsos despolarizantes (que con nuestras condiciones experimentales fue rápida y mayor que la anterior).

Creemos que con nuestras condiciones de estimulación de los receptores nicotínicos (intensidad media pero prolongada en el tiempo), en comparación con las publicaciones anteriormente citadas (en las que la estimulación de los receptores nicotínicos era breve pero más intensa), nos permiten diferenciar dos procesos diferentes por los que la ACh induce o regula la liberación de catecolaminas por las células cromafines adrenomedulares (Figura 45).

Así, existiría una primera vía (vía “1” en figura 45), por la que una pequeña y lenta entrada de Ca^{2+} a través de los receptores nicotínicos va a producir pequeñas

elevaciones (en un rango nanomolar) de la $[Ca^{2+}]_c$, que van a servir principalmente para movilizar las vesículas secretoras hacia la proximidad del subplasmalema, sin que se llegue a producir una exocitosis rápida de dichas vesículas. Este paso podría ocurrir fisiológicamente a frecuencias bajas de estimulación del nervio esplácnico (0,2 Hz), que se producen en condiciones de reposo y podría desempeñar una doble función fisiológica, causando un pequeño incremento en la liberación basal de catecolaminas (como observamos experimentalmente durante los prepulsos con ACh), y, adicionalmente, preparando la maquinaria secretora con suficientes vesículas para el paso 2, que ocurriría durante situaciones de estrés.

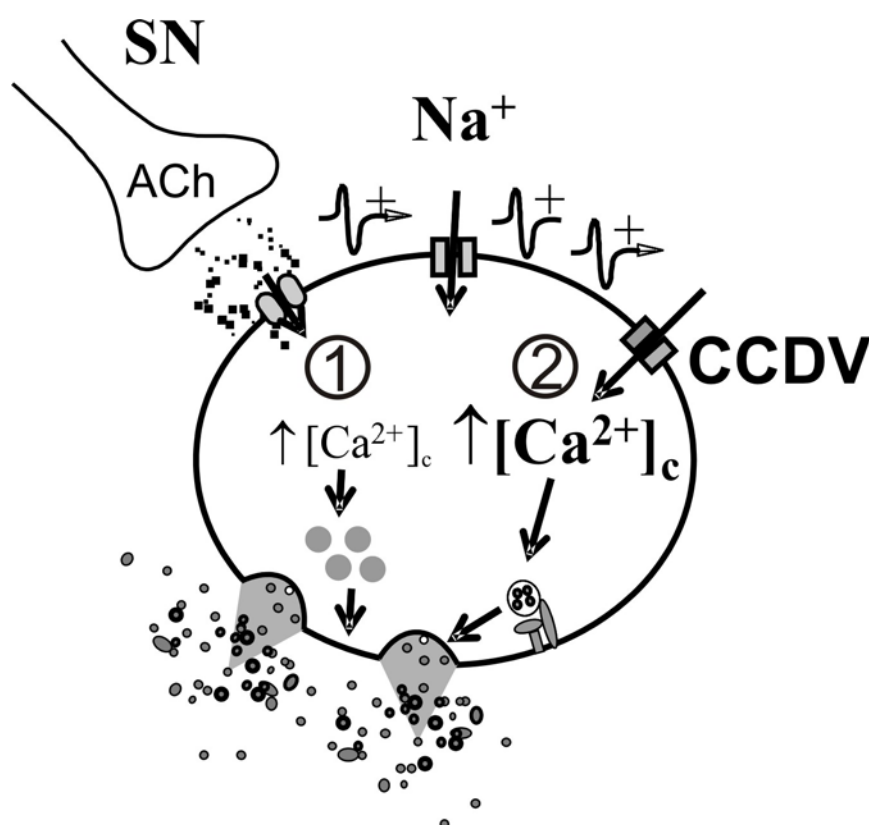


Figura 45. Modelo que explicaría el doble papel de la acetilcolina en el disparo y regulación de la liberación de catecolaminas por las células cromafines bovinas. La pequeña entrada de Ca^{2+} a través de los receptores nicotínicos serviría para (1) aproximar vesículas al subplasmalema, lo que permitiría una mayor secreción de catecolaminas ante la mayor secreción de catecolaminas ante la activación de los receptores nicotínicos por altas concentraciones de ACh durante situaciones de estrés (2). Ver texto para más detalles.

La segunda vía (vía “2” en figura 45) se activaría en respuesta a una estimulación nerviosa de alta frecuencia por parte del nervio esplácnico (5-30 Hz),

produciéndose de esta manera una gran liberación de ACh, lo que conlleva la despolarización de la célula cromafín y la entrada masiva de Ca^{2+} a través de los CCDV, y como última consecuencia la liberación masiva de catecolaminas al medio extracelular.

Nosotros pensamos que ésta constituye una interpretación novedosa para la clásica observación de Douglas y Rubin (Douglas y Rubin, 1961a) sobre el papel del Ca^{2+} que entra a través de los receptores nicotínicos y su implicación en la regulación de la exocitosis. También creemos que éste modelo en dos vías nos puede aportar nuevas ideas y experimentos con el fin de esclarecer la función reguladora de los receptores nicotínicos en la transmisión sináptica, particularmente la del subtipo $\alpha 7$.

2.- MODULACIÓN DE LA NEUROTRANSMISIÓN EN CULTIVOS DE NEURONAS DE HIPOCAMPO DE RATA

En este estudio hemos utilizado la configuración de célula entera de la técnica de “patch clamp” para evaluar los efectos de la activación de los receptores nicotínicos neuronales sobre la transmisión sináptica. Hemos utilizado neuronas de hipocampo obtenidas de embriones de rata de aproximadamente 14 días de cultivo, los cuales expresaban ya una mayor densidad de los receptores $\alpha 7$ con respecto a las neuronas de cultivos de 1-7 días (figura 31).

Nos hemos centrado en el estudio del efecto producido por colina porque a pesar de que se han identificado tres subtipos diferentes de receptores nicotínicos en el hipocampo (Alkondon y Albuquerque, 2004), el receptor $\alpha 7$ parece ser el subtipo que se encuentra más ampliamente distribuido (McQuiston y Madison, 1999).

2.1.-La activación de los receptores $\alpha 7$ aumenta la liberación de GABA

En nuestros experimentos hemos observado que la activación de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ con colina (1-10 mM) produce un aumento tanto de la frecuencia como de la amplitud de las CPS en neuronas de hipocampo en cultivo.

A pesar de que se ha descrito que la activación de los receptores muscarínicos aumenta la liberación de GABA (Pitler y Alger, 1992), en nuestros resultados no han

influido los receptores muscarínicos ya que hemos empleado colina, un agonista selectivo de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ (Pereira *et al.*, 2002).

El efecto potenciador de la transmisión sináptica se bloqueó por bicuculina pero no por el ácido kinurénico, lo que nos sugiere un efecto selectivo de la colina sobre las sinapsis GABAérgicas. Estos resultados estarían de acuerdo con un estudio en el que tan solo se registran corrientes en respuesta a ACh en interneuronas de tipo GABAérgico, así como con los resultados obtenidos de estudios inmunohistoquímicos en los cuales se veía una co-localización selectiva de los receptores $\alpha 7$ en neuronas de hipocampo GABAérgicas (Kawai *et al.*, 2002), pero no en células piramidales (Frazier *et al.*, 1998b).

El incremento en la transmisión sináptica GABAérgica producido por la activación de los receptores $\alpha 7$, se bloqueó reversiblemente con MLA, y se incrementó drásticamente (7-8 veces) cuando la colina se co-aplicó con el modulador alostérico del receptor $\alpha 7$ 5-OH-indol. Estos datos apoyarían la participación del receptor $\alpha 7$ en la modulación de la actividad GABAérgica.

Existen actualmente ciertas controversias sobre el papel que pueden desempeñar los diferentes subtipos de receptores nicotínicos en la regulación de la transmisión sináptica a nivel del hipocampo. Así, se ha descrito que los receptores nicotínicos $\alpha 3\beta 4$ regulan la transmisión glutamatérgica en interneuronas de CA1 en rodajas de hipocampo de rata, descartándose la implicación de los receptores $\alpha 4\beta 2$ (Alkondon y Albuquerque, 2004). Por otro lado se ha demostrado la participación de los receptores $\alpha 7$ en la modulación de eCPS en neuronas de piramidales de hipocampo (Gray *et al.*, 1996; Ji *et al.*, 2001), lo que contrasta con nuestros resultados, que demuestran que estos efectos se ejercen sólo sobre las sinapsis GABAérgicas y que estarían de acuerdo con experimentos previos en rodajas de hipocampo donde el efecto de nicotina sobre las conexiones aferentes del estrato lacunoso se bloqueó mediante antagonistas GABAérgicos (Giocomo y Hasselmo, 2005). Otros estudios apuntan que la liberación de GABA sensible a TTX por parte de interneuronas del área CA1 y en cultivos de neuronas de hipocampo está facilitada por la activación de los receptores $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$, pero que la liberación de GABA producida en respuesta a la estimulación eléctrica de campo se inhibe por ambos subtipos de receptores nicotínicos (Albuquerque *et al.*, 1998).

2.2.-Ubicación presináptica y/o axonal de los receptores $\alpha 7$

La adición de TTX suprimió el efecto producido por colina (figura 36), lo que indica que los receptores $\alpha 7$ no se encuentran estrictamente localizados en las terminaciones presinápticas sino en el cuerpo celular o el axón, y que se requiere el disparo de potenciales de acción, o una despolarización local dependiente de canales de Na^+ , para producir el efecto modulador observado sobre la transmisión sináptica. De esta forma, los receptores $\alpha 7$ proporcionan un mecanismo mediante el cual la activación de unos pocos receptores nicotínicos podría alterar la excitabilidad de las neuronas del hipocampo.

La presencia de los receptores $\alpha 7$ podría aportar ciertas ventajas dada su alta permeabilidad relativa al Ca^{2+} en un eventual acoplamiento directo entre dichos receptores y la maquinaria exocitótica. Sin embargo, en éste y otros estudios se ha visto que generalmente, los receptores nicotínicos intervienen indirectamente en la liberación de neurotransmisores mediante un proceso dependiente de Na^+ que se redujo drásticamente mediante TTX, Cd^{2+} y bloqueantes de CCDV (Soliakov y Wonnacott, 1996).

2.3.-Supresión “paradójica” de la actividad sináptica en el hipocampo por estimulación de los receptores nicotínicos

Algunas interneuronas inhiben potentemente a las células piramidales; sin embargo, las interneuronas comprenden distintos grupos con una amplia variedad de sinapsis especializadas que varían según las neuronas implicadas (McQuiston y Madison, 1999). Así, la activación de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ puede producir tanto una inhibición como una desinhibición de la actividad sináptica además de producir efectos divergentes en la plasticidad sináptica (Fujii *et al.*, 2000; Ji y Dani, 2000).

Durante el desarrollo experimental de la presente Tesis hemos encontrado un pequeño número de neuronas (aproximadamente en el 7% de las neuronas estudiadas) que mostraban una alta actividad espontánea y en las que el efecto de los pulsos de colina fue una reducción drástica de las eCPS (figura 40). Esta disminución en la actividad fue mayor cuando se co-aplicó la colina con el 5-OH-indol (500 μM), confirmando la implicación del receptor $\alpha 7$ en este efecto inhibitorio de la actividad sináptica.

En este sentido, parece que la activación de los receptores $\alpha 7$ podría dar como resultado la supresión de la transmisión sináptica debido a la potenciación de la transmisión GABAérgica en interneuronas que establecerían sinapsis con otras interneuronas (Acsady *et al.*, 1996). En rodajas de hipocampo se han obtenido datos similares (Ji y Dani, 2000).

3.-EL CULTIVO DE NEURONAS DE HIPOCAMPO COMO MODELO PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS LIGANDOS NICOTÍNICOS

Como se ha comentado anteriormente, los receptores nicotínicos están siendo considerados como potenciales dianas terapéuticas en el tratamiento de diversas enfermedades neurológicas en las que se encuentra alterada la función del sistema colinérgico, entre otras la enfermedad de Alzheimer, la demencia con cuerpos de Levy, la enfermedad del Parkinson, la epilepsia o la esquizofrenia.

Las distintas estrategias farmacológicas tendentes a incrementar la transmisión nicotínica a nivel del SNC incluyen el desarrollo de nuevos agonistas selectivos y de moduladores alostéricos que actúen produciendo una potenciación de los efectos de la acetilcolina. El desarrollo de estos nuevos ligandos nicotínicos requiere de un adecuado banco de pruebas en el que estudiar sus efectos sobre la neurotransmisión a nivel del SNC

Nosotros hemos demostrado que el cultivo de neuronas de hipocampo de rata puede constituir un adecuado modelo experimental para la caracterización de nuevos ligandos nicotínicos. Utilizando condiciones experimentales basadas en la eliminación de los iones Cl^- en la solución intracelular y la aplicación de un HP de 0 mV, hemos disecado las corrientes GABAérgicas sin necesidad de recurrir a otras herramientas farmacológicas que pudieran interferir con la actividad de los receptores nicotínicos.

Estas condiciones experimentales nos han servido para caracterizar el perfil farmacológico del nuevo potenciador alostérico PNU120596 (Hurst *et al.*, 2005). Este nuevo agente se muestra más eficaz que el modulador utilizado como control, el 5-OH-indol (figuras 43 y 44).

Experimentos similares se han realizado con otros productos facilitados por Jonson & Jonson, lo que nos han permitido concluir que este nuevo grupo de moduladores alostéricos pueden actuar potenciando marcadamente la neurotransmisión

GABAérgica de tipo inhibitor, lo que les convertiría en potenciales herramientas farmacológicas para el tratamiento de enfermedades tales como la esquizofrenia y/o la epilepsia en las que se requiere incrementar la neurotransmisión inhibitora para contrarrestar una excesiva estimulación de determinadas áreas cerebrales.

CONCLUSIONES

De los resultados de este trabajo y de su análisis y discusión, nos permitimos extraer las siguientes conclusiones:

1.- La activación de los receptores nicotínicos de tipo postsináptico presentes en la membrana de la célula cromafín adrenomedular ejerce una doble función:

1.1.-La pequeña entrada de iones Ca^{2+} a través de estos receptores sirve para aproximar vesículas secretoras al subplasmalema

1.2.-La entrada mayoritaria de Na^+ a través de estos receptores sirve para despolarizar la membrana plasmática, conduciendo a la apertura de CCDV, y la consiguiente entrada de Ca^{2+} a su través dispara el proceso secretor de catecolaminas.

Creemos que estas conclusiones son relevantes desde un punto de vista fisiológico, para conocer los delicados mecanismos que modulan la neurotransmisión en las sinapsis esplácnico-célula cromafín en situaciones de estrés.

2.- La actividad postsináptica debida a la liberación de GABA desde interneuronas del hipocampo está regulada por la activación de receptores nicotínicos del subtipo $\alpha 7$.

3.- Los receptores $\alpha 7$ que regulan la neurotransmisión a nivel del hipocampo están situados a nivel presináptico y/o axonal.

4.- En función de su ubicación, la activación de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ también pueden inhibir la actividad postsináptica a nivel del hipocampo.

5.- Los estudios electrofisiológicos en cultivos de hipocampo de rata constituyen un excelente modelo para la caracterización de nuevos ligandos nicotínicos (agonistas y/o moduladores alostéricos) con capacidad para modular la liberación de GABA, con proyección terapéutica en la enfermedad de Alzheimer, en la enfermedad de Parkinson o en la esquizofrenia.

BIBLIOGRAFÍA

- ACSADY, L., GORCS, T.J. & FREUND, T.F. (1996). Different populations of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons are specialized to control pyramidal cells or interneurons in the hippocampus. *Neuroscience*, **73**, 317-334.
- ADAMS, C.E., BROIDE, R.S., CHEN, Y., WINZER-SERHAN, U.H., HENDERSON, T.A., LESLIE, F.M. & FREEDMAN, R. (2002). Development of the alpha7 nicotinic cholinergic receptor in rat hippocampal formation. *Brain Res Dev Brain Res*, **139**, 175-187.
- ADAMS, C.E., STITZEL, J.A., COLLINS, A.C. & FREEDMAN, R. (2001). Alpha7-nicotinic receptor expression and the anatomical organization of hippocampal interneurons. *Brain Res*, **922**, 180-190.
- ALBUQUERQUE, E.X., PEREIRA, E.F., BRAGA, M.F. & ALKONDON, M. (1998). Contribution of nicotinic receptors to the function of synapses in the central nervous system: the action of choline as a selective agonist of alpha 7 receptors. *J Physiol Paris*, **92**, 309-316.
- ALKONDON, M. & ALBUQUERQUE, E.X. (2004). The nicotinic acetylcholine receptor subtypes and their function in the hippocampus and cerebral cortex. *Prog Brain Res*, **145**, 109-120.
- ALKONDON, M., PEREIRA, E.F. & ALBUQUERQUE, E.X. (1998). alpha-bungarotoxin- and methyllycaconitine-sensitive nicotinic receptors mediate fast synaptic transmission in interneurons of rat hippocampal slices. *Brain Res*, **810**, 257-263.
- ALKONDON, M., PEREIRA, E.F., BARBOSA, C.T. & ALBUQUERQUE, E.X. (1997a). Neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation modulates gamma-aminobutyric acid release from CA1 neurons of rat hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther*, **283**, 1396-1411.
- ALKONDON, M., PEREIRA, E.F., CORTES, W.S., MAELICKE, A. & ALBUQUERQUE, E.X. (1997b). Choline is a selective agonist of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Eur J Neurosci*, **9**, 2734-2742.
- ALKONDON, M., PEREIRA, E.F., EISENBERG, H.M. & ALBUQUERQUE, E.X. (1999). Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *J Neurosci*, **19**, 2693-2705.
- BAKER, P.F. & KNIGHT, D.E. (1978). Calcium-dependent exocytosis in bovine adrenal medullary cells with leaky plasma membranes. *Nature*, **276**, 620-622.
- BRANDT, B.L., HAGIWARA, S., KIDOKORO, Y. & MIYAZAKI, S. (1976). Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *J Physiol*, **263**, 417-439.
- CAMPOS-CARO, A., SMILLIE, F.I., DOMÍNGUEZ DEL TORO, E., ROVIRA, J.C., VICENTE-AGULLÓ, F., CHAPULI, J., JUIZ, J.M., SALA, S., SALA, F., BALLESTA, J.J. & CRIADO, M. (1997). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors on bovine chromaffin cells: cloning, expression, and genomic organization of receptor subunits. *J Neurochem*, **68**, 488-497.
- CANO-ABAD, M.F., GARCÍA, A.G., SÁNCHEZ-GARCÍA, P. & LÓPEZ, M.G. (2000). Ba²⁺-induced chromaffin cell death: cytoprotection by Ca²⁺ channel antagonists. *Eur J Pharmacol*, **402**, 19-29.
- CANO-ABAD, M.F., VILLARROYA, M., GARCÍA, A.G., GABILÁN, N. & LÓPEZ, M.G. (2002). Contribution of calcium entry through L-type calcium channels to chromaffin cell death. *Ann N Y Acad Sci*, **971**, 171-173.

- CANO-ABAD, M.F., VILLARROYA, M., GARCÍA, A.G., GABILÁN, N.H. & LÓPEZ, M.G. (2001). Calcium entry through L-type calcium channels causes mitochondrial disruption and chromaffin cell death. *J Biol Chem*, **276**, 39695-39704.
- CARMICHAEL, S.W. & WINKLER, H. (1985). The adrenal chromaffin cell. *Sci Am*, **253**, 40-49.
- CRIADO, M., ÁLAMO, L. & NAVARRO, A. (1992). Primary structure of an agonist binding subunit of the nicotinic acetylcholine receptor from bovine adrenal chromaffin cells. *Neurochem Res*, **17**, 281-287.
- CHANGEUX, J.P., GALZI, J.L., DEVILLERS-THIERY, A. & BERTRAND, D. (1992). The functional architecture of the acetylcholine nicotinic receptor explored by affinity labelling and site-directed mutagenesis. *Q Rev Biophys*, **25**, 395-432.
- DAJAS-BAILADOR, F. & WONNACOTT, S. (2004). Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci*, **25**, 317-324.
- DANI, J.A. (2001). Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol Psychiatry*, **49**, 166-174.
- DANI, J.A. & BERTRAND, D. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **47**, 699-729.
- DEMURO, A., PALMA, E., EUSEBI, F. & MILEDI, R. (2001). Inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by bicuculline. *Neuropharmacology*, **41**, 854-861.
- DOUGLAS, W.W., KANNO, T. & SAMPSON, S.R. (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, W.W. & RUBIN, R.P. (1961a). Mechanism of nicotinic action at the adrenal medulla: calcium as a link in stimulus-secretion coupling. *Nature*, **192**, 1087-1089.
- DOUGLAS, W.W. & RUBIN, R.P. (1961b). The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J Physiol*, **159**, 40-57.
- DOUGLAS, W.W. & RUBIN, R.P. (1963). The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling. *J Physiol*, **167**, 288-310.
- EGEA, J., ROSA, A.O., SOBRADO, M., GANDÍA, L., LÓPEZ, M.G. & GARCÍA, A.G. (2007). Neuroprotection afforded by nicotine against oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices is lost in alpha7 nicotinic receptor knockout mice. *Neuroscience*, **145**, 866-872.
- EULER, U.S.V. (1972). Synthesis, uptake and storage of catecholamines in adrenergic nerves. The effect of drugs. *Hand. Exp. Pharmacol.*, **33**, 186-230.
- FISHER, S.K., HOLZ, R.W. & AGRANOFF, B.W. (1981). Muscarinic receptors in chromaffin cell cultures mediate enhanced phospholipid labeling but not catecholamine secretion. *J Neurochem*, **37**, 491-497.
- FRAZIER, C.J., BUHLER, A.V., WEINER, J.L. & DUNWIDDIE, T.V. (1998a). Synaptic potentials mediated via alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal interneurons. *J Neurosci*, **18**, 8228-8235.
- FRAZIER, C.J., ROLLINS, Y.D., BREESE, C.R., LEONARD, S., FREEDMAN, R. & DUNWIDDIE, T.V. (1998b). Acetylcholine activates an alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic current in rat hippocampal interneurons, but not pyramidal cells. *J Neurosci*, **18**, 1187-1195.

- FREEDMAN, R., WETMORE, C., STROMBERG, I., LEONARD, S. & OLSON, L. (1993). Alpha-bungarotoxin binding to hippocampal interneurons: immunocytochemical characterization and effects on growth factor expression. *J Neurosci*, **13**, 1965-1975.
- FREUND, T.F. & BUZSAKI, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, **6**, 347-470.
- FUENTEALBA, J. (2004). Señales de calcio y de exocitosis generadas por acetilcolina, colina y potasio, en la célula cromafín. *Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid*.
- FUJII, S., JIA, Y., YANG, A. & SUMIKAWA, K. (2000). Nicotine reverses GABAergic inhibition of long-term potentiation induction in the hippocampal CA1 region. *Brain Res*, **863**, 259-265.
- FUJITA, T., KANNO, T. & KOBAYASHI, S. (1988). Adrenal chromaffin cells. In *The paraneuron*. pp. 135-144. Berlin: Springer-Verlag.
- GANDÍA, L. (2006). El receptor nicotínico. En *La huella nicotínica de la demencia*. ed García, A.G. pp. 13-28. Madrid: Instituto Teófilo Hernando.
- GANDÍA, L., CASADO, L.F., LÓPEZ, M.G. & GARCÍA, A.G. (1991). Separation of two pathways for calcium entry into chromaffin cells. *Br J Pharmacol*, **103**, 1073-1078.
- GARCÍA-GUZMÁN, M., SALA, F., SALA, S., CAMPOS-CARO, A., STUHMER, W., GUTIÉRREZ, L.M. & CRIADO, M. (1995). alpha-Bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors on bovine chromaffin cells: molecular cloning, functional expression and alternative splicing of the alpha 7 subunit. *Eur J Neurosci*, **7**, 647-655.
- GARCÍA, A.G., GANDÍA, L., LÓPEZ, M. & MONTIEL, C. (2000). Calcium Channels for Exocytosis: Functional Modulation with Toxins, in *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and detection*. *Botana L, Ed, Marcel-Decker, NewYork*, 91-124.
- GARCÍA, A.G., GARCÍA-DE-DIEGO, A.M., GANDÍA, L., BORGES, R. & GARCÍA-SANCHO, J. (2006). Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev*, **86**, 1093-1131.
- GARCÍA, A.G., SALA, F., REIG, J.A., VINIEGRA, S., FRIAS, J., FONTERIZ, R. & GANDÍA, L. (1984). Dihydropyridine BAY-K-8644 activates chromaffin cell calcium channels. *Nature*, **309**, 69-71.
- GILLIS, K.D., PUN, R.Y. & MISLER, S. (1991). Single cell assay of exocytosis from adrenal chromaffin cells using "perforated patch recording". *Pflugers Arch*, **418**, 611-613.
- GIOCOMO, L.M. & HASSELMO, M.E. (2005). Nicotinic modulation of glutamatergic synaptic transmission in region CA3 of the hippocampus. *Eur J Neurosci*, **22**, 1349-1356.
- GONZÁLEZ-RUBIO, J.M., GARCÍA DE DIEGO, A.M., EGEA, J., OLIVARES, R., ROJO, J., GANDÍA, L., GARCÍA, A.G. & HERNÁNDEZ-GUIJO, J.M. (2006). Blockade of nicotinic receptors of bovine adrenal chromaffin cells by nanomolar concentrations of atropine. *Eur J Pharmacol*, **535**, 13-24.
- GRAY, R., RAJAN, A.S., RADCLIFFE, K.A., YAKEHIRO, M. & DANI, J.A. (1996). Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature*, **383**, 713-716.
- HAMILL, O.P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B. & SIGWORTH, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, **391**, 85-100.

- HARKINS, A.B. & FOX, A.P. (1998). Activation of nicotinic acetylcholine receptors augments calcium channel-mediated exocytosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *J Gen Physiol*, **111**, 257-269.
- HEFFT, S., HULO, S., BERTRAND, D. & MULLER, D. (1999). Synaptic transmission at nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal organotypic cultures and slices. *J Physiol*, **515 (Pt 3)**, 769-776.
- HERNÁNDEZ-GUIJO, J.M. & GANDÍA, L. (2006). Receptor nicotínico y liberación de neurotransmisores. En *La huella nicotínica de la demencia*. ed García, A.G. pp. 41-56. Madrid: Instituto Teófilo Hernando.
- HERNÁNDEZ-GUIJO, J.M., MANEU-FLORES, V.E., RUIZ-NUNO, A., VILLARROYA, M., GARCÍA, A.G. & GANDÍA, L. (2001). Calcium-dependent inhibition of L, N, and P/Q Ca²⁺ channels in chromaffin cells: role of mitochondria. *J Neurosci*, **21**, 2553-2560.
- HILMAS, C., PEREIRA, E.F., ALKONDON, M., RASSOULPOUR, A., SCHWARCZ, R. & ALBUQUERQUE, E.X. (2001). The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *J Neurosci*, **21**, 7463-7473.
- HURST, R.S., HAJOS, M., RAGGENBASS, M., WALL, T.M., HIGDON, N.R., LAWSON, J.A., RUTHERFORD-ROOT, K.L., BERKENPAS, M.B., HOFFMANN, W.E., PIOTROWSKI, D.W., GROPP, V.E., ALLAMAN, G., OGIER, R., BERTRAND, S., BERTRAND, D. & ARNERIC, S.P. (2005). A novel positive allosteric modulator of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor: in vitro and in vivo characterization. *J Neurosci*, **25**, 4396-4405.
- JI, D. & DANI, J.A. (2000). Inhibition and disinhibition of pyramidal neurons by activation of nicotinic receptors on hippocampal interneurons. *J Neurophysiol*, **83**, 2682-2690.
- JI, D., LAPE, R. & DANI, J.A. (2001). Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, **31**, 131-141.
- KANNO, T., YAGUCHI, T., YAMAMOTO, S., NAGATA, T., YAMAMOTO, H., FUJIKAWA, H. & NISHIZAKI, T. (2005). Bidirectional regulations for glutamate and GABA release in the hippocampus by alpha7 and non-alpha7 ACh receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, **338**, 742-747.
- KAWAI, H., ZAGO, W. & BERG, D.K. (2002). Nicotinic alpha 7 receptor clusters on hippocampal GABAergic neurons: regulation by synaptic activity and neurotrophins. *J Neurosci*, **22**, 7903-7912.
- KHIROUG, S.S., HARKNESS, P.C., LAMB, P.W., SUDWEEKS, S.N., KHIROUG, L., MILLAR, N.S. & YAKEL, J.L. (2002). Rat nicotinic ACh receptor alpha7 and beta2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels. *J Physiol*, **540**, 425-434.
- KIDOKORO, Y. & RITCHIE, A.K. (1980). Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. *J Physiol*, **307**, 199-216.
- KLEPPER, M., HANS, M. & TAKEDA, K. (1990). Nicotinic cholinergic modulation of voltage-dependent calcium current in bovine adrenal chromaffin cells. *J Physiol*, **428**, 545-560.
- KOELLE, G.B. (1961). A proposed dual neurohumoral role of acetylcholine: its functions at the pre- and post-synaptic sites. *Nature*, **190**, 208-211.
- KORN, S.J. & HORN, R. (1989). Influence of sodium-calcium exchange on calcium current rundown and the duration of calcium-dependent chloride currents in pituitary cells, studied with whole cell and perforated patch recording. *J Gen Physiol*, **94**, 789-812.

- LENA, C., CHANGEUX, J.P. & MULLE, C. (1993). Evidence for "preterminal" nicotinic receptors on GABAergic axons in the rat interpeduncular nucleus. *J Neurosci*, **13**, 2680-2688.
- LI, X., RAINNIE, D.G., MCCARLEY, R.W. & GREENE, R.W. (1998). Presynaptic nicotinic receptors facilitate monoaminergic transmission. *J Neurosci*, **18**, 1904-1912.
- LINDAU, M. & NEHER, E. (1988). Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells. *Pflugers Arch*, **411**, 137-146.
- LIVETT, B.G. (1984). Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol Rev*, **64**, 1103-1161.
- MAGGI, L., SHER, E. & CHERUBINI, E. (2001). Regulation of GABA release by nicotinic acetylcholine receptors in the neonatal rat hippocampus. *J Physiol*, **536**, 89-100.
- MANSVELDER, H.D. & MCGEHEE, D.S. (2000). Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron*, **27**, 349-357.
- MCGEHEE, D.S. (2002). Nicotinic receptors and hippocampal synaptic plasticity ... it's all in the timing. *Trends Neurosci*, **25**, 171-172.
- MCGEHEE, D.S., HEATH, M.J., GELBER, S., DEVAY, P. & ROLE, L.W. (1995). Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science*, **269**, 1692-1696.
- MCGEHEE, D.S. & ROLE, L.W. (1995). Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu Rev Physiol*, **57**, 521-546.
- McQUISTON, A.R. & MADISON, D.V. (1999). Nicotinic receptor activation excites distinct subtypes of interneurons in the rat hippocampus. *J Neurosci*, **19**, 2887-2896.
- MICHELENA, P., GARCIA-PEREZ, L.E., ARTALEJO, A.R. & GARCIA, A.G. (1993). Separation between cytosolic calcium and secretion in chromaffin cells superfused with calcium ramps. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 3284-3288.
- MOLLARD, P., SEWARD, E.P. & NOWYCKY, M.C. (1995). Activation of nicotinic receptors triggers exocytosis from bovine chromaffin cells in the absence of membrane depolarization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 3065-3069.
- MONCK, J.R. & FERNANDEZ, J.M. (1992). The exocytotic fusion pore. *J Cell Biol* **119**, 1394-1404.
- MONTERO, M., ALONSO, M.T., CARNICERO, E., CUCHILLO-IBÁÑEZ, I., ALBILLOS, A., GARCÍA, A.G., GARCÍA-SANCHO, J. & ÁLVAREZ, J. (2000). Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol*, **2**, 57-61.
- MORO, M.A., LÓPEZ, M.G., GANDÍA, L., MICHELENA, P. & GARCÍA, A.G. (1990). Separation and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medullae. *Anal Biochem*, **185**, 243-248.
- NEHER, E. (1998). Vesicle pools and Ca^{2+} microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron*, **20**, 389-399.
- NEMOTO, N., KUBO, S., YOSHIDA, T., CHINO, N., KIMURA, T., SAKAKIBARA, S., KYOGOKU, Y. & KOBAYASHI, Y. (1995). Solution structure of omega-conotoxin MVIIC determined by NMR. *Biochem Biophys Res Commun*, **207**, 695-700.
- PEREIRA, E.F., HILMAS, C., SANTOS, M.D., ALKONDON, M., MAELICKE, A. & ALBUQUERQUE, E.X. (2002). Unconventional ligands and modulators of nicotinic receptors. *J Neurobiol*, **53**, 479-500.
- PITLER, T.A. & ALGER, B.E. (1992). Cholinergic excitation of GABAergic interneurons in the rat hippocampal slice. *J Physiol*, **450**, 127-142.

- RAMÓN Y CAJAL, S. (1911). Dibujo de la circuitería neuronal del hipocampo de roedor. En "Histologie du Systeme Nervoux de l'homme et des vertebrales". Vols. 1 y 2. Mantoine, Paris.
- ROERIG, B., NELSON, D.A. & KATZ, L.C. (1997). Fast synaptic signaling by nicotinic acetylcholine and serotonin 5-HT₃ receptors in developing visual cortex. *J Neurosci*, **17**, 8353-8362.
- ROSA, J.M., DE DIEGO, A.M., GANDÍA, L. & GARCÍA, A.G. (2007). L-type calcium channels are preferentially coupled to endocytosis in bovine chromaffin cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **357**, 834-839.
- SCHILSTROM, B., SVENSSON, H.M., SVENSSON, T.H. & NOMIKOS, G.G. (1998). Nicotine and food induced dopamine release in the nucleus accumbens of the rat: putative role of alpha7 nicotinic receptors in the ventral tegmental area. *Neuroscience*, **85**, 1005-1009.
- SÉGUÉLA, P., WADICHE, J., DINELEY-MILLER, K., DANI, J.A. & PATRICK, J.W. (1993). Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci*, **13**, 596-604.
- SOBRADO, M., LÓPEZ, M.G., CARCELLER, F., GARCÍA, A.G. & RODA, J.M. (2003). Combined nimodipine and citicoline reduce infarct size, attenuate apoptosis and increase bcl-2 expression after focal cerebral ischemia. *Neuroscience*, **118**, 107-113.
- SOLIAKOV, L. & WONNACOTT, S. (1996). Voltage-sensitive Ca²⁺ channels involved in nicotinic receptor-mediated [³H]dopamine release from rat striatal synaptosomes. *J Neurochem*, **67**, 163-170.
- STALEY, K.J. & MODY, I. (1992). Shunting of excitatory input to dentate gyrus granule cells by a depolarizing GABA_A receptor-mediated postsynaptic conductance. *J Neurophysiol*, **68**, 197-212.
- UNWIN, N. (1993). Neurotransmitter action: opening of ligand-gated ion channels. *Cell*, **72 Suppl**, 31-41.
- WILSON, S.P. & KIRSHNER, N. (1977). The acetylcholine receptor of the adrenal medulla. *J Neurochem*, **28**, 687-695.
- WINKLER, H. (1976). The composition of adrenal chromaffin granules: an assessment of controversial results. *Neuroscience*, **1**, 65-80.
- WINKLER, H. (1977). The biogenesis of adrenal chromaffin granules. *Neuroscience*, **2**, 657-683.
- WINKLER, H., SIETZEN, M. & SCHOBER, M. (1987). The life cycle of catecholamine-storing vesicles. *Ann N Y Acad Sci*, **493**, 3-19.
- WINZER-SERHAN, U.H. & LESLIE, F.M. (2005). Expression of alpha5 nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA during hippocampal and cortical development. *J Comp Neurol*, **481**, 19-30.
- WOOD, E.R., DUDCHENKO, P.A. & EICHENBAUM, H. (1999). The global record of memory in hippocampal neuronal activity. *Nature*, **397**, 613-616.
- ZAREI, M.M., RADCLIFFE, K.A., CHEN, D., PATRICK, J.W. & DANI, J.A. (1999). Distributions of nicotinic acetylcholine receptor alpha7 and beta2 subunits on cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*, **88**, 755-764.
- ZHOU, Z. & MISLER, S. (1996). Amperometric detection of quantal secretion from patch-clamped rat pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*, **271**, 270-277.
- ZHOU, Z. & NEHER, E. (1993). Calcium permeability of nicotinic acetylcholine receptor channels in bovine adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch*, **425**, 511-517.

ZWART, R., DE FILIPPI, G., BROAD, L.M., MCPHIE, G.I., PEARSON, K.H., BALDWINSON, T. & SHER, E. (2002). 5-Hydroxyindole potentiates human alpha 7 nicotinic receptor-mediated responses and enhances acetylcholine-induced glutamate release in cerebellar slices. *Neuropharmacology*, **43**, 374-384.

ANEXO

PUBLICACIÓN N° 1

Arnáiz-Cot, J.J., García-de-Diego, A.M., Hernández-Guijo, J.M., Gandía, L. y García, A.G.. **A two-step model for acetylcholine control of exocytosis via nicotinic receptors.** Biochemical and Biophysical Research Communications 365: 413–419, 2008.

A two-step model for acetylcholine control of exocytosis via nicotinic receptors

Juan J. Arnáiz-Cot^{a,b}, Antonio M.G. de Diego^{a,b}, Jesús M. Hernández-Guijo^{a,b},
Luis Gandía^{a,b}, Antonio G. García^{a,b,c,*}

^a Instituto “Teófilo Hernando” para la Investigación de Fármacos y del Envejecimiento (ITH), Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Cl Arzobispo Morcillo, 4, 28029 Madrid, Spain

^b Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Cl Arzobispo Morcillo, 4, 28029 Madrid, Spain

^c Servicio de Farmacología Clínica, Hospital Universitario de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, cl Diego de León, 62, 28006 Madrid, Spain

Received 18 October 2007

Available online 5 November 2007

Abstract

The view that Ca^{2+} entry through voltage-dependent Ca^{2+} channels (VDCC) and through nicotinic receptors for acetylcholine (nAChRs) causes equal catecholamine release responses in chromaffin cells, was reinvestigated here using new protocols. We have made two-step experiments consisting in an ACh prepulse followed by a depolarizing pulse (DP). In voltage-clamped bovine chromaffin cells an ACh prepulse caused a slow-rate release but augmented 4.5-fold the much faster exocytotic response triggered by a subsequent depolarizing pulse (measured with capacitance and amperometry). If the ACh prepulse was given with mecamylamine or in low external Ca^{2+} , the secretion increase disappeared. This suggests a two-step model for the effects of ACh: (1) meager Ca^{2+} entry through nAChRs mostly serves to keep loaded with vesicles the secretory machine; and (2) in this manner, the cell is prepared to respond with an explosive secretion of catecholamine upon depolarization and fast high Ca^{2+} entry through VDCC.

© 2007 Published by Elsevier Inc.

Keywords: Acetylcholine; Exocytosis; Nicotinic receptors; Calcium currents; Chromaffin cells; Capacitance; Amperometry

At the adrenal medullary chromaffin cell, the pathway from stimulus to secretion includes acetylcholine (ACh)-evoked depolarization [1] and action potentials [2], that open a variety of voltage-dependent Ca^{2+} channel subtypes (VDCC) [3], leading to enhanced Ca^{2+} entry [4], augmentation of the cytosolic concentration of free Ca^{2+} ions ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) [5], that activates the secretion machinery [6].

In the absence of depolarization, Ca^{2+} entry through nAChRs also evokes exocytosis in cat [7] and bovine chromaffin cells [8,9], as well as in PC12 cells [10]. This has been interpreted as a redundant two Ca^{2+} entry pathways that indistinctly and equally contribute to trigger exocytosis in chromaffin cells. Contrary to this view, experiments in volt-

age-clamped bovine adrenal medullary cells reported here, suggest different physiological roles for the Ca^{2+} entering through nAChRs, and the Ca^{2+} that enters the cell through VDCC following ACh-evoked depolarization. This novel interpretation of a sequential dual role of ACh in controlling exocytosis is based on the observation that an ACh prepulse that by itself produced slow-rate exocytosis did however markedly enhance the fast and explosive release response triggered by a short DP.

Materials and methods

Isolation and culture of bovine chromaffin cells. Bovine chromaffin cells were isolated from adrenal glands of adult cows, following standard methods [11] with some modifications [12]. Cells were suspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% fetal calf serum, and plated on glass coverslips at a density of 50,000 cells/coverslip. Experiments were done with 2–4-days-old cells at 24 ± 2 °C.

* Corresponding author. Address: Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Arzobispo Morcillo, 4, 28029 Madrid, Spain. Fax: +34 91 497 31 20. E-mail address: agg@uam.es (A.G. García).

Recording of Ca^{2+} currents, ACh-elicited currents, and membrane capacitance changes. Membrane currents were measured using the perforated-patch configuration [13,14] of the patch-clamp technique [15]. Coverslips containing the cells were continuously perfused with a Tyrode solution (composition in mM): 137 NaCl, 1 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$, 10 Hepes (pH 7.2). For current and membrane capacitance recordings, 2 mM Ca^{2+} was used as charge carrier. The cells were internally dialyzed with a solution containing (in mM): 135 CsGlutamate, 10 Hepes, 9 NaCl, pH 7.2 adjusted with CsOH.

Cell membrane capacitance (C_m) changes were estimated by the Lindau–Neher technique [16]. A 400 ms sinusoidal wave (1 kHz, 70 mV peak to peak amplitude) was added before the depolarizing protocol and an 8 s sinusoidal wave of the same characteristics after it, to allow for the computation of membrane capacitance changes. Membrane current was sampled at 20 kHz. Only cells with responses greater than 250 pA of peak I_{Ca} and 50 fF ΔC_m were selected. Cells were held at -80 mV and single depolarizing pulses to voltages where I_{Ca} peak was reached (usually 0 mV) were applied at 5 min intervals.

In some experiments, inward currents, C_m changes, and amperometric single-vesicle quantal release of catecholamines, were simultaneously recorded using a graphite microelectrode placed close to the cell membrane after the patch seal had been achieved [17] (see [18] for further details).

Data analysis and statistics. The whole-cell inward Ca^{2+} current peak (I_{Ca}), and the current area, representing the total Ca^{2+} that entered the cell during a depolarizing stimulus (Q_{Ca}), were analyzed after the initial 20 ms of each DP, to get rid of the Na^+ current. In this study, exo- and endocytosis were measured by monitoring the changes of cell capacitance. Exocytosis peak (ΔC_m) was measured by subtracting the basal mean C_m obtained 400 ms previous to depolarization, to that obtained 50 ms after the end of the depolarizing pulse, to avoid a possible Na^+ channel gating artefact [19]. Comparisons between means of group data were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post hoc test when appropriate. A p value equal or smaller than 0.05 was taken as the limit of significance.

Materials and solutions. The following materials were used: collagenase from *Clostridium histolyticum* (Boehringer-Mannheim, Madrid, Spain); DMEM, bovine serum albumin fraction V, fetal calf serum and antibiotics were from Gibco (Madrid, Spain). ACh chloride and amphotericin B were from Sigma (Madrid, Spain).

Results and discussion

All experiments were done in bovine chromaffin cells, voltage-clamped at -80 mV, which were continuously superfused with an extracellular solution containing a physiological concentration of Ca^{2+} (2 mM). We used the perforated-patch mode [13] of the patch-clamp technique [15]. Under these conditions, the intracellular milieu is preserved intact, and long-term experiments with repeated depolarizing test pulses (DP) can be performed; this produced reproducible traces of inward Ca^{2+} currents (I_{Ca}) and membrane capacitance jumps (ΔC_m) in experiments lasting 30–90 min in bovine chromaffin cells, as shown first by Engisch and Nowicky [20] and recently corroborated by Rosa et al. [18]. Thus, these experimental conditions permitted to make a sandwich-type experiment within the same cell, by giving repeated DP to 0 mV at 5-min intervals.

The features of inward currents and capacitance changes evoked by DPs and by ACh pulses appear in Fig. 1. Panel A shows a typical current trace generated by a 100-ms DP to 0 mV. There are two clear components in such a trace:

(i) an initial fast Na^+ current (I_{Na}) peaked in about a millisecond at 1 nA; then, relaxed to a slower I_{Ca} that gradually inactivated to reach 50% of its initial value at the end of the pulse. Panel B shows the ΔC_m produced by the DP; the exocytotic jump reached a peak in few milliseconds and showed a slight endocytosis along the ensuing 8-s period of capacitance recording. Pooled results in panel C shows I_{Ca} peak ≈ 400 pA, $Q_{Ca} \approx 27$ pC, and $\Delta C_m \approx 35$ fF. Panel D shows a prototype inward current trace generated by a 100 μM ACh pulse of 10-s duration; note the pronounced inactivation of the ACh current (I_{ACh}) along the pulse. Panel E shows ΔC_m produced along the 10-s stimulation with ACh. Pooled results of Fig. 1F show I_{ACh} peak ≈ 750 pA, I_{ACh} area (Q_{ACh}) ≈ 1500 pC, and $\Delta C_m \approx 100$ fF. Note that this ΔC_m was about 3-fold higher than that produced by DPs (35 fF); however, the stimulus duration with ACh was 10 s while the DP was 100-fold shorter (100 ms). This indicates that under our experimental conditions, the Ca^{2+} entering via VDCC caused much faster secretory responses than that entering through nAChR channels (see later comments on Fig. 3).

To study the effect of an ACh prepulse on Ca^{2+} entry and exocytosis elicited by a DP within the same cell, a sandwich-type experiment was done, as the protocol of Fig. 2A indicates. Three sequential DPs were applied to the same cell, at 5 min intervals. DP1 was the initial control pulse and DP2 was given 2.5 s after washout of the ACh prepulse. DP3 was the last control pulse to test the recovery of the ACh prepulse on DP2.

Fig. 2B shows the inward current traces generated by the three DPs. Note that the ACh prepulse reduced the amplitude of I_{Ca} and slowed down its inactivation; this may indicate a preferential effect on N and P/Q VDCC that in bovine chromaffin cells are known to be inactivated faster than L channels, by a mechanism dependent on the increase of the cytosolic Ca^{2+} concentration, $[Ca^{2+}]_c$ [21]. The current generated by DP3 returned to initial values. The changes of C_m traces elicited by DPs are shown in Fig. 2C. DP1 and DP3 elicited similar ΔC_m with slow endocytosis along the 8-s recording period. DP2, that was preceded by the ACh prepulse, caused a much greater ΔC_m , that was followed by a faster endocytosis. Repetition of the protocol of panel A once more in the same cell produced similar effects on I_{Ca} and ΔC_m (not shown).

Quantitative normalized data (% DP1, within each cell) from pooled experiments showed that the ACh prepulse blocked I_{Ca} (Fig. 2D) and Q_{Ca} (Fig. 2E) by about 30%; such effect was reversible, as indicated by recovery of the initial current in DP3. In spite of 30% decrease of Ca^{2+} entry, the ACh prepulse augmented ΔC_m by as much as 4.5-fold (Fig. 2F); this increase was reversible since the DP3 response returned to the level of DP1 (Fig. 2C and F).

An increase of membrane capacitance is an indication of exocytosis; however, it does not tell us whether the catecholamines stored in chromaffin vesicles are actually released to the extracellular space [6]. On the other hand, during the 10-s ACh pulse application it was not possible

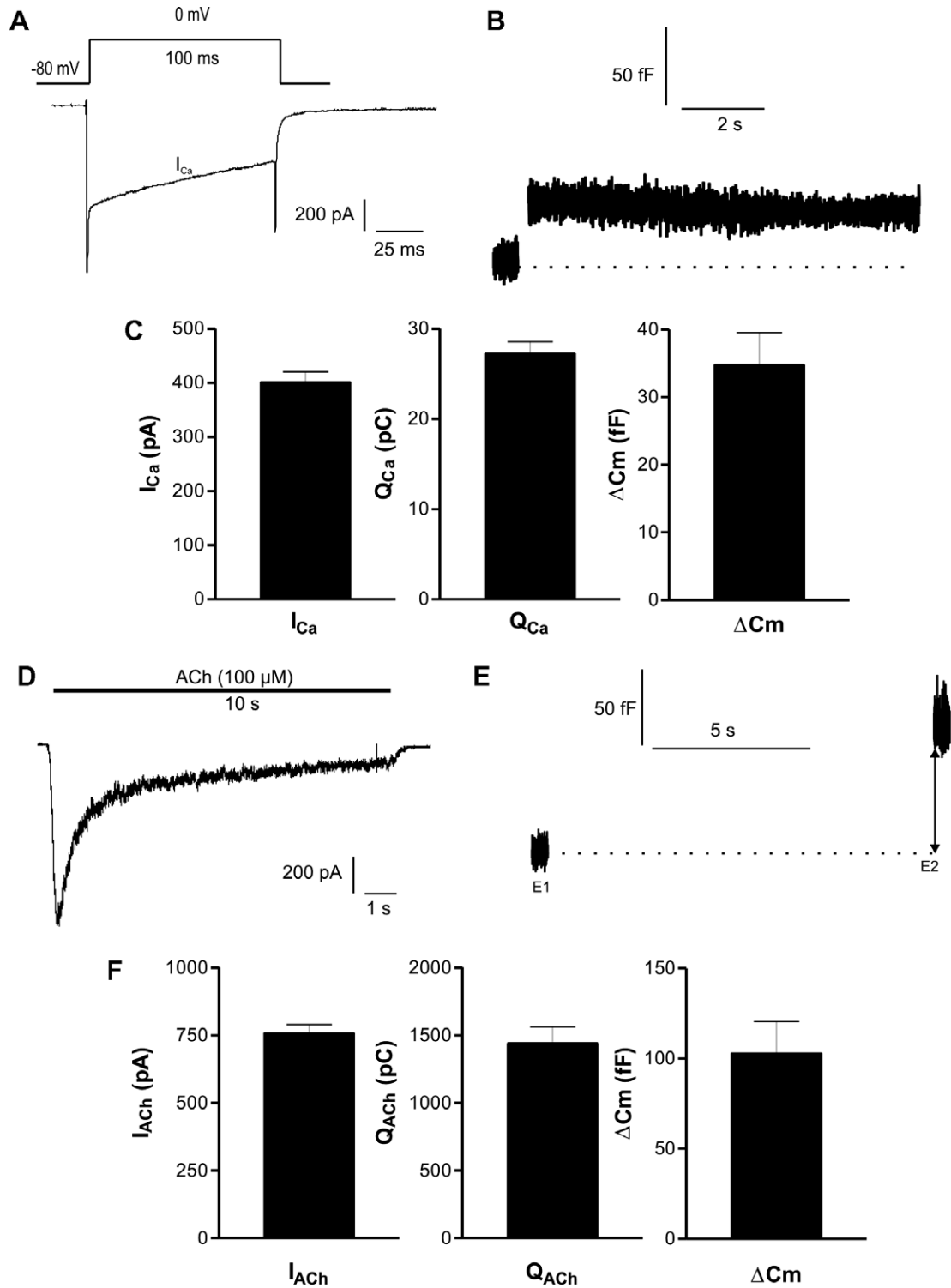


Fig. 1. Inward currents and membrane capacitance increases (ΔC_m) elicited by short depolarizing pulses (DPs) or by long ACh pulses applied to cells voltage-clamped at -80 mV. Panel A shows an example of an inward Ca^{2+} current (I_{Ca}) generated by a 100-ms test DP to 0 mV, as indicated in the protocol on top. The trace has an initial fast inactivating Na^+ current component (I_{Na}) followed by a slow-inactivating I_{Ca} component. Panel B shows an example trace of the ΔC_m that followed the I_{Ca} of panel A, sequentially recorded in the same cell; this 8-s capacitance trace showed little endocytosis. Panel C shows quantitative results of peak I_{Ca} (pA), the I_{Ca} area (Q_{Ca} , pC), and peak ΔC_m (fF) (means \pm SE of 83 DPs from 58 cells, 20 different cell cultures). Panel D shows an inward current trace elicited by a 10-s pulse of 100 μ M ACh, that underwent a rapid initial inactivation followed by a much slower inactivating component. Panel E shows the C_m increase measured from baseline before the ACh prepulse (E1) and 2 s thereafter (E2) (double arrowhead). Panel F shows averaged results of I_{ACh} peak (pA), the area of I_{ACh} (Q_{ACh}), and ΔC_m (fF); data are means \pm SE of 67 ACh pulses given to 49 cells from 15 different cell cultures.

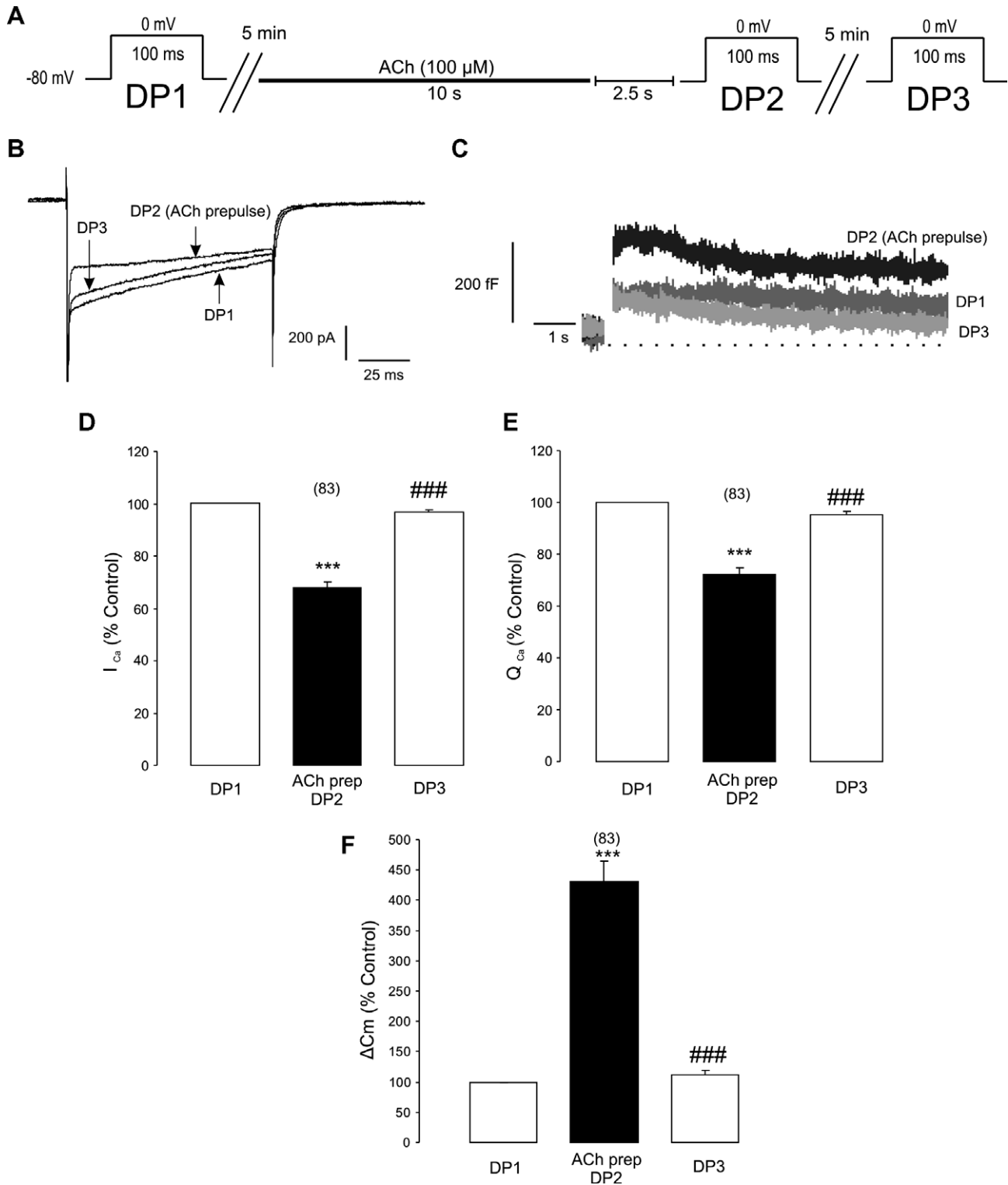


Fig. 2. An ACh prepulse slightly decreased I_{Ca} and Q_{Ca} but drastically augmented the ΔC_m , evoked by DPs. Panel A shows the experimental protocol consisting of three DPs (from -80 mV to 0 mV, during 100 ms) given at 5 -min intervals to the same cell. DP2 was separated 2.5 s from a preceding 10 -s ACh ($100 \mu\text{M}$) prepulse. Panel B shows the superimposed I_{Ca} traces generated by DP1, DP2, and DP3 from an example cell. Note the inhibition of I_{Ca} peak elicited by the ACh prepulse before DP2, and the slowing of current inactivation, suggesting a preferential effect of ACh on non-L-type Ca^{2+} channels (N, P/Q). Also note the reversibility of the ACh effect (current generated by DP3). Panel C shows the three ΔC_m measured after the three DPs (same cell as in panel B). Panels D–F show normalized averaged results (% values obtained after DP1 within each individual cell) of I_{Ca} peak, Q_{Ca} and ΔC_m , respectively. Data are means \pm SE of 83 protocols (panel A) from 58 cells from 20 different cultures. *** $p < 0.001$ with respect to DP1; ### $p < 0.0001$ with respect to DP2.

to measure continuously the ΔC_m changes, since the plasmalemma ion permeability was being changed by ACh. Hence, we decided to measure the actual single vesicle quantal catecholamine release with a carbon fibre microelectrode simultaneously with the changes in ΔC_m before and immediately after the ACh and DPs.

In the experiments shown in Fig. 3, the DP1 elicited an I_{Ca} of around 400 pA (panel A) that gave rise to the capacitance increase of 42 fF (panel B; 33 ± 4 fF, average of 4 cells). Since a bovine chromaffin cell vesicle contributes 2.5 fF to ΔC_m [22], about 21 vesicles were released by DP1. With a circular shape and a radius of 5 μm , the graphite microelectrode sensitive area is around 78 pm^2 . As the chromaffin cell radius is about 10 μm and assuming it is spherical, membrane surface will be in the order of 1.26 nm^2 . Thus, the carbon fibre is covering and thus recording only about 6% of cell surface. Assuming that chromaffin vesicles undergo exocytosis with equal probability in any place of the cell membrane, only 6% of the 21 vesicles released, that is 1.26 vesicles, would be recorded by the electrode. This is in good agreement with the single spike elicited by DP1 (Fig. 3C).

During the ACh prepulse (I_{ACh} trace of Fig. 3D), there is an increment of C_m previous to DP2 (80 fF, in the example of Fig. 3E, first double arrowhead) paralleled by several spikes (Fig. 3F). This number of spikes agree with the calculations made above: the ACh-elicited C_m jump (80 fF) is equivalent to approximately 32 vesicles; since the carbon fiber microelectrode detects only 6% of the vesicles, this is about 2 vesicles, a number close to the 2–3 spikes present in the amperometric trace of Fig. 3F. Note that in the absence of ACh, there was no change in C_m (Fig. 3B, before DP1 arrow) and spikes were not produced (Fig. 3C, trace to the left of DP1 arrow). Following the ACh prepulse, DP2 produced a ΔC_m of 136 fF (Fig. 3E, second double arrowhead) accompanied by numerous spikes (Fig. 3F, spikes above DP2 arrow). It should be noted that the few amperometric events produced by ACh superfusion occur in a time lapse of 10 s, whereas those elicited by the 100 ms DP are concentrated in a much shorter time lapse, indicating a faster release of greater amount of vesicles during the last stimulus.

Experiments to test whether the effects of an ACh prepulse on I_{Ca} , Q_{Ca} , and ΔC_m were associated to nicotinic or muscarinic receptors, as well as their Ca^{2+} -dependence, were also done. They are not given in figures because of space restrictions. When present during the ACh prepulse, 10 μM mecamylamine abolished the effects of ACh prepulses; this was not the case for 1 μM atropine ($n = 6$ cells). On the other hand, when the ACh prepulses were applied in a solution containing 0.2 mM Ca^{2+} and 2.8 mM Mg^{2+} , the potentiation of ΔC_m was abolished ($n = 6$ cells), suggesting that augmentation of DP-elicited exocytosis by ACh prepulses involved Ca^{2+} entry through nAChRs.

In a study by Klepper et al. [23], about 30% inhibition of I_{Ca} by ACh in bovine chromaffin cells was associated to nAChRs. Although these authors did not study exocytosis,

they suggested however that inhibition of I_{Ca} by ACh may act as a “negative feed back control of catecholamine secretion”. It is interesting that as Klepper et al. [23], we found a 30% I_{Ca} inhibition by the ACh prepulse that contrary to their prediction, led to a 4.5-fold increase of DP-evoked secretion. This suggests that enhanced catecholamine release was not due to augmentation of Ca^{2+} entry through VDCC opened by the DP that was in fact mildly reduced.

In voltage-clamped bovine chromaffin cells bathed in a solution containing 2 mM Ca^{2+} , it was found that 97.5% of the net inward current generated by ACh pulses was carried by Na^+ , and only 2.5% by Ca^{2+} ; this ACh currents generated small increases of the $[\text{Ca}^{2+}]_c$ of about 50 nM [24]. Although this might seem low, at subplasmalemmal sites the $[\text{Ca}^{2+}]_c$ may rise to higher values [3,6], thus explaining two of the effects of ACh prepulses in our present experiments: (i) 30% blockade of I_{Ca} , that may be due to $[\text{Ca}^{2+}]_c$ -dependent inactivation of Ca^{2+} channels [21]; and (ii) the mild slow secretory response seen during the ACh prepulse.

Mollard et al. [9] found that a 200-ms puff of a high nicotine concentration (50–200 μM) produced a large capacitance increase equivalent to exocytosis of 200 vesicles; a train of 10 DPs from -90 to $+20$ mV evoked the secretion of as much as 500 vesicles (1000 fF). The authors concluded that “nicotinic receptors activation triggers secretion through an additional coupling pathway (i.e. Ca^{2+} entry through nAChR channel) that coexists with classical voltage-dependent Ca^{2+} entry”. Similar conclusions were reached by Gandía et al. [8] in bovine chromaffin cells and by Harkins and Fox [10] in PC12 cells. The protocols used in our present study drastically differ from those used in these three previous studies. We selected a milder concentration of the physiological neurotransmitter ACh, and we applied it as a long-duration prepulse, to clearly separate the secretory response associated to nAChRs (that in our conditions was slow and meager) from that elicited by a single short DP (that in our conditions was very fast and large). In using here milder but longer stimulation of nAChRs, as compared to the much shorter and stronger stimulation of nAChRs used in the previous three cited reports, we could discern two quite different steps in the effects of ACh on secretion (Fig. 4).

During step 1, meager and slow Ca^{2+} entry through nAChRs causes mild elevations (nanomolar) of the $[\text{Ca}^{2+}]_c$ [24], that mainly serve to move secretory vesicles towards subplasmalemmal sites rather than to trigger a fast exocytosis. This step may physiologically occur at resting low-frequency (0.2 Hz) stimulation of splanchnic nerves giving rise to low but sustained synaptic concentrations of ACh as those used here. This may have the double function of causing low-rate basal catecholamine release (as that found with ACh prepulses in this study) as well as to load the secretory machinery with sufficient vesicles to be prepared for step 2. This last step will be activated during stressful conditions that cause a high-firing rate of

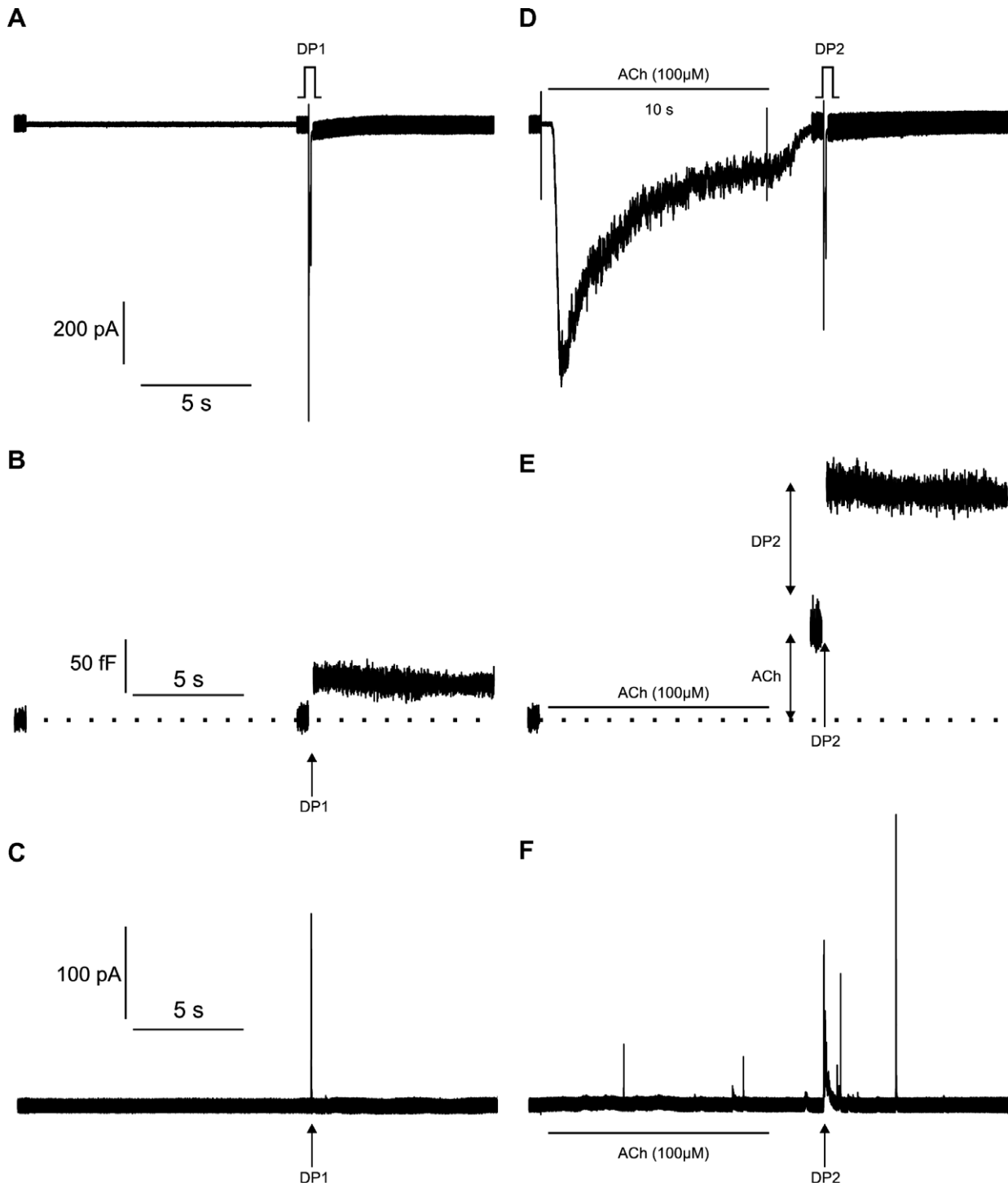


Fig. 3. Simultaneous amperometry and patch-clamp recordings shows that the drastic potentiation by an ACh prepulse of secretion evoked by a DP, was indeed due to a pronounced augmentation of quantal single-vesicle catecholamine release. Panels A and D show currents elicited by ACh and depolarizing pulses (DP1 and DP2). These records were taken from a cell, out of four cells explored with this protocol. Panel D shows the typical ACh elicited current (I_{ACh}) and that elicited by a depolarizing pulse 2.5 s after the ACh superfusion ended. Corresponding Cm responses can be observed in B and E. Notice the increment in the basal capacitance produced (first double arrowhead) by ACh superfusion and the great potentiation (around 3 times) of the ΔC_m response to later depolarization (DP2; second double arrowhead). Amperometric traces are those of panels C and F. Notice again the clear potentiation of depolarization-elicited secretion, as indicated by I_{amp} , after ACh superfusion, in accordance to ΔC_m in panel E, and compare to I_{amp} shown in panel F.

splanchnic nerves (5–30 Hz) and greater ACh release, chromaffin cell depolarization, massive Ca^{2+} entry through VDCC, and an explosive catecholamine release response. We believe that this is a novel interpretation for the classi-

cal observation of Douglas and Rubin [7] on the role of a possible Ca^{2+} entry pathway through nAChRs in regulating exocytosis. We also believe that this two-step model will give rise to new ideas and experiments to clarify the

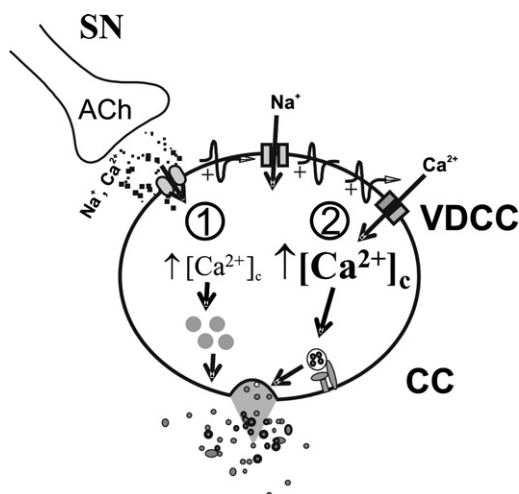


Fig. 4. A two-step model to explain the role of the Ca^{2+} entry pathways activated by ACh, in the adrenal medullary chromaffin cell (see text for explanation). (Step 1) Meager Ca^{2+} entry through nAChRs serves to move secretory vesicles towards subplasmalemmal sites. (Step 2) Faster and greater Ca^{2+} entry through voltage-dependent Ca^{2+} channels serves to activate the secretory machine, loaded with vesicles during step 1.

regulatory functions of nAChRs on synaptic transmission, particularly of the $\alpha 7$ subtype [25].

Acknowledgments

This work was supported by Grants from “Ministerio de Educación y Ciencia” (No. SAF2006-03589 to AGG, SAF2004-07307 to L.G., and BFU2004-07998/BFI to J.M.H.G.), Comunidad Autónoma de Madrid (S/SAL-0275/2006), and Fundación Mútua Madrileña, Spain. We thank “Fundación Teófilo Hernando” for continued support, Mr. Ricardo de Pascual and Mrs. Lorena Cortés Gil for the preparation of cell cultures. J.J.A.C. is a fellow of Fundación Teófilo Hernando, and A.M.G.D. is a fellow of FPI-MEC program, Spain.

References

- [1] W.W. Douglas, T. Kanno, S.R. Sampson, Influence of the ionic environment on the membrane potential of adrenal chromaffin cells and on the depolarizing effect of acetylcholine, *J. Physiol.* 191 (1967) 107–121.
- [2] B.L. Brandt, S. Hagiwara, Y. Kidokoro, S. Miyazaki, Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine, *J. Physiol.* 263 (1976) 417–439.
- [3] A.G. Garcia, A.M. Garcia-De-Diego, L. Gandia, R. Borges, J. Garcia-Sancho, Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells, *Physiol. Rev.* 86 (2006) 1093–1131.
- [4] W.W. Douglas, A.M. Poisner, Stimulation of uptake of calcium-45 in the adrenal gland by acetylcholine, *Nature* 192 (1961) 1299.
- [5] P.F. Baker, D.E. Knight, Calcium-dependent exocytosis in bovine adrenal medullary cells with leaky plasma membranes, *Nature* 276 (1978) 620–622.
- [6] E. Neher, Vesicle pools and Ca^{2+} microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release, *Neuron* 20 (1998) 389–399.
- [7] W.W. Douglas, R.P. Rubin, The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling, *J. Physiol.* 167 (1963) 288–310.
- [8] L. Gandia, L.F. Casado, M.G. Lopez, A.G. Garcia, Separation of two pathways for calcium entry into chromaffin cells, *Br. J. Pharmacol.* 103 (1991) 1073–1078.
- [9] P. Mollard, E.P. Seward, M.C. Nowycky, Activation of nicotinic receptors triggers exocytosis from bovine chromaffin cells in the absence of membrane depolarization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 3065–3069.
- [10] A.B. Harkins, A.P. Fox, Activation of nicotinic acetylcholine receptors augments calcium channel-mediated exocytosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells, *J. Gen. Physiol.* 111 (1998) 257–269.
- [11] B.G. Livett, Adrenal medullary chromaffin cells in vitro, *Physiol. Rev.* 64 (1984) 1103–1161.
- [12] M.A. Moro, M.G. Lopez, L. Gandia, P. Michelena, A.G. Garcia, Separation and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medullae, *Anal. Biochem.* 185 (1990) 243–248.
- [13] S.J. Korn, R. Horn, Influence of sodium-calcium exchange on calcium current rundown and the duration of calcium-dependent chloride currents in pituitary cells, studied with whole cell and perforated patch recording, *J. Gen. Physiol.* 94 (1989) 789–812.
- [14] K.D. Gillis, R.Y. Pun, S. Misler, Single cell assay of exocytosis from adrenal chromaffin cells using “perforated patch recording”, *Pflugers Arch.* 418 (1991) 611–613.
- [15] O.P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F.J. Sigworth, Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Pflugers Arch.* 391 (1981) 85–100.
- [16] M. Lindau, E. Neher, Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells, *Pflugers Arch.* 411 (1988) 137–146.
- [17] Z. Zhou, S. Misler, Amperometric detection of quantal secretion from patch-clamped rat pancreatic beta-cells, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 270–277.
- [18] J.M. Rosa, A.M. de Diego, L. Gandia, A.G. Garcia, L-type calcium channels are preferentially coupled to endocytosis in bovine chromaffin cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357 (2007) 834–839.
- [19] F.T. Horrigan, R.J. Bookman, Releasable pools and the kinetics of exocytosis in adrenal chromaffin cells, *Neuron* 13 (1994) 1119–1129.
- [20] K.L. Engisch, M.C. Nowycky, Calcium dependence of large dense-core vesicle exocytosis evoked by calcium influx in bovine adrenal chromaffin cells, *J. Neurosci.* 16 (1996) 1359–1369.
- [21] J.M. Hernandez-Guijo, V.E. Maneu-Flores, A. Ruiz-Nuno, M. Villarroya, A.G. Garcia, L. Gandia, Calcium-dependent inhibition of L, N, and P/Q Ca^{2+} channels in chromaffin cells: role of mitochondria, *J. Neurosci.* 21 (2001) 2553–2560.
- [22] E. Neher, R.S. Zucker, Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells, *Neuron* 10 (1993) 21–30.
- [23] M. Klepper, M. Hans, K. Takeda, Nicotinic cholinergic modulation of voltage-dependent calcium current in bovine adrenal chromaffin cells, *J. Physiol.* 428 (1990) 545–560.
- [24] Z. Zhou, E. Neher, Calcium permeability of nicotinic acetylcholine receptor channels in bovine adrenal chromaffin cells, *Pflugers Arch.* 425 (1993) 511–517.
- [25] J.A. Dickinson, K.E. Hanrott, M.H. Mok, J.N. Kew, S. Wonnacott, Differential coupling of $\alpha 7$ and non- $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors to calcium-induced calcium release and voltage-operated calcium channels in PC12 cells, *J. Neurochem.* 100 (2007) 1089–1096.

PUBLICACIÓN N° 2

Arnaiz-Cot, J.J., González, J.C., Sobrado, M., Baldelli, P., Carbone, E., Gandía, L., García, A.G. y Hernández-Guijo, J.M. **Allosteric modulation of alpha7 nicotinic receptors selectively increase GABAergic synaptic transmission in hippocampal neurons.** European Journal of Neuroscience 27: 1097-1110, 2008.

Allosteric modulation of $\alpha 7$ nicotinic receptors selectively depolarizes hippocampal interneurons, enhancing spontaneous GABAergic transmission

J. J. Arnaiz-Cot,^{1,2} J. C. González,^{1,2} M. Sobrado,⁴ P. Baldelli,⁵ E. Carbone,⁶ L. Gandía,^{1,2} A. G. García^{1,2,3} and J. M. Hernández-Guijo^{1,2}

¹Instituto Teófilo Hernando, Facultad de Medicina, University Autónoma de Madrid, Avenida Arzobispo Morcillo 4, 28029 Madrid, Spain

²Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, University Autónoma de Madrid, Avenida Arzobispo Morcillo 4, 28029 Madrid, Spain

³Servicio de Farmacología Clínica del Hospital Universitario de la Princesa, Facultad de Medicina, University Autónoma de Madrid, c/diego de León 62, 28006 Madrid, Spain

⁴Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria 28040 Madrid, Spain

⁵Department of Neuroscience and Brain Technologies, IIT and Department of Experimental Medicine, University of Genova, Viale Benedetto XV, 3, I-16132 Genova, Italy

⁶Department of Neuroscience, NIS Center of Excellence, Corso Raffaello 30, I-10125 Turin, Italy

Keywords: 5-OH-indole, allosteric receptor modulation, choline, GABAergic synapses, hippocampal neurons

Abstract

The role of postsynaptic nicotinic receptors for acetylcholine (nAChRs) in mediating fast neurotransmission processes in the CNS is controversial. Here we have studied the modulation of synaptic transmission by an agonist (choline) and an allosteric modulator (5-OH-indole) of $\alpha 7$ nAChRs in rat hippocampal neuronal cultures. Choline evoked a fast inactivating inward current, causing neuron depolarization and action potential discharge, thereby enhancing the spontaneous postsynaptic current activity (sPSCs). This effect was markedly enhanced when both choline and 5-OH-indole were applied together and was blocked by the selective $\alpha 7$ nAChR antagonist methyllycaconitine. This choline action was suppressed by the GABA_A receptor antagonist bicuculline, while the glutamatergic receptor antagonist kynurenic acid had no effect. Frequency, but not amplitude or area, of both excitatory and inhibitory miniature postsynaptic currents (mEPSCs and mIPSCs) were drastically reduced when Ca²⁺ influx was blocked by Cd²⁺. Additionally, nAChR activation did not modify the mIPSCs. These data suggest that Ca²⁺ influx through the highly Ca²⁺-permeable $\alpha 7$ nAChRs was insufficient to directly activate neurotransmitter release, suggesting that a tight colocalization of this receptor with secretory hot spots is unlikely. In a few cases, the activation of $\alpha 7$ AChRs led to a suppression of spontaneous synaptic transmission. This effect may be related to the potentiation of GABAergic interneurons that inhibit the spontaneous activity of neurons making synapses with the cell under study. We suggest that GABA release is modulated by $\alpha 7$ nAChRs. Thus, selective allosteric modulators of $\alpha 7$ nAChRs could have potential therapeutic applications in brain disorders such as epilepsy and schizophrenia and in alterations of cognition and sensory processing.

Introduction

Since the demonstration of the existence of functional nicotinic receptors for acetylcholine (nAChRs) in the central nervous system (CNS) (Aracava *et al.*, 1987) the evidence for postsynaptic nicotinic activity is scarce (Hefft *et al.*, 1999). Although neuronal nAChRs are major mediators of fast synaptic transmission in the peripheral nervous system (Zhang *et al.*, 1996), there are few examples of nAChR-mediated fast synaptic transmission in the mammalian CNS (Frazier *et al.*, 1998; Alkondon & Albuquerque, 2004). Both electrophysiological and neurotransmitter-release studies support the view that a significant proportion of nAChRs in the CNS are presynaptic (Wonnacott, 1997); however, they exert a modulatory

role rather than mediating fast postsynaptic neurotransmission processes (Role & Berg, 1996; for a recent review see Dani & Bertrand, 2007).

In the mammalian brain, $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nAChRs control synaptic transmission (Gray *et al.*, 1996; Role & Berg, 1996; Bertolino *et al.*, 1997; Albuquerque *et al.*, 1998; Alkondon *et al.*, 1999; Ji & Dani, 2000). They also modulate certain aspects of neuronal proliferation, differentiation and death (Berger *et al.*, 1998; Broide & Leslie, 1999). On the other hand, nAChRs seem to be involved in several neuronal functions such as attention, learning and memory processes; particularly relevant to the regulation of these processes are the hippocampal nAChRs (Wood *et al.*, 1999). GABAergic interneurons have been shown to be the major target of cholinergic inputs to the hippocampus (Yoshida & Oka, 1995), where there is both a high expression of nAChRs (Martin & Aceto, 1981) and intrinsic cholinergic synapses between interneurons (Freund & Buzsaki, 1996).

Correspondence: Dr J.M. Hernández-Guijo, ²Departamento de Farmacología, as above.
E-mail: jesusmiguel.hernandez@uam.es

Received 26 July 2007, revised 28 December 2007, accepted 7 January 2008

The hippocampus possesses distinct subsets of interneurons regarding nicotinic receptor expression (McQuiston & Madison, 1999). $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 3\beta 4$ receptors (Alkondon *et al.*, 1994; Sudweeks & Yakel, 2000) as well as $\alpha 5$ subunits (Winzer-Serhan & Leslie, 2005) have been identified in the hippocampus. Pitler and Alger (1992) described the cholinergic excitation of GABAergic interneurons in rat hippocampal slices. In culture, these cells appear to express three different nAChR subtypes (Alkondon & Albuquerque, 2004) that appear to be located in subpopulations of GABAergic inhibitory interneurons (Freedman *et al.*, 1993; Adams *et al.*, 2001). Pyramidal cells lack nAChRs (Frazier *et al.*, 1998) or rarely show nicotinic responses and, when present, they are much smaller than those found in interneurons (McQuiston & Madison, 1999).

The $\alpha 7$ nAChR modulates the release of various neurotransmitters, including glutamate (McGehee *et al.*, 1995; Gray *et al.*, 1996), GABA (Alkondon & Albuquerque, 2004), dopamine (Schilstrom *et al.*, 1998) and noradrenaline (Li *et al.*, 1998). An important modulatory role has been attributed to $\alpha 7$ nAChRs expressed in GABAergic hippocampal cells (Alkondon *et al.*, 1999; Maggi *et al.*, 2001). However, other authors pointed out that this receptor can modulate transmitter release from both GABAergic and glutamatergic terminals (Gray *et al.*, 1996; Le Magueresse *et al.*, 2006), and that long-term potentiation is related to the presence of $\alpha 7$ nAChRs on glutamatergic terminals (Mansvelder & McGehee, 2000).

Insight into the modulatory role of nAChRs on hippocampal synaptic transmission will undoubtedly contribute to a better understanding of hippocampal physiology and physiopathology, and obviously will have therapeutic implications. The hippocampus is the centre of cognition, learning and memory so nAChRs may play an important role in these physiological processes (Buccafusco *et al.*, 1998). Selective activation of the $\alpha 7$ nAChR subtype was found to improve sensory processing and cognition in animal models (Levin *et al.*, 1999); also, deletion of the $\alpha 7$ nAChR gene elicited cognition impairment (Keller *et al.*, 2005). The alterations of this synaptic mechanism could account for the apparent involvement of nAChRs in the psychological effects of tobacco and in brain disorders such as schizophrenia and epilepsy, and contribute to cognitive deficits in Alzheimer's disease (Wood *et al.*, 1999).

Hence, we performed the present study in which we describe the properties of the modulation of GABAergic synaptic transmission exerted by a selective $\alpha 7$ nAChR agonist, choline, (Pereira *et al.*, 2002) and a specific allosteric modulator of $\alpha 7$ nAChRs, 5-OH-indole (Zwart *et al.*, 2002). We demonstrate that the nAChRs involved in this modulation are not localized close to secretory hot spots, and that Ca^{2+} influx through this highly Ca^{2+} -permeable receptor (Seguela *et al.*, 1993) is insufficient to induce neurotransmitter release in the absence of depolarization.

Materials and methods

Isolation and culture of rat hippocampal neurons

All experiments were carried out in accordance with the guidelines established by the National Council on Animal Care and were approved by the local Animal Care Committee of the Universidad Autónoma de Madrid. Pregnant Sprague–Dawley rats were killed by inhalation of CO_2 and 18-day embryos were removed immediately by caesarean section. Hippocampi were dissected rapidly under a stereomicroscope and sterile conditions in cold (4 °C) phosphate buffer solution (PBS) of the following composition (in mM): NaCl, 137; KCl, 2.7; NaH_2PO_4 , 11.6; and KH_2PO_4 1.47 (pH 7.4, adjusted with NaOH). The tissue was digested with 0.5 mg/mL papain and

0.25 mg/mL DNAase. The enzymes were dissolved in a Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free PBS solution containing 1 mg/mL BSA and 10 mM glucose at 37 °C for 20 min. The papain solution was replaced with 5 mL of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum. The digested tissue was then gently triturated by suction using a glass pipette flamed on the tip to avoid cellular damage. The cell suspension was centrifuged for 4 min at 120 g. The supernatant was removed and the cells were resuspended in 5 mL DMEM and plated at a density of 100 000 cells/mL on 4-cm-diameter Petri dishes (2 mL/dish) coated with poly DL-ornithine (0.5 mg/mL) and laminin (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cells were plated in DMEM supplemented with 10% foetal bovine serum, 60 mg/mL L-glutamine, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin and 100 IU/mL penicillin, and maintained in a 5% CO_2 incubator at 37 °C. A day later, the medium was replaced with a DMEM medium deprived of serum to avoid fibroblast proliferation; this medium contained B27 supplement to facilitate hippocampal neuron survival *in vitro*. Under these conditions the standard cell survival was 4 weeks and the experiments were performed on neurons of 8–15 days in culture. The criteria of selection for current recordings were adhesion to the substrate, soma diameters of 15–30 μm , neuronal shape without an evident shrinkage or swelling, neurite extensions, and absence of intracellular vacuoles (Baldelli *et al.*, 2005).

Immunoblot analysis

Hippocampal neurons were lysed in RIPA buffer of the following composition: Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM; NaCl, 150 mM; ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM; Triton X-100, 1%; sodium deoxycholate, 1%; and SDS, 0.1%; containing 1 mM dithiothreitol and protease inhibitors. Protein concentration was determined with the BCA Protein Assay (Pierce). Equal amounts of total protein were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Immunodetection of proteins was performed by standard procedures using monoclonal antibodies specific for the $\alpha 7$ nAChR subunit (mAb306; 1 : 3000) and β -actin (1 : 10000). We used goat antimouse coupled to horseradish peroxidase. Immunocomplexes were detected with the bioluminescence kit. Densitometric analysis of bands was performed with ImageJ (free image analysis software from NIH).

Current recordings, data acquisition and analysis

Spontaneous activity and nicotinic currents were studied using voltage-clamp recordings in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique (Hamill *et al.*, 1981). Action potentials were recorded using the perforated-patch configuration (Korn *et al.*, 1991) under the current-clamp mode. Whole-cell recordings were made with fire-polished electrodes (resistance 2–5 M Ω when filled with the standard CsCl intracellular solution) mounted on the headstage of an EPC-10 patch-clamp amplifier (HEKA Electronic, Lambrecht, Germany), allowing cancellation of capacitive transients and compensation for series resistance. Data were acquired at sampling frequencies ranging between 5 and 10 kHz and filtered at 1–2 kHz. Recordings with leak currents > 100 pA or series resistance > 20 M Ω were discarded. Petri dishes containing the cells were placed in an experimental chamber mounted on the stage of a Nikon Eclipse T2000 inverted microscope. The cell being recorded was locally, rapidly and continuously superfused with a Tyrode solution containing (in mM): CaCl_2 , 2; NaCl, 137; MgCl_2 , 1; glucose, 10; KCl, 4; and HEPES–NaOH, 10 (pH 7.4). External solutions were rapidly exchanged using electronically driven miniature solenoid valves coupled to a

multibarrel concentration-clamp device, the common outlet of which was placed within 100 μm of the cell to be patched. The flow rate was 1 mL/min and was regulated by gravity. The perforated patch was obtained using pipettes containing 50–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amphotericin B as permeabilizing agent and a pipette-filling solution containing (in mM): KCl, 135; NaCl, 8; MgCl_2 , 2; HEPES, 20; and EGTA, 5 (pH 7.3 with KOH). Amphotericin B was dissolved in dimethyl sulfoxide and stored at -20°C in stock aliquots of 50 mg/mL. Fresh pipette solution was prepared every 2 h. To facilitate the sealing, the pipette was first dipped in a beaker containing the internal solution and then back-filled with the same solution containing amphotericin B. Recordings started when the access resistance decreased to $<15\text{ M}\Omega$, which usually happened within 10 min after sealing. The internal solution used for spontaneous synaptic recordings contained (in mM): CsCl, 160; EGTA, 10; Mg-ATP, 5; Na-GTP, 0.3; and HEPES-CsOH, 10 (pH 7.3). Postsynaptic currents (PSCs) were recorded by superfusing the whole-cell clamped postsynaptic neuron with a Tyrode solution. Miniature (m)PSCs were recorded by superfusing the postsynaptic neuron with a Tyrode solution containing tetrodotoxin (TTX; 5 μM) to block the propagation of spontaneous action potentials. In some experiments the nonselective blocker of glutamate receptors kynurenic acid (1 mM) was used to inhibit the excitatory neurotransmission. In other experiments bicuculline (40 μM) was used in order to block the inhibitory transmission. For nicotinic current recording, cells were dialysed with an intracellular solution containing (in mM): NaCl, 10; CsCl, 100; TEA Cl, 20; Mg ATP, 5; Na GTP, 0.3; EGTA, 14; and HEPES-CsOH, 20 (pH 7.3). Atropine to block muscarinic receptors was not given because we used selective agonists for $\alpha 7$ nAChRs and, additionally, a recent study shows that, at the nM concentrations typically used in synaptic transmission studies, atropine partially blocks nicotinic receptors (González-Rubio *et al.*, 2006).

Data acquisition was performed using PULSE programs (HEKA Elektronik). The data analysis was performed with the MiniAnalysis program (Synaptosoft, Leonia, NJ, USA). All experiments were performed at room temperature (22–24 $^\circ\text{C}$).

Chemicals

5-OH-indole, obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain), was dissolved in DMSO; the maximum concentration of DMSO used was 0.5% and this had no measurable effects on spontaneous (s)PSCs. Choline, methyllycaconitine, bicuculline, kynurenic acid, the monoclonal antibodies for $\alpha 7$ nAChR subunit (mAb306) and for β -actin, and other chemical components for solutions were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). DMEM, B-27, foetal bovine serum and penicillin–streptomycin were purchased from Gibco-Invitrogen (Barcelona, Spain). TTX was obtained from Tocris (Bristol, UK). Protease inhibitors (Complete Protease inhibitor cocktail tablets) were from Boehringer-Mannheim (Germany). Nitrocellulose membranes (Potran[®]) were from Schleicher & Schuell BioSci, GmbH, Germany. Antimouse coupled to horseradish peroxidase was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The bioluminescence kit was from Perkin-Elmer Life Sciences (Milan, Italy).

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM of the number of cells (n) studied, from at least three different cell cultures. Student's t -test was used to determine statistical significance between means. The statistical significance was established at P -values <0.05 .

Results

$\alpha 7$ nAChR expression as a function of days in culture of hippocampal neurons

Immunocytochemistry and patch-clamp techniques have shown that embryonic rat hippocampal neurons maintained in primary cultures for ~ 1 –7 days express a low density of $\alpha 7$ nAChRs; in contrast, 3- to 4-week-old neurons express a higher density of such receptors (Zarei *et al.*, 1999). Therefore, in order to prevent variations in $\alpha 7$ nAChR expression, we analysed the levels of $\alpha 7$ nAChR expression at different numbers of days *in vitro* (DIV). Hence, we performed immunoblot analysis of nAChR $\alpha 7$ proteins in hippocampal neuron homogenates at 0, 7, 14, and 21 DIV. A representative immunoblot corresponding to the same culture measured at different DIV is illustrated in Fig. 1A and the averaged values from four independent experiments are shown in Fig. 1B. $\alpha 7$ nAChR expression was significantly increased above time 0 DIV values by 2.5-, 3.5- and 4.5-fold at 7, 14 and 21 DIV, respectively ($n = 4$). The expression of β -actin remained unchanged. These increases in nAChR $\alpha 7$ expression correlated with an increase in the choline-evoked currents detected, as shown in Fig. 1C. Neurons of 7–10, 11–17 and >18 DIV showed averaged currents of 335 ± 24 , 834 ± 128 and 1290 ± 230 pA, respectively. Thus, we decided to perform all experiments in neurons of ~ 14 DIV, which present both a high expression of $\alpha 7$ nAChRs and a good degree of connectivity between neurons.

Effects of choline on spontaneous action potential firing and on sPSCs recorded from cultured hippocampal neurons

Under perforated-patch and current-clamp conditions in 2 mM external Ca^{2+} , the majority of hippocampal neurons spontaneously fire trains of action potentials. We examined the effects of choline on such electrical activity by selecting neurons without or with very low connectivity, to prevent interference deriving from neighbouring excitatory cells. These neurons showed a resting potential of ~ -56 mV; the threshold for action potential firing was at -40 mV with an overshoot at $+10$ mV. Their frequency and amplitude were drastically modified by choline in a population of these neurons (Fig. 1D); in contrast, other cells (mainly glutamatergic neurons, as established in later experiments; Figs 4 and 5) did not show a change in the action potential pattern upon choline application. This result is probably related to the distinct subset of interneurons present in the hippocampus, with different nAChR expression (McQuiston & Madison, 1999).

A neuron voltage-clamped at -80 mV continuously receives spontaneous synaptic inputs from neighbouring neurons; those inputs are translated into sPSCs. An example of spontaneous activity is shown in trace 1 of Fig. 2A; sPSCs have a quite regular frequency and variable amplitudes, from 100 to 400 pA, with some sporadic larger events. Choline (10 mM) sharply increased the frequency and amplitude of sPSCs (trace 2 of Fig. 2A). The choline response suffered little desensitization along the 5-s pulse period, and its effect was rapidly reversible upon washout (trace 3, Fig. 2A). The choline response was quite variable between different cultures, probably due to different synaptic contacts between neurons. In some cases, neurons failed to respond to choline (26 out of 114 neurons; 22.8%) but in most cases choline exerted an effect similar to that described above (88 out of 114 neurons; 77.2%). The effect exerted by choline seems to be concentration-independent as we did not find statistically significant differences between 1, 3 and 10 mM, so an all-or-none effect seems to account for the actions of choline. Depending on the

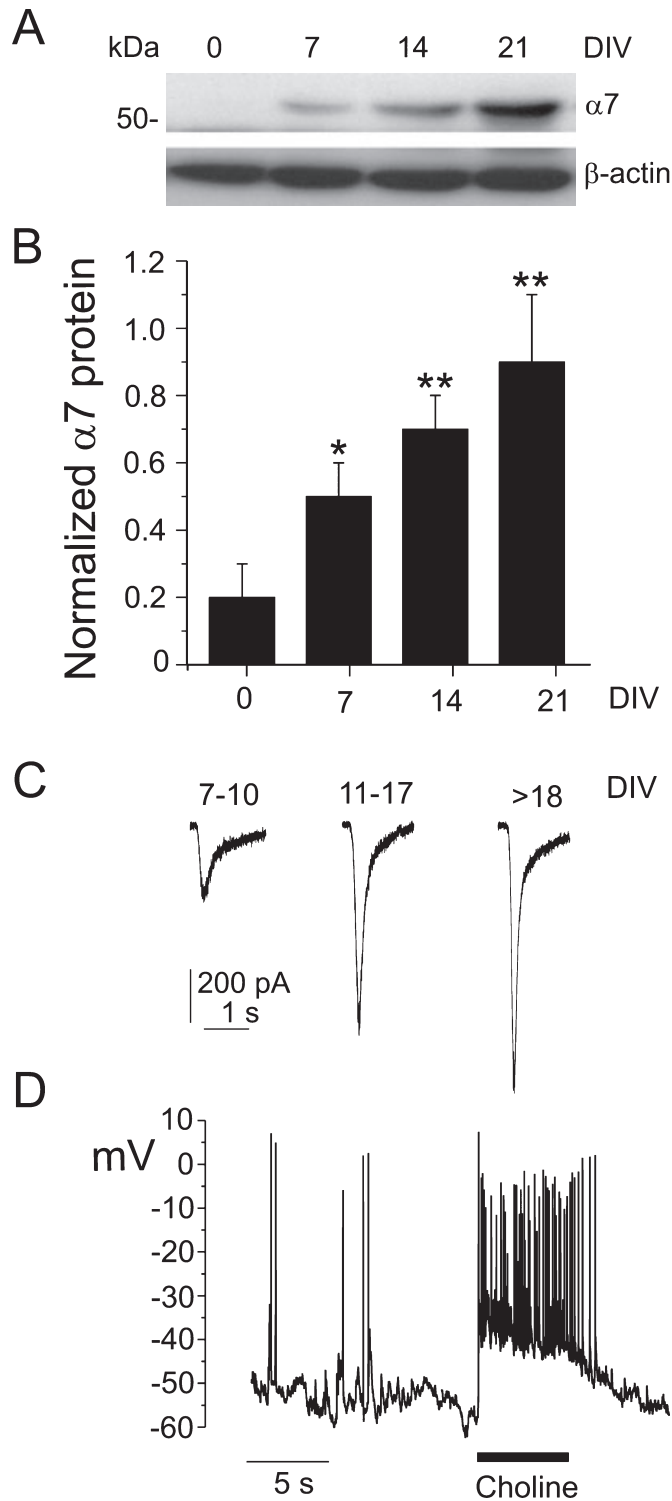


FIG. 1. Time-course of $\alpha 7$ nAChR protein expression in primary cultures of rat hippocampal neurons. (A) Representative immunoblot of the $\alpha 7$ nAChR subunit showing an increase in $\alpha 7$ nAChR protein as a function of DIV (0, 7, 14 and 21). Expression levels of β -actin were also determined by immunoblot and used to normalize the $\alpha 7$ nAChR expression. (B) Densitometric quantification of $\alpha 7$ nAChR blots are shown in panel A; data are the means \pm SEM ($n = 4$ independent experiments from different cell cultures). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. 0 DIV. (C) Original traces of 1 mM choline-evoked currents (2-s pulses) in neurons of the indicated DIV; holding potential -80 mV. (D) Membrane potential and action potential firing in control conditions and during application of 10 mM choline (5-s pulse). Note the pronounced firing augmentation elicited by choline.

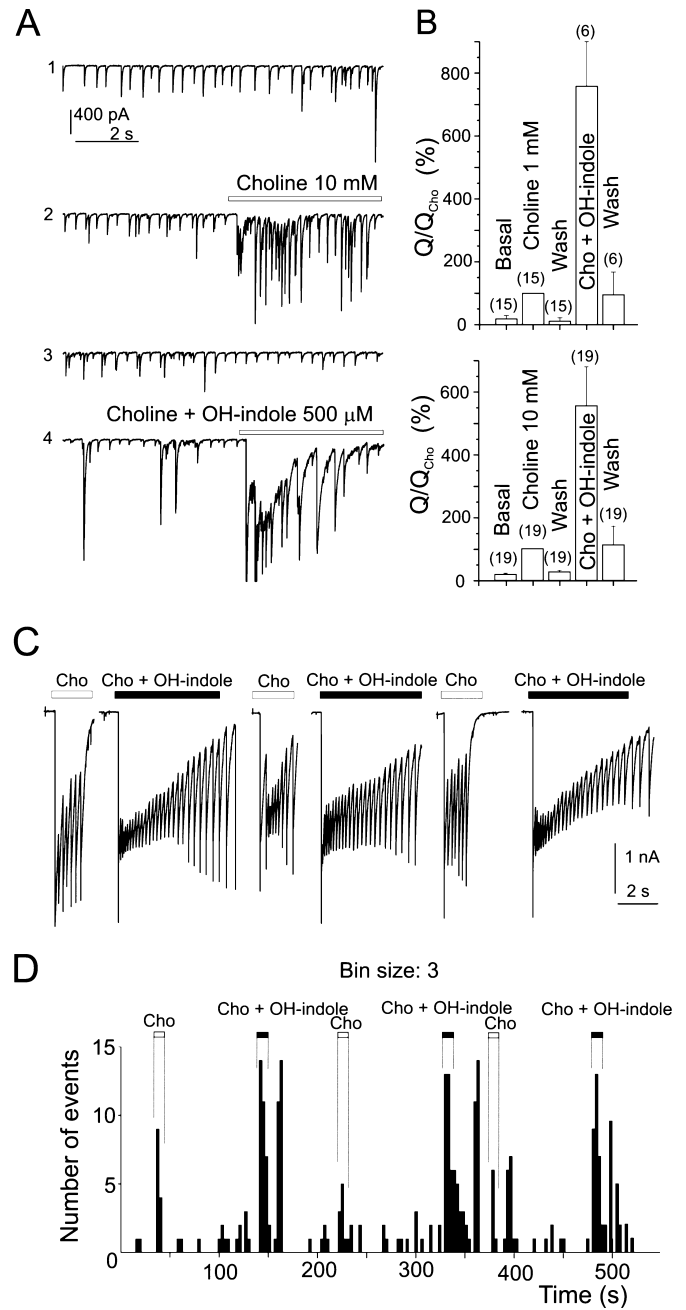


FIG. 2. Choline enhanced spontaneous synaptic activity. (A) Representative traces recorded in a hippocampal cell voltage-clamped at -80 mV under control conditions (trace 1), during application of 5-s choline (Cho; 10 mM, horizontal bar, trace 2), after choline washout (trace 3) and during a 5-s coapplication of choline plus 5-OH-indole (OH-indole; 500 μ M, trace 4). Traces are a 10-s recording selected from continuous sPSCs monitoring; between successive traces there is ~ 1 min interval. Note the marked increase in sPSCs during the time period of nicotinic agonist application. (B) Plot of normalized area calculated at 5-s intervals with respect to responses elicited by choline at 1 mM (top panel) and 10 mM (bottom panel) under the indicated experimental conditions. Means \pm SEM of the cell numbers shown in parentheses. (C) Reproducibility of the effects of choline (10 mM) and their coapplication with 5-OH-indole (500 μ M) on sPSCs within the same neuron; drugs were applied as indicated by the top horizontal bars. (D) Frequency histogram of sPSC activity under control conditions and in the presence of choline or choline plus 5-OH-indole, as indicated (bin size 3 s).

number of inputs to the cell under study, low choline concentrations had no response; however, higher concentrations with or without the $\alpha 7$ nAChR allosteric modulator 5-OH-indole increased the spontaneous activity (see Fig. 3, top trace). Additionally, in many voltage-clamped cells we recorded an inward current immediately after choline application (traces 2 and 4 in Fig. 2A). This was probably due to the presence of $\alpha 7$ nAChR on the neuron being recorded.

Next we wanted to test the effect of 5-OH-indole on synaptic transmission. By itself, 5-OH-indole (500 μM) had no effect on the pattern of sPSCs (data not shown). However, its coapplication with choline produced a pronounced potentiation of sPSCs frequency and amplitude (trace 4, Fig. 2A). This drastic potentiation was also seen in the large shift of the zero-baseline due to overlapping of high-frequency sPSC events. The augmented sPSCs suffered a pronounced desensitization along the 5-s duration of the pulse with choline and 5-OH-indole. Washout of the compounds led to a prompt recovery of the basal pattern of sPSCs (Fig. 2B).

Pooled quantitative results from these experiments are shown in Fig. 2B. The net sPSCs charge (Q) was cumulatively calculated for the 5-s periods preceding drug treatment (basal) or during drug treatments. Data are expressed as percentages of Q_{Cho} , the charge obtained during the 5-s choline application. The top histogram shows that 1 mM choline raised $Q \sim 6$ -fold. 5-OH-indole further augmented the response to choline seven-fold. The bottom histogram shows similar experiments but with 10 mM choline; the data were close to those obtained with 1 mM choline. Note the reversibility of the effects upon washout of choline or choline plus 5-OH-indole.

Figure 2C shows the reproducibility of sPSC augmentation upon repeated application of choline or choline plus 5-OH-indole within the same neuron. Figure 2D is a frequency histogram plotted with data in Fig. 2C, showing the enhanced event frequency elicited by choline or by choline plus 5-OH-indole.

Methyllycaconitine blocked the response to choline and choline plus 5-OH-indole

To corroborate the implication of $\alpha 7$ nAChRs in the modulation of synaptic transmission elicited by choline or by choline plus 5-OH-indole, sPSCs were recorded in both the presence and the absence of the selective $\alpha 7$ nAChR antagonist methyllycaconitine (MLA; Alkondon *et al.*, 2002).

The experiments in Fig. 3 show that the application of choline in combination with 5-OH-indole produced their expected drastic increase in sPSCs. This potentiation was fully prevented by pretreatment with 1 nM MLA (top trace), or when the antagonist was coapplied in combination with choline and 5-OH-indole (bottom trace), in a clearly reversible manner. Thus, exposure to the $\alpha 7$ -selective competitive antagonist MLA completely abolished the effect of choline, even when these receptors were allosterically modulated by 5-OH-indole, confirming the involvement of $\alpha 7$ nAChRs in the choline-induced sPSCs. We found some hippocampal neurons that exhibited a mild response to 10 mM choline (see Fig. 3, top panel); such a response was not augmented by further

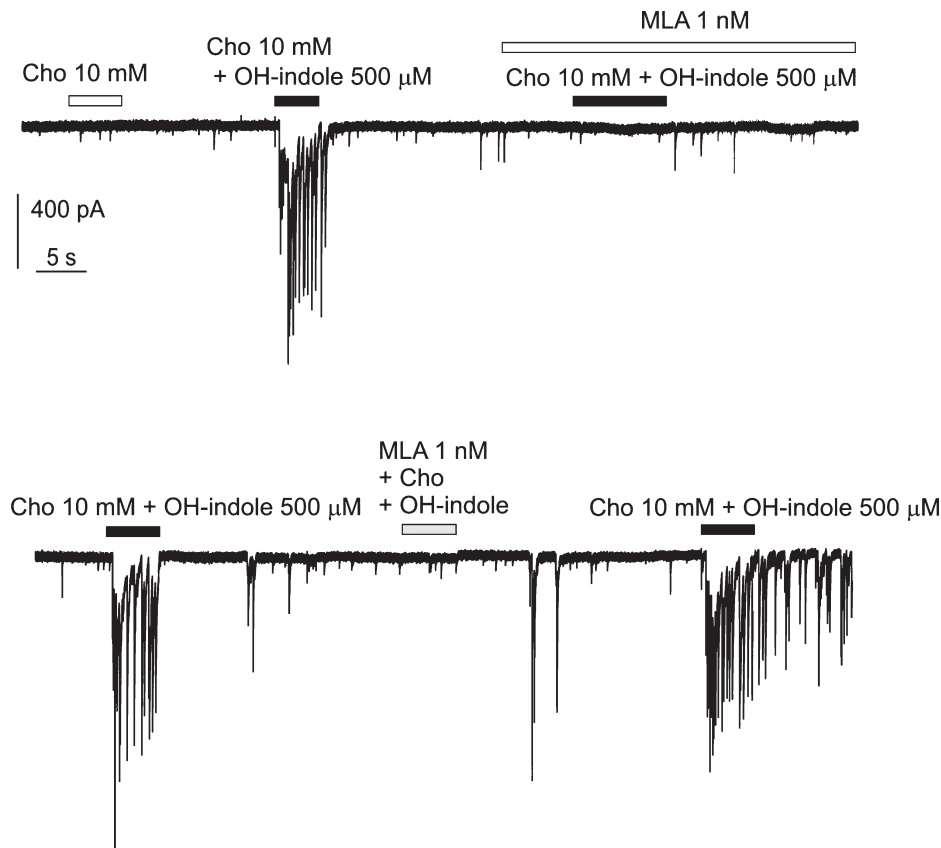


FIG. 3. Methyllycaconitine (MLA), a selective $\alpha 7$ nAChR blocker, inhibited the choline-induced sPSCs. A continuous original record (separated into two traces) of sPSCs is shown. Drugs were applied as shown by top horizontal bars. Holding potential -80 mV. Note that the enhancing effects of choline plus 5-OH-indole were suppressed by MLA.

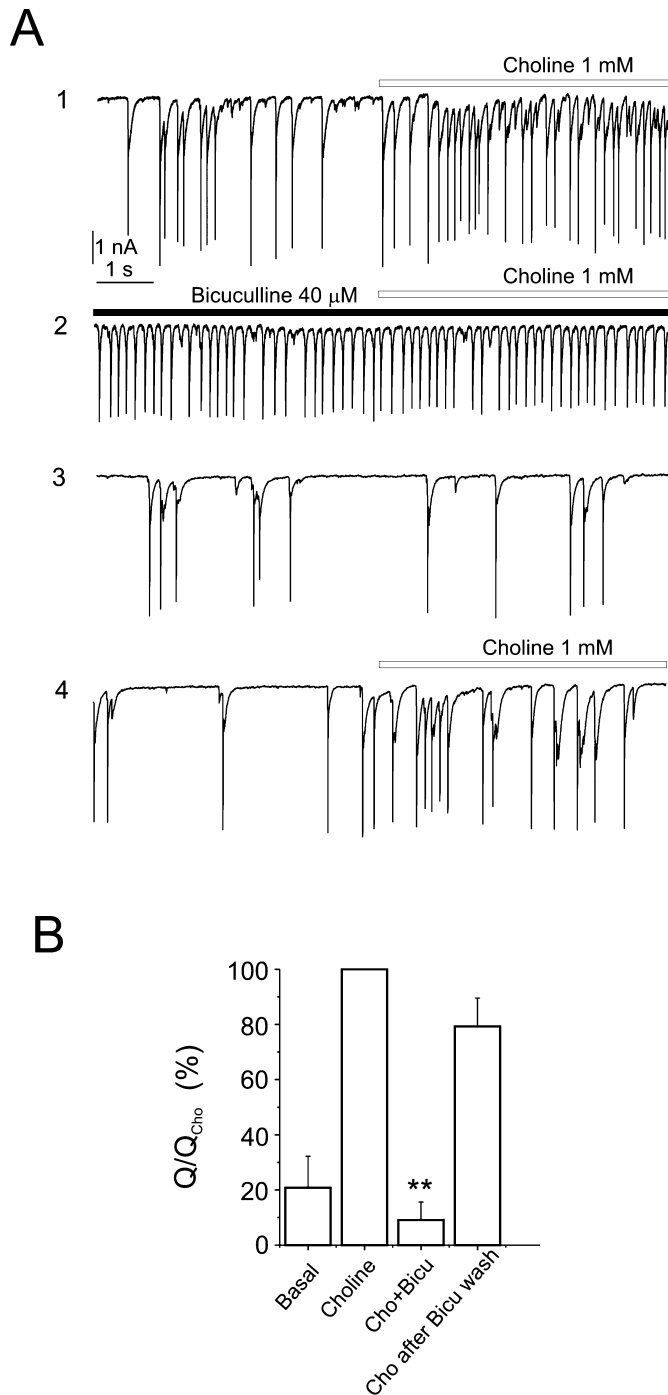


FIG. 4. Bicuculline suppressed the augmentation of sPSCs elicited by choline. (A) Representative recordings of sPSCs in a neuron voltage-clamped at -80 mV. Choline (1 mM) was applied as shown by the top horizontal bars. Note the enhancement effect of choline before (trace 1) and after (trace 4) bicuculline application but not during bicuculline (Bicu) perfusion (trace 2). Note how the inhibition of GABAergic transmission by bicuculline unmasked a previously silent glutamatergic transmission (trace 2); the activity returned to control after bicuculline washout (trace 3). The traces are 10-s records selected from a continuous trace, taken at 1-min intervals. (B) Cumulative charge Q , before and during choline application (Q_{cho}) during 5-s periods under the different experimental conditions. Mean \pm SEM of $n = 7$ cells. $**P < 0.01$ vs. choline.

elevation in the choline concentration. However, in these cells the coapplication with 5-OH-indole allowed cells to reach the firing threshold and so to potentiate neurotransmitter release.

Bicuculline but not kynurenic acid prevented the modulatory effects of $\alpha 7$ nAChR stimulation

We wanted next to explore whether choline preferentially modulated the GABAergic transmission and/or the excitatory glutamatergic transmission. Thus, the experiment of Fig. 4A shows the enhancement by choline of sPSCs (trace 1). In trace 2, bicuculline was added to block the GABA component of the sPSCs; note that in these conditions choline did not modify the pattern of the remaining sPSCs that must be related to glutamate release. Note in trace 3 the restoration of the normal pattern of firing after washout of bicuculline and that choline again potentiated the sPSCs (trace 4). When GABAergic transmission was blocked, a choline-insensitive glutamatergic transmission arose (trace 2) which had previously been inhibited by GABAergic inputs. Pooled results from seven neurons are summarized in Fig. 4B as cumulative charge (Q) in the absence and the presence of bicuculline. The value of Q was calculated during the 5-s application of the agonists and compared with the 5-s recording prior to the addition of choline (basal). The data show that choline induced a five-fold increase in the basal response; this potentiation disappeared in the presence of bicuculline, suggesting a selective effect of choline on GABA release.

The experiment of Fig. 5 further explored the possible glutamatergic component in the facilitatory effect of choline. Note the drastic increase in sPSCs evoked by choline (trace 2); this persisted in the presence of kynurenic acid (1 mM; trace 4) and upon its washout (trace 5). Averaged data from nine cells are shown in Fig. 5B. Note how the choline-evoked potentiation (five-fold higher than basal) was not prevented by kynurenic acid. These data corroborate the finding that the modulatory effect of choline is exerted on GABAergic transmission.

Effect of TTX on sPSCs augmentation elicited by choline and choline plus 5-OH-indole

When nAChRs are activated by an agonist, they mediate a cationic inward current that may depolarize the membrane and open voltage-dependent channels. Furthermore, the high relative permeability to Ca^{2+} of neuronal $\alpha 7$ nAChRs raises the possibility that they might act directly on the exocytotic machinery to promote transmitter release without the need for action potentials propagated into the presynaptic terminal. These possibilities were tested with TTX.

Figure 6A shows the original sPSC traces obtained from a voltage-clamped neuron. Choline plus 5-OH-indole elicited a sharp augmentation of sPSCs (trace 1) that returned to basal upon washout (trace 2). TTX silenced the neuron (trace 3) and suppressed the potentiation effects of choline plus 5-OH-indole (trace 4). TTX washout allowed the recovery of sPSC activity (trace 5) and its potentiation by choline plus 5-OH-indole (not shown). Figure 6B shows pooled data of the cumulative charge Q obtained during each treatment. Note that, by itself, choline enhanced by six-fold the basal activity. Also note that choline plus 5-OH-indole drastically augmented the basal activity found upon choline application (~ 7.5 -fold). TTX silenced the neuron both in the absence and in the presence of $\alpha 7$ ligands. This suggests that the regulatory actions of choline and 5-OH-indole on sPSCs requires Na^+ channel activity and action potential propagation; it is therefore unlikely that the Ca^{2+} influx through the nAChRs directly trigger neurotransmitter release.

Effects of external Ca^{2+} , choline and 5-OH-indole on spontaneous unitary currents

$\alpha 7$ nAChRs being highly permeable to Ca^{2+} ions, the Ca^{2+} entering through presynaptic $\alpha 7$ nAChRs may directly activate the release of

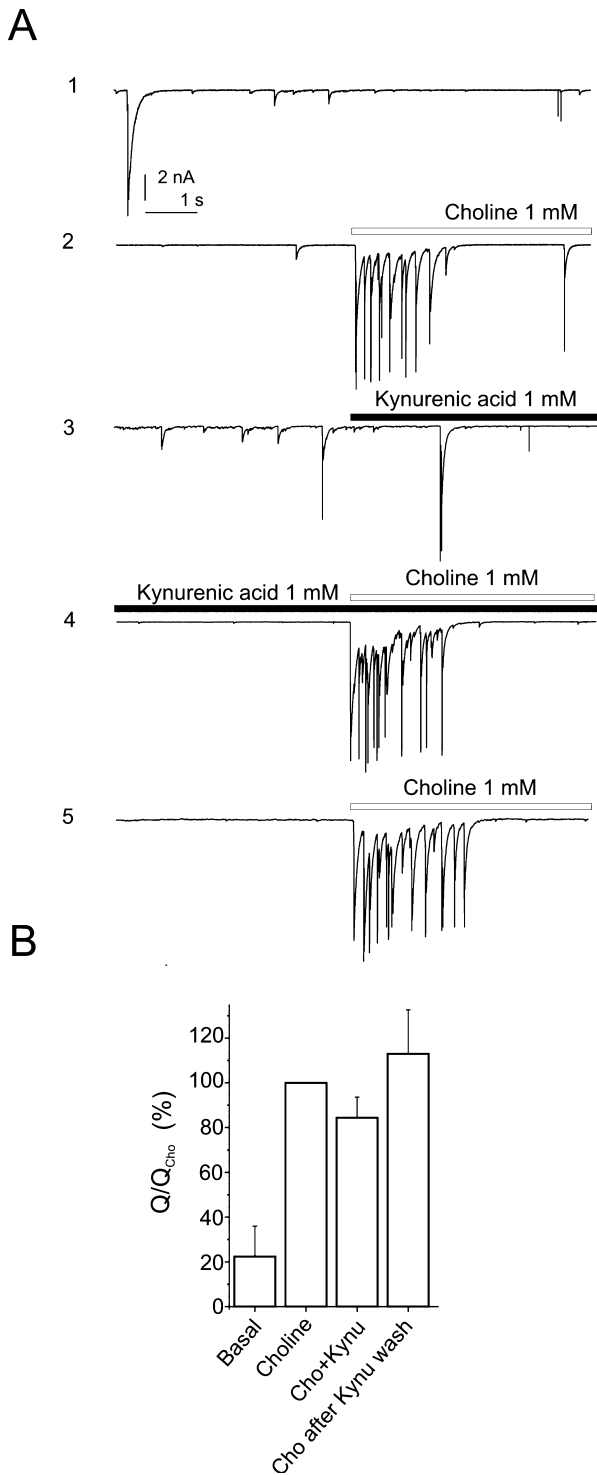


FIG. 5. Kynurenic acid did not affect the enhancement of sPSCs elicited by choline. (A) Representative traces recorded in a hippocampal neuron voltage-clamped at -80 mV. Drugs were added as shown by top horizontal bars. The figure represents the choline (Cho) effect exerted before (trace 2), during (trace 4) and after (trace 5) glutamatergic transmission blockade by kynurenic acid (Kynu). Note the similar enhancement of sPSCs by choline in the presence of kynurenic acid. Traces are 10-s records selected at 1-min intervals from a continuous sPSCs record. (B) Normalized cumulative areas during 5-s choline pulses under different experimental conditions. There were no statistically significant differences between the effects of choline in the different experimental conditions. Means \pm SEM of $n = 9$ cells.

neurotransmitter. To test this possibility, we investigated (i) the Ca^{2+} dependence of mPSCs in the presence of TTX and (ii) whether $\alpha 7$ activation modified the mPSC activity.

Figure 7A shows original traces obtained from a neuron clamped at -80 mV, superfused with $5 \mu\text{M}$ TTX, in control conditions and after blockade of Ca^{2+} influx by Cd^{2+} ($100 \mu\text{M}$). Note the initial small-amplitude mPSCs (~ 25 – 40 pA; control traces) and their partial blockade by Cd^{2+} . The inhibited mPSCs recovered after Cd^{2+} washout (Fig. 7B). We observed a clear difference in the frequency of miniature excitatory PSCs (mEPSCs; 8.6 ± 2 in control vs. 4.0 ± 0.9 Hz in the presence of Cd^{2+} Fig. 7B left, $n = 27$) and miniature inhibitory PSCs (mIPSCs; 2.1 ± 0.8 in control vs. 0.5 ± 0.1 Hz in the presence of Cd^{2+} Fig. 7B right, $n = 20$). In contrast, the amplitude and area of mEPSCs were unaffected by Cd^{2+} (34.4 ± 2 vs. 31.6 ± 2 pA and 152.2 ± 12 vs. 136.4 ± 8 nC in control and in the presence of Cd^{2+} , respectively); the same was true for mIPSCs (41.9 ± 3.1 vs. 41.5 ± 3 pA and 931.8 ± 96 vs. 803.1 ± 71 nC in control and in the presence of Cd^{2+} , respectively).

To test whether the $\alpha 7$ nAChRs are located close to the exocytotic machinery such that their activation produces sufficient Ca^{2+} influx to directly trigger the release process, we recorded the sPSCs and mPSCs in neurons voltage-clamped at -80 mV (see Fig. 7C). Trace 1 shows the normal pattern of sPSCs and their reversible potentiation by 1 mM choline. Traces 2 and 3 were obtained in the same neuron but in the presence of $5 \mu\text{M}$ TTX. mEPSCs and mIPSCs showed clear differences in their biophysical parameters. Events that showed a decay time < 20 ms were considered glutamatergic events, while the GABAergic unitary currents showed a slower inactivation with a decay time considerably longer than 20 ms. According to this, we separated the unitary events in two groups and we analysed the effect of choline on the two independent groups.

Notice that choline, applied for 5 s (trace 2) or 60 s (trace 3), did not modify the pattern of mPSCs activity, which occurred at a frequency of 0.9 ± 0.1 Hz. No modification was detected in kinetic parameters compared with control conditions (amplitude, 35.3 ± 2 pA; area, 883 ± 65 nC; slope $_{10-90}$, 18.6 ± 2 mV/ms; rise time, 4.8 ± 0.3 ms; decay time, 45.7 ± 1.8 ms; and half-width, 8.2 ± 0.4 ms). Choline also produced no effects on the frequency (3.3 ± 0.6 Hz) or kinetic parameters (amplitude, 29.3 ± 2 pA; area, 138 ± 11 nC; slope $_{10-90}$, 27.7 ± 2 mV/ms; rise time, 3.2 ± 0.1 ms; decay time, 7.8 ± 0.6 ms; and half-width, 3.4 ± 0.3 ms) of mEPSCs. mIPSCs were asymmetrically distributed around a peak at 35 pA, indicating that besides a large population of unitary events there was a small proportion of larger events of amplitude > 60 pA that could be ascribed to an increased rate of double vesicular release. The amplitude distribution of mEPSCs was also asymmetrically distributed around a peak of 29 pA. The quantitative analysis of amplitudes showed no difference between controls and nicotinic agonist applications. Neither choline nor choline plus 5-OH-indole affected the pattern of mIPSC or mEPSC events (not shown). The results in Figs 6 and 7 strongly suggest that nAChRs are not tightly colocalized with the active zone of the presynaptic terminals.

Bicuculline and kynurenic acid partially blocked $\alpha 7$ nAChR currents

Few available results in the literature demonstrate that kynurenic acid behaves as a noncompetitive antagonist of ACh-evoked currents (Hilmas *et al.*, 2001). On the other hand, the GABAergic receptor blocker bicuculline reduces the ACh-induced currents in a competitive

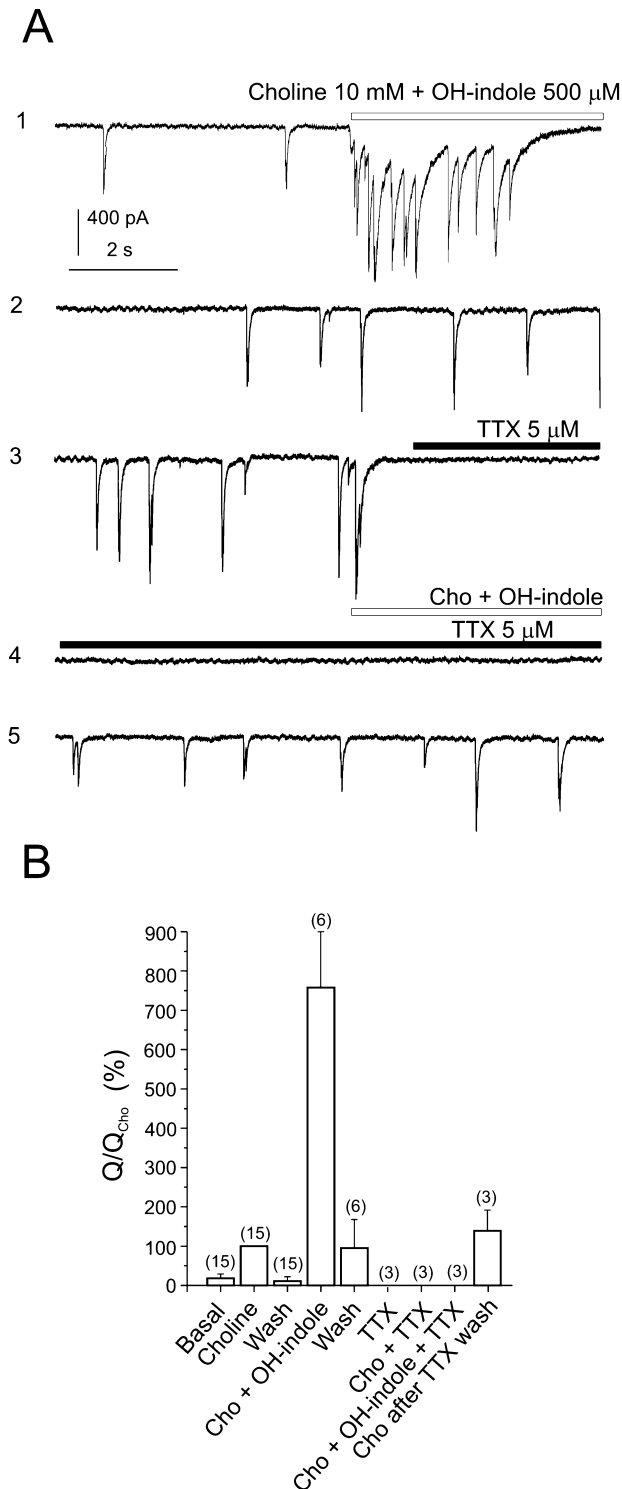


FIG. 6. Choline-evoked sPSCs were blocked by TTX. (A) Representative sPSC traces recorded from a neuron voltage-clamped at -80 mV. TTX blocked the sPSCs but not the small currents arising from quantal release; these events are difficult to see due to the large y -scale. Note the marked sPSC increase during choline and its suppression by TTX. Traces shown represent 10-s records selected from a continuous sPSCs monitoring at 1-min intervals. (B) Cumulative charge in 5-s periods, expressed as percentages of the charge obtained during choline application. Data are means \pm SEM of the number of cells indicated in parentheses. Note the recovery of the spontaneous activity and the choline-induced response after washout of TTX.

or noncompetitive manner for the different nAChR subtypes (Demuro *et al.*, 2001). Hence, we decided to study the effects of bicuculline and kynurenic acid on nAChR currents elicited by choline.

To record nicotinic receptor currents, hippocampal cells superfused with $5 \mu\text{M}$ TTX were voltage-clamped at -80 mV and 1 mM choline was applied as 2-s pulses given at 30-s intervals through a fast superfusion pipette, to prevent nAChR desensitization. The application of choline pulses at 30-s intervals produced highly reproducible currents without desensitization. In 44% of cultured hippocampal neurons tested (17 out of 38 cells), choline-evoked inward currents (I_{cho}) were characterized by fast activation kinetics as well as a fast inactivation. The I_{cho} peak averaged 725.8 ± 66 pA. Figure 8A shows original records obtained in the experimental conditions indicated by the top horizontal bars. Initial choline pulses exerted stable and reproducible nicotinic currents. Bicuculline ($40 \mu\text{M}$) or kynurenic acid (1 mM) were applied before and during choline pulses. Most of the blockade occurred during the first choline pulse after bicuculline or kynurenic acid application. No further blockade was developed during the next pulses. The initial I_{cho} was recovered after blocker washout. The normalized average peak I_{cho} just preceding the application of bicuculline, kynurenic acid or MLA was used as control response to calculate the degree of blockade induced by each individual compound; averaged data are shown in Fig. 8B. Note that bicuculline caused a $25.8 \pm 4\%$ decrease in I_{cho} ($n = 12$ cells) and kynurenic acid caused a $29.8 \pm 6\%$ ($n = 7$ cells) decrease. The selective $\alpha 7$ nAChR blocker MLA (1 nM) reduced I_{cho} by $93.1\% \pm 4$ ($n = 7$ cells).

The $\alpha 7$ nAChR was also able to inhibit the hippocampal synaptic activity

As shown before, the $\alpha 7$ nAChR is involved in the potentiation of synaptic transmission in the hippocampus and so the stimulation of GABAergic synapses can cause either inhibition or disinhibition, depending on neuronal connectivity.

During most of this study, we recorded from neurons with low spontaneous synaptic activity in which the potentiation evoked by choline was more evident. Under these conditions, the most common effect of the $\alpha 7$ nAChR stimulation was GABA_A-mediated potentiation of synaptic transmission. However, in a few neurons we also recorded synaptic inhibition (eight out of 114 cells). Figure 9A shows a clamped neuron with high spontaneous activity in which choline exerted a drastic decrease in sPSCs. This depression was even more pronounced when choline was applied in combination with 5-OH-indole and yet more evident with longer coapplications (1 min) of choline plus 5-OH-indole. This can be better seen in Fig. 9B, where the number of events is plotted against time. The spontaneous activity recovered within a few seconds of choline washout.

Discussion

In the present work we studied the effects of nAChR activation on spontaneous synaptic transmission. We employed rat embryonic hippocampal neurons of ~ 14 days of culture; these express a high density of $\alpha 7$ nAChRs with respect to the weak expression in hippocampal neurons maintained in primary cultures for ~ 1 –7 days (Fig. 1 and Zarei *et al.*, 1999). Moser *et al.* (2007), state that the mAb306 is unreliable for identifying the mouse $\alpha 7$ nAChR protein. However, after testing other antibodies showing nonspecific

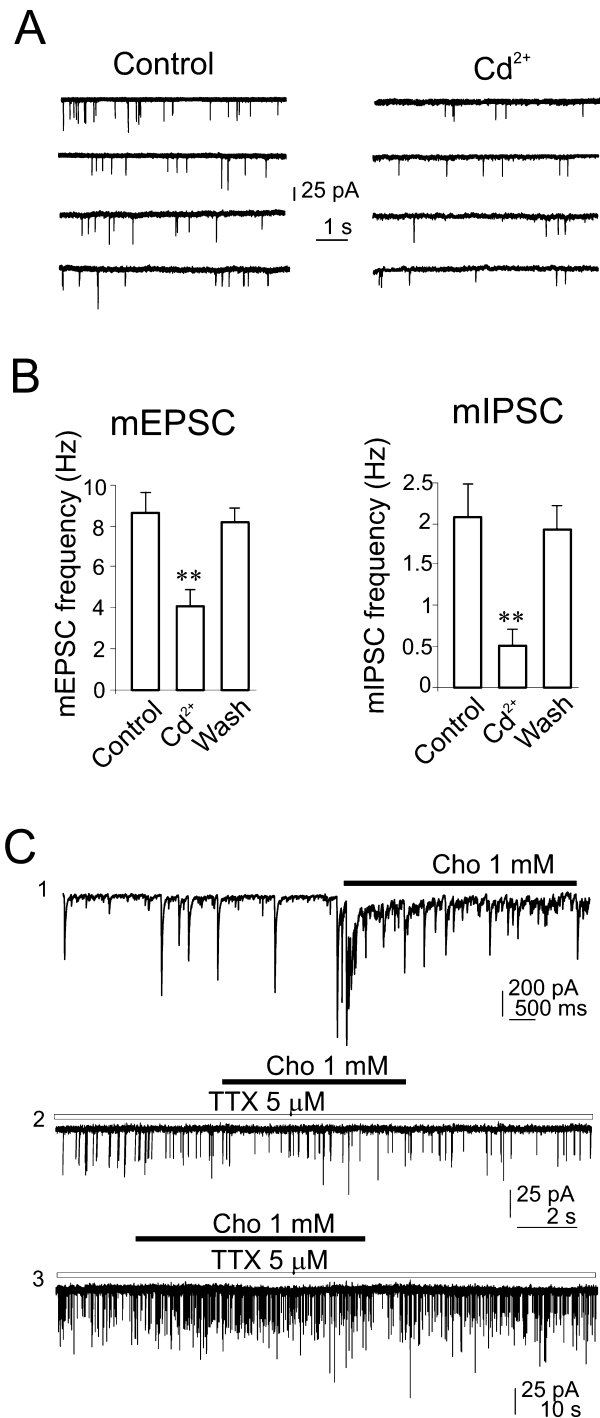


FIG. 7. Calcium dependence of miniature postsynaptic currents was not modified by choline. (A) Representative sequential traces (top to bottom) of mPSCs recorded in the same hippocampal neuron in control conditions (left) and in the presence of $100 \mu\text{M Cd}^{2+}$ (right). Cd^{2+} partially depressed the spontaneous activity. The subsequent washout of Cd^{2+} rapidly restored the control condition (panel B). (B) Frequency histogram of quantal events for mEPSCs and mIPSCs recorded in the conditions indicated at the bottom of each column. Data are means \pm SEM (27 neurons for mEPSCs and 20 for mIPSCs; $**P < 0.01$). (C) Sequential recordings of sPSCs in control conditions and their potentiation by choline (trace 1). Traces of mIPSCs and mEPSCs recorded in the same neuron in the presence of TTX; note that choline given for 5 s (trace 2) or 60 s (trace 3) had no effect. Holding potential, -80 mV .

multibands, we selected mAb306 for two reasons: (i) a single band corresponding to the expected molecular weight of the $\alpha 7$ nAChR subunit was seen; and (ii) the increase in the band density in neurons at

the various DIV tested correlated with the increase in choline-evoked nicotinic currents (Fig. 1). These data agree with binding studies with [^{125}I]- α -bungarotoxin showing an increase in surface $\alpha 7$ nAChRs as a function of DIV during at least the first 3 weeks (Freedman *et al.*, 1993; Barrantes *et al.*, 1995; Samuel *et al.*, 1997; Adams *et al.*, 2001, 2002; Kawai *et al.*, 2002). This suggests that interneuron excitability is differentially regulated by $\alpha 7$ nAChRs at different stages of *in vitro* development (Alkondon *et al.*, 2007). Three different types of nicotinic receptors have been identified in the hippocampus (Alkondon & Albuquerque, 2004); however, the $\alpha 7$ subtype appear to be the most widespread (McQuiston & Madison, 1999). Hence, we focused our study on this receptor subtype.

The structural and functional diversity of nAChRs is well documented. Their diverse preterminal, presynaptic and/or postsynaptic localization, their function and their involvement in several brain diseases has been highly debated in recent years (see Dani & Bertrand, 2007 for a recent review). Here we have demonstrated how $\alpha 7$ nAChR activation clearly enhanced the frequency of sIPSCs in hippocampal neurons in culture. This is in line with the observation that nicotine causes activation of $\alpha 7$ nAChRs of GABAergic neurons (Maggi *et al.*, 2001). Activation of muscarinic receptors also increases GABA release (Pitler & Alger, 1992). However, these receptors did not account for any of our present results as we used choline, a selective agonist of $\alpha 7$ nAChRs.

The choline effect was blocked by bicuculline but not by kynurenic acid, suggesting a selective action of choline on GABAergic interneurons. This agrees with the detection of ACh-evoked currents only in GABAergic interneurons and the selective immune localization of $\alpha 7$ subunits in such neurons (Kawai *et al.*, 2002) but not in pyramidal cells (Frazier *et al.*, 1998). The increase in GABAergic transmission due to the activation by choline of $\alpha 7$ nAChRs was reversibly blocked by MLA, and drastically increased (seven- to eight-fold) when choline was coapplied with 5-OH-indole. This positive allosteric modulator of $\alpha 7$ nAChRs (Zwart *et al.*, 2002) enhances receptor function elicited by endogenous agonists; thus, the presence of choline was necessary for 5-OH-indole activity. In the absence of choline, 5-OH-indole had no action on sIPSCs, suggesting an absence of endogenous agonists in the extracellular space. Therefore, $\alpha 7$ nAChRs are not tonically activated. These data agree with the studies of Zwart *et al.* (2002) and Mok & Kew (2006) who found that single application of this allosteric modulator had not effects on hippocampal slices even though the expression of functional $\alpha 7$ nAChRs was confirmed. However, in another study, 5-OH-indole was found to increase transmitter release in the CA1 region of the hippocampus (Mannaioni *et al.*, 2003).

Presently, there is no agreement about the role of nAChRs in synaptic transmission in the hippocampus. For instance, $\alpha 3\beta 4$ nAChRs regulate glutamatergic transmission to CA1 interneurons of rat hippocampal slices, $\alpha 4\beta 2$ nAChRs playing no role (Alkondon & Albuquerque, 2004). On the other hand, $\alpha 7$ nAChR-dependent EPSC modulation in CA1 pyramidal neurons (Gray *et al.*, 1996; Ji *et al.*, 2001) contrasts with our results which demonstrate that their effects are exerted exclusively on GABAergic synapses; they are also in contradiction with previous studies in hippocampal slices where the effect of nicotine on the afferent connections of stratum lacunosum-moleculare was blocked by GABAergic antagonists (Giocomo & Hasselmo, 2005). Other studies suggest that the TTX-sensitive GABA release from CA1 interneurons and from cultured hippocampal neurons is facilitated by activation of both $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nAChRs; however, GABA released by field electrical stimulation is inhibited by both nAChR subtypes (Albuquerque *et al.*, 1998). Using genetically modified mice, other authors have described how $\alpha 7$ nAChRs exert a

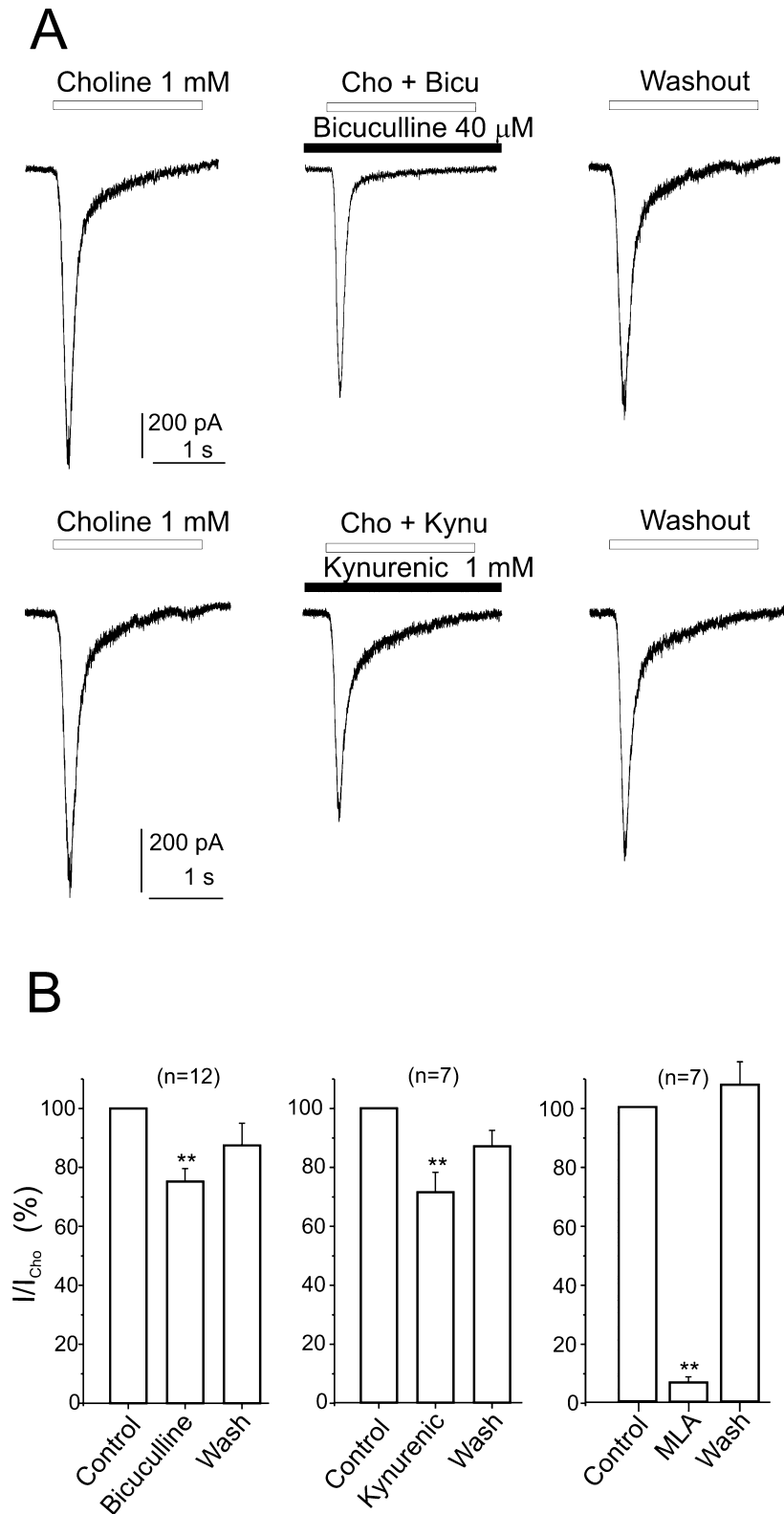


FIG. 8. Effect of bicuculline and kynurenic acid on $\alpha 7$ nicotinic currents. Nicotinic currents were elicited by application of 1 mM choline in cells voltage-clamped at -80 mV. Choline pulses (1 mM, 2 s) were applied at 30-s intervals. (A) Top panels: original traces obtained with choline, in control conditions (left), in the presence of $40 \mu\text{M}$ bicuculline (middle) and after bicuculline washout (right). Bottom panels: similar experiments have been developed to test the blocking effect exerted by 1 mM kynurenic acid on choline-evoked nicotinic currents. (B) Pooled quantitative I_{ChO} obtained with the different experimental conditions shown in A, and (right) control experiments to test the contribution of $\alpha 7$ nAChRs to the total choline-evoked current; the nicotinic current was blocked with the selective $\alpha 7$ antagonist MLA (1 nM). Data are means \pm SEM of the number of neurons shown in parentheses; ** $P < 0.01$.

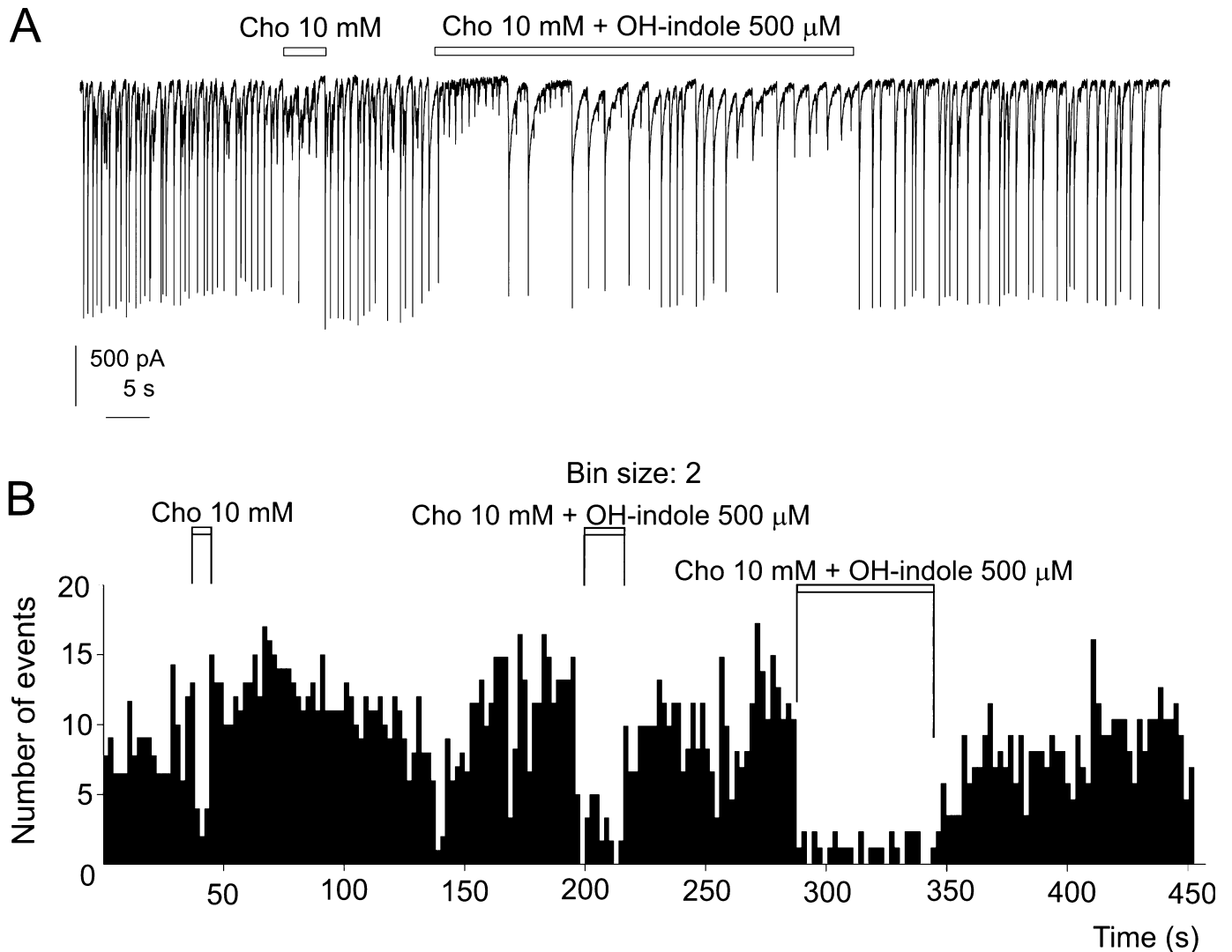


FIG. 9. In some neurons choline application exerted a decrease in sPSC frequency. (A) Continuous spontaneous activity recorded in voltage-clamped neurons (holding potential, -80 mV). Choline exerted a drastic decrease in sPSCs, which was more pronounced when choline was applied in combination with 5-OH-indole (top horizontal bars). (B) Frequency histogram for sPSC activity under control conditions and in the presence of choline or choline plus 5-OH-indole, as shown by the top horizontal bars (bin size 2 s). The data in the histogram are from the experiment shown in panel A.

fine regional modulation of GABAergic and glutamatergic transmission that underlies nicotine-elicited changes in neuronal network synchronization (Le Magueresse *et al.*, 2006).

In our hands, choline-evoked inward currents exhibited the kinetic characteristics of $\alpha 7$ nAChRs. An extensive literature suggests that this receptor is the target of many compounds in addition to selective nAChR antagonists. Focusing on specific glutamatergic or GABAergic receptor blockers, it was seen that bicuculline, hydrastine and gabazine inhibited the ACh responses in a noncompetitive and voltage-independent fashion (Jackson *et al.*, 2002). Furthermore, NMDA receptor antagonists can inhibit both the transmission of pain signals from the intestine and enteric reflexes, and their effects on motility reflexes are probably due to non-NMDA receptor actions, possibly on nAChRs (Shafton *et al.*, 2007). We have demonstrated that selective specific drugs for these receptors also induce a partial blockade of nAChRs, as pointed out in previous studies (Demuro *et al.*, 2001; Hilmas *et al.*, 2001). So, to prevent a partial suppression of the effects of choline on synaptic transmission, we avoided the use of bicuculline and kinurenic acid in the experiments on the effects of

choline on synaptic current recordings. In any case, we demonstrated that the effects of choline on synaptic transmission were exerted exclusively on GABAergic synapses and did not involve glutamate release (Figs 4 and 5).

The addition of TTX abolished the effect of choline, indicating that (i) $\alpha 7$ nAChRs are mainly located on the cell body and dendrites but not in the nerve terminals tightly colocalized with the exocytotic machinery and that (ii) the initiation of an action potential or local Na^+ channel-dependent depolarization is required for the effects of $\alpha 7$ on synaptic transmission. Such localization of $\alpha 7$ nAChRs has also been found in other brain regions (Léna *et al.*, 1993). Recently, it has been reported that the amplitude of the $\alpha 7$ nAChR-mediated current drastically decreased with the distance from the soma in rat hippocampal neurons, while the amplitude of evoked $[\text{Ca}^{2+}]_c$ signals did not correlate with distance from the soma (Fayk & Yakel, 2007).

Even in the absence of GABAergic transmission or action potentials, some GABAergic neurons respond with inward nicotinic currents following their exposure to choline. Thus, the $\alpha 7$ nAChR

provides a mechanism whereby the activation of only a few nAChRs could alter the hippocampal network excitability. The question arises as to whether Ca^{2+} entering through the highly Ca^{2+} -permeable $\alpha 7$ nAChR may trigger transmitter release. Our present study and other reports have generally shown that nAChR-evoked transmitter release is a Na^+ -dependent process as it was drastically reduced by TTX, Cd^{2+} and voltage-dependent calcium channel blockers (Soliakov & Wonnacott, 1996). So, Ca^{2+} influx through voltage-dependent Ca^{2+} channels seems to be an obligatory step in the nAChR-evoked facilitation of neurotransmitter release. A recent report indicates that the activation of presynaptic Ca^{2+} stores is not necessary for, but contributes to, nAChR-elicited increases in neurotransmitter release (Le Magueresse & Cherubini, 2007). Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release triggered by Ca^{2+} entry through $\alpha 7$ nAChRs may be a step in the complex regulation of Ca^{2+} -mediated events following nAChR activation (Dickinson *et al.*, 2007). In summary, the sIPSC modulation exerted by $\alpha 7$ nAChRs seems to be TTX-sensitive; however, we cannot discount a minor TTX-insensitive stimulation of transmitter release.

This TTX-insensitive nAChR stimulation of transmitter release could be dependent on: (i) Na^+ influx through the $\alpha 7$ nAChR that may produce sufficient local depolarization to activate Ca^{2+} channels colocalized with the exocytotic machinery; thus, the modulatory effect of $\alpha 7$ nAChRs could be exerted in the absence of action potential propagation and Ca^{2+} influx through the nAChRs; or (ii) cooperativity of Ca^{2+} entry through $\alpha 7$ nAChRs and local depolarization, as postulated for excitatory synapses where presynaptic $\alpha 7$ nAChRs increase the probability of glutamate release in the presence of TTX and Ca^{2+} channel blockers (Gray *et al.*, 1996). To test this hypothesis we recorded the spontaneous vesicular release; we observed that an important fraction of quantal release is Ca^{2+} -dependent. Application of choline or choline plus 5-OH-indole did not modify the frequency or amplitude of mIPSCs or mEPSCs. This suggested that the increased vesicular release detected by $\alpha 7$ nAChR activation occurred through the activation of receptors not colocalized with the secretory machinery. Therefore, the absence of the effects of $\alpha 7$ nAChRs on mIPSCs rules out the possibility of a nicotinic-mediated Ca^{2+} influx and confirms the need for depolarization to open Ca^{2+} channels, to explain the effects of choline. This partnership of external Ca^{2+} influx in quantal release disagrees with the classical idea that this phenomenon is independent of the activity of presynaptic Ca^{2+} channels (Emptage *et al.*, 2001), occurs in the absence of extracellular Ca^{2+} (Erulkar & Rahamimoff, 1978; Malgaroli & Tsien, 1992) and may be driven by Ca^{2+} that becomes available from other sources than the extracellular space (Llano *et al.*, 2000). In our hands, the quantal release (mIPSCs and mEPSCs) is strongly dependent on Ca^{2+} influx through voltage-gated Ca^{2+} channels. However, in hippocampal mossy fibres (Sharma & Vijayaraghavan, 2003), Ca^{2+} influx through $\alpha 7$ nAChRs may initiate Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release from presynaptic stores, which evokes the firing of mEPSCs.

Interneurons comprise a very diverse group with a wide variety of specialized synapses, depending on the neurons involved (McQuiston & Madison, 1999). Thus, $\alpha 7$ nAChR activation can lead to either inhibition or disinhibition of hippocampal output and can have divergent effects on synaptic plasticity as well (Fujii *et al.*, 2000; Ji *et al.*, 2001). These anatomical differences could explain how the activation of nicotinic inputs to the hippocampus could produce the activation of interneurons that directly inhibit pyramidal neuron activity, but they could also produce inhibition of other GABAergic cells, leading to disinhibition of pyramidal cells. The activation of $\alpha 7$ nAChRs could result in a suppression of

synaptic transmission due to the potentiation of GABAergic interneurons that contact with other interneurons (Acsady *et al.*, 1996). We have observed this phenomenon in $\sim 7\%$ of neurons tested. Similar data have been obtained in rat hippocampal slices (Ji & Dani, 2000). Thus, cholinergic nicotinic activation can produce both a direct inhibition and an indirect disinhibition to control the firing rate of a neuron.

In summary, in the hippocampus, GABAergic inhibitory interneurons, which are $< 15\%$ of the total neuron population (Olbrich & Braak, 1985), play an important role in regulating the excitability and synchronization of neuronal activity. Thus, when nAChRs are expressed on presynaptic neurons their activation increases neurotransmitter release but when they are expressed on postsynaptic neurons they induce depolarization and Ca^{2+} signals that activate intracellular signalling mechanisms and gene transcription. Both presynaptic and postsynaptic effects lead to changes in synaptic transmission (see McKay *et al.*, 2007, for a recent review).

With this study we aimed at achieving a better knowledge of the physiological relevance of nAChRs in the hippocampus. Additionally, nAChRs have been considered as targets for novel therapeutic approaches in the treatment of pathologies and neurology disorders that involve disruption of the normal function of cholinergic systems, i.e. Alzheimer's disease, Levy body dementia and Parkinson's disease (Perry *et al.*, 1995), epilepsy (Steinlein *et al.*, 1995), schizophrenia (Freedman *et al.*, 1997) and even cell proliferation and differentiation in the developing CNS (McFarland *et al.*, 1991). Current strategies to enhance nicotinic transmission in the brain include the use of selective agonists or acetylcholinesterase inhibitors, but an alternative would be the use of drugs that are not nAChR agonists themselves but allosteric modulators that potentiate responses to the endogenous transmitter acetylcholine. We expect that our study will provide new knowledge to favour the identification of novel therapeutic targets and therapeutic strategies to treat such diseases.

Acknowledgements

We thank Dr José María Solís for stimulating discussions throughout the course of this work. We are grateful to C. Franchino for the excellent cell culture preparation. This work was supported by a Ramon y Cajal contract to J.M.H.-G. and by Ministerio de Educación y Ciencia (grant BFU2004-07998/BFI to J.M.H.-G.; grant SAF2004-07307 to L.G. and grant SAF2006-03589 to A.G.G.), and Mutua Madrileña to L.G. J.J.A. is a fellow of Fundación Teófilo Hernando; J.C.G. is a fellow of Ministerio de Educación y Ciencia. We also thank 'Fundación Teófilo Hernando' for continued support.

Abbreviations

CNS, central nervous system; DIV, days *in vitro*; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EPSC, excitatory PSC; I_{cho} , choline-evoked current; IPSC, inhibitory PSC; mEPSC, miniature EPSC; mIPSCs, miniature IPSC; MLA, methyllycaconitine; mPSCs, miniature PSC; nAChR, nicotinic receptor for acetylcholine; PBS, phosphate buffer solution; PSC, postsynaptic current; Q, net sPSCs charge; sPSC, spontaneous PSC; TTX, tetrodotoxin.

References

- Acsady, L., Gores, T.J. & Freund, T.F. (1996) Different populations of vasoactive intestinal polypeptide immunoreactive interneurons are specialized to control pyramidal cells or interneurons in the hippocampus. *Neuroscience*, **73**, 317–334.
- Adams, C.E., Broide, R.S., Chen, Y., Winzer-Serhan, U.H., Henderson, T.A., Leslie, F.M. & Freedman, R. (2002) Development of the $\alpha 7$ nicotinic

- cholinergic receptor in rat hippocampal formation. *Dev. Brain Res.*, **139**, 175–187.
- Adams, C.E., Stitzel, J.A., Collins, A.C. & Freedman, R. (2001) $\alpha 7$ -nicotinic receptor expression and anatomical organization of hippocampal interneurons. *Brain Res.*, **922**, 180–190.
- Albuquerque, E.X., Pereira, E.F., Braga, M.F. & Alkondon, M. (1998) Contribution of nicotinic receptors to the function of synapses in the central nervous system: the action of choline as a selective agonist of $\alpha 7$ receptors. *J. Physiol. (Paris)*, **92**, 309–316.
- Alkondon, M. & Albuquerque, E.X. (2004) The nicotinic acetylcholine receptor subtypes and their function in the hippocampus and cerebral cortex. *Prog. Brain Res.*, **145**, 109–120.
- Alkondon, M., Pereira, E.F. & Albuquerque, E.X. (2007) Age-dependent changes in the functional expression of two nicotinic receptor subtypes in CA1 stratum radiatum interneurons in the rat hippocampus. *Biochem. Pharmacol.*, **74**, 1134–1144.
- Alkondon, M., Pereira, E.F., Eisenberg, H.M. & Albuquerque, E.X. (1999) Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *J. Neurosci.*, **19**, 2693–2705.
- Alkondon, M., Pereira, E.F., Wonnacott, S. & Albuquerque, E.X. (2002) Blockade of nicotinic currents in hippocampal neurons defines methyllycaconitine as a potent and specific receptor antagonist. *Mol. Pharmacol.*, **41**, 802–808.
- Alkondon, M., Reinhardt, S., Lobron, C., Hermsen, B., Maelicke, A. & Albuquerque, E.X. (1994) Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. The rundown and inward rectification of agonist-elicited whole-cell currents and identification of receptor subunits by *in situ* hybridization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **271**, 494–506.
- Aracava, Y., Deshpande, S.S., Swanson, K.L., Wonnacott, S., Lunt, G. & Albuquerque, E.X. (1987) Nicotinic acetylcholine receptors in cultured neurons from the hippocampus and brain stem of the rat characterized by single channel recording. *FEBS Lett.*, **222**, 63–70.
- Baldelli, P., Hernández-Guijo, J.M., Carabelli, V. & Carbone, E. (2005) Brain-derived neurotrophic factor enhances GABA release probability and nonuniform distribution of N- and P/Q-type channels on release sites of hippocampal inhibitory synapses. *J. Neurosci.*, **25**, 3358–3368.
- Barrantes, G.E., Roger, A.T., Lindstrom, J. & Wonnacott, S. (1995) α -Bungarotoxin binding sites in rat hippocampal and cortical cultures: initial characterization, colocalization with $\alpha 7$ subunits and up-regulation by chronic nicotine treatment. *Brain Res.*, **672**, 228–236.
- Berger, F., Cage, F.H. & Vijayaraghavan, S. (1998) Nicotinic receptor-induced apoptotic cell death of hippocampal progenitor cells. *J. Neurosci.*, **18**, 6871–6881.
- Bertolino, M., Kellar, K.J., Vicini, S. & Gillis, R.A. (1997) Nicotinic receptor mediates spontaneous GABA release in rat dorsal motor nucleus of the vagus. *Neuroscience*, **79**, 671–681.
- Broide, R.S. & Leslie, F.M. (1999) The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity. *Mol. Neurobiol.*, **20**, 1–16.
- Buccafusco, J.J., Prendergast, M.A., Terry, A.V. & Jackson, W.J. (1998) Cognitive effects of nicotinic cholinergic receptor agonists in nonhuman primates. *Drug Dev. Res.*, **38**, 196–203.
- Dani, J.A. & Bertrand, D. (2007) Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **47**, 699–729.
- Demuro, A., Palma, E., Eusebi, F. & Miledi, R. (2001) Inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by bicuculline. *Neuropharmacology*, **41**, 854–861.
- Dickinson, J.A., Hanrott, K.E., Mok, M.H., Kew, J.N. & Wonnacott, S. (2007) Differential coupling of $\alpha 7$ and non- $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors to calcium-induced calcium release and voltage-operated calcium channels in PC12 cells. *J. Neurochem.*, **100**, 1089–1096.
- Emptage, N.J., Reid, C.A. & Fine, A. (2001) Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca^{2+} entry, and spontaneous transmitter release. *Neuron*, **29**, 197–208.
- Erlulker, S.D. & Rahamimoff, R. (1978) The role of calcium ions in tetanic and post-tetanic increase of miniature end-plate potential frequency. *J. Physiol. (Lond.)*, **278**, 501–511.
- Fayk, D. & Yakel, J.L. (2007) Dendritic Ca^{2+} signalling due to activation of $\alpha 7$ -containing nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. *J. Physiol. (Paris)*, **282**, 597–611.
- Frazier, C.J., Rollins, Y.K., Breese, C.R., Leonard, S., Freedman, R. & Dunwiddie, T.V. (1998) Acetylcholine activates a α -bungarotoxin-sensitive nicotinic current in rat hippocampal interneurons, but not in pyramidal cells. *J. Neurosci.*, **18**, 1187–1195.
- Freedman, R., Coon, H., Myles-Worsley, M., Orr-Urtreger, A., Olincy, A., Davis, A., Polymeropoulos, M., Holik, J., Hopkins, J., Hoff, M., Rosenthal, J., Waldo, M.C., Reimherr, F., Wender, P., Yaw, J., Young, D.A., Breese, C.R., Adams, C., Patterson, D., Adler, L.E., Kruglyak, L., Leonard, S. & Byerley, W. (1997) Linkage of a neurophysiological deficit in schizophrenia to a chromosome 15 locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 587–592.
- Freedman, R., Wetmore, C., Stromberg, I., Leonard, S. & Olson, L. (1993) α -bungarotoxin binding to hippocampal interneurons: immunocytochemical characterization and effects on growth factor expression. *J. Neurosci.*, **13**, 1965–1975.
- Freund, T.F. & Buzsáki, G. (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, **6**, 347–470.
- Fujii, S., Ji, Z. & Sumikawa, K. (2000) Inactivation of $\alpha 7$ ACh receptors and activation of non- $\alpha 7$ ACh receptors both contribute to long term potentiation induction in the hippocampal CA1 region. *Neurosci. Lett.*, **286**, 134–138.
- Giocomo, L.M. & Hasselmo, M.E. (2005) Nicotinic modulation of glutamatergic synaptic transmission in region CA3 of the hippocampus. *Eur. J. Neurosci.*, **22**, 1349–1356.
- González-Rubio, J.M., García de Diego, A.M., Egea, J., Olivares, R., Rojo, J., Gandía, L., García, A.G. & Hernández-Guijo, J.M. (2006) Blockade of nicotinic receptors of bovine adrenal chromaffin cells by nanomolar concentrations of atropine. *Eur. J. Pharmacol.*, **535**, 13–24.
- Gray, R., Rajan, A., Radcliffe, K., Yakehiro, M. & Dani, J. (1996) Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature*, **383**, 713–716.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **391**, 85–100.
- Hefft, S., Hulo, S., Bertrand, D. & Müller, D. (1999) Synaptic transmission at nicotinic receptors in rat hippocampal organotypic cultures and slices. *J. Physiol. (Lond.)*, **515**, 769–776.
- Hilmas, C., Pereira, E.F., Alkondon, M., Rassoulpour, A., Schwarcz, R. & Albuquerque, E.X. (2001) The brain metabolite kynurenic acid inhibits $\alpha 7$ nicotinic receptor activity and increases non- $\alpha 7$ nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *J. Neurosci.*, **21**, 7463–7473.
- Jackson, C., Bermudez, I. & Beadle, D.J. (2002) Pharmacological properties of nicotinic acetylcholine receptors in isolated *Locusta migratoria* neurons. *Microsc. Res. Techn.*, **56**, 249–255.
- Ji, D. & Dani, J.A. (2000) Inhibition and disinhibition of pyramidal neurons by activation of nicotinic receptors on hippocampal interneurons. *J. Neurophysiol.*, **83**, 2683–2690.
- Ji, D., Lape, R. & Dani, J.A. (2001) Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, **31**, 131–141.
- Kawai, H., Zago, W. & Berg, D.K. (2002) Nicotinic $\alpha 7$ receptor clusters on hippocampal GABAergic neurons: regulation by synaptic activity and neurotrophins. *J. Neurosci.*, **22**, 7903–7912.
- Keller, J.J., Keller, A.B., Bowers, B.J. & Wehner, J.M. (2005) Performance of $\alpha 7$ nicotinic receptor null mutants is impaired in appetitive learning measured in a signalled nose poke task. *Behav. Brain Res.*, **162**, 143–152.
- Korn, S.J., Marty, A., Connor, J.A. & Horn, R. (1991) Perforated patch recording. *Meth. Neurosci.*, **4**, 264–273.
- Le Magueresse, C. & Cherubini, E. (2007) Presynaptic calcium stores contribute to nicotinic-elicited potentiation of evoked synaptic transmission at CA3-CA1 connections in the neonatal rat hippocampus. *Hippocampus*, **17**, 316–325.
- Le Magueresse, C., Safulina, V., Changeux, J.P. & Cherubini, E. (2006) Nicotinic modulation of network and synaptic transmission in the immature hippocampus investigated with genetically modified mice. *J. Physiol. (Lond.)*, **576**, 533–546.
- Léna, C., Changeux, J.P. & Mulle, C. (1993) Evidence for preterminal nicotinic receptors on GABAergic axons in the rat interpeduncular nucleus. *J. Neurosci.*, **13**, 2680–2688.
- Levin, E.D., Bettgowda, C., Blosser, J. & Gordon, J. (1999) AR-R17779, an $\alpha 7$ nicotinic agonist, improves learning and memory in rats. *Behav. Pharmacol.*, **10**, 675–680.
- Li, X., Rainnie, D.G., McCarley, R.W. & Greene, R.W. (1998) Presynaptic nicotinic receptors facilitate monoaminergic transmission. *J. Neurosci.*, **18**, 1904–1912.
- Llano, I., González, J., Caputo, C., Lai, F.A., Blayney, L.M., Tan, Y.P. & Marty, A. (2000) Presynaptic calcium stores underlie large-amplitude miniature IPSCs and spontaneous calcium transients. *Nat. Neurosci.*, **3**, 1256–1265.
- Maggi, L., Sher, E. & Cherubini, E. (2001) Regulation of GABA release by nicotinic acetylcholine receptors in the neonatal rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)*, **536**, 89–100.

- Malgaroli, A. & Tsien, R.W. (1992) Glutamate-induced long-term potentiation of the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *Nature*, **357**, 134–139.
- Mannaioni, G., Carpenedo, R. & Moroni, F. (2003) 5-hydroxyindole causes convulsions and increases transmitter release in the CA1 region of the rat hippocampus. *Br. J. Pharmacol.*, **138**, 245–253.
- Mansvelder, H.D. & McGehee, D.S. (2000) Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron*, **27**, 349–357.
- Martin, B.R. & Aceto, M.D. (1981) Nicotine binding sites and their localization in the central nervous system. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **5**, 473–478.
- McFarland, B.J., Seidler, F.J. & Slotkin, T.A. (1991) Inhibition of DNA synthesis in neonatal rat brain regions caused by acute nicotine administration. *Brain Res. Dev.*, **58**, 223–229.
- McGehee, D.S., Heath, M.J., Gelber, S., Davay, P. & Role, L.W. (1995) Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science*, **269**, 1692–1695.
- McKay, B.E., Placzek, A.N. & Dani, A. (2007) Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol.*, **74**, 1120–1133.
- McQuiston, A.R. & Madison, D.V. (1999) Nicotinic receptor activation excites distinct subtypes of interneurons in the rat hippocampus. *J. Neurosci.*, **19**, 2887–2896.
- Mok, M.H.S. & Kew, J.N. (2006) Excitation of hippocampal interneurons via modulation of endogenous agonist activity at the $\alpha 7$ nicotinic ACh receptor. *J. Physiol. (Lond.)*, **574**, 699–710.
- Moser, N., Mechawar, N., Jones, I., Gochberg-Sarver, A., Orr-Urtreger, A., Plomann, M., Salas, R., Molles, B., Marubio, L., Roth, U., Maskos, U., Winzer-Serhan, U., Bourgeois, J.P., Le Sourd, A.M., De Biasi, M., Schröder, H., Lindstrom, J., Maelicke, A., Changeux, J.P. & Wevers, A. (2007) Evaluating the suitability of nicotinic acetylcholine receptor antibodies for standard immunodetection procedures. *J. Neurochem.*, **102**, 479–492.
- Olbrich, H.G. & Braak, H. (1985) Ratio of pyramidal cells versus non-pyramidal cells in sector CA1 of the human Ammon's horn. *Anat. Embryol.*, **173**, 105–110.
- Pereira, E.F., Hilmas, C., Santos, M.D., Alkondon, M., Maelicke, A. & Albuquerque, E.X. (2002) Unconventional ligands and modulators of nicotinic receptors. *J. Neurobiol.*, **53**, 479–500.
- Perry, E.K., Morris, C.M., Court, J.A., Cheng, A., Fairbairn, A.F., McKeith, I.G., Irving, D., Brown, A. & Perry, R.H. (1995) Alteration in nicotine binding sites in Parkinson's disease, Levy body dementia and Alzheimer's disease: Possible index of early neuropathology. *Neuroscience*, **64**, 385–395.
- Pitler, T.A. & Alger, B.E. (1992) Cholinergic excitation of GABAergic interneurons in the rat hippocampal slice. *J. Physiol. (Lond.)*, **450**, 127–142.
- Role, L.W. & Berg, D.K. (1996) Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron*, **16**, 1077–1085.
- Samuel, N., Wonnacott, S., Lindstrom, J. & Futerman, A.H. (1997) Parallel increases in ^{125}I - α -bungarotoxin binding and $\alpha 7$ nicotinic subunit immunoreactivity during the development of rat hippocampal neurons in culture. *Neurosci. Lett.*, **222**, 179–182.
- Schilstrom, B., Svensson, H.M., Svensson, T.H. & Nomikos, G.G. (1998) Nicotine and food induced dopamine release in the nucleus accumbens of the rat: putative role of $\alpha 7$ nicotinic receptors in the ventral tegmental area. *Neuroscience*, **85**, 1005–1009.
- Seguela, P., Wadiche, J., Dineley-Miller, K., Dani, J. & Patrick, J.W. (1993) Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J. Neurosci.*, **13**, 596–604.
- Shafton, A.D., Bogeski, G., Kitchener, P.D., Sanger, G.J., Furness, J.B. & Shimizu, Y. (2007) Effects of NMDA receptor antagonists on visceromotor reflexes and on intestinal motility, in vivo. *Neurogastroenterol. Motil.*, **19**, 617–624.
- Sharma, G. & Vijayaraghavan, S. (2003) Modulation of presynaptic store calcium induces release of glutamate and postsynaptic firing. *Neuron*, **38**, 929–939.
- Soliakov, L. & Wonnacott, S. (1996) Voltage sensitive Ca^{2+} channels involved in nicotinic receptor mediated [^3H]dopamine release in rat striatal synaptosomes. *J. Neurochem.*, **67**, 163–170.
- Steinlein, O.K., Mulley, J.C., Propping, P., Wallace, R.H., Phillips, H.A., Sutherland, G.R., Scheffer, I.E. & Berkovic, S.F. (1995) A mutation in the nAChR $\alpha 4$ subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat. Genet.*, **11**, 201–203.
- Sudweeks, S.N. & Yakel, J.L. (2000) Functional and molecular characterization of neuronal nicotinic ACh receptors in rat CA1 hippocampal neurons. *J. Physiol. (Lond.)*, **527**, 515–528.
- Winzer-Serhan, U.H. & Leslie, F.M. (2005) Expression of $\alpha 5$ nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA during hippocampal and cortical development. *J. Comp. Neurol.*, **481**, 19–30.
- Wonnacott, S. (1997) Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci.*, **20**, 92–98.
- Wood, E.R., Dudchenko, P.A. & Eichenbaum, H. (1999) The global record of memory in hippocampal neuronal activity. *Nature*, **397**, 613–616.
- Yoshida, K. & Oka, H. (1995) Topographical projections from the medial septum-diagonal band complex to the hippocampus: a retrograde tracing study with multiple fluorescent dyes in rats. *Neurosci. Res.*, **21**, 199–209.
- Zarei, M.M., Radcliffe, K.A., Chen, D., Patrick, J.W. & Dani, J.A. (1999) Distributions of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ and $\beta 2$ subunits on cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*, **88**, 755–764.
- Zhang, Z.W., Coggan, J.S. & Berg, D.K. (1996) Synaptic currents generated by neuronal acetylcholine receptors sensitive to α -bungarotoxin. *Neuron*, **17**, 1231–1240.
- Zwart, R., Fipippi, G.D., Broad, L.M., McPhie, G.I., Pearson, K.H., Baldwinson, T. & Sher, E. (2002) 5-hydroxyindole potentiates human $\alpha 7$ nicotinic receptor-mediated responses and enhances acetylcholine-induced glutamate release in cerebellar slices. *Neuropharmacology*, **43**, 374–384.

