



Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
UAM

**TRÁFICO DE VESÍCULAS SECRETORAS Y EXOCITOSIS EN LA
CÉLULA CROMAFÍN: MODULACIÓN POR CALCIO Y PKC**

MEMORIA DE LA TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA POR

JOSEFINA GARCÍA EGUIAGARAY

DIRECTORES:

ANTONIO GARCÍA GARCÍA

M^a FRANCISCA CANO ABAD

Madrid, Septiembre 2008

AGRADECIMIENTOS

LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ABC	Área bajo la curva
ACh	Acetilcolina
ACP	Ácido ciclopiazónico
AEQ	Ecuorina
AM	Acetoxi-metil éster
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BAPTA	Ácido 1,2-bis (2-aminofenoxi) etano-N, N, N', N'-tetraacético
BHQ	Hidroxibutilhidroquinona
Caf	Cafeína
[Ca²⁺]_c	Concentración de calcio en el citosol
[Ca²⁺]_M	Concentración de calcio en la matriz mitocondrial
[Ca²⁺]_{RE}	Concentración de calcio en el retículo endoplásmico
CCB	Célula/s cromafín/es bovina/s
CCDV	Canales de calcio dependientes de voltaje
CICR	Liberación de Ca ²⁺ inducida por Ca ²⁺ (de “calcium-induced calcium release”)
Cho	Colina
DBH	Dopamina-β-hidroxilasa
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMPP	1,1-dimetil-4-fenil-piperazinio
EGTA	Ácido etilenglicol-bis-(β-aminoetil éter)-N,N,N', N'-tetraacético
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GFP	Proteína fluorescente en verde
HEPES	Ácido (N-[2-hidroxietil]-piperacino-N'-[2-etanosulfónico])

HVA	CCDV de alto umbral de activación (de “high-voltage activated”)
I_{ACh}	Corrientes en respuesta a ACh
ICRAC	Corriente capacitativa de calcio (de “calcium release activated calcium current”)
IP₃R	Receptores de inositol 1,4,5-trifosfato
IRP	Depósito de vesículas inmediatamente liberables (de “immediately releasable pool”)
K_d	Constante de disociación
KH	Krebs-HEPES
λ	Longitud de onda
LDCV	Vesículas grandes de núcleo denso, o cromafines (de “large dense core vesicles”)
LVA	CCDV de bajo umbral de activación (de “low-voltage activated”)
MARCKS	Proteínas sustrato de PKC ricas en alanina-miristoilada
MbP	Membrana plasmática
nAChR	Receptor nicotínico para la ACh de tipo neuronal
[Na⁺]_c	Concentración de sodio en el citosol
NCX	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ (de “Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger”)
PKC	Proteína cinasa C
PNMT	Feniletanolamina N-metiltransferasa
RE	Retículo endoplásmico
RyR	Receptores de rianodina
RP	Depósito de vesículas de reserva (de “reserve pool”)
RRP	Depósito de vesículas rápidamente liberables (de “rapidly o readily releasable pool”)
SERCA	Ca ²⁺ -ATPasa del RE (de “sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase”)

SIF	Células cromafines de vesículas pequeñas (de “small intensely fluorescent cells”)
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SRP	Depósito de vesículas lentamente liberables (de “slowly releasable pool”)
TIRFM	Microscopía de fluorescencia por reflexión total interna (o microscopía de onda o campo evanescente)
UPP	Depósito de vesículas inmaduras (de “unprimed pool”)
V_m	Potencial de membrana de la célula

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. MARCO EN EL QUE SE DESARROLLA ESTA TESIS	2
2. LA CÉLULA CROMAFÍN COMO MODELO NEUROSECRETOR	3
2.1 <i>La glándula suprarrenal.....</i>	3
2.2 <i>Las células de la médula adrenal: la célula cromafín.....</i>	7
2.3 <i>La vesícula cromafín: composición y tipos de depósitos o poblaciones.....</i>	10
2.4 <i>Similitud de las células cromafines con las neuronas: el término paraneurona</i>	14
2.5 <i>Funciones fisiológicas de la célula cromafín</i>	15
3. CANALES IÓNICOS EN LA CÉLULA CROMAFÍN.....	17
3.1 <i>Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje</i>	17
3.2 <i>Canales iónicos activados por ligando.....</i>	23
3.3 <i>Canales iónicos operados por depósitos intracelulares.....</i>	23
4. HOMEOSTASIA CELULAR DEL CALCIO	24
4.1 <i>Mecanismos de salida de Ca^{2+} de la célula y su modulación</i>	26
4.2 <i>Mecanismos de secuestro/liberación de Ca^{2+} por las organelas intracelulares dinámicas.....</i>	29
5. ACTIVIDAD DE LA PKC	35
5.1 <i>Función del citoesqueleto de filamentos de actina en el proceso neurosecretor</i>	36
5.2 <i>Dos vías que controlan la dinámica del citoesqueleto de filamentos de actina: escinderina y PKC-MARKS</i>	37
6. ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-SECRECIÓN	38
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	42
MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
1. CULTIVOS CELULARES Y SOLUCIONES	47
1.1. <i>Extracción y cultivo de células cromafines bovinas de médula adrenal</i>	47
1.2. <i>Cultivo de células PC12.....</i>	47
1.3. <i>Soluciones y reactivos.....</i>	48

2. TÉCNICAS Y PROTOCOLOS EXPERIMENTALES EMPLEADOS PARA EL DESARROLLO DE ESTA TESIS.....	49
2.1. Medida de la liberación de catecolaminas a tiempo real.....	49
2.2. Medida de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ con ecurorina	52
2.3. Medida de la $[Ca^{2+}]_c$ con la sonda fluo-4 AM.....	57
3. ESTADÍSTICA	60
RESULTADOS	61
1. EL PAPEL DEL RE EN LA REGULACIÓN DE LA EXOCITOSIS EN CCB: PRIMER OBJETIVO	62
1.1 <i>Curso temporal de las respuestas secretoras de catecolaminas inducidas por pulsos repetidos de $100K^+$ aplicados a células cromafines bovinas en un sistema de perfusión rápido</i>	<i>62</i>
1.2 <i>Efecto de los inhibidores de la SERCA: tapsigargina, ACP y BHQ sobre el curso temporal a largo plazo de la liberación de catecolaminas inducida por pulsos repetidos de $100K^+$</i>	<i>68</i>
1.3 <i>Efecto de la concentración de Ca^{2+} extracelular y de la temperatura sobre el curso temporal de las respuestas secretoras de catecolaminas inducidas por pulsos repetidos de $100K^+$ en presencia de tapsigargina</i>	<i>71</i>
1.4 <i>Efectos de los inhibidores de la SERCA tapsigargina, ACP y BHQ sobre las respuestas secretoras inducidas por $100K^+$: extensión del análisis estadístico</i>	<i>73</i>
1.5 <i>Efecto de la tapsigargina sobre la $[Ca^{2+}]_{RE}$ en poblaciones de células cromafines bovinas</i>	<i>75</i>
1.6 <i>Efecto de la tapsigargina sobre la $[Ca^{2+}]_{RE}$ en células PC12.....</i>	<i>78</i>
1.7 <i>Efecto de la tapsigargina sobre los cambios en la $[Ca^{2+}]_c$ basal o producidos por cafeína.....</i>	<i>82</i>
2. INTERACCIONES ENTRE EL Ca^{2+} DEL RE Y LA PKC EN LA REGULACIÓN DE LA EXOCITOSIS EN CCB: SEGUNDO OBJETIVO.....	85
2.1 <i>Efecto de los moduladores de la PKC sobre el curso temporal a largo plazo de las respuestas secretoras de catecolaminas inducidas por pulsos repetidos de $100K^+$</i>	<i>85</i>
2.2 <i>La tapsigargina antagoniza la facilitación y el bloqueo generados por el PMA y la queleritrina respectivamente, sobre</i>	

<i>las respuestas secretoras inducidas por pulsos repetidos de 100K⁺</i>	88
2.3. <i>Efectos de la tapsigargina y de los moduladores de la PKC, PMA y queleritrina, sobre las respuestas secretoras inducidas por 100K⁺: extensión del análisis estadístico</i>	91
2.4. <i>Efecto de los moduladores de la PKC, PMA y queleritrina, sobre la [Ca²⁺]_{RE} en poblaciones de células cromafines</i>	93
2.5. <i>Efecto de los moduladores de la PKC en combinación con tapsigargina sobre la [Ca²⁺]_{RE} en poblaciones de células cromafines</i>	95
2.6. <i>Efecto de la queleritrina y su combinación con tapsigargina sobre la [Ca²⁺]_{RE} en células PC12</i>	97
2.7. <i>Efecto de los moduladores de la PKC, la tapsigargina y su combinación con PMA o queleritrina sobre los cambios en la [Ca²⁺]_c basal o evocados por cafeína</i>	99
3. CONTRIBUCIÓN DE LOS CCDV A LA EXOCITOSIS EN CCB TRATADAS CON OUABAÍNA: TERCER OBJETIVO	102
3.1. <i>Efecto de la ouabaína sobre las respuestas secretoras inducidas por pulsos de 2Ca²⁺ en células cromafines bovinas</i>	102
3.2. <i>Efecto del FPL 64176 y de los bloqueantes de los distintos subtipos de los CCDV, nifedipino, ω-conotoxina GVIA y ω-agatoxina IVA sobre la potenciación de las respuestas secretoras inducidas por ouabaína</i>	104
3.3. <i>Efecto del nifedipino sobre la potenciación por ouabaína de los transientes de Ca²⁺ inducidos por pulsos de 2Ca²⁺</i>	108
DISCUSIÓN	110
CONCLUSIONES	126
BIBLIOGRAFÍA	128

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. MARCO EN EL QUE SE DESARROLLA ESTA TESIS

Este trabajo se enmarca dentro del proyecto “**SEÑALES DE CALCIO Y EXOCITOSIS DE NEUROTRANSMISORES**” y versa sobre el estudio de mecanismos básicos de comunicación celular, que se desarrolla desde hace tres décadas en el Instituto Teófilo Hernando de I + D del Medicamento (ITH), de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM), con la dirección de profesor Antonio G. García. En concreto, se centra en el análisis de señales de calcio (Ca^{2+}), la exocitosis y la regulación de la migración y la liberación de vesículas secretoras cargadas de neurotransmisores que las células excitables (la neurona o la célula cromafín) utilizan para comunicarse entre sí y con las células del organismo cuyas funciones controlan.

En los últimos treinta años, el laboratorio del profesor Antonio G. García, en colaboración con el del profesor Javier García Sancho (Universidad de Valladolid), ha llegado a la **hipótesis de la existencia de una tríada funcional** capaz de generar microdominios subcelulares de Ca^{2+} que controlan las distintas etapas de la exocitosis. Dicha tríada está formada por tres pilares heterogéneos: 1) los canales de Ca^{2+} (L, N, P/Q, R); 2) el retículo endoplásmico (RE) con la SERCA como vía de entrada de Ca^{2+} y los canales iónicos de IP3 y de rianodina como vías de salida; y 3) la mitocondria, también heterogénea, que ve “distintos calcios” según su ubicación celular (ver revisión de García y col., 2006). Por otra parte, la proteína cinasa C (**PKC**) juega un importante papel modulador de la exocitosis dependiente de Ca^{2+} en la célula cromafín: favorece el paso de la población de vesículas de reserva (RP) a la población de vesículas fácilmente liberables (RRP; Yang y col., 2002) mediante el desensamblaje del citoesqueleto de filamentos de actina que se encuentra por debajo de la membrana plasmática (MbP; Vitale y col., 1995). Esta tesis plantea la relación entre la PKC y el Ca^{2+} reticular para mantener de forma estable y duradera, las respuestas de liberación de catecolaminas inducidas por estímulos despolarizantes repetidos.

Para ello, se utilizan protocolos de estimulación con pulsos despolarizantes a fin de poder estudiar la liberación de catecolaminas en tiempo real, en periodos largos de tiempo, en poblaciones de células cromafines bovinas (CCB) mediante un sistema de superfusión rápido de las mismas. En paralelo a este tema de investigación central, se ha realizado la medición de las variaciones de la concentración citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) y de los niveles de Ca^{2+} dentro del RE ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$) en el marco de las condiciones experimentales en las que se ha estudiado la secreción: básicamente con el uso de bloqueantes de la Ca^{2+} -ATPasa reticular y activadores y bloqueantes de la PKC.

Antes de exponer el objetivo fundamental de esta tesis, conviene explicar las características fundamentales de nuestro modelo celular, la célula cromafín, los principales mecanismos de entrada, redistribución y salida del Ca^{2+} así como los mecanismos implicados en el proceso secretor. Ello despejará el camino para el planteamiento de la hipótesis de trabajo y de los objetivos para contrastarla.

2. LA CÉLULA CROMAFÍN COMO MODELO NEUROSECRETOR

2.1 La glándula suprarrenal

Los vertebrados mamíferos poseen, en la parte superior de cada riñón, dos pequeñas glándulas triangulares y aplanadas denominadas **glándulas adrenales o suprarrenales** que son ganglios simpáticos modificados cuyas neuronas postsinápticas han perdido sus axones y se han convertido en células cromafines. En lugar de inervar un tejido y liberar neurotransmisores localmente como las neuronas simpáticas, las células cromafines, tras recibir un estímulo, vierten sus productos de secreción directamente al torrente sanguíneo, con lo que sus neurotransmisores (catecolaminas, péptidos o purinas) se comportan funcionalmente como hormonas (Fig. 1).

La glándula adrenal de mamífero está compuesta por dos zonas: una estructural y otra secretora. La zona **estructural o cápsula suprarrenal**, recubre la zona secretora y está constituida por una gruesa cápsula de tejido

conectivo que se extiende hacia el interior formando conductos por los que transcurren los vasos y nervios que irrigan la glándula e inervan sus células cromafines. En la zona **secretora** se diferencian, a su vez, dos zonas: la corteza y la médula (Carmichael y Stoddard, 1993). Ambas regiones no solo tienen orígenes embriológicos distintos (las células corticales se originan a partir del mesénquima mesodérmico, mientras que la médula deriva de células de la cresta neural -origen neuroectodérmico- que migran hasta el interior de la glándula en desarrollo) sino que, también, tienen funciones fisiológicas muy diferentes. La **corteza**, que es la porción secretora que se encuentra por debajo de la cápsula y que supone el 70-90% del peso de la glándula, contiene células encargadas de la síntesis y secreción de hormonas de naturaleza esteroidea: glucocorticoides (relacionados con el metabolismo energético y la inmunosupresión), mineralcorticoides (responsables del volumen circulante y la presión arterial) y hormonas sexuales (relacionadas con la aparición de algunos caracteres sexuales secundarios). En la parte central de la glándula y por debajo de la corteza, se sitúa la **médula (Fig. 1A)**. El tipo celular mayoritario en la médula es la **célula cromafín**, que se distribuye en acinos en torno a los vasos sanguíneos y es responsable de la síntesis, almacenamiento y secreción de **catecolaminas** (dopamina, adrenalina y noradrenalina). Desde el punto de vista funcional, las catecolaminas estimulan tanto la glucogenólisis, que aumenta el nivel de glucosa en sangre, como la movilización de ácidos grasos desde el tejido adiposo. Estas aminas redistribuyen el volumen sanguíneo circulante, es decir, dilatan los vasos que irrigan los músculos esquelético y cardíaco mientras que contraen los que irrigan piel o intestino. La liberación de catecolaminas también causa el aumento de la presión arterial, de la frecuencia cardíaca y del volumen por minuto cardíaco, y el incremento de la frecuencia y profundidad respiratorias. En el sistema nervioso central (SNC) incrementan la atención y la vigilia. A este respecto, aunque la liberación basal de catecolaminas es del orden de nanogramos por minuto, frente a situaciones de estrés se produce un vertido masivo de adrenalina (70%) y noradrenalina (30%) al torrente circulatorio.

En cuanto a la **inervación** de la glándula suprarrenal, así como la corteza adrenal carece de ella y es controlada por la hormona adrenocorticotropa (ACTH) liberada por la adenohipófisis, la médula adrenal está inervada por fibras preganglionares simpáticas, la mayoría procedentes del nervio esplácnico mayor y, en menor proporción, de los nervios esplácnicos menores y de los ganglios celíacos lumbares (Holets y Elde, 1982; Appel y Elde, 1988). Los axones pueden contactar con una o varias células, recibiendo cada una de ellas de dos a cuatro botones presinápticos que pueden incluso proceder de la misma fibra (Kajiwara y col., 1997). Todas las fibras inervan tanto las células adrenérgicas como las noradrenérgicas, a excepción de las fibras encefalinérgicas, que inervan exclusivamente las células adrenérgicas, por lo que se postula que pudieran estar implicadas en el control de la secreción de adrenalina (Pelto-Huikko y col., 1985; Holgert y col., 1995). El espacio sináptico esplácnico-cromafín es de unos 30 nm. La mayoría de estas fibras son amielínicas (Coupland, 1965), aunque también se pueden observar células de Schwann. La naturaleza química de los nervios esplácnicos es principalmente colinérgica, aunque algunos secretan también encefalina (Pelto-Huikko y col., 1985), péptido intestinal vasoactivo (VIP; Malhotra y Wakade, 1987) o sustancia P (Linnoila y col., 1980) (**Fig. 1B**).

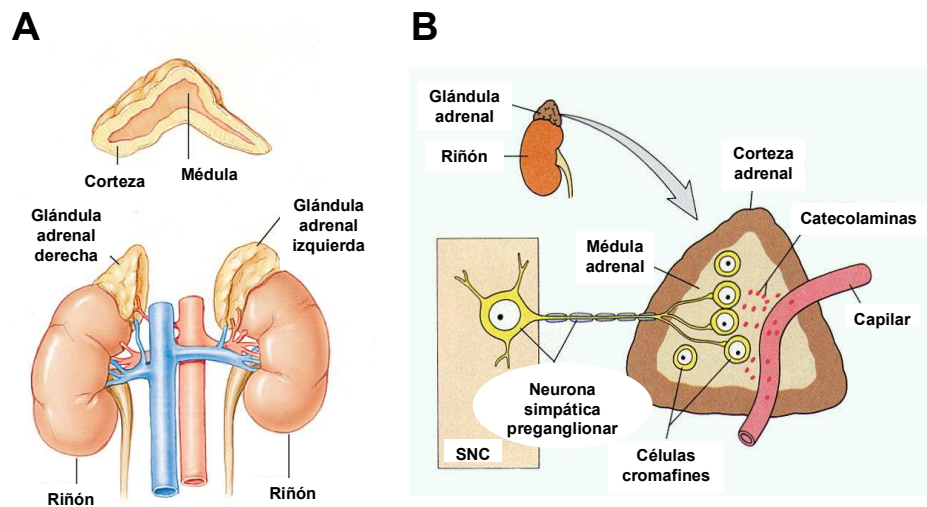


Figura 1. La glándula suprarrenal: panel A; localización y estructura de la glándula adrenal en el organismo humano. Panel B; esquema representativo de la inervación de las células cromafines en el interior de la médula adrenal y de cómo sus productos de secreción (catecolaminas) son vertidos al torrente sanguíneo.

En la cápsula suprarrenal hay vasos linfáticos que no llegan a la zona secretora. La **circulación** intraadrenal es bastante compleja: corteza y médula reciben una irrigación independiente, existiendo una separación total de la circulación sanguínea entre ambos tipos de tejidos. Las glándulas adrenales reciben su **irrigación** de las arterias aorta, renal y subfrénica. La arteria renal se ramifica en las arterias suprarrenales superiores, medias e inferiores que, a su vez, se ramifican en múltiples pequeñas arterias que dan lugar a un sistema de distribución sanguínea constituido por tres tipos de vasos: 1) los capilares capsulares que irrigan la cápsula; 2) los capilares sinusoidales corticales fenestrados que irrigan la corteza y desembocan en los capilares medulares y 3) las arteriolas medulares que atraviesan la corteza para irrigar los sinusoides capilares medulares. El **drenaje** de esta múltiple aferencia arterial se lleva a cabo por una sola vena, la adrenolumbar o medular central, que también recoge parte del drenaje retroperitoneal. La vena adrenolumbar derecha

desemboca en la cava inferior, mientras que la izquierda lo hace en la vena renal.

Ambas porciones de la región secretora, corteza y médula, pueden relacionarse para realizar funciones muy concretas. Los glucocorticoides sintetizados en la corteza, a través de los capilares sinusoidales corticales, desembocan directamente en la médula para estimular la actividad de la enzima PNMT (feniletanolamina N-metiltransferasa) que transforma la noradrenalina en adrenalina. Sólo las células adrenérgicas, que son más abundantes en la periferia medular (Eränkö, 1952; Hilarp y Hökfelt, 1953; Livett y col., 1982) presentan esta actividad enzimática mientras que las células noradrenérgicas, más abundantes en las zonas centrales de la médula (Livett y col., 1982), no la contienen y, por lo tanto, acumulan noradrenalina en sus vesículas (Hilarp y Hökfelt, 1953).

2.2 Las células de la médula adrenal: la célula cromafín

Las **células cromafines** constituyen el tipo celular más importante de la médula adrenal tanto desde el punto de vista estructural como funcional. Derivan del neuroectodermo y aunque su localización más habitual es la glándula suprarrenal también se encuentran, por ejemplo, en ganglios simpáticos paravertebrales y prevertebrales. Deben su nombre a la alta afinidad que tienen sus vesículas secretoras para teñirse con sales de cromo como el cromato potásico (Coupland y Hopwood, 1966).

En los mamíferos se han descrito hasta tres tipos de células cromafines: 1) adrenérgicas, 2) noradrenérgicas y 3) de vesículas pequeñas o SIF (“small intensely fluorescent cells”; Michel-Béchet y col., 1963; Kanno, 1998). Como ya se ha dicho con anterioridad, la principal diferencia bioquímica entre las células adrenérgicas y noradrenérgicas es la presencia o ausencia, respectivamente, de la enzima adicional PNMT, que metila la noradrenalina y la convierte en adrenalina (Goldstein y col., 1971). Las células cromafines SIF,

que en el ratón constituyen menos del 4%, poseen un fenotipo intermedio entre células noradrenérgicas y neuronas (Aunis y Langley, 1999).

A nivel tisular (**Fig. 2B**), las células cromafines están organizadas en grupos o acinos de un diámetro de 80 μm , que contienen alrededor de 100 células (Hillarp, 1946; Kajiwara y col., 1997) y que se distribuyen en torno a los vasos sanguíneos. En la glándula intacta, su morfología tiene un aspecto poligonal y hay estudios que sugieren un fenotipo polarizado con el núcleo desplazado hacia un polo de la célula (Aunis y García, 1981) y las vesículas cromafines acumuladas en el resto del citosol, de tal manera, que la sinapsis se realiza en el polo neural y la exocitosis preferentemente en el polo capilar (Carmichael y col., 1989). Sin embargo, cuando se aíslan las células cromafines, pierden su polaridad y se hacen esféricas (aproximadamente 15 μm de diámetro; Kajiwara y col., 1997; Barbara y col., 1998). En cultivos primarios de células cromafines bovinas, la proporción de células noradrenérgicas a adrenérgicas es de 1:5 a 1:10 (Núñez y col., 1995).

Al microscopio electrónico, en el citoplasma de las células cromafines bovinas se pueden observar del orden de 20.000 vesículas secretoras o vesículas de núcleo denso (LDCV, del inglés “large dense core vesicles”), que reciben su nombre por su alto contenido peptídico denso a los electrones (Aunis y García, 1981) (**Fig. 2C**). En concreto, las células adrenérgicas poseen vesículas secretoras de mayor tamaño y de contenido más homogéneo y menos electrodense que las noradrenérgicas. En la glándula intacta, cada acino constituye una unidad funcional independiente para la liberación de catecolaminas. Así, todas las células del acino, tras recibir el estímulo de las fibras espláncnicas, secretan su contenido a la vez. El neurotransmisor fisiológico a nivel de la sinapsis espláncnico-cromafín (Feldberg y col., 1934) es la acetilcolina (ACh) que se libera por los axones simpáticos preganglionares para desencadenar, a su vez, la secreción (exocitosis) del contenido de las vesículas de secreción.

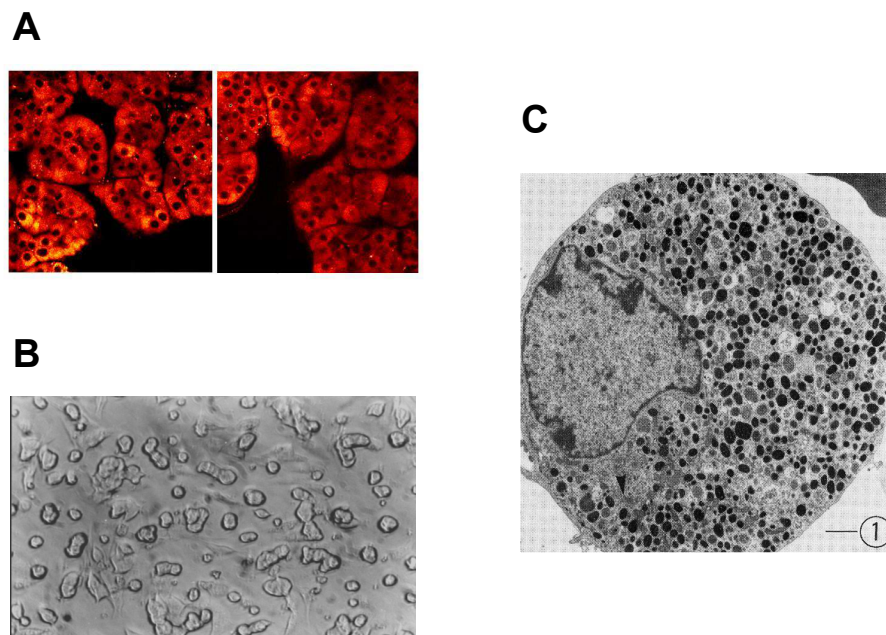


Figura 2. La célula cromafin: panel A; imagen confocal de la organización en “acinos” de las células cromafines en una rodaja de glándula adrenal de ratón, marcada con la sonda fluorescente Lysotracker Red (tesis de Jorge Fuentealba). Panel B, cultivo primario de cuatro días de células cromafines bovinas. Nótese que junto a algunas células con aspecto esférico otras comienzan a agruparse y formar una especie de acinos. Panel C, microscopía electrónica de una célula cromafin bovina en la que se pueden observar del orden de 20.000 vesículas con una polaridad opuesta al núcleo (Aunis y García, 1981).

Algunos autores han demostrado la comunicación entre células cromafines, fundamentalmente dentro del mismo acino, mediante nexos o uniones intercelulares (gap junctions; Grynszpan-Wynogrand y Nicolas, 1980). En el año 1998, Moser observó que la conductancia entre las células cromafines es muy baja, por lo que también se las ha llamado uniones de baja conductancia. Además, hay datos que sugieren que estas estructuras permeables a compuestos de bajo peso molecular (similares a un canal iónico) y que permiten el acoplamiento metabólico entre células sin necesidad de que los “mensajeros intracelulares” pasen por el espacio extracelular, juega un papel importante en la propia liberación de catecolaminas (Martin y col., 2001).

Por último, hay que destacar que en la médula adrenal, las células cromafines coexisten con otros tipos celulares como: 1) las **células sustentaculares** que son células pequeñas e irregulares, que se intercalan con

las células cromafines y que contienen el marcador glial S-100 (Cocchia y Michetti, 1981); se consideran componentes neurogliales de la médula adrenal 2) las **células endoteliales** y 3) los **fibroblastos** que forman un estroma de fibras reticulares que rodean a los acinos de células cromafines (Coupland, 1965).

2.3 La vesícula cromafín: composición y tipos de depósitos o poblaciones

Las células cromafines almacenan sus productos de secreción en las **vesículas secretoras**. En las células cromafines bovinas se han llegado a identificar al microscopio electrónico hasta cinco tipos diferentes de estas vesículas, según su tamaño y forma (Koval y col., 2001); las más abundantes son las denominadas vesículas grandes de núcleo denso o LDCV. De la misma manera, se han obtenido distintas estimaciones en cuanto a su número (Phillips, 1982: 30.000 vesículas; Vitale y col., 1995: 17.000 vesículas en células adrenérgicas y 7.000 en células noradrenérgicas; Plattner y col., 1997: 26.000 vesículas), y a su diámetro establecido entre 250 y 450 nm (Ornberg y col., 1995; Parsons y col., 1995; Plattner y col., 1997).

La formación de las **LDCV** comienza en el entramado trans-Golgi, donde se ensamblan algunos componentes proteicos (transportadores de membrana y proteínas intravesiculares). A continuación, se produce la fase de maduración de la vesícula; el medio intravesicular se acidifica hasta un pH de 5,5 y se incorporan en su interior el ácido ascórbico, los nucleótidos (principalmente ATP), el Ca^{2+} y las **catecolaminas** (Winkler, 1993). Se sabe que la cantidad de catecolaminas que almacena una vesícula cromafín es proporcional a su volumen, de tal manera que aunque las vesículas difieran en tamaño, la concentración que almacenan en su interior va a ser constante (Finnegan y col., 1996; Albillos y col., 1997).

Una de las proteínas intravesiculares de las células cromafines, tanto noradrenérgicas como adrenérgicas, es la enzima dopamina- β -hidroxilasa

(DBH) fundamental para la síntesis de noradrenalina junto con su cofactor, el ácido ascórbico. Curiosamente la PNMT (ver sección 2.1 de la Introducción), que transforma la noradrenalina en adrenalina, es una enzima citosólica, por lo que en las células cromafines adrenérgicas la noradrenalina tendrá que salir fuera de la vesícula para, una vez transformada en adrenalina, volver a entrar en ella gracias a la H^+ -ATPasa (alojada en la membrana vesicular) que además es responsable del mantenimiento del pH ácido intravesicular.

Además de adrenalina y noradrenalina, que constituyen el 20% de su contenido, en las vesículas cromafines también se almacenan, aunque en proporciones muy inferiores, otras aminas como la dopamina, la histamina o la serotonina, todas ellas asociadas a las cromograninas. Las **cromograninas** son proteínas de naturaleza ácida y soluble que junto con el ATP, el Ca^{2+} y el Mg^{2+} , son responsables de formar un complejo entramado o matriz en forma de gel que permite fijar o empaquetar las catecolaminas (Fitzpatrick y Waisman, 1996) lo que reduce enormemente el gradiente osmótico de la vesícula (Winkler, 1976).

En las vesículas cromafines también se almacenan opioides y otros péptidos como la sustancia P, la somatostatina, las encefalinas, el péptido intestinal vasoactivo o factor natriurético atrial y el neuropéptido Y. Por último, un 22% del contenido vesicular lo constituyen lípidos como la lisolecitina, que favorece la fusión de membranas.

En cuanto al **Ca^{2+} intravesicular**, constituye casi un 60% del total del Ca^{2+} contenido en la célula, aunque sólo un 0,03% es Ca^{2+} intravesicular libre mientras que el resto está asociado a las cromograninas (Haigh y col., 1989). Por esta razón, se ha especulado con la posibilidad de que pueda estar involucrado en la homeostasia celular del Ca^{2+} (algunas vesículas presentan receptores de IP3 en su membrana; Gerasimenko y col., 1996) como en la exocitosis (Mundorf y col., 2000; Camacho y col., 2008).

En función de su estadio de madurez para experimentar la exocitosis se han establecido hasta cuatro tipos de depósitos o poblaciones de vesículas secretoras: 1) el **RP (de “reserve pool” o depósito de reserva)**, es la población de vesículas más alejada de la membrana plasmática y constituye un 95% del total. Su migración hacia las zonas más subplasmalemales es lenta (tarda unos 6 min, Steyer y col., 1997) y requiere de una $[Ca^{2+}]_c$ en el rango de submicromolar. Una vez acercadas las vesículas pueden sufrir exocitosis gracias a mecanismos moleculares como el desensamblaje del citoesqueleto de filamentos de actina que constituye una barrera física entre la membrana plasmática y las vesículas situadas más internamente en el citosol (Trifaró y Vitale, 1993; Vitale y col., 1991, 1992, 1995; Aunis, 1998) (ver secciones 4.1 y 4.2 de esta Introducción).

2) El **UPP (de “unprimed pool” o depósito de vesículas inmaduras)**: es la población de vesículas atracada a la membrana pero que todavía no ha experimentado la maduración o “priming”, es decir, carece del complejo SNARE (Ashery y col., 2000) y por lo tanto todavía no son competentes para la fusión. Esta población vesicular requiere MgATP para pasar a constituir 3) el **depósito de vesículas maduras o “primed”**, proceso que puede verse potenciado por bajas concentraciones de Ca^{2+} (entre 0,3 y 2,0 μ M) (Bittner y Holz, 1992b; von Rüden y Neher, 1993) y al que le sigue un paso dependiente de la temperatura (Bittner y Holz, 1992a). Por otra parte, parece que sólo la activación de la PKC garantiza dicha potenciación máxima del proceso de maduración por Ca^{2+} (Gillis y col., 1996; Smith y col., 1998). Esta población de vesículas se divide, a su vez, en dos subpoblaciones que pueden experimentar exocitosis en cuanto se incrementan los niveles de $[Ca^{2+}]_c$ hasta el rango de decenas de μ M: 3.1) el **SRP (de “slowly releasable pool” o depósito lentamente liberable)** que experimenta una exocitosis lenta (en unos 300 ms) y está formado por un grupo de vesículas que ha empezado pero que no ha completado la maduración (esto es, que constan de un complejo SNARE laxo); y 3.2) **RRP (de “rapidly o readily releasable pool” o depósito**

fácilmente liberable) que experimenta una exocitosis casi inmediata (en unos 30 ms), gracias a la existencia de un complejo SNARE fuerte.

Además, cabe destacar que dentro del RRP se ha establecido otra subpoblación de vesículas (~25%); 3.1.1) el **IRP (de “immediately releasable pool” o depósito de liberación inmediata)**, formado por una población vesicular más próxima a los CCDV, que al “ver” mayores $[Ca^{2+}]_c$ durante la despolarización de la célula sería la primera en experimentar el proceso exocitótico (Moser y Neher, 1997; Voets y Moser, 1999).

La transición del SRP al RRP se produce en unos 10 s, es reversible e independiente de Ca^{2+} (Voets y Moser, 1999; Voets, 2000). Tras la depleción del RRP y el SRP, la recuperación de estos depósitos de vesículas se produce en aproximadamente 1 min (von Rüden y Neher, 1993; Smith y col., 1998).

En resumen, las vesículas cargadas de transmisor tienen que migrar (**migración**) y anclarse a zonas específicas de la membrana plasmática (**anclaje, ataque o “docking”**), donde aproximadamente sólo un 10% (las que hayan experimentado el proceso de **maduración o “priming”**) (Parsons y col., 1995; Steyer y col., 1997) serán aptas para experimentar la exocitosis tras un estímulo despolarizante que las exponga a incrementos de Ca^{2+} adecuados (Becherer y col., 2003) (**Fig. 3**).

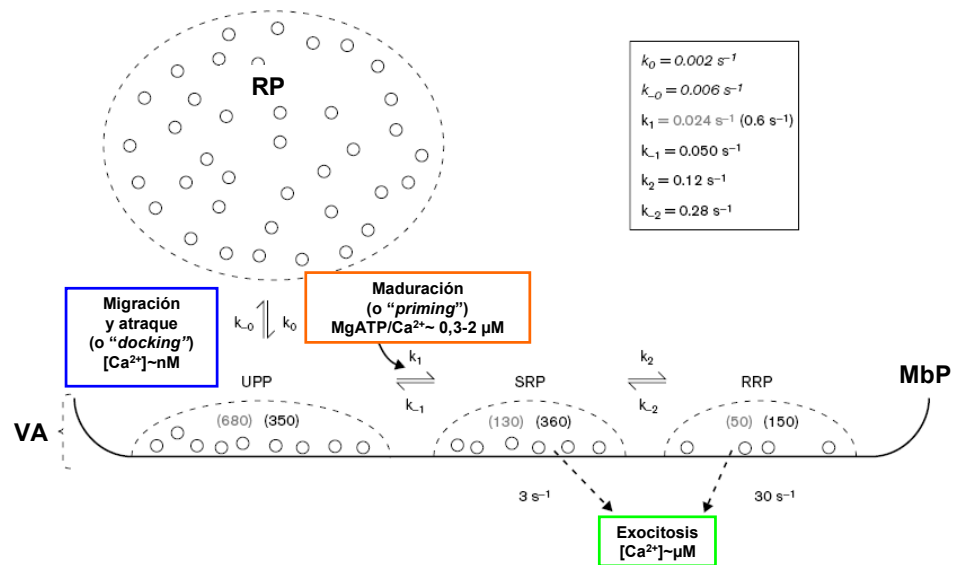


Figura 3. Regulación por Ca^{2+} o ATP de las transiciones entre poblaciones de vesículas secretoras: nótese la reversibilidad de los procesos de transición entre RP, UPP, SRP y RRP así como la irreversibilidad de los procesos de exocitosis desde el SRP y el RRP. MB.PL: membrana plasmática; VA: vesículas atracadas (adaptado de Brose y col., 2000).

En cuanto al proceso de maduración (que requiere de unos 30 s en células cromafines), el inicio de la formación del **complejo SNARE** es su base molecular. En los últimos años algunos trabajos han postulado incluso que las proteínas del complejo SNARE, como SNAP-25 (Sörensen y col., 2003), junto con sus proteínas reguladoras, como Munc-13 (Ashery y col., 2000; Brose y col., 2000), participarían en la maduración pero no en la fusión final de las vesículas con la membrana plasmática.

2.4 Similitud de las células cromafines con las neuronas: el término paraneurona

Las células cromafines de las glándulas adrenales de los mamíferos presentan un gran parentesco con las neuronas simpáticas **postganglionares** (Douglas, 1968); ambas derivan de la cresta neural y liberan catecolaminas en respuesta a la estimulación con ACh. Existen otras semejanzas funcionales

importantes entre las neuronas simpáticas y las células cromafines: 1) poseen receptores nicotínicos, (Douglas y Rubin, 1961b; Wilson y Kirshner, 1977; Barbara y Takeda, 1996) y muscarínicos (Douglas y Poisner, 1965), sobre los que actúa la ACh liberada; 2) disparan potenciales de acción (Brandt y col., 1976; Kidokoro y Ritchie, 1980); 3) tienen canales de Ca^{2+} , Na^+ y K^+ sensibles a voltaje (Fenwick y col., 1982b; Artalejo y col., 1993); 4) exhiben facilitación de la corriente de Ca^{2+} por prepulsos despolarizantes repetidos (Fenwick y col., 1982a; Hoshi y col., 1984; Ikeda y col., 1991; Artalejo y col., 1992b) y 5) emiten prolongaciones al exponerlas a factor de crecimiento nervioso (Unsicker y col., 1980).

Las células cromafines bovinas pueden considerarse **paraneuronas** (Kobayashi, 1977; Fujita y col., 1988) ya que sintetizan neurotransmisores o productos relacionados con éstos (adrenalina, noradrenalina, dopamina, histamina y serotonina), poseen vesículas sinápticas y/o de secreción donde se almacenan los neurotransmisores sintetizados y secretan el contenido de las vesículas por un mecanismo exocitótico dependiente de Ca^{2+} tras un estímulo adecuado (principalmente ACh liberada por el nervio espláncnico, pero también en respuesta a estimulación eléctrica, altas concentraciones de K^+ extracelular, veratridina o inhibidores de la ATPasa dependiente de Na^+/K^+) (Feldberg y col., 1934; Douglas y Rubin, 1961b; Douglas, 1968; Fujita y col., 1976, 1988)

En base a lo expuesto anteriormente, y al hecho de que las células cromafines se pueden aislar y mantener en cultivos primarios con facilidad (Livett, 1984), son esféricas (en cultivo) y al no tener dendritas, son accesibles a los análisis bioquímicos y su conexión con el nervio espláncnico es sencilla, se justifica su amplio empleo como **modelo neurosecretor**.

2.5 Funciones fisiológicas de la célula cromafín

Las células cromafines bovinas (CCB), pueden recibir dos tipos de **estímulos secretagogos** para liberar catecolaminas al torrente circulatorio: de un lado, mediante un incremento de la actividad de los nervios espláncnicos,

que liberarán el neurotransmisor fisiológico ACh y, de otro, mediante estímulos químicos que llegan a la médula adrenal por vía hemática. Entre los primeros figuran las situaciones de estrés físico (hipoxia, hipoglucemia o hipotermia) o emocional (miedo, ansiedad, alerta). En cambio, por vía hemática van a llegar sustancias como la histamina, la bradicinina o la angiotensina II, liberadas en situaciones de alergia o hipotensión.

Una vez liberadas, el papel principal de las catecolaminas es asegurar el flujo sanguíneo adecuado de los órganos vitales para que el organismo pueda adoptar una actitud de **“lucha o huida”** frente al estímulo estresante. Por lo tanto, aunque la médula adrenal no es esencial para la vida, en la cadena de reacciones mediante las cuales el cerebro coordina la respuesta al estrés, el sistema nervioso simpático y la médula adrenal tienen un papel predominante.

Las catecolaminas también desempeñan funciones reguladoras en sinapsis dopaminérgicas, noradrenérgicas y adrenérgicas. La alteración en su síntesis, almacenamiento, liberación y degradación se ha asociado a diversos estados patológicos como la hipertensión arterial esencial, la isquemia coronaria, la esquizofrenia o la enfermedad de Parkinson. A ello se añade, que junto con las catecolaminas se **co-liberan** otras sustancias igualmente almacenadas en las vesículas secretoras como el ATP, los péptidos opiáceos, otros péptidos (factor natriurético atrial, péptido intestinal vasoactivo, neuropéptido Y, sustancia P), el ascorbato o las cromograninas y sus derivados. Se ha demostrado que muchas de ellas pueden modular la secreción adrenal de forma autocrina y paracrina (Gandía y col., 1993b; Albillos y col., 1996a y b; Winkler y Fischer-Colbrie, 1998). De otras, se ha postulado que ejercen un papel hormonal. Por ejemplo, el ATP y sus derivados, que pueden actuar localmente sobre las células endoteliales, provocando la liberación de NO, agente vasodilatador que producirá un incremento del flujo sanguíneo, facilitando así la rápida liberación de catecolaminas al torrente sanguíneo (Moro y col., 1993).

3. CANALES IÓNICOS EN LA CÉLULA CROMAFÍN

Los canales iónicos involucrados en la excitabilidad de las células cromafines (canales de Na^+ , canales de Ca^{2+} , canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , canales de K^+ dependientes de voltaje, canales de Cl^- y los canales no selectivos para cationes) se han podido estudiar gracias al desarrollo de distintas técnicas. Por un lado, la biología molecular permite indagar sobre la estructura molecular de los canales. Las propiedades biofísicas (cinéticas de activación, inactivación, conductancia etc.), se han caracterizado, a su vez, gracias al desarrollo de las técnicas de “patch-clamp” y a la aparición de herramientas farmacológicas, fundamentalmente neurotoxinas (procedentes de caracoles marinos, arañas, abejas, alacranes, serpientes, ranas, plantas, etc.), y moléculas orgánicas de síntesis que son capaces de reconocer selectivamente los diversos tipos de canales iónicos presentes en la membrana celular.

3.1 Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje

Este abordaje técnico, ha permitido el descubrimiento de una gran diversidad de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV; Olivera y col., 1994; García y col., 2006) que se encuentran en todas las células excitables del reino animal, incluidas las células cromafines, en protozoos y en algunas plantas.

En cuanto a la **estructura**, los CCDV son complejos multiproteicos formados por una subunidad α_1 (170-240 KDa) y otras subunidades auxiliares entre las que se encuentran la subunidad intracelular β y la subunidad α_2 - δ que se mantiene unida mediante puentes disulfuro. La subunidad α_1 alberga el poro iónico y la maquinaria de apertura del canal, el sensor de voltaje, el sitio de unión al ligando y a las moléculas moduladoras de la activación de estos canales. En algunos tejidos, como el músculo esquelético, puede existir otro componente formando parte del complejo multiproteico, la subunidad γ . La gran cantidad de genes que se han identificado que codifican para distintas

clases de subunidades α_1 y β y las múltiples combinaciones posibles entre las distintas subunidades podría explicar la rica diversidad funcional que presentan los CCDV (Fig. 4).

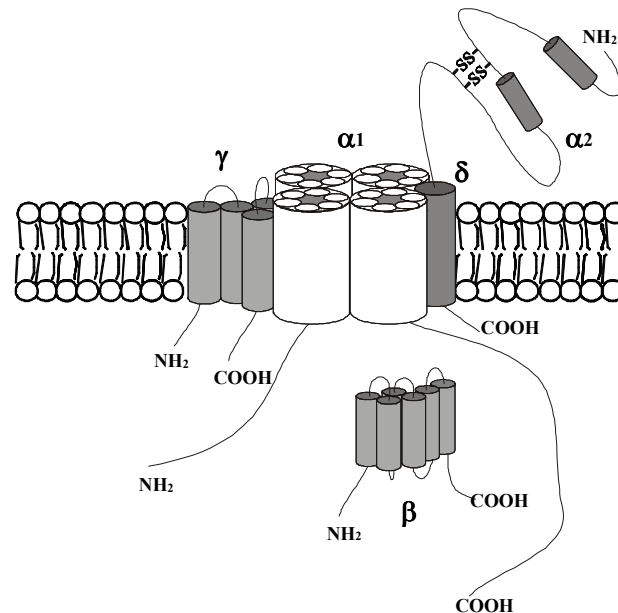


Figura 4. Canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV): estructura típica.

Los CCDV se pueden clasificar en dos grandes grupos, en función del voltaje que se requiera para provocar la apertura de los mismos: 1) canales de bajo umbral de activación (**LVA**, del inglés “low voltage activated”; canales T) que se abren en respuesta a pequeñas despolarizaciones a potenciales por encima de -50 mV y 2) canales de alto umbral de activación (**HVA**, del inglés “high voltage activated”; canales L, N, P/Q y R) que requieren una fuerte despolarización de la membrana para abrirse.

Dentro de los CCVD del tipo LVA sólo se ha identificado el **subtipo T** (de “transient” o “tiny”; **Tabla 1**: $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$) que tras su apertura en respuesta a pequeñas despolarizaciones, presentan una rápida cinética de inactivación que hace que se produzca una corriente transitoria de baja conductancia (8 pS). Además, muestran una permeabilidad similar al ión bario

(Ba²⁺) que al Ca²⁺ (Carbone y Lux, 1984a, b, 1987; Fox y col 1987a). Los canales T se han identificado en una gran variedad de células excitables, incluyendo neuronas centrales y periféricas, células musculares cardíacas, esqueléticas y lisas y en algunas células secretoras (Tsien y col., 1991). No obstante, en la actualidad, en la célula cromafín existen, tan solo tres trabajos que recogen corrientes de Ca²⁺ a través del componente T en bovino (Diverse-Pierluissi y col., 1991) y en rata (Hollins e Ikeda, 1996; Bournaud y col., 2001). En nuestro grupo hemos aislado el ARNm que codifica para los CCVD del subtipo T pero, sin embargo, no hemos sido capaces de registrar sus corrientes. Se ha sugerido, que los canales de Ca²⁺ tipo T se expresan en células cromafines embrionarias (Bournaud y col., 2001). Además, recientemente, se han identificado canales del subtipo T de la clase α_{1H} (Ca_v3.2) que al exponerse a cAMP disparaban la respuesta secretora (Novara y col., 2004).

En cuanto a los canales **HVA**, se han descrito hasta cinco subtipos, que se diferencian entre sí por sus propiedades biofísicas y farmacológicas. Los **CCDV del subtipo L** (de “long lasting”; **Tabla 1**: Ca_v1.1, Ca_v1.2, Ca_v1.3 y Ca_v1.4) se activan a potenciales más negativos que los canales LVA, en torno a -30 mV. Cinéticamente, se caracterizan por su lenta inactivación ante un pulso despolarizante ($\tau_{inact} > 500$ ms), presentando una conductancia entre 18-25 pS en 100 mM de Ba²⁺ (Fenwick y col., 1982b; Fox y col., 1987b); estos canales se inactivan por completo cuando la carga transportada es el ion Ca²⁺ (Hernández-Guijo y col., 2001). Desde el punto de vista farmacológico, los canales L se caracterizan por su sensibilidad a las 1,4-dihidropiridinas (DHP), tanto agonistas (Ej. BAY K 8644), como antagonistas (nifedipino, nisoldipino, nimodipino, nitrendipino, furnidipino; García y col., 1984; 2006). También se bloquean por compuestos orgánicos (Fleckenstein, 1983; Spedding, 1985) como las aril-alquilaminas (Ej. verapamilo) y las benzodiazepinas (Ej. diltiazem); y de toxinas que bloquean los canales tipo L de forma selectiva (calciseptina y calcicludina) o no selectiva (ω -agatoxina-IA, ω -agatoxina-IIA, ω -agatoxina-IIIA). Este subtipo de canales parece que está presente en todas

las células excitables (y en algunas que no lo son) y constituyen la principal vía de entrada de Ca^{2+} al corazón y al músculo liso; además regulan la liberación de hormonas y neurotransmisores en células endocrinas y algunos tipos de neuronas (Perney y col., 1986; Rittenhouse y Zigmond, 1999; Okita y col., 2000).

El resto de los canales HVA también se expresan en la célula cromafín: el **subtipo N** (de “Neuronal” o “No-L”; **Tabla 1: $\text{Ca}_v2.2$**), (Hans y col., 1990; Bossu y col., 1991a y b; Artalejo y col., 1992a; Albillos y col., 1994), el **subtipo P** identificado inicialmente en las células de Purkinje (Albillos y col., 1993; Gandía y col., 1993a; Artalejo y col., 1994) y el **subtipo Q** (López y col., 1994; Albillos y col., 1996c). El aislamiento, purificación y síntesis, a partir del caracol marino *Conus magus*, de la toxina ω -conotoxina MVIIC permitió la identificación y caracterización de los canales Q (Randall y Tsien, 1995, Wheeler y col., 1994). Su corriente muestra una rápida inactivación (Sather y col., 1993; Randall y Tsien, 1995) y se caracteriza por ser resistente al bloqueo por DHP, ω -conotoxina GVIA y bajas concentraciones (<100 nM) de ω -agatoxina IVA. Sin embargo, la corriente Q es sensible a ω -conotoxina MVIIC (1-3 μM) y a altas concentraciones de ω -agatoxina IVA (por encima de 2 μM ; Wheeler y col., 1994). Dado que los canales P y Q están codificados por distintas isoformas de una misma subunidad, la α_{1A} (y dependiendo de cómo se combinen con sus subunidades β se obtendría una corriente de tipo P de tipo Q), parece conveniente hablar de un subtipo de **canales P/Q** (**Tabla 1: $\text{Ca}_v2.1$**) en vez de dos subtipos de CCDV. Este componente, que se ha estudiado extensamente en células cromafines, se inactiva por voltaje (Villarroya y col., 1999) y se ha aislado farmacológicamente con 2 μM de ω -conotoxina MVIIC, ω -conotoxina MVIIC y ω -agatoxina IVA.

Respecto al CCDV del **subtipo R** (de “Resistente o residual”; **Tabla 1: $\text{Ca}_v2.3$**), se sabe que la célula cromafín bovina presenta el ARNm que codifica y expresa para la subunidad α_{1E} (García-Palomero y col., 2000), implicada en la formación del poro iónico de este subtipo de canal. El aislamiento de la corriente de tipo R se encontró en rodajas de médula adrenal de ratón y en

células cromafines de ratón (Albillos y col., 2000; Aldea y col., 2002), gracias a la configuración de parche perforado de la técnica de patch-clamp ya que, los experimentos iniciales realizados en la configuración de célula entera, en células cromafines de distintos orígenes, no permitieron identificar dicha corriente. Esto hace pensar que este subtipo de canal requiera de un factor citosólico soluble para mantener su actividad en la célula cromafín.

La **Tabla 1** recoge la nomenclatura nueva y tradicional de los CCDV y resume tanto sus activadores y bloqueantes como su distribución en sistemas, órganos, tejidos y células (ver revisión García y col., 2006):

Nomenclatura nueva	Nombre tradicional	Tipo de corriente	Bloqueantes	Activadores	Distribución
(Ca _v 1.1)	α_{1S}	L	Nifedipino, nisoldipino, nitrendipino	Bay K 8644 FPL64176	Músculo esquelético, SNC, células cromafines
(Ca _v 1.2)	α_{1C}	L	Nifedipino, nisoldipino, nitrendipino	Bay K 8644 FPL64176 PCA50941	Corazón, SNC, músculo liso, fibroblastos, células PC12
(Ca _v 1.3)	α_{1D}	L	Nifedipino, calcicludina	Bay K 8644 FPL64176 PCA50941	SNC, células neuroendocrinas
(Ca _v 1.4)	α_{1D}	L	Nifedipino	Bay K 8644 FPL64176	Retina
(Ca _v 2.1)	α_{1A}	P/Q	ω -Aga-IVA, ω -Ctx-MVIIC ω -Ctx-MVIID		SNC, placa motora, células PC12, células cromafines
(Ca _v 2.2)	α_{1B}	N	ω -Ctx-GVIA ω -Ctx-MVIA		SNC, SNP, células PC12, células neuroendocrinas,
(Ca _v 2.3)	α_{1E}	R	SNX-482		SNC, placa motora, células cromafines
(Ca _v 3.1)	α_{1G}	T	Mibrefradilo		SNC, SNP, células cromafines
(Ca _v 3.2)	α_{1H}	T			Corazón, riñón, hígado, SNC células cromafines,
(Ca _v 3.3)	α_{1I}	T			SNC

Tabla 1. Subtipos de CCDV: ω -Aga-IVA, ω -agatoxina-IVA; ω -Ctx-GVIA, ω -conotoxina GVIA; ω -Ctx-MVIA, ω -conotoxina MVIA; ω -Ctx-MVIIC, ω -conotoxina MVIIC; ω -Ctx-MVIID, ω -conotoxina MVIID.

Los diferentes subtipos de canales HVA en la célula cromafín presentan una densidad relativa muy diferente entre especies (García y col., 2000 y 2006). Así, los del subtipo P/Q predominan en la humana y bovina, especies en las que los del subtipo L están muy poco representados; los canales L son los más abundantes en rata, ratón y gato y los del subtipo N abundan en células cromafines de cerdo. También difiere entre especies el grado en que cada uno

de estos subtipos de canales HVA contribuye a la secreción de catecolaminas. En células cromafines bovinas los canales del subtipo L y Q parecen ser los más implicados (Jiménez y col., 1993; Artalejo y col., 1994; López y col., 1994), e incluso se ha sugerido que los de tipo Q estarían más directamente acoplados a la maquinaria exocitótica que los L (Lara y col., 1998; Chan y col., 2005). Sin embargo, en otros trabajos la secreción se acopla más a los canales N (O'Farrell y col., 1997). Los distintos patrones de estimulación o las condiciones experimentales diferentes podrían explicar por qué uno u otro subtipo de CCDV domina el control de la exocitosis. En este contexto, el papel que juegan los distintos subtipos de CCDV en controlar la liberación de catecolaminas en células cromafines tratadas con ouabaína permanece inexplorado. En la actualidad, se sabe que la ouabaína exógena aumenta tanto la liberación de catecolaminas espontánea (Banks, 1967; Aunis y García, 1981; Török y Powis, 1990; Haass y col., 1997) como la que se desencadena cuando sometemos a las células cromafines bovinas a estímulos despolarizantes de K^+ (de Pascual y García, 2007). Dicho estudio es relevante si consideramos que la ouabaína endógena se sintetiza en la corteza adrenal (Inagami y Tamura, 1988; Schneider y col., 1998). Así como los esteroides corticales controlan la expresión de la enzima PNMT y la síntesis de catecolaminas (Wurtman y Axelrod, 1965), el esteroide ouabaína podría desempeñar un papel fisiológico para controlar algunas funciones en las células cromafines de la médula adrenal de las células cromafines.

Por último, es curioso como enzimas como la PKC ϵ son capaces de modular los CCDV en células neuronales como los astrositos. Parece que el aumento de la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV del subtipo L regulado por la isoforma ϵ de la PKC, mediaría los cambios morfológicos que sufre este tipo celular en cultivo (Burgos y col., 2007).

3.2 Canales iónicos activados por ligando

Estos canales se abren tras reconocer a una sustancia química específica (su ligando), que puede ser un neurotransmisor o una hormona. En la célula cromafín se han descrito el receptor nicotínico neuronal para la ACh (nAChR), el receptor de GABA de tipo GABA_A permeable a Cl⁻, el receptor de glicina y el receptor para glutamato. Dada su baja selectividad iónica, estos canales suelen ser permeables a varios iones.

Cabe resaltar la importancia del **nAChR** en la célula cromafín por su papel en el acoplamiento “excitación-secreción”; término acuñado por Douglas y Rubin en 1961(a) para establecer el mecanismo por el cual, la ACh provoca la secreción de catecolaminas. De hecho, dicho acoplamiento se inicia cuando las moléculas de ACh, procedentes de las terminaciones de las fibras preganglionares del nervio esplácnico se combinan con receptores nicotínicos o múscarínicos de la membrana celular (Artalejo y col., 1995). Como consecuencia, se produce la apertura del poro de los nAChR y el paso de cationes a través de él (Na⁺ en mayor medida, pero también permea Ca²⁺ y K⁺). Al margen de su implicación fisiológica en la célula cromafín, los nAChR son glicoproteínas transmembrana constituidas por 5 subunidades: la α o de unión al agonista (receptores homoméricos) o al menos dos subunidades α y el resto (hasta cinco) β o estructurales (receptores heteroméricos).

3.3 Canales iónicos operados por depósitos intracelulares

Estos canales constituyen la principal vía de entrada de Ca²⁺ en las células eucariotas no excitables. Se activan por el vaciado de depósitos intracelulares de Ca²⁺ (aunque el mecanismo exacto que los activa no está claramente dilucidado) generando una “entrada capacitativa de Ca²⁺” o “entrada de Ca²⁺ operada por depósitos” destinada a rellenar tales depósitos (se puede consultar una revisión en Parekh y Putney, 2005). La corriente mejor caracterizada de este tipo es la denominada ICRAAC (de “calcium release activated calcium current”), una corriente de Ca²⁺ no activada por voltaje y con

rectificación de entrada; se ha descrito en numerosos tipos de células, principalmente de origen hematopoyético. En neuronas y células cromafines bovinas existen evidencias de que se produce entrada de Ca^{2+} operada por depósitos, aunque no del tipo ICRCAC (Fomina y Nowycky, 1999; Putney, 2003).

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

4. HOMEOSTASIA CELULAR DEL CALCIO

El Ca^{2+} es un **mensajero intracelular universal**. En la célula en reposo la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ($[\text{Ca}^{2+}]_{c \text{ reposo}}$) es del orden de 50-200 nM, unas 10.000 veces menor que la concentración extracelular, lo que da lugar a que incrementos relativamente pequeños de Ca^{2+} eleven la razón $[\text{Ca}^{2+}]_c/[\text{Ca}^{2+}]_{c \text{ reposo}}$ para servir como señal que dispare una gran variedad de fenómenos fisiológicos desde la fecundación del ovocito por el espermatozoide, el desarrollo embrionario y la contracción muscular hasta la excitabilidad neuronal, la secreción de hormonas o la liberación de neurotransmisores (Berridge y col., 1998).

Además, a diferencia de otros segundos mensajeros el catión Ca^{2+} no puede sintetizarse *de novo* ni degradarse. Así, las señales intracelulares de Ca^{2+} son el

resultado de una regulación rápida y dinámica entre el Ca^{2+} que entra a través de los CCDV (ver sección 3.1 de la Introducción), el Ca^{2+} tamponado, el secuestro/liberación de Ca^{2+} por las organelas intracelulares y la salida o bombeo de Ca^{2+} desde el citosol hacia el exterior celular. Por lo tanto, la fina regulación de este sistema definirá la magnitud, distribución espacio-temporal y frecuencia de la señal citosólica de Ca^{2+} , de tal manera que los incrementos locales en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ generarán respuestas celulares como las mencionadas en el párrafo anterior.

En las células endocrinas se estima que sólo uno de cada 30-100 iones de Ca^{2+} se encuentra en estado libre; el resto permanecen reversiblemente unidos a **proteínas tamponadoras** que unen Ca^{2+} , como la parvalbúmina, la calbindina o la calmodulina (Neher y Augustine, 1992). Estas proteínas actúan como primer mecanismo de tamponamiento tras la entrada masiva de Ca^{2+} , pero la célula cromafín presenta otros mecanismos que le permitirán recuperar los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ basales y evitar su sobrecarga con Ca^{2+} : 1) las **bombas e intercambiadores de la MbP**, que expulsan Ca^{2+} hacia el exterior celular; 2) las **organelas intracelulares dinámicas**, como el RE y la mitocondria, que secuestran o liberan el Ca^{2+} en función de su estado de relleno y de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$; y 3) las **organelas estáticas** como las vesículas cromafines (ver sección 2.3 de la Introducción), que quelan el Ca^{2+} en su interior.

A continuación se describirán los mecanismos de salida (el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y la bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP) y de secuestro/liberación de Ca^{2+} (el RE y la mitocondria) que contribuyen a la homeostasia del Ca^{2+} en la célula cromafín (Berridge y col., 2003) (**Fig. 5**).

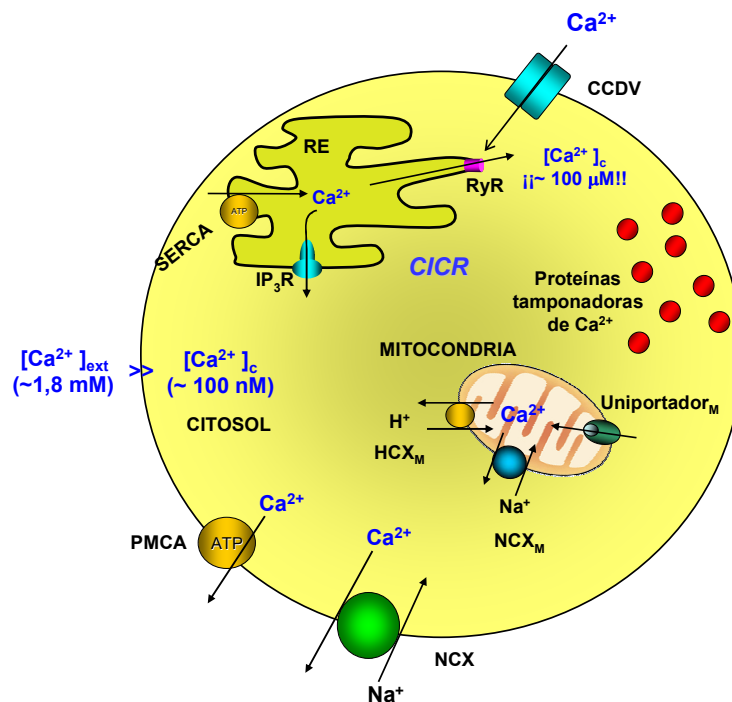


Figura 5. Resumen de los principales sistemas que regulan la homeostasia del Ca^{2+} en la célula: ver secciones 4.1 y 4.2 de la Introducción.

4.1 Mecanismos de salida de Ca^{2+} de la célula y su modulación

4.1.1 Intercambiador Na^{+}/Ca^{2+}

El intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} (NCX; del inglés “ $Na^{+} Ca^{2+}$ exchanger”) de la MbP es un transportador electrogénico con una estequiometría Na^{+}/Ca^{2+} 3:1; constituye uno de los mecanismos más importantes encargados de mantener la homeostasia intracelular del Ca^{2+} (y devolver sus niveles a la situación de reposo) en la célula cromafín bovina (Chern y col., 1992; Lin y col., 1994; Liu y col., 1990; Pan y col., 1998).

El NCX puede trabajar tanto en modo directo (intercambio de Na^{+} extracelular por Ca^{2+} intracelular) como en reverso (intercambio de Ca^{2+} extracelular por Na^{+} intracelular). Se han clonado al menos tres genes que codifican para el NCX (Lin y col., 1994; Nicoll y col., 1990): el *ncx1* que predomina en corazón y el *ncx2* y el *ncx3* restringidos al cerebro y al músculo esquelético. La MbP de la célula cromafín expresa mayoritariamente el NCX codificado a partir del clon p17h del gen *ncx1* (por procesamiento alternativo de la región variable; ver más abajo: Pan y col., 1998). El gen *ncx1* se clonó

por primera vez a partir de tejido cardiaco de perro y codifica para una proteína de 970 residuos. Su estructura secundaria consta de: un péptido señal seguido de una pequeña región extracelular glicosilada; un dominio con cinco segmentos hidrofóbicos transmembrana; un lazo citoplasmático largo y una región final compuesta por seis segmentos transmembrana (Hryshko y col., 1993; Lin y col., 1994; Nicoll y col., 1990 y 1996). A la altura del extremo C-terminal del lazo citoplasmático, existe una región variable responsable de las distintas isoformas para el NCX1 generadas por procesamiento alternativo (Pan y col., 1998). Parece que la regulación de la actividad del NCX también está ligada a este extenso lazo citoplasmático y que la fosforilación reversible por proteínas cinasa juega un papel modulador de gran importancia. En la célula cromafín, se sabe que la actividad del NCX se inhibe por agentes que promueven la fosforilación (Lin y col., 1994) a diferencia de otros tipos celulares como los cardiomiocitos de rata en donde el inhibidor de la PKC, queleritrina, anula la actividad del intercambiador (Yeung y col., 2007). Es más, la inhibición de la PKC acelera, y su activación atenúa el flujo de Ca^{2+} a través del NCX en la célula cromafín bovina (Houchi y col., 1995; Tokumura y col., 1998). Así, el éster de forbol PMA ($0,4 \mu\text{M}$) es capaz de disminuir la actividad intercambiadora del clon p17h (aislado de la célula cromafín y expresado en ovocitos de *Xenopus*) en un 73% y la subunidad catalítica de la PKC inhibe la corriente de entrada de Na^+ del mismo clon, tras 4 min de exposición, en un 20%. El inhibidor de la PKC, calfostina C, por el contrario y bajo las mismas condiciones experimentales, aumenta dicha corriente en un 70% (Pan y col., 1998).

Es interesante descubrir cómo en las CCB el NCX, el RE y la mitocondria se armonizan para regular la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ cerca de los sitios de exocitosis. Sin embargo, cuando el Ca^{2+} se difumina hacia el interior celular, la mitocondria se convierte en el mecanismo dominante del aclaramiento de Ca^{2+} . Así, cuando las células cromafines se estimulan con alto K^+ , y la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria está inhibida, la actividad secretora supera a la que se observa en células control y la caída de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ se hace significativamente más lenta. El

NCX, por otro lado, parece que sólo funciona durante la fase inicial de la caída de Ca^{2+} citosólico y cuando la SERCA está bloqueada. De igual manera, el RE sólo tiene un efecto significativo sobre dicha caída, y sobre la secreción cuando se bloquea el NCX (Yang y col., 2001). Además, la elevación en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ evocada por el NCX cuando trabaja en reverso se ve facilitada por los depósitos intracelulares de Ca^{2+} en la célula cromafin bovina, de tal manera que cuando se inhibe la SERCA del RE con tapsigargina (Thapstrup 1990b) dicha elevación disminuye significativamente (Pan y col., 2006).

4.1.2 Ca^{2+} ATPasa de la membrana plasmática

Además del NCX las células excitables necesitan un segundo mecanismo principal para sacar el Ca^{2+} fuera de la célula: la Ca^{2+} ATPasa de la MbP (PMCA; del inglés “plasma membrane Ca^{2+} ATPase”). La PMCA es una ATPasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina, semejante a la SERCA pero insensible a la tapsigargina, que posee una elevada afinidad por el Ca^{2+} (0,1-1,0 μM) y por lo tanto baja capacidad para transportarlo, de manera que se satura fácilmente (Zylinska y Soszynski, 2000). Esto indica que puede responder a modestas elevaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ por lo que es útil para mantener bajos los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en condiciones de reposo.

En la MbP de las células se pueden expresar distintas isoformas de la PMCA lo que sugiere que estas enzimas se han especializado para desempeñar funciones específicas. Mientras que la PMCA1 y 4 son ubicuas, la PMCA 2 y 3 son isoformas características de células excitables (Zylinska y col., 2007). La isoforma PMCA4b, que quizás es la más extendida y se lleva estudiando desde hace tres décadas, presenta dos regiones autoinhibidoras en la zona carboxiterminal que mantienen inactivada la bomba en ausencia de activadores. En estas regiones se encuentra el dominio de unión a la calmodulina; cuando se unen dos moléculas de calmodulina anulan las dos regiones inhibidoras y la bomba se activa al máximo. En la zona carboxiterminal también se ha identificado el sitio de fosforilación por la PKC.

Así, la fosforilación de este sitio activa parcialmente la bomba por inactivación de una de las regiones inhibitorias (Enyedi y col., 1996).

Por último, Kosk-Kosicka y Zylinska (1997) demostraron que la calmodulina y la PKC eran capaces de modular positivamente tanto la PMCA en células no excitables (eritrocitos) como en células excitables. Además, el mismo grado de fosforilación de la PMCA por la PKC en células excitables exhibía un 20-40% más de actividad que en células no excitables.

4.2 Mecanismos de secuestro/liberación de Ca^{2+} por las organelas intracelulares dinámicas

4.2.1 Retículo endoplásmico

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

En la membrana del RE de la célula cromafín se encuentran tres estructuras que participan en la homeostasia del Ca^{2+} : 1) la bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP (SERCA, del inglés “*Sarcoplasmic and Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase*”); 2) los receptores de rianodina (RyR; del inglés “*Ryanodine Receptors*”); y 3) los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃R, del inglés “*IP₃ receptors*”).

1) SERCA: toma Ca^{2+} del citosol y lo acumula en el lumen del RE en contra del gradiente electroquímico, con gasto de ATP (Pozzan y col., 1994; Meldolesi y Pozzan, 1998). Al igual que la PMCA, posee una alta afinidad por el Ca^{2+} (0,1-1 μM) y por lo tanto, una baja capacidad para transportarlo. Por ello, su función principal es la de controlar la $[Ca^{2+}]_c$ en condiciones de reposo o ausencia de estímulo.

En la célula cromafín se expresan principalmente las isoformas SERCA 2b y SERCA 3 de tal modo que las isoformas 1 y 2A están confinadas al músculo esquelético (Poulsen y col., 1995). Para acometer su función la SERCA sufre una serie de cambios conformacionales. En el estado conformacional E1 la SERCA es capaz de unir Ca^{2+} y ATP. A continuación, se genera el intermediario $\text{E1}'\text{Ca}_2\text{ATP}$ susceptible de fosforilarse. Como consecuencia se pasa a un estado de baja afinidad por el Ca^{2+} E2PCa_2 que lanza el Ca^{2+} al lumen del RE y se defosforila para pasar al estado conformacional E2. Sólo entonces, el estado E2 es capaz de volver al estado E1 (Lee y East, 2001).

La SERCA se caracteriza porque es sensible al agente tumoral **tapsigargina**. La tapsigargina es un inhibidor selectivo e irreversible de la SERCA que se utiliza como herramienta farmacológica para depletar el depósito de Ca^{2+} del RE (Thapstrup y col., 1990a y b; Kijima y col., 1991; Lytton y col., 1991; Mathiasen y col., 1993; Pan y Fox, 2000). Sin embargo, parece que la presencia de Ca^{2+} infunde protección sobre el efecto inhibidor de la SERCA con tapsigargina (Caspersen y Treiman, 1995). Como consecuencia de la acción de la tapsigargina, el Ca^{2+} del RE sale a través de los RyR (Wei y Perry, 1996; Yoshida y col., 2006) y los IP_3R (Robinson y col., 1992) aumentando la $[\text{Ca}^{2+}]_c$.

Por último, la actividad PKC además de acelerar la actividad de la PMCA también fue capaz de aumentar la tasa de rellenado del RE a través de la SERCA en neuronas sensoriales de rata (Usachev y col., 2006). Estos autores concluyeron que la actividad moduladora de la PKC favorecía el aclaramiento del Ca^{2+} citosólico tanto por estimulación del secuestro de Ca^{2+} a través de la SERCA del RE, como por la liberación del Ca^{2+} hacia el exterior celular a través de la PMCA.

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

La función de los RyR está íntimamente ligada al fenómeno de **CICR** (del inglés “*Calcium-Induced Calcium Release*” o *Liberación de Calcio Inducida por Calcio*). En 1983 Fabiato fue el primero en caracterizar dicho fenómeno; el Ca^{2+} que entra por los CCDV (de tipo L) activa la salida de Ca^{2+} del RE a través de los RyR, amplificando y propagando la señal de Ca^{2+} por el citosol. Más tarde, Alonso y sus colaboradores (1999), mediante el empleo de ecurina (AEQ) dirigida al RE de CCB, descubrió que su estimulación repetida con pulsos de K^+ , cafeína o DMPP, provocaba liberaciones transitorias de Ca^{2+} del RE en el citosol. En este trabajo, que constituyó la primera evidencia directa del fenómeno de CICR en CCB, se sugería que el CICR podría servir para mantener la migración vesicular durante la despolarización celular.

La liberación de Ca^{2+} por CICR responde a una curva en campana. Inicialmente, la liberación se incrementa por un mecanismo de retroalimentación positiva; pero cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ alcanza su meseta (con una CI_{50} de 120-150 μM) la liberación de Ca^{2+} se inhibe (Meissner y col., 1986).

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

Otro de los compuestos capaces de liberar Ca^{2+} del RE a través de los RyR es la **cafeína** (Teraoka y col., 1991; Cheek y col., 1993), hasta el punto de que en ausencia de Ca^{2+} extracelular puede provocar la secreción de catecolaminas en muchas especies animales. A este respecto, en un trabajo del grupo (Lara y col., 1997) se observó que al perfundir poblaciones de CCB con una solución libre de Ca^{2+} (0Ca^{2+} nominal), cuando se depletaba el depósito de Ca^{2+} del RE con cafeína las respuestas secretoras evocadas por K^+ disminuían; al lavar la cafeína se recuperaban las respuestas secretoras. En este trabajo se sugería la

hipótesis de que el RE, en función de su estado de relleno, podía actuar como una fuente (si está lleno) o un sumidero (si está vacío) de Ca^{2+} citosólico, modulando de este modo la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y la secreción de catecolaminas inducidas por la apertura de CCDV.

La actividad de la cafeína sobre los RyR es dependiente de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$. Así, ésta sólo puede liberar Ca^{2+} del RE de forma cuantal hasta que se alcanzan ciertos niveles en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ (Alonso y col., 1999).

3) IP_3R : los IP_3R se encuentran en todos los tipos celulares. Determinados agonistas como la histamina o la bradicinina se unen a los receptores mÚscarÍnicos para activar una cascada de señalización intracelular en la que se activa la fosfolipasa C (PLC), que hidroliza el fosfatidil inositol 4,5-difosfato (PIP_2) presente en la MbP a IP_3 y diacilglicerol (DAG) (Forsberg y col., 1986; Augustine y Neher, 1992; Alonso y col., 1999). El IP_3 se liberará al citosol, donde activará la salida de Ca^{2+} del RE a través de los RIP_3 desencadenando en última instancia la exocitosis (Augustine y Neher, 1992).

La capacidad del IP_3R para liberar Ca^{2+} del RE también es dependiente de las concentraciones de Ca^{2+} intraluminal y citosólico que modulan el estado de afinidad del receptor por su agonista IP_3 . Esta situación permitirá que estos receptores estén dinámicamente acoplados a las condiciones del medio citosólico y al estado de relleno del RE para activarse o inhibirse (Taylor, 1998; Miyakawa y col., 2001; Taylor y Laude, 2002; Berridge y col., 2003). Además, esta habilidad del Ca^{2+} para regular la actividad de los IP_3R explicaría la generación de oscilaciones intracelulares de Ca^{2+} en células cromafines de rata (Malgaroli y Meldolesi, 1991; Inoue y col., 2004). A este respecto, adicionalmente una vez que se activan los receptores de IP_3 , el Ca^{2+} que sale del RE es capaz de activar otros RyR colindantes integrándose también en el fenómeno de CICR.

El segundo producto que se obtiene a partir de la hidrólisis de PIP_2 es el DAG que es capaz de activar la PKC que inhibe a su vez la liberación de Ca^{2+} vía IP_3R . Por lo tanto, parece que la histamina activa la liberación de Ca^{2+} del RE para poco después activar la PKC y cortar la salida (Montero y col., 2003). Estos autores también observaron que los inhibidores de la PKC, estaurosporina, GF109203X o Ro-31-8220 eran capaces de alargar la fase inicial de salida de Ca^{2+} del RE vía IP_3 hasta que el depósito quedaba totalmente vacío.

Finalmente, Kim y col., (1999) también correlacionan la CEE evocada por la estimulación con bradicinina con la activación de la PLC y la señal citosólica que desencadena.

4.2.2 Mitocondria

Hasta la década de los 90 se pensaba que la función principal de la mitocondria era la producción de energía en forma de ATP. Sin embargo, durante esa década quedó patente que dicha organela además era esencial en el control de la señal intracelular del Ca^{2+} , tanto en neuronas (Werth y Thayer, 1994; White y Reynolds, 1997; Pivovarova y col., 1999) como en células cromafines (Herrington y col., 1996; Babcock y col., 1997; Montero y col., 2000). En estos tipos celulares la mitocondria puede actuar como un depósito rápido y reversible de Ca^{2+} que tampona y modula los incrementos de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que se producen tras una despolarización.

En las CCB ello se traduce en que la mitocondria es capaz de modular procesos como el de la secreción de neurotransmisores (Montero y col., 2000; 2001a; Villalobos y col., 2002), la inactivación de CCDV por Ca^{2+} (Hernández-Guijo y col., 2001), el fenómeno de CICR mitocondrial (Montero y col., 2001b) o el desensamblaje de los filamentos de F-actina mediado por la PKC, que a su vez regula la magnitud de la respuesta secretora (Cuchillo-Ibáñez y col., 2004). Así, en la membrana de la mitocondria de la célula cromafin se encuentran tres estructuras principales que participan en la

homeostasia del Ca^{2+} : 1) el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial; 2) el NCX mitocondrial; y 3) el intercambiador de $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial.

1) Uniportador de Ca^{2+} mitocondrial: está ubicado en la membrana interna de la mitocondria. En las células cromafines presenta una baja afinidad y una alta capacidad para unir Ca^{2+} , activándose en un rango de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ de 500 nM a 2 μM sin llegar a la saturación. Esto se traduce en que, tras un estímulo, la mitocondria puede captar Ca^{2+} rápidamente, hasta alcanzar una concentración en la matriz mitocondrial ($[\text{Ca}^{2+}]_M$) cercana al rango de milimolar (Herrington y col., 1996; Montero y col., 2000).

El uniportador mitocondrial introduce Ca^{2+} a favor de gradiente electroquímico gracias a la baja $[\text{Ca}^{2+}]_M$ existente en la matriz mitocondrial. Esta concentración, similar a la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, es del orden de 100-200 nM (Rizzuto y col., 1993). El uniportador también se rige por el potencial de la membrana interna mitocondrial, en torno a los -150 y -180 mV (Duchen, 1999).

Una vez captado el Ca^{2+} por la mitocondria, el gradiente electroquímico de este catión se invierte y el Ca^{2+} comenzará a salir lentamente de esta organela. El Ca^{2+} mitocondrial puede salir bien a través del propio uniportador que trabajará en reverso para generar el fenómeno de CICR mitocondrial (Montero y col., 2001b), o bien a través de los intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y de $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$. Finalmente, los niveles basales de la $[\text{Ca}^{2+}]_M$ se recuperarán en 1-2 min.

Por último, Montero y sus colaboradores (2002b) descubrieron un nuevo mecanismo de modulación del uniportador mitocondrial a través la proteína cinasa activada por el mitogéno p38 (MAPK, de inglés "*p38 mitogen-activated protein kinase*"). En ese trabajo demostraron que el inhibidor de la MAPK, SB202190, estimulaba la captura de Ca^{2+} por el uniportador mitocondrial en más de 10 veces.

2 y 3) Intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y de $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondriales: Son los dos mecanismos involucrados en la salida del Ca^{2+} mitocondrial tras un

estímulo. El NCX introduce en el lumen mitocondrial 3 iones de Na^+ por cada ion Ca^{2+} que saca al citosol (Reeves y Hale, 1984); posee baja afinidad y alta capacidad para movilizar Ca^{2+} y es reversible; y funciona a favor de gradiente iónico y según la magnitud y la polaridad de los potenciales electroquímicos. El intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (HCX, del inglés “ $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger”) introduce 2 H^+ por cada Ca^{2+} que saca al citosol y se ha caracterizado principalmente en hígado y riñón (Günter y col., 2000).

5. ACTIVIDAD DE LA PKC

La PKC es una enzima perteneciente a la familia de las serín-treonín cinasas dependientes de fosfolípidos. Estas cinasas se activan en respuesta a un estímulo de tipo hormonal, a través de un factor de crecimiento o por la acción de neurotransmisores (Basu, 1993; Newton, 1995; Nishizuka, 1995; Mellor y Parker, 1998). En general, presentan 4 dominios altamente conservados; C1-C4. En células de mamíferos existen al menos, 11 isoformas de la PKC que se clasifican en tres grupos dependiendo de su estructura y de cómo se regulan: 1) las **clásicas** (α , βI , βII , γ) que se regulan por DAG, Ca^{2+} y fosfolípidos (en particular la fosfatidil serina; PS); 2) las **nuevas** (δ , ϵ , η , θ) que presentan una organización similar a las isoformas clásicas pero con diferencias en el dominio C2 y no se regulan por Ca^{2+} ; y 3) las **atípicas** (ζ , λ , μ) que no tienen dominio C2 y no se regulan ni por DAG ni por Ca^{2+} (Dekker y Parker, 1994; Newton y Jonson, 1998). De entre estas 11 isoformas, las células cromafines de la médula adrenal sólo contienen las isoformas PKC α , ϵ y ζ (Yanagita y col., 2000).

Se sabe que la PKC α se une a la PS de la MbP por interacción directa de uno de los dos iones calcio que alberga en la región de unión a Ca^{2+} CBR1 del dominio C2. Es decir, parece que dicho ion es capaz de mediar el reconocimiento de la PS mientras que la región de unión a Ca^{2+} CBR3 podría penetrar en la bicapa lipídica de la MbP (Verdaguer y col., 1999; **Fig. 6**).

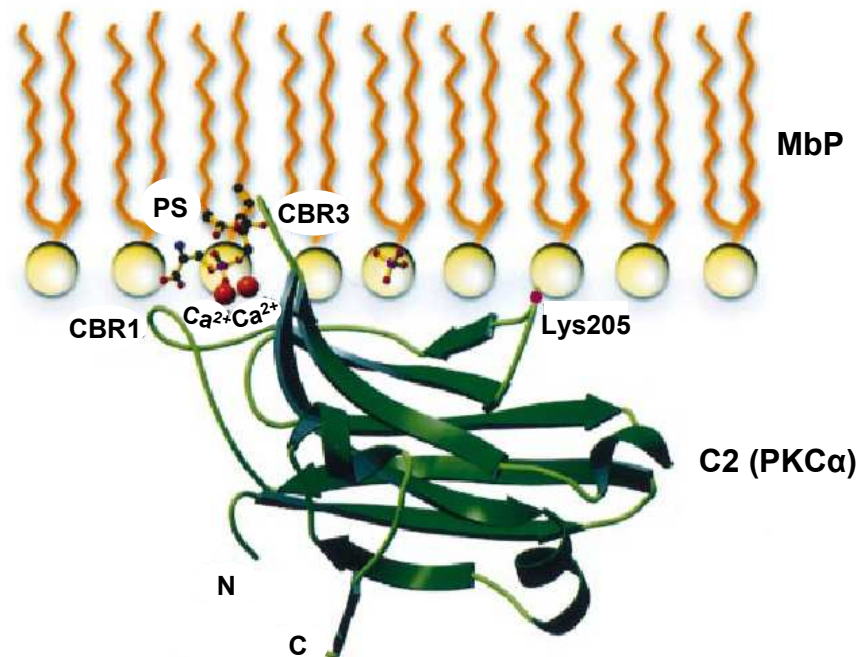


Figura 6. Modelo referido al anclaje del complejo ternario PKC α -C2-Ca²⁺-PS; véase como el ion calcio (Ca²⁺) unido al sitio de unión a Ca²⁺ 1 (CBR1) de la región C2 de la PKC α , se une directamente a la fosfatidil serina (PS) de la membrana plasmática (MbP). La Lys205 de la región C2 también se une a la MbP pero sin invadirla. En este modelo los extremos N y C terminales tienen una polaridad opuesta a la MbP y flotan en el citosol (adaptado de Verdaguer y col., 1999).

5.1 Función del citoesqueleto de filamentos de actina en el proceso neurosecretor

En las CCB, el citoesqueleto de filamentos de actina se dispone justo por debajo de la MbP formando una barrera entre la RP y los sitios de exocitosis (Vitale y col., 1995, Burgoyne y col., 1982). El desensamblaje de este citoesqueleto en respuesta a un estímulo secretor, como la nicotina o una solución con un alto contenido en K⁺ (Trifaró y col., 2000; Cuchillo-Ibáñez y col., 2004), permite el paso de la RP a formar parte de la RRP (Vitale y col., 1991; 1995). Cuando el estímulo cesa, el citoesqueleto de filamentos de actina se recompone (Trifaró y col., 2000; Vitale y col., 1991). Por lo tanto, dicho citoesqueleto, en respuesta a determinados estímulos, se comporta como una estructura dinámica que sufre una ruptura necesaria para el proceso secretor.

El éster de forbol PMA, que estimula la actividad PKC favoreciendo su incorporación del citosol a la MbP (Vitale y col., 1992), también provoca el

desensamblaje del citoesqueleto de filamentos de actina (Trifaró y col., 2000). Los inhibidores de dicha actividad enzimática (esfingosina, estaurosporina y calfostina C), por el contrario, inhiben de manera dependiente de concentración el desensamblaje de los filamentos de actina inducido por el PMA. Además, el PMA potencia en 2 ó 3 veces la tasa inicial de secreción de catecolaminas (durante los 6 primeros min de incubación con PMA) inducida por nicotina o por una solución con un alto contenido en K^+ (Knight y Baker, 1983; Burgoyne y col., 1984; Vitale y col., 1995), sin cambiar la secreción basal. Cuando se mide la secreción en términos de capacidad de la membrana, también aumenta su tasa inicial sin que se produzca un incremento en la entrada de Ca^{2+} dependiente de voltaje (Trifaró y col., 2000).

5.2 Dos vías que controlan la dinámica del citoesqueleto de filamentos de actina: escinderina y PKC-MARKS

Este discurso indica que el desensamblaje del citoesqueleto de filamentos de actina puede ocurrir en respuesta a la despolarización celular (K^+) o al tratamiento con ésteres de forbol (PMA). Sin embargo, mientras el primer mecanismo requiere la entrada extracelular de Ca^{2+} el segundo también acontece en ausencia de Ca^{2+} extracelular (Vitale y col., 1991; 1992; 1995). Por lo tanto, la dinámica del citoesqueleto de filamentos de actina está controlada por al menos dos mecanismos dependientes de Ca^{2+} : 1) el mecanismo controlado por la **escinderina** (Rodríguez del Castillo y col., 1990); y 2) el mecanismo vía **PKC-MARKS** (Trifaró, 1999; Rosé y col., 2001). También el grupo de Smith y sus colaboradores (1998) concluyeron que pequeñas elevaciones en la $[Ca^{2+}]_c$, que no disparan la secreción por sí mismas, aumentan la población RRP y la secreción de forma tanto dependiente como independiente de la PKC.

Dado que los inhibidores de la PKC sólo disminuyen en un 20% el desensamblaje del citoesqueleto y la liberación de catecolaminas inducida por nicotina (Trifaró y col., 2000), el mecanismo escinderina es responsable de al

menos el 80% del desensamblaje y de la liberación de catecolaminas evocados por estimulación colinérgica; es el mecanismo principal cuando entra Ca^{2+} a través de los CCVD. Sin embargo, cuando las células se estimulan con secretagogos que liberan Ca^{2+} de los depósitos intracelulares como la histamina, el mecanismo PKC-MARKS es el que predomina; la estimulación con histamina desencadena la formación de IP_3 y la activación de los IP_3R favoreciendo la salida del Ca^{2+} del RE, la activación de la actividad PKC (TerBush y col., 1988), el desensamblaje del citoesqueleto de actina para aumentar en última instancia la secreción (Zhang et al., 1995; Vitale y col., 1995). Por lo tanto, el mecanismo Ca^{2+} -escinderina es el más importante cuando entra Ca^{2+} extracelular y el mecanismo PKC-MARKS predomina durante la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares.

Además, la PKC controla en un 20% la liberación de catecolaminas evocada por estimulación colinérgica actuando a dos niveles: 1) en el desensamblaje del citoesqueleto de filamentos de actina media la redistribución de la escinderina (de los fosfolípidos de membrana al citoesqueleto de filamentos de actina) indirectamente vía elevación del pH intracelular, por fosforilación y activación del antiportador Na^+/H^+ ; y 2) durante el proceso de recuperación del citoesqueleto de actina, cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ vuelve a bajar (10^{-7} M) y el pH aún es alto, aumenta la afinidad de la escinderina hacia los fosfolípidos de membrana (Rodríguez del Castillo y col., 1992).

6. ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-SECRECIÓN

En las células cromafines de la médula adrenal los iones calcio constituyen la señal que acopla el estímulo a la respuesta secretora de catecolaminas (Douglas, 1968). En estas células, La entrada masiva de Ca^{2+} (Douglas y Poisner, 1961) a través de los CCDV (Fenwick y col., 1982a) se asocia a la secreción inducida por ACh (el neurotransmisor fisiológico a nivel de la sinapsis esplácnico-cromafín; Feldberg y col., 1934), o inducida por la despolarización celular química mediante el uso de soluciones con un alto

contenido en K^+ (Douglas y Rubin, 1963). En los últimos años, el uso combinado de las técnicas de patch-clamp y de imagen de las señales de Ca^{2+} ha establecido varios patrones de estimulación basados en trenes de potenciales de acción o de pulsos despolarizantes (también sencillos), para relacionar la entrada de Ca^{2+} con los cambios en la $[Ca^{2+}]_c$ y la respuesta exocitótica medida con técnicas de capacidad y amperometría (Zhou y Misler, 1995; Elhamdani y col., 2001; Chan y Smith, 2001; Duan y col., 2003; Carabelli y col., 2003; Chan y col., 2005; de Diego y col., 2006, 2008).

En 1965 Douglas y Poisner establecieron que los agonistas de los receptores muscarínicos también podían disparar la liberación de catecolaminas de la médula adrenal. La histamina también estimula la secreción (Livett y Marley, 1986; Noble y col., 1988) a través de la disociación de los fosfolípidos de membrana (Forsberg y col., 1986) y la liberación del Ca^{2+} del RE mediada por IP_3 (Malhotra y col., 1988; Stauderman y Pruss, 1990). Experimentos posteriores en los que se medía la exocitosis mediante técnicas de capacidad en células con voltaje fijo, sugerían un papel alternativo para la liberación del Ca^{2+} del RE evocada por histamina y la correspondiente, pequeña pero sostenida elevación de la $[Ca^{2+}]_c$; por ejemplo, para aumentar la población de vesículas RRP potenciando así la respuesta exocitótica evocada por pulsos despolarizantes secuenciales (Von Rüden y Neher, 1993). Zhang y sus colaboradores (1995) también emplearon histamina con la misma intención.

La liberación del Ca^{2+} de RE a través de los receptores de rianodina (RyR) también está implicada en la modulación de la secreción. Así, el activador de los RyR, cafeína, causa tanto la liberación del Ca^{2+} de dicho depósito (Cheek y col., 1993; Lara y col., 1997) como de catecolaminas (Cheek y col., 1990; Teraoka y col., 1991; Lara y col., 1997). El depósito de Ca^{2+} sensible a cafeína puede que no sirva únicamente como fuente de Ca^{2+} ; dicho depósito podría actuar también como sumidero de Ca^{2+} para modular finamente el tamaño y la forma de las oscilaciones que sufre la $[Ca^{2+}]_c$ al abrirse los CCDV como propusieron Cheek y col. (1990) y Liu y col. (1991) para las células cromafines bovinas. Nuestro grupo probó funcionalmente esta hipótesis: la

cafeína deprimía gradualmente la respuesta secretora generada por pulsos repetidos de K^+ , efecto paralelo a la depleción del depósito del Ca^{2+} del RE. Tanto el depósito de Ca^{2+} como la respuesta secretora se recuperaron al lavar la cafeína (Lara y col., 1997). Von Räden y Neher (1993) también utilizaron cafeína para elevar moderadamente la $[Ca^{2+}]_c$ por liberación de Ca^{2+} del RE y aumentar la RRP y la secreción.

Posteriormente, se hicieron experimentos en los que se combinaban las técnicas de imagen de Ca^{2+} con microscopía confocal y utilizando AEQ dirigida al RE, que aportaron información directa sobre la presencia del fenómeno de CICR (del inglés “ Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release” o liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}) en células cromafines bovinas de la médula adrenal. Dicho mecanismo se activaba por la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV evocada por despolarizaciones de K^+ (Alonso y col., 1999). Así, fue tomando fuerza la idea de que las señales de Ca^{2+} citosólico y exocitótica no sólo estaban influenciadas por la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV si no también a través de la liberación de Ca^{2+} del RE mediante el fenómeno de CICR.

Una forma alternativa de probar esta hipótesis ha sido estudiando los cambios en la $[Ca^{2+}]_c$ y en la respuesta exocitótica con AEQ dirigida al RE de células cromafines cuyo depósito había sido previamente depletado con el inhibidor irreversible de la SERCA tapsigargina (Kijima y col., 1991; Lytton y col., 1991; Mathiasen y col., 1993). Así, Mollard y col. (1995) incubaron las células con tapsigargina (1 μ M) y detectaron que la depleción del RE no afectaba a la secreción. Por otro lado, Pan y Fox (2000) demostraron en células cromafines bovinas (en condiciones de fijación de voltaje) que el pretratamiento durante 1 h con altas concentraciones de tapsigargina (3 μ M), aumentaba la secreción durante el primer tren de pulsos despolarizantes pero disminuía la secreción evocada por los tres pulsos siguientes, dados a intervalos de 4 min. Nuestro laboratorio utilizó un protocolo similar en un trabajo posterior pero con poblaciones de células cromafines bovinas intactas. Las células se pretrataron con la mezcla tapsigargina, rianodina y cafeína para

provocar una depleción drástica del depósito de Ca^{2+} del RE, lo que dio lugar a una disminución en las respuestas secretoras evocadas por 5 pulsos secuenciales de ACh en presencia de Ca^{2+} . Sin embargo, bajo las mismas condiciones experimentales pero aplicando pulsos despolarizantes de K^+ , sólo se obtuvo una potenciación de la secreción (Cuchillo-Ibáñez y col., 2002).

Aunque estos experimentos sugieren que el Ca^{2+} del RE juega un papel relevante en el control de la secreción, son contradictorios (quizá por las diferentes condiciones experimentales) y no aportan dos tipos de información: de un lado, el posible paralelismo entre el curso temporal de la depleción del Ca^{2+} del RE por tapsigargina y la disminución en la secreción y, de otro, el papel del Ca^{2+} del RE en el mantenimiento de las respuestas secretoras evocadas por estímulos despolarizantes repetidos, aplicados a CCB a intervalos regulares durante largos periodos de tiempo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las células cromafines de la médula adrenal almacenan sus catecolaminas en organelas especializadas, las vesículas cromafines (Smith, 1968). Su estimulación con ACh (Douglas y Rubin, 1961b) o concentraciones despolarizantes de K^+ (Douglas y Rubin, 1963) libera las catecolaminas y otros contenidos vesiculares al espacio extracelular mediante un proceso exocitótico dependiente de Ca^{2+} (Douglas, 1968). Éste es un proceso de interacción complejo entre los componentes de la vesícula cromafín y factores citosólicos que culmina con la fusión entre las membranas vesicular y plasmática (Neher, 1998; Sörensen, 2004; García y col., 2006). La exocitosis ha sido explicada mediante modelos de secreción secuencial que asumen el tráfico vesicular entre al menos un RP y un RRP (Heinemann y col., 1993). En la CCB, se sabe que el Ca^{2+} y la actividad PKC regulan el tráfico entre ambas poblaciones vesiculares (Smith 1999). Así, el tamaño de la RRP y la secreción se regulan a través de la dinámica del citoesqueleto de filamentos de actina mediante dos vías dependientes de Ca^{2+} (Trifaró y col., 2000, 2002): 1) escinderina y; 2) PKC-MARKS. La primera vía depende de la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV tras la estimulación con ACh o K^+ y la segunda del Ca^{2+} que se libera del RE.

Hay tres trabajos (Mollard y col., 1995; Pan y Fox, 2000; Cuchillo-Ibáñez y col., 2002) que utilizan un protocolo de dos pasos para estudiar si la depleción total del Ca^{2+} del RE afectaba a la secreción en células cromafines bovinas. Durante el primer paso, las células se incubaban con altas concentraciones de tapsigargina (1-3 μ M) para asegurar la depleción total e irreversible del RE. El segundo paso consistía en la aplicación de unos pocos pulsos despolarizantes y contrastar si la respuesta secretora obtenida difería de aquella registrada a partir de células con su RE intacto. Para estudiar el efecto de la PKC sobre la secreción también se utilizaron protocolos similares a los de la tapsigargina pero empleando PMA o inhibidores de la PKC.

Nosotros decidimos seguir una estrategia diferente; aplicar pulsos despolarizantes de K^+ de corta duración (2 s), a intervalos de 1 min, a la misma población de CCB bañadas en un sistema de perfusión rápido con una solución

de KH a 37°C. Además, en nuestro sistema experimental los tratamientos se añadían una vez empezada la estimulación con K^+ . A diferencia de los protocolos anteriormente mencionados, este nuevo patrón de estimulación permite estudiar, en tiempo real, el curso temporal de las respuestas secretoras durante periodos de estimulación largos y bajo unas condiciones que pueden reproducir mejor las situaciones de estrés prolongado en animales o humanos.

En esta tesis también se plantea un tema secundario de estudio en torno al papel de la ouabaína endógena sobre la secreción. Dicho estudio es relevante si consideramos que la ouabaína endógena se sintetiza en la corteza adrenal (Inagami y Tamura, 1988; Schneider y col., 1998). Por otro lado, se sabe que la ouabaína exógena aumenta tanto la liberación de catecolaminas espontánea (Banks, 1967; Aunis y García, 1981; Török y Powis, 1990; Haass y col., 1997) como la que se desencadena cuando sometemos a las CCB a estímulos despolarizantes de K^+ (de Pascual y García, 2007). Además, hay datos en CCB (Török y Powis, 1990) que sugieren que dicha liberación de catecolaminas en presencia de ouabaína, es una consecuencia de la entrada de Ca^{2+} producida por el aumento en la concentración citosólica de sodio ($[Na^+]_c$). Así, el papel de la ouabaína endógena podría estar relacionado con el control de la exocitosis a través de su efecto modulador sobre algún subtipo de los CCVD.

Con todo lo dicho anteriormente, y valiéndome de técnicas amperométricas para monitorizar la secreción, la sonda fluorescente fluo-4 para medir los cambios en la $[Ca^{2+}]_c$ y la utilización de ecurina dirigida al RE de células cromafines bovinas, los objetivos planteados para el desarrollo de esta tesis han sido:

1. Estudio del papel del RE, a largo plazo (durante 30 min), en el mantenimiento de las respuestas secretoras evocadas por pulsos despolarizantes cortos (2 s) y repetidos a intervalos de 1 min.
2. Estudio de la relación entre el RE y la actividad PKC, a largo plazo, en el marco de la regulación del tráfico vesicular y la secreción en células cromafines bovinas.

3. Estudio de la contribución de los distintos subtipos de CCDV al control de la entrada de Ca^{2+} para disparar el proceso excitotóxico de liberación de catecolaminas, durante la despolarización de células cromafines bovinas superfundidas con ouabaína.

Estos objetivos persiguen someter a crítica la hipótesis de que la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ y la actividad PKC interaccionan de forma sutil para mantener respuestas de secreción de catecolaminas adecuadas en periodos prolongados de estimulación simpática, durante situaciones de estrés de larga duración.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES Y SOLUCIONES

1.1. Extracción y cultivo de células cromafines bovinas de médula adrenal

La extracción de las células cromafines bovinas de médula adrenal se ha llevado a cabo mediante el método estándar (Livett, 1984) con algunas modificaciones (Moro y col., 1990). Las células se han suspendido en DMEM suplementado con suero fetal de ternera al 5%, citosina arabinósido (10 μ M), fluorodeoxiuridina (10 μ M), 50 UI/ml de penicilina, y 50 μ g/ml de estreptomycin. Para medir la liberación de catecolaminas, las células se sembraron en placas de Petri de 5 cm a 5×10^6 células por placa. Para estudiar los cambios en los niveles de Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]$), la siembra de las células se llevó a cabo a una densidad de 2×10^5 células/pocillo, sobre cubreobjetos de 25 mm de diámetro. Para medir los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ con eucorina dirigida a dicho depósito intracelular, se realizó un cultivo diferencial de 10-15 min. A continuación, las células se sembraron a una densidad de 3×10^5 células/pocillo, sobre placas de 4-pocillos de 15 mm de diámetro pretratadas con 0,01mg/ml de poli-lisina. Los experimentos se realizaron de dos a cuatro días después de la siembra (**Fig. 2A**).

1.2. Cultivo de células PC12

La línea celular de feocromocitoma de médula adrenal de rata, PC12, se crece en botellas de plástico Colstar en medio de cultivo DMEM, suplementado con suero bovino fetal al 7,5%, suero de caballo al 7,5%, glutamina 2 mM y antibióticos estreptomycin/penicilina (25 UI/ml y 25 μ g/ml respectivamente). Bajo una atmósfera húmeda con un contenido en CO_2 del 5% y a 37°C, el medio se cambia cada 2 días y los pases celulares se llevan a cabo tres veces a la semana. Para medir la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$, las células se sembraron

sobre cubreobjetos (13 mm de diámetro), tratados con poli-l-lisina y colocados en placas de 24 pocillos.

1.3. Soluciones y reactivos

Para la preparación de todas las soluciones se utilizó **agua** tratada mediante osmosis inversa (Milli-Ro 6 Plus, Millipore) y desionizada en resina de intercambio iónico (Milli-Q Plus, Millipore), con una resistencia de, aproximadamente, $18 \text{ M}\Omega \times \text{cm}^{-1}$.

Para los experimentos realizados para esta tesis (de amperometría, de fluorometría y de fotoluminiscencia) se ha usado una solución extracelular de **Krebs-HEPES (KH)**, en mM: 145 NaCl, 5,5 KCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 11 glucosa. Cada día, al elaborar la solución de KH se ajustó con ayuda de un pHmetro (MicropH 2000, Crison), a un pH de 7,4 con una solución de NaOH 1 N.

Según el protocolo y la condición experimental se han utilizado diferentes concentraciones de **CaCl₂** (indicado en el texto). Como estímulo despolarizante químico se ha utilizado una solución de K⁺ elevado (100 mM), reemplazando 94,5 mmoles de NaCl por KCl, en presencia de 2 mM de Ca²⁺ (**100K⁺/2Ca²⁺**). Para los experimentos realizados con CCB en presencia de ouabaína se dieron pulsos de reintroducción de Ca²⁺ (2 mM; **2Ca²⁺**)

En cuanto a los **reactivos**, el DMEM, el suero fetal bovino, la penicilina y la estreptomina se adquirieron en Gibco (Madrid, España). La taspigargina, el ácido ciclopiazónico (ACP), el éster de forbol 12-miristato-13-acetato (PMA), la queleritrina, la cafeína, la ouabaína, el nifedipino y el FPL 64176 se obtuvieron en Sigma (Madrid, España). El hidroxibutil-hidroquinona (BHQ) se compró en Calbiochem. La celenteracina n y el fluo-4 se obtuvieron en Molecular Probes a través de Invitrogen (Madrid, España). La ω -agatoxina IVA se compró en Peptide Institute (Osaka, Japón) y la ω -conotoxina GVIA se adquirió en Bachem Feinchemikalien (Bubendorf, Suiza). La lana de vidrio

procedía de Panreac (Madrid, España) y las placas de 4 pocillos TC (empleadas para los experimentos de fotoluminiscencia en CCB) se obtuvieron en NUC a través de Lab-Clinic (Madrid, España).

2. TÉCNICAS Y PROTOCOLOS EXPERIMENTALES EMPLEADOS PARA EL DESARROLLO DE ESTA TESIS

2.1. Medida de la liberación de catecolaminas a tiempo real

La medida de la liberación de catecolaminas a tiempo real tras estimular las CCB con una solución despolarizante se ha materializado mediante la **técnica amperométrica** (Green y Perlman, 1981; Herrera y col., 1985; Borges y col., 1986). La amperometría es un método electroquímico que se basa en las propiedades de óxido-reducción (capacidad de ceder o captar electrones respectivamente; **Fig. 7**), que tienen algunas moléculas. Las catecolaminas tienen un potencial redox específico como consecuencia del cual se establece un equilibrio entre las moléculas que se encuentran en estado oxidado (una mitad) y en estado reducido (la otra mitad).

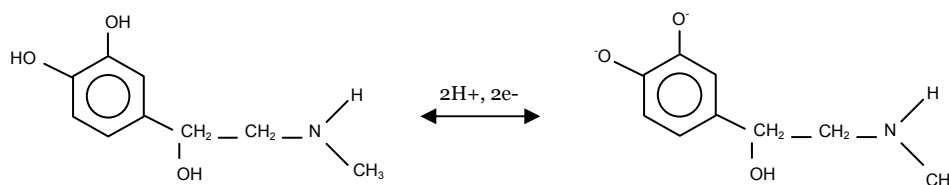


Figura 7: Oxidación de catecolaminas. Esquema que muestra el equilibrio de óxido-reducción de una molécula de adrenalina (nótese que la reacción red-ox acontece en el anillo catecol de la molécula).

Así, para favorecer la oxidación de todas las moléculas secretadas se debe aplicar un voltaje que exceda al potencial redox en al menos +200 mV. La aplicación de un voltaje menor disminuiría drásticamente la velocidad de oxidación y por tanto la detección de señales amperométricas (Bruns y Jahn, 1995).

Aunque dentro de la vesícula cromafin existen otras moléculas oxidables como la encefalina o la somatostatina, dado su contenido en aminoácidos tirosina, triptófano y cisteína (Crespi, 1991), su secreción y grado de difusión es muy escasa y, por lo tanto, también es limitada su detección amperométrica.

Para la realización de los experimentos que se muestran en esta tesis, las CCB se separaron con cuidado de la base de la placa de Petri con una espátula de plástico y se centrifugaron a 800 rpm durante 10 min. A continuación, el sedimento se resuspendió en 200 μ l de KH (en mM: NaCl 144; KCl 5.9; MgCl₂ 1,2; glucosa 11; HEPES 10. pH: 7,4) en ausencia (0Ca²⁺ nominal) o en presencia de una concentración de Ca²⁺ extracelular 2 mM. Las células se introdujeron en una **microcámara**, sobre un lecho de lana de vidrio y se superfundieron con una solución de KH, a una velocidad de 2 ml min⁻¹ con la ayuda de una **bomba peristáltica**, a 37°C. Mediante un sistema de **electroválvulas** de cuatro vías se puede controlar el medio que superfundirá a las células, así como la duración y la frecuencia de su exposición. A continuación, las CCB se estimularon con pulsos cortos (2 s), cada minuto, con una solución de KH con alto K⁺ (100 mM; reduciendo la concentración de Na⁺ para mantener la isotonicidad), en presencia de una concentración extracelular de Ca²⁺ de 2 mM. Para los experimentos con ouabaína, se aplicaron pulsos de 10 s de duración, cada tres minutos, con una solución de KH rica en Ca²⁺ (2 mM)

Bajo estas condiciones, el fluido de superfusión celular que emana de la microcámara alcanza la **cámara de oxidación** de catecolaminas. Para favorecer la oxidación de todas las moléculas secretadas se aplica un voltaje de +650 mV gracias a un sistema de dos electrodos (uno de referencia y otro auxiliar) conectados a un **detector electroquímico**, modelo Metrohm AG CH-9100 Hersau. A continuación, un electrodo de carbono, que confluye en la cámara de oxidación, recoge el producto de la secreción de catecolaminas (2e- por cada molécula oxidada) a tiempo real. Entonces, se produce un flujo de corriente (señal analógica) a su través que es directamente proporcional a la

concentración de catecolaminas oxidadas. Esta señal llega al detector, el cual la amplifica y la convierte en un valor numérico (digitaliza) antes de ser adquirida por un ordenador personal (PC; del inglés “Personal Computer”). El PC, mediante un programa informático desarrollado en lenguaje BASIC (del inglés “Beginners All-purpose Symbolic Instruction Code”; en español ‘código de instrucciones simbólicas para cualquier propósito para principiantes’) permite, tanto, adquirir la señal como controlar la apertura de las válvulas con una frecuencia de muestreo de 2 Hz, o analizar los resultados (ABC en nA x min o amplitud de la espiga secretora en nA) (**Fig. 8**).

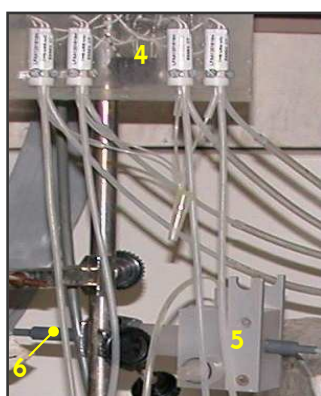
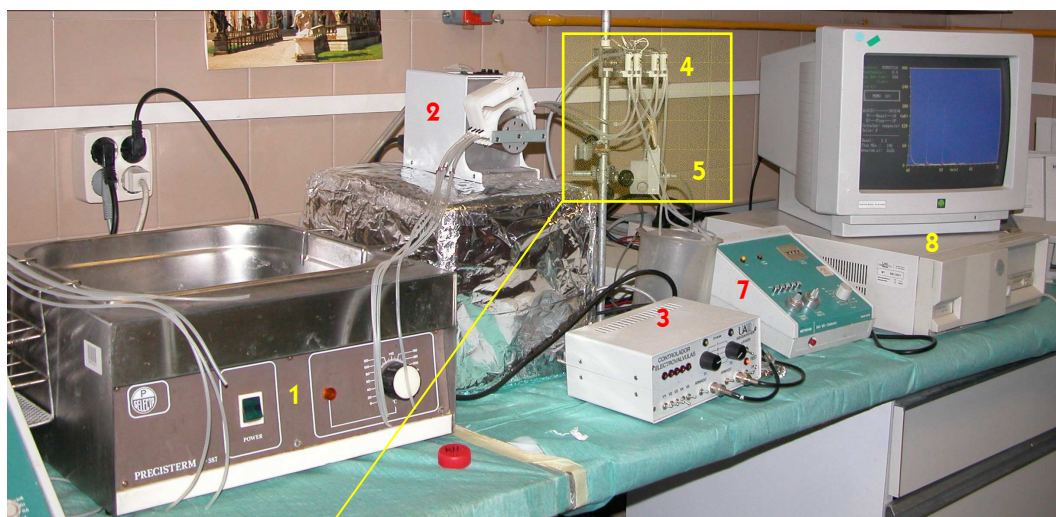


Figura 8: Secreción de catecolaminas en poblaciones de CCB: sistema experimental. Esta figura muestra el dispositivo empleado para la detección de la liberación de catecolaminas a tiempo real. El sistema está formado por los siguientes componentes: 1) Baño termostatzado para mantener las soluciones experimentales a 37 °C; 2) bomba peristáltica 3) controlador de válvulas; 4) sistema de cuatro electroválvulas; 5) cámara de oxidación; 6) electrodo de carbono (EC); 7) detector electroquímico; y 8) PC.

Los experimentos amperométricos que, a modo de ejemplo, se muestran en esta tesis se obtuvieron importando los datos obtenidos en formato ASCII al programa Origin 7.0.

2.2. Medida de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ con ecuorina

La ecuorina (AEQ) es una fotoproteína sensible a Ca^{2+} procedente de la medusa *Aequorea victoria*, que presenta tres dominios de unión a Ca^{2+} (Shimomura, 1986). La apoenzima, con un peso molecular de 21 Kd (Blinks y col., 1976), se une a su grupo prostético, denominado celenteracina, mediante un ataque peroxidativo. Una vez reconstituida en su forma activa, la proteína es capaz de unir Ca^{2+} . Cuando esto ocurre, la celenteracina se oxida a celenteramida liberando energía en forma de un fotón de luz (**Fig. 9**). Cuando se produce el fenómeno de **bioluminiscencia** se emite luz azul (máximo a 470 nm) cuya intensidad es proporcional a la concentración de Ca^{2+} . Tras la oxidación de la celenteracina ésta se libera y, una vez libre, la unión de la AEQ a una nueva molécula de celenteracina es un proceso muy lento que se puede considerar esencialmente irreversible. Por esta razón, la cantidad de proteína disponible disminuye progresivamente a lo largo de cada experimento, de tal manera, que la velocidad relativa de consumo es proporcional a la concentración de Ca^{2+} .

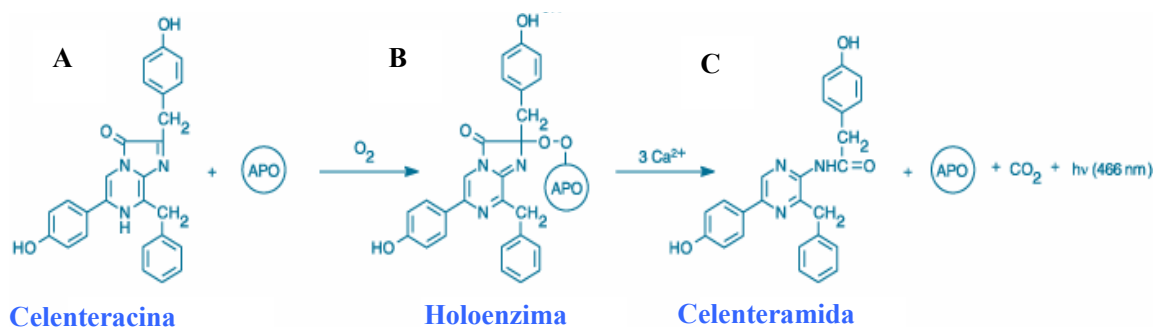


Figura 9: Reacción de fotoluminiscencia. Esquema que ilustra como la AEQ (apoenzima: APO) se une covalentemente a su grupo prostético, la celenteracina (A). Cuando esto ocurre se genera la forma catalíticamente activa (holoenzima) que es capaz de unir Ca^{2+} (B). Entonces, la celenteracina se oxida a celenteramida que se libera de la APO, emitiéndose así un fotón de luz (C).

La AEQ nativa, purificada y microinyectada en poblaciones celulares, se ha utilizado durante décadas como indicador de la concentración de Ca^{2+} citosólica (Blinks y col., 1978; Ridgway y Ashley, 1967; Ridgway y col., 1977).

La clonación del ADNc que codifica para la AEQ ha hecho posible, tanto la sustitución del tedioso proceso de microinyección por el de transfección, como la inserción de secuencias diana que permiten dirigir la AEQ selectivamente al interior mitocondrial (Rizzuto y col., 1992), al núcleo (Brini y col., 1993) y al RE (Montero y col., 1995).

La AEQ nativa es capaz de ver concentraciones de Ca^{2+} en el rango comprendido entre 0,1 y 10 μM (Blinks y col., 1978). Sin embargo, para poder medir incrementos de Ca^{2+} mayores, como es de esperar en compartimentos intracelulares como la mitocondria o el RE, es necesario reducir la afinidad de la AEQ por el Ca^{2+} en, al menos, dos órdenes de magnitud. Para conseguir este fin, se han empleado dos estrategias: 1) la utilización de una AEQ mutada (**mutAEQ**) de baja afinidad por el Ca^{2+} , en la que se sustituye el aspártico en posición 119, del segundo dominio de unión a Ca^{2+} de la proteína, por una alanina y 2) el empleo de un derivado sintético de la celenteracina nativa o **celenteracina n** que se une covalentemente a la AEQ y reduce la velocidad de emisión de luminiscencia (Shimomura y col., 1993). Así, la mutAEQ es capaz de ampliar el rango de medida de la concentración de Ca^{2+} hasta 100 μM (Montero y col., 1995) y junto a la celenteracina n hasta el rango de mM (Álvarez y Montero, 2002).

En 2002, Álvarez y Montero propusieron un método para la transformación de los datos de luminiscencia en valores de $[\text{Ca}^{2+}]$. Este método, que deriva de un modelo matemático propuesto por Allen y col., en 1977, expresa la $[\text{Ca}^{2+}]$ en términos de la razón L/L_{TOTAL} según el algoritmo (Brini y col., 1995):

$$[\text{Ca}^{2+}] (\text{M}) = [(L/L_{\text{TOTAL}}\lambda)^{1/n} + (L/L_{\text{TOTAL}}\lambda)^{1/n} K_{\text{TR}} - 1] / [K_{\text{R}} - (L/L_{\text{TOTAL}}\lambda)^{1/n} K_{\text{R}}]$$

La razón L/L_{TOTAL} consiste en el número de cuentas por segundo (cps) registradas en un determinado instante del experimento (L) entre las cps que se registrarían si se expusiera la AEQ total a una $[\text{Ca}^{2+}]$ saturante (L_{TOTAL}). Como

la AEQ se consume paulatinamente a lo largo del experimento la L_{TOTAL} no es constante. Por lo tanto, para obtener el valor de L_{TOTAL} utilizado para calcular la $[Ca^{2+}]$ en cada instante, hay que substrair la luminiscencia acumulada hasta un punto determinado de la luminiscencia total (cuentas totales).

Según este modelo, cada uno de los dominios de unión a Ca^{2+} de la AEQ presenta dos posibles estados, T y R. El Ca^{2+} sólo se une al estado R y, por lo tanto, desplaza el equilibrio a favor de dicho estado y la luminiscencia sólo se emite cuando todos los sitios están en estado R. Así, “n” es el número de sitios de unión a Ca^{2+} que nos da una idea de la **afinidad** (Tabla 2: n ~ 3 para la AEQ y la celenteracina nativas a 20 °C; n ~ 1,3 para la mutAEQ y la celenteracina n a 20 °C), “ K_{TR} ” es la proporción de sitios en estado T frente a los sitios en estado R y “ K_R ” es la constante de asociación a Ca^{2+} que nos da una idea de la **capacidad**.

La constante de velocidad de consumo de la AEQ en presencia de una $[Ca^{2+}]$ saturante (λ) varía (al igual que n, K_{TR} y K_R), en función de si la AEQ es nativa o mutada, del tipo de celenteracina y de la temperatura (Allen y Blinks, 1978).

AEQ	Celenteracina	Temperatura	K_R	K_{TR}	λ	n
Nativa	Nativa	20	$7,23 \cdot 10^6$	120	1	2,99
Nativa	Nativa	37	$4,81 \cdot 10^7$	601	1	2,3
Nativa	n	20	$2,18 \cdot 10^6$	85	0,0457	2,4205
Nativa	n	37	$2,23 \cdot 10^7$	348	0,129	2
Mutada	Nativa	20	$1,61 \cdot 10^7$	22008	1	1,43
Mutada	Nativa	37	-	-	-	-
Mutada	n	20	$5 \cdot 10^7$	159700	0,02512	1,27
Mutada	n	37	$8,47 \cdot 10^6$	165600	0,138	1,2038

Tabla 2. Constantes AEQ: constante de asociación al Ca^{2+} (K_R); proporción de sitios en estado T frente a los sitios en estado R (K_{TR}); constante de la velocidad de consumo de AEQ en presencia de una $[Ca^{2+}]$ saturante (λ); número de sitios de unión al Ca^{2+} (n). Nótese que los experimentos de esta tesis se realizaron con mutAEQ y celenteracina n a 25 °C.

2.2.1. Medida de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ con ecuorina dirigida al RE en poblaciones de células cromafines bovinas

La construcción, empaquetamiento y titulación del vector amplicón pHSVerGFP-AEQ, su expresión y la medición de fotoluminiscencia con ecuorina, en poblaciones de células cromafines bovinas, se ha llevado a cabo como se describe en Alonso y col. (1998). Una hora antes de la infección, se cambia el medio parcialmente y se sustituye por otro fresco. Las células sembradas, a una densidad de 3×10^5 , son infectadas con unas $1-5 \times 10^4$ partículas víricas infecciosas (a una proporción de 15 μ l de solución vírica/0,5 ml de medio) que codifican para la AEQ dirigida al RE. Los experimentos se realizaron entre las 12 y las 24 h siguientes a la infección. El porcentaje de CCB que expresaron la AEQ dirigida al RE en estos experimentos es de un 15%. Una hora antes de la depleción se vuelve a cambiar el medio parcialmente y se sustituye por otro fresco. La depleción del depósito de Ca^{2+} del RE se lleva a cabo con el inhibidor reversible de la SERCA, hidroxibutilhidroquinona (BHQ; 10 μ M), durante 10 min a 37°C en una solución de KH suplementada con 3 mM de EGTA. A continuación, se reconstituyen las células con celenteracina n 1 μ M en una solución de KH suplementada con BHQ 10 μ M y EGTA 0,5 μ M, a temperatura ambiente y durante 1 h. El cubreobjetos con las células reconstituidas se coloca directamente sobre el luminómetro termostatzado. A continuación, las células se superfunden a una velocidad de 2 ml min^{-1} , a 25°C, durante 5 min, con una solución de KH en 0Ca²⁺ suplementada con EGTA 0,5 mM para lavar el BHQ y registrar la basal. Entonces, se superfunde con medio estándar enriquecido con Ca^{2+} (1 mM) para rellenar el RE. El número total de cuentas obtenidas a partir de estos experimentos está entre 0,6 y 9 millones.

2.2.2. Medida de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ con ecurina dirigida al RE en células PC12

La realización de estos experimentos ha supuesto la puesta a punto de la técnica y de los protocolos de transfección y reconstitución para la medición de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ con ecurina dirigida al RE en nuestro laboratorio (bajo la dirección y supervisión de la Dra. Cano-Abad). Los experimentos de fotoluminiscencia con ecurina se han llevado a cabo, básicamente, según el protocolo descrito por Alonso y col. (1999). 1 h antes de la transfección se sustituye el medio de cultivo por otro fresco. La **transfección** ha sido realizada utilizando Metafectene (Biontex, Munich, Alemania) según la siguiente proporción: 1,5 μ g de ADNc codificante para ecurina reticular (er-AEQ) por cada 6 μ l de reactivo. Los experimentos se realizaron 48 h más tarde. Las células que expresaban er-AEQ se reconstituyeron durante 1,5 h, a 4 °C, con un solución KH (composición en mM: NaCl, 144; KCl, 5,9; MgCl₂, 1,2; HEPES, 10; glucosa, 11), suplementada con 0,6 mM EGTA, ionomicina 5 μ M, y celenteracina n 5 μ M. A continuación, el cubreobjetos se coloca sobre la cámara de perfusión (**Fig. 10**) del luminómetro termostatzado (**Fig. 11**) y se superfunde con medio rico en Ca²⁺ (1 mM) para rellenar el Ca²⁺ del RE. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. El número de cuentas totales obtenidas se encuentra en el rango entre 0,2 y 1,5 millones.

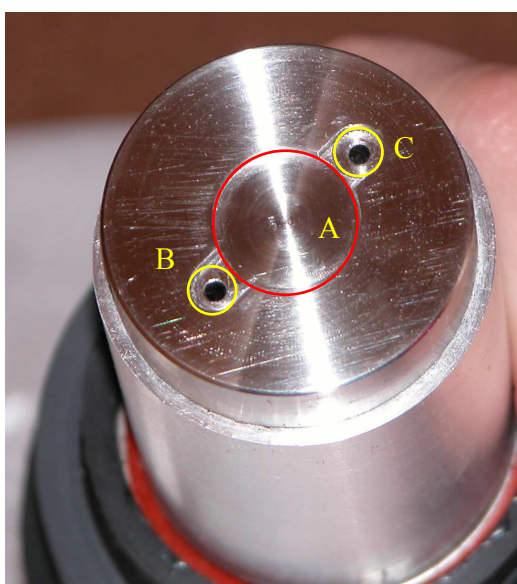


Figura 10: Cámara de perfusión del luminómetro: sistema experimental. Esta figura muestra la cámara de perfusión sobre la cual se coloca el cubreobjetos (A) con las células que expresan la er-AEQ, reconstituidas con celenteracina n para la medida de la $[Ca^{2+}]_{RE}$. La solución experimental entra por el orificio de la izquierda (B) para bañar las células y sale por el orificio de la derecha (C).



Figura 11: Medida de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ con er-AEO: sistema experimental. Esta figura muestra el luminómetro empleado para la detección de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ en células PC12. El sistema está formado por los siguientes componentes, de abajo a arriba: 1) cámara de perfusión; 2) fotomultiplicador o fototubo que recoge y amplifica la señal de luz; y 3) fuente de alimentación.

2.3. Medida de la $[Ca^{2+}]_c$ con la sonda fluo-4 AM

En el año 2000, Gee y sus colaboradores desarrollaron una nueva sonda fluorescente sensible al Ca^{2+} , capaz de cuantificar la $[Ca^{2+}]_c$ en el rango entre

0,1 y 1 μM denominada **fluo-4**. Este rango de $[\text{Ca}^{2+}]_c$, que abarca desde el estado de reposo a niveles capaces de desencadenar la exocitosis tras someter a la célula cromafín a un estímulo adecuado, convierte a la sonda fluo-4 en una herramienta muy valiosa para el desarrollo del estudio que nos ocupa. Además de tener una estructura y propiedades espectrales muy similares a la sonda fluo-3 (también fluorescente e indicadora de Ca^{2+}), la sonda fluo-4 presenta algunas mejoras sobre la anterior (Thomas y col., 2000) ya que gracias a su mayor espectro de absorción (cerca de 488 nm) ofrece una emisión de fluorescencia más intensa, lo que permite su uso a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ más bajas y convierte su uso en una práctica menos invasiva; dado que su constante de disociación (K_d) para el Ca^{2+} es de 345 nM, amplía su rango de detección de Ca^{2+} y permea la célula con mayor facilidad.

El **fluoróforo** fluo-4 es capaz de excitarse cuando recibe luz con una longitud de onda (λ) de 485 nm. La interacción del fotón con el fluoróforo hace que uno de sus electrones salte de su nivel basal a otro de mayor energía. Cuando dicho electrón vuelve a su nivel original libera energía en forma de luz con una λ característica.

En este trabajo se ha empleado la **forma esterificada** de la molécula de fluo-4 (éster acetoximetilo; fluo-4 AM) que se caracteriza por ser hidrofóbica (lo que le permite atravesar la MbP con facilidad) e insensible a iones. Una vez en el citosol, los enlaces éster son hidrolizados por esterasas intracelulares ubicuas, liberándose la forma polianiónica del fluoróforo, ya sensible a iones, que quedará atrapada en el interior celular. No obstante, este tipo de sonda presenta algunos inconvenientes como: 1) la posible hidrólisis incompleta de la forma esterificada, lo que puede distorsionar las estimaciones sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ya que, en el interior de la célula, queda parte de la sonda igualmente fluorescente pero insensible al Ca^{2+} y; 2) la compartimentalización de la sonda en organelas intracelulares lo que se hace más factible a medida que aumenta la temperatura haciendo difícil realizar experimentos a 37°C.

2.3.1. Medida de la $[Ca^{2+}]_c$ en célula cromafín bovina aislada

Para la realización de estos experimentos, hay que cargar las células cromafines bovinas con la sonda fluorescente fluo-4 AM (5 μ M) durante 45 min a 37 °C en una solución de KH (composición en mM: NaCl, 144; KCl, 5,9; MgCl₂, 1,2; CaCl₂, 2; HEPES, 10; glucosa, 11). Después, las células se lavan dos veces con una solución de KH, a temperatura ambiente y durante un total de 30 min para eliminar los restos de sonda no captados por las células y para garantizar la completa desesterificación de la sonda que sí ha sido captada.

Los cubreobjetos con las células ya cargadas se colocan sobre una cámara de metacrilato situada, a su vez, sobre un microscopio de fluorescencia invertido modelo Nikon eclipse TE300. A continuación, se seleccionan unas cuantas células del campo que se encuentra justo por debajo de la pipeta de perfusión y se activa la salida de la solución de KH. El sistema de perfusión por gravedad regulado mediante un sistema de válvulas excluyentes controlado manualmente, se acopla a una pipeta de perfusión común con vías lentas para evitar los desplazamientos que las vías rápidas provocan sobre las células cuando se hacen experimentos de largos periodos de duración, como es nuestro caso.

La fuente de iluminación del sistema es una lámpara de Xenon de 75 W (Cairn Reasearch, Faversham, UK) conectada al microscopio mediante una fibra óptica de **cuarzo**. La longitud de onda (λ) de excitación es de 485 nm. La luz emitida se transmite a través de un cristal dicróico de 505 nm y de un filtro de emisión de 520 nm. La señal de fluorescencia se adquiere a través un objetivo conectado a una cámara digital con tecnología CCD (del inglés “*charged coupled device*”) de 12 bits de resolución (Hamamatsu Orca-AG, Hamamatsu Photonics Inc, Japón). El control del sistema de filtros, la adquisición y procesamiento de imágenes y el análisis de los datos se realizó con ayuda del programa (“*software*”) **MetaFluor v 6.3** (Molecular Devices, Union City, CA, USA).

3. ESTADÍSTICA

Los resultados están expresados como media \pm error estándar de la media (EEM) del número de experimentos indicado en cada protocolo. Las diferencias estadísticas entre dos medias de resultados o dos curvas experimentales distintas han sido estimadas mediante la prueba t de Student o el análisis ANOVA, respectivamente. Como límite de significación se ha utilizado el valor de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. EL PAPEL DEL RE EN LA REGULACIÓN DE LA EXOCITOSIS EN CCB: PRIMER OBJETIVO

1.1 Curso temporal de las respuestas secretoras de catecolaminas inducidas por pulsos repetidos de $100K^+$ aplicados a células cromafines bovinas en un sistema de perfusión rápido

La utilización de un protocolo con pulsos pareados para medir exocitosis en forma de incrementos de capacidad de membrana (ΔC_m) permitió a Dinkelacker y col. (2000) sugerir que, después de la depleción por un pulso despolarizante, el rellenado de la población de vesículas atracadas, en la célula cromafín bovina, tardaba alrededor de 30 s.

Por otro lado, nuestro laboratorio posee una larga y afianzada experiencia en el estudio de la cinética de las espigas de catecolaminas liberadas como respuesta a varios estímulos aplicados a poblaciones de células cromafines bovinas, registrando la secreción a tiempo real mediante técnicas amperométricas, en un sistema de perfusión rápido; al emplear un sistema de perfusión rápido (2ml/s), se asegura el lavado entre pulsos de las catecolaminas liberadas. En estudios previos, se ha podido observar que, con pulsos despolarizantes aplicados con soluciones salinas que contienen concentraciones crecientes de K^+ , durante 1-5 s, las espigas secretoras volvían a alcanzar la línea basal de secreción en unos 30-40 s (Cuchillo-Ibáñez y col., 2002). Esto sugería que la estimulación con pulsos repetidos, con una solución de KH con un alto contenido en K^+ , podía dar lugar a respuestas secretoras reproducibles. Además, pulsos cortos de ACh o K^+ , dados a intervalos de 2 min, evocan respuestas secretoras saludables pero intermitentes que se mantienen durante periodos de estimulación largos (Michelena y col., 1997). Estos resultados justifican la elección de intervalos de 1 min de duración entre pulsos repetidos de K^+ , en el presente trabajo. La idea era que la respuesta secretora decayera poco a lo largo de media hora de estimulación de las células controles, para así poder estudiar, de forma comparativa, la variación

del curso temporal de esas respuestas en células sometidas a los distintos tratamientos que se describirán más adelante.

Desde el primer momento, ha sido propósito del presente estudio analizar el curso temporal del área bajo la curva (ABC) de las espigas secretoras, evocadas por pulsos repetidos de K^+ durante un periodo de tiempo prolongado (alrededor de 30 min). Después de la realización de unos cuantos experimentos, quedó claro que la decisión de estimular poblaciones de células cromafines bovinas con pulsos repetidos de 2 s, a intervalos de 1 min, con una solución de KH con un alto contenido en K^+ (100 mM de K^+ o $100K^+$) era adecuada para obtener espigas secretoras reproducibles. La razón por la que se utilizó una concentración tan alta de K^+ fue para alcanzar una despolarización máxima de las células cromafines (Kidokoro y col., 1992) cambiando su potencial de membrana de -65 a 0 mV (Orozco y col., 2006), con la consiguiente apertura total de los CCDV y la entrada masiva de Ca^{2+} (la solución de $100K^+$ contiene una concentración de 2 mM de Ca^{2+}), en un tiempo lo más breve posible (2 s). El objetivo no era otro que liberar, en un momento dado, todas las vesículas secretoras maduras ya atracadas a la membrana y preparadas para sufrir exocitosis, es decir, las vesículas de las dos poblaciones; SRP y RRP de liberación lenta y rápida respectivamente (von Rüden and Neher, 1993; Neher 1998). Así, bajo estas condiciones de estimulación ya observamos en un trabajo previo (de Pascual y García, 2007) que las respuestas secretoras de catecolaminas (amplitud de la espiga) decaían en un 20% durante la primera media hora de estimulación intermitente con K^+ y hasta un 40% durante el segundo periodo de 30 min de estimulación. Además, en el trabajo que nos ocupa, los experimentos de secreción se realizaron a 37°C, lo que ligado a la utilización de un sistema de perfusión rápido imita mejor las condiciones fisiológicas de las células cromafines ubicadas en la médula adrenal (Dinkelacker y col., 2000), en donde las células están sometidas a un alto nivel de perfusión sanguínea para asegurar la

incorporación de las catecolaminas a la circulación durante las situaciones de estrés (García y col., 2006).

Tras cargar las células en la microcámara, se superfunden con una solución basal de KH que contiene 2 mM de Ca^{2+} , durante unos 10 min, hasta que se alcanza una línea basal de liberación de catecolaminas estable de unos 10-15 nA. Cuando esto ocurre se inicia el disparo de pulsos de K^+ ($100\text{K}^+/2\text{Ca}^{2+}$) de 2 s de duración, aplicados a intervalos de 1 min. En la **Fig. 12A**, se muestra un experimento control prototipo en el que el primer pulso alcanza una amplitud de 90 nA, luego llega hasta 245 y 310 nA en el cuarto pulso. Dicho nivel de secreción se mantiene varios minutos hasta el pulso de K^+ número 24, a partir del cual las respuestas secretoras empiezan a decaer durante los últimos minutos del experimento. Nótese que las amplitudes de las espigas se alternan entre unas más o menos altas pero en general, las respuestas son bastante reproducibles dentro de un mismo experimento.

En la **Fig. 12B** se representa el curso temporal de la secreción total de catecolaminas (ABC de la espiga por pulso de $100\text{K}^+/2\text{Ca}^{2+}$, en μC) de un promedio de 91 experimentos realizados con el mismo protocolo que se explica en la Fig. 12A, con células obtenidas a partir de unos 40 cultivos diferentes. Nótese el aumento inicial de las respuestas y cómo al final del experimento decaen de forma estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$). En la **Fig. 12C** se muestra el promedio de las respuestas secretoras normalizadas como el % del ABC de la espiga inicial. Véase que la secreción normalizada en el último pulso ha decaído hasta un 22% con respecto a la respuesta inicial y hasta un 33% con respecto al cuarto pulso de $100\text{K}^+/2\text{Ca}^{2+}$ (ver más abajo). Nuevamente, las diferencias estadísticas de los últimos pulsos son significativas con respecto a las respuestas iniciales.

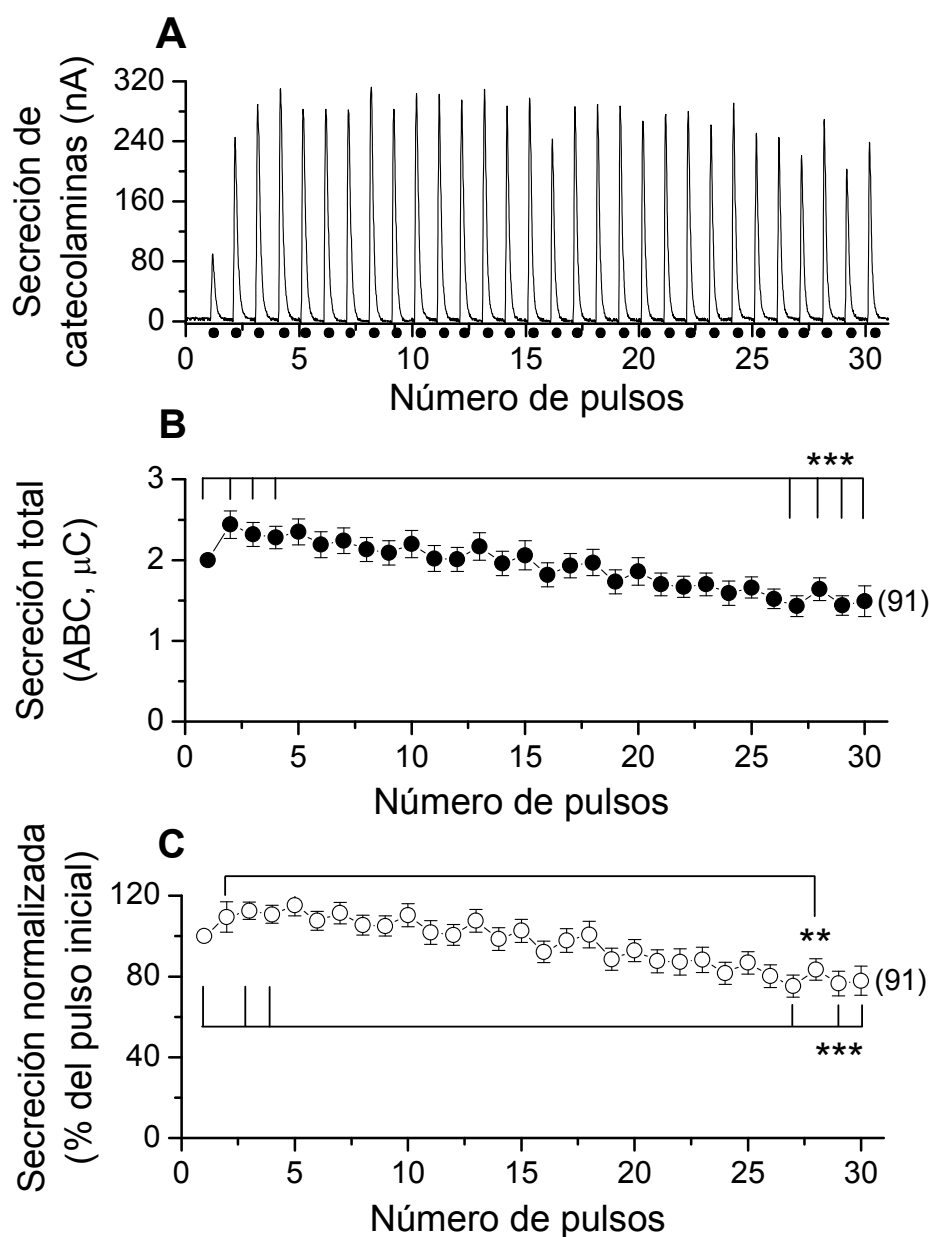


Figura 12: Las respuestas secretoras de catecolaminas se mantienen durante periodos de estimulación largos con K^+ pero sufren una caída gradual durante los últimos pulsos. El panel A muestra un registro típico de las espigas secretoras que resultan de la oxidación de catecolaminas en nA (ordenada) registradas a tiempo real con un detector amperométrico. Tras un periodo de superfusión inicial de unos 10 min, necesario para equilibrar la tasa de secreción basal, con una solución de KH que contiene 2 mM de Ca^{2+} (siempre a 37°C , a lo largo del experimento), las células cromafines bovinas (5 millones) se estimularon a intervalos de 1 min, con pulsos de 100K^+ (en una solución de KH con una reducción isoosmótica de Na^+ y 2 mM de Ca^{2+} : $100\text{K}^+/2\text{Ca}^{2+}$; abscisa) de 2 s de duración, a lo largo de un periodo de 30 min. Los puntos negros pintados en la base de cada espiga secretora se corresponden con cada pulso de 100K^+ . El panel B representa el promedio de la secreción total de catecolaminas expresada como el ABC de cada espiga (en μC , ordenada) durante la aplicación de 30 pulsos de $100\text{K}^+/2\text{Ca}^{2+}$ (abscisa). El panel C muestra las respuestas secretoras promedio normalizadas como el % del pulso inicial de $100\text{K}^+/2\text{Ca}^{2+}$. A dicho pulso inicial se le asignó el 100%. En los paneles B y C los resultados son promedios \pm e. s. de 91 experimentos realizados con el protocolo de la Fig. 12A y con células de unos 40 cultivos diferentes.

En la **Fig. 13A** se muestra otro experimento control prototipo que siempre se realizará en paralelo a experimentos en los que se somete a la población de células cromafines bovinas a un tratamiento determinado. En este caso, el primer pulso de K^+ dio lugar a una espiga de secreción con unos 400 nA de amplitud. Al igual que en el experimento de la Fig. 12A, el nivel de secreción inicial aumentó (hasta los 500 nA en el cuarto pulso), después se mantuvo bastante estable, aunque sufriendo pequeños cambios y finalmente, después de 30 min de experimento (30 pulsos), la amplitud de las espigas se igualó con aquellas de las respuestas iniciales.

La **Fig. 13B** muestra el esquema de representación que, a partir de ahora, se generalizará para el resto de los experimentos de secreción. Como en la Fig. 12C, se representa el curso temporal (en minutos) del promedio de 91 experimentos control, de las respuestas secretoras normalizadas (ABC) pero en este caso, con respecto al cuarto pulso de $100K^+/2Ca^{2+}$. Nótese que no se representan los primeros tres pulsos de K^+ y por lo tanto, el aumento inicial de la secreción, y que la secreción normalizada decae hasta un 31% al final del experimento.

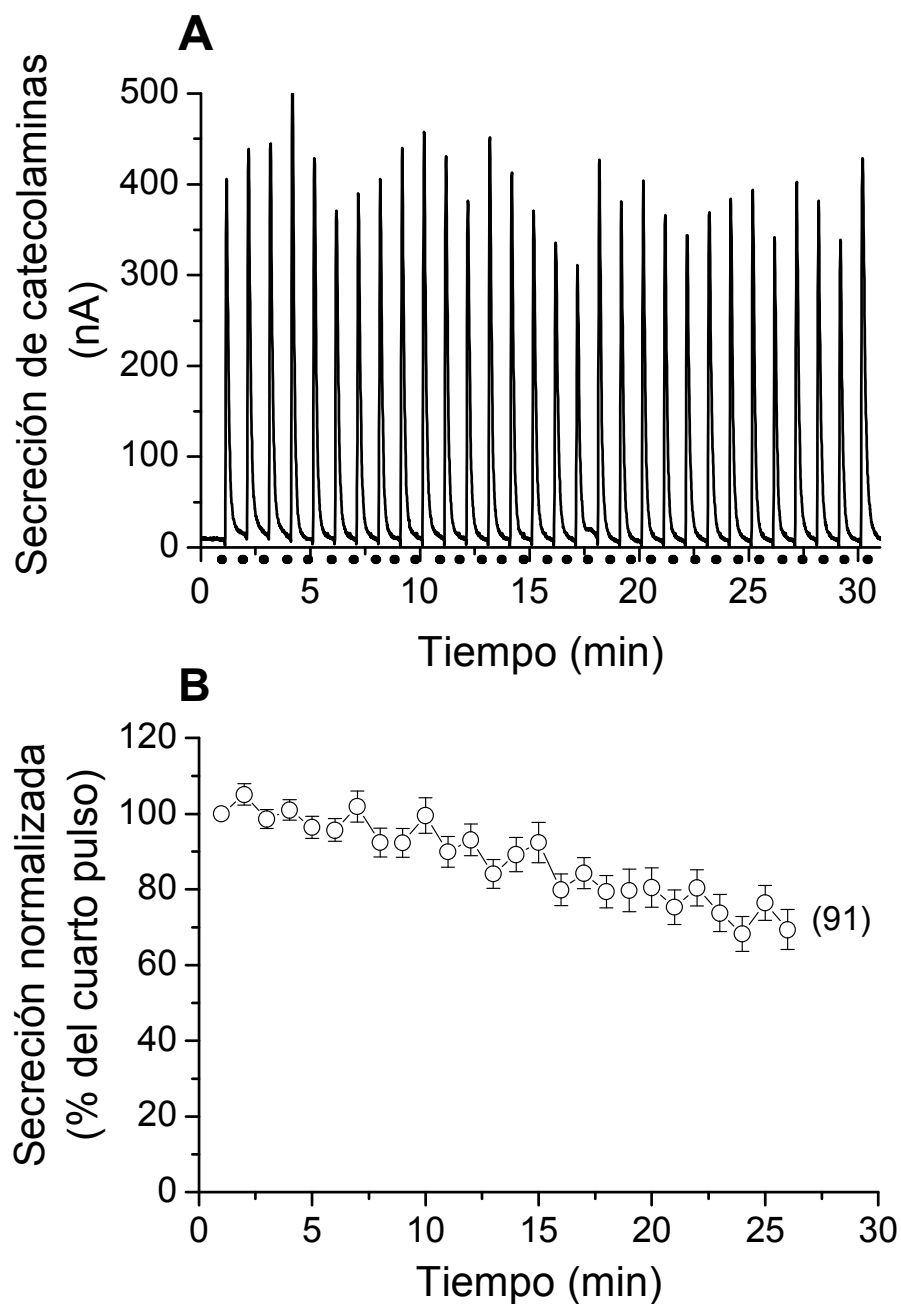


Figura 13: Curso temporal de la respuesta secretora de liberación de catecolaminas evocada por pulsos secuenciales de $100K^+$, dados a células cromafines bovinas en un sistema de superfusión rápido.

El panel A muestra un experimento prototipo de secreción realizado con el mismo protocolo de la Fig. 12A (ver leyenda). El panel B representa la secreción promedio normalizada (ABC) como el % del cuarto pulso de K^+ (ordenada) con respecto al tiempo (min; abscisa). Nótese que los tres primeros pulsos de K^+ no están representados ya que nos sirvieron para asegurarnos una respuesta secretora estable antes de aplicar un tratamiento farmacológico dado (ver Fig. 14-16 y 22-23). Los resultados son promedios \pm e. s. de 91 experimentos realizados con células de unos 40 cultivos diferentes.

1.2. Efecto de los inhibidores de la SERCA: tapsigargina, ACP y BHQ sobre el curso temporal a largo plazo de la liberación de catecolaminas inducida por pulsos repetidos de 100K⁺

Como ya se ha dicho, las respuestas secretoras evocadas por 100K⁺ se mantienen inicialmente y después sufren una caída espontánea paulatina (de un 25-30% tras aplicar 30 pulsos de K⁺). Dicha caída no se debió a la depleción del depósito de catecolaminas de la célula ya que usando el mismo protocolo, las CCB tratadas con ouabaína respondieron con respuestas secretoras crecientes que no disminuyeron ni tras 1 h de estimulación (de Pascual y García, 2007). Por lo tanto, este protocolo parecía adecuado para estudiar los efectos de los inhibidores de la SERCA sobre el curso temporal de las respuestas secretoras evocadas por pulsos de 100K⁺ aplicados durante un periodo de 30 min.

Así, en esta serie de experimentos se utiliza un protocolo similar al que se muestra en las Fig. 12 y 13A y se han realizado experimentos control, en paralelo, con otros en los que las CCB eran superfundidas con una solución de KH en presencia de un inhibidor de la SERCA, aplicado de forma continuada a partir del quinto pulso de K⁺. En la **Fig. 14A** se representan las respuestas secretoras normalizadas de células control y células tratadas con el inhibidor irreversible de la SERCA tapsigargina (0,1 μM; Kijima y col., 1991; Lytton y col., 1991) como en la Fig. 13B. Nótese que el primer pulso de 100K⁺ aplicado a las células nada más iniciar el tratamiento con tapsigargina (flecha ascendente) produce una respuesta secretora similar en condiciones control. Sin embargo, a partir del tercer pulso las respuestas empiezan a decaer separándose progresivamente de la curva control, primero lentamente y más tarde (a partir del minuto 10) siguiendo un ritmo más rápido para alcanzar un 32% de la respuesta inicial al final del experimento (ANOVA: $p < 0,05$).

Como la tapsigargina es un inhibidor irreversible de la SERCA, pareció conveniente probar dos inhibidores reversibles; a saber el ACP (10 μM) y el BHQ (10 μM). La **Fig. 14B** muestra cómo el ACP, que también causa la

depleción del Ca^{2+} del RE en la célula cromafín bovina (Demaurex y col., 1992; Novalbos y col., 1999), inicialmente produce respuestas secretoras similares en células control y en células tratadas con ACP. Sin embargo, tras dicho retraso el ABC de las respuestas decayó más rápidamente en células tratadas con ACP que en células control (ANOVA: $p < 0,05$). Como el ACP es un inhibidor reversible de la SERCA, se decidió lavarlo a partir del minuto 28 (flecha descendente), produciéndose, como se esperaba, una recuperación de la respuesta secretora ya que al lavar el ACP, la SERCA se reactiva y el depósito de Ca^{2+} del retículo vuelve a llenarse (Novalbos y col., 1999). Así, el curso temporal de ambas curvas, control y superfundida con ACP, se encuentran de nuevo al final del experimento. Finalmente, la células se perfundieron con BHQ (10 μM), otro inhibidor reversible de la SERCA (Moore y col., 1987), que se comportó de manera similar al ACP (**Fig. 14C**). Curiosamente, el BHQ fue el único inhibidor de la SERCA empleado que produjo un aumento de la secreción (en un 25%) apenas 1 min después de su introducción. Después, las células tratadas con BHQ se comportaron de una forma similar a las células control. Sin embargo, a partir del minuto 10 las respuestas secretoras en presencia de BHQ decaen de forma significativamente más rápida hasta alcanzar, tan solo, un 20% de la secreción inicial normalizada en el minuto 27 (ANOVA: $p < 0.05$). En dicho instante, se lavó el BHQ (flecha descendente) y la respuesta secretora se recuperó paulatinamente hasta encontrarse con la curva control.

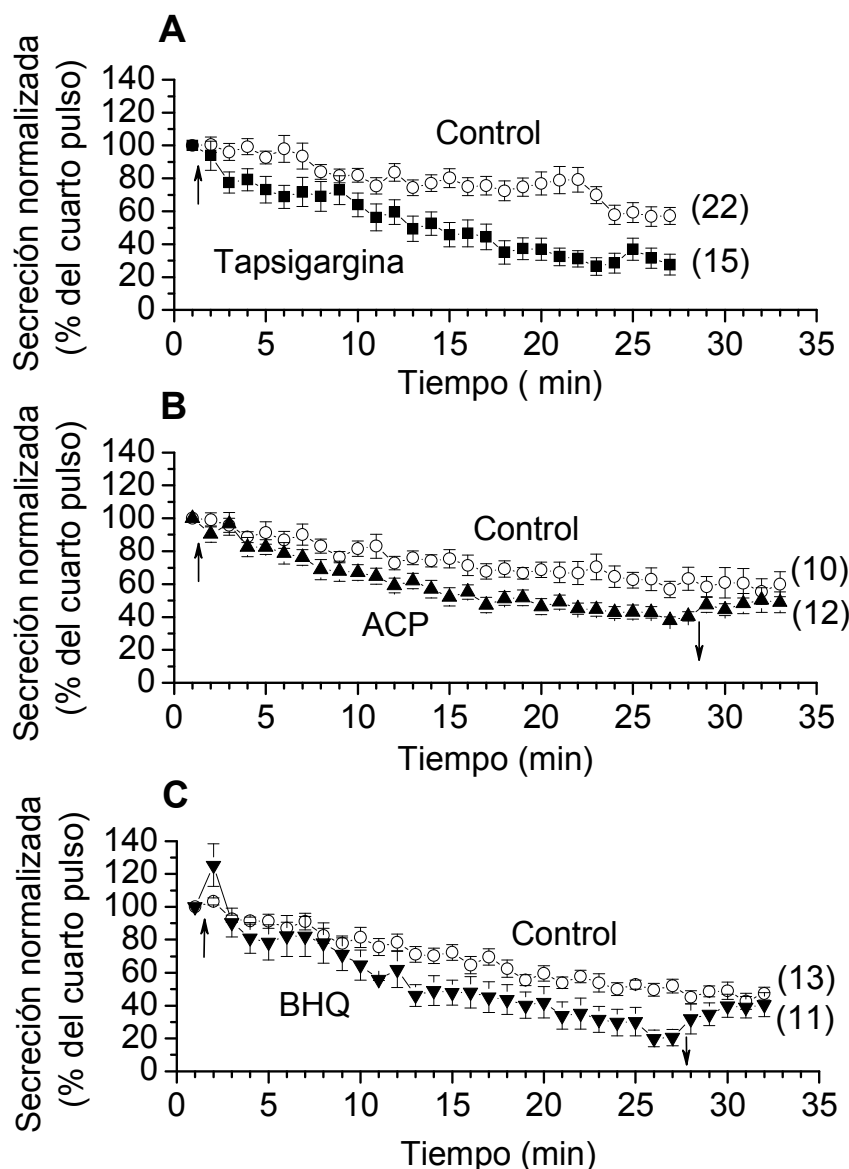


Figura 14: Curso temporal de la respuesta secretora de liberación de catecolaminas evocada por pulsos de $100K^+$ secuenciales en células control y en células expuestas a tapsigargina, ácido ciclopiazónico (ACP) o hidroxibutil-hidroquinona (BHQ). Estos experimentos se hicieron con el protocolo de la Fig. 12A. Las células se estimularon con pulsos de $100K^+$ durante 2 s a intervalos de 1 min (en presencia de 2 mM de Ca^{2+} y a $37^\circ C$). Cada día se hicieron en paralelo experimentos con dos poblaciones de células del mismo cultivo; una población se utilizó como control (células no tratadas) y otra se superfundió con 0,1 μM de tapsigargina (panel A), con 10 μM de ACP (panel B), o con 10 μM de BHQ (panel C). En cada experimento individual, la secreción total (el ABC de la espiga: en nA x s) obtenida en el cuarto pulso de $100K^+$ se normalizó al 100%. Los tratamientos se introdujeron entre los pulsos 4 y 5 (flecha ascendente); véase que los tres primeros pulsos no están incluidos en la gráfica. Así, la secreción obtenida después del cuarto pulso se expresó como el % del cuarto pulso (ordenada) con respecto al tiempo en minutos (abscisa). Como el ACP y el BHQ son inhibidores reversibles de la SERCA, paneles B y C respectivamente, se lavaron dichos tratamientos a partir de los pulsos de $100K^+$ 28 y 27 respectivamente (flecha descendente). Los resultados son promedios \pm e. s. del número de experimentos escritos entre paréntesis en cada gráfica. En los tres casos, un ANOVA refleja que las curvas, control y tratamiento, se separan de forma estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$).

1.3. Efecto de la concentración de Ca^{2+} extracelular y de la temperatura sobre el curso temporal de las respuestas secretoras de catecolaminas inducidas por pulsos repetidos de $100K^+$ en presencia de tapsigargina

Ya en un trabajo previo, el grupo se había planteado la pregunta de si la depleción del Ca^{2+} del RE en presencia ($2\text{ mM } Ca^{2+}$) o ausencia de Ca^{2+} ($0Ca^{2+}$ nominal) extracelular deprimía la respuesta secretora evocada bien por ACh o bien por K^+ . De cualquier manera, en ese trabajo las células se preincubaron durante 1 h en una solución con la mezcla cafeína (10 mM), rianodina (10 μM) y tapsigargina (1 μM) para conseguir una depleción drástica del Ca^{2+} del RE, antes de estimular las células con los secretagogos. Además, en esos experimentos, sólo se aplicaron 5 estímulos de ACh o de K^+ de duraciones crecientes (1-5 s) de tal manera que no pudo estudiarse, desde el inicio del tratamiento farmacológico, el curso temporal de la amplitud de la espiga secretora (Cuchillo-Ibáñez y col., 2002).

En el trabajo que nos ocupa abordamos otra estrategia. Como se ha visto en la sección anterior, la baja concentración de tapsigargina empleada (0,1 μM) produjo una caída paulatina de las respuestas secretoras en presencia de Ca^{2+} extracelular (2 mM; Fig. 14A). Para facilitar su comparación, en la **Fig. 15**, además de los registros de la Fig. 14A (cuadrados) se muestra el mismo tipo de experimento pero llevado a cabo con una solución de KH en ausencia de Ca^{2+} extracelular ($0Ca^{2+}$; círculos) en condiciones control (sin tratamiento; símbolos vacíos) o superfundiendo con tapsigargina (0,1 μM ; símbolos negros).

En ausencia de Ca^{2+} extracelular la curva tapsigargina no empieza a mostrar diferencias estadísticamente significativas con respecto a su curva control hasta la segunda mitad del experimento (ANOVA: $p \leq 0.05$; pulso 15-27). Por otro lado, si se comparan ambas curvas de la Fig. 15 en presencia de tapsigargina ($\pm 2\text{ mM } Ca^{2+}$) vemos que en presencia de Ca^{2+} extracelular la tapsigargina produce una caída más pronunciada de las respuestas secretoras

inducidas por 100K^+ que cuando se superfunde con una solución de $\text{KH } 0\text{Ca}^{2+}$ nominal (ANOVA: $p \leq 0,05$).

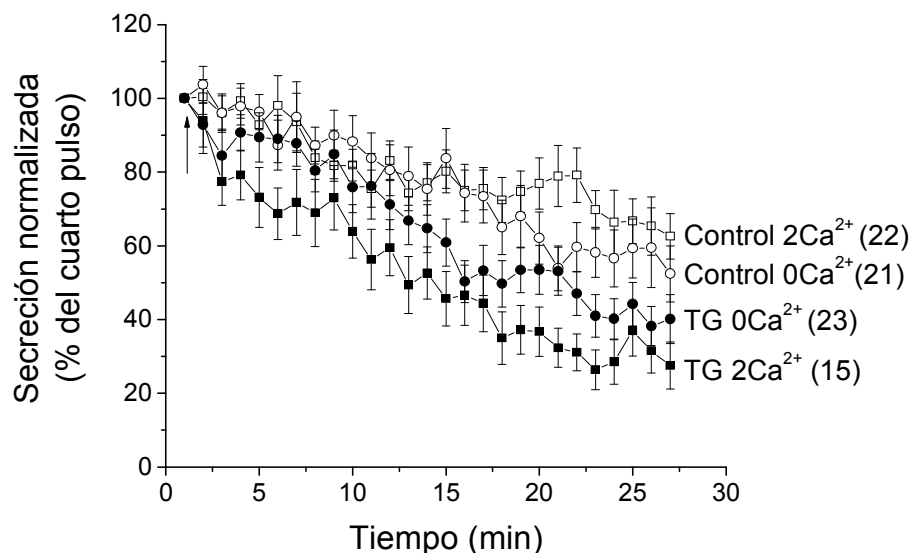


Figura 15: Curso temporal de la respuesta secretora de liberación de catecolaminas evocada por pulsos secuenciales de 100K^+ en células control y en células tratadas con tapsigargina (TG) en presencia o ausencia de Ca^{2+} extracelular. Estos experimentos se hicieron con el protocolo de la Fig. 12A. Las células se estimularon con pulsos de 100K^+ durante 2 s a intervalos de 1 min en presencia (2 mM de Ca^{2+} ; cuadrados) o en ausencia (0Ca^{2+} nominal; círculos) de Ca^{2+} extracelular. Cada día se hicieron en paralelo experimentos con dos poblaciones de células del mismo cultivo; una población se utilizó como control (células no tratadas; símbolos blancos) y otra se superfundió con $0,1 \mu\text{M}$ de tapsigargina (símbolos negros). En cada experimento individual, la secreción total (el ABC de la espiga: en $\text{nA} \times \text{s}$) obtenida en el cuarto pulso de 100K^+ se normalizó al 100%. Los tratamientos se introdujeron entre los pulsos 4 y 5 (flecha ascendente); véase que los tres primeros pulsos no están incluidos en la gráfica. Así, la secreción obtenida después del cuarto pulso se expresó como el % del cuarto pulso (ordenada) con respecto al tiempo en minutos (abscisa). Los resultados son promedios \pm e. s. del número de experimentos escritos entre paréntesis en cada gráfica.

Por último, se analizó el efecto de la temperatura sobre las acciones de la tapsigargina en las respuestas secretoras evocadas por pulsos de $100\text{K}^+ / 2\text{Ca}^{2+}$ en presencia de Ca^{2+} extracelular (2 mM; Fig. 16). Sorprendentemente, a temperatura ambiente no se observa la caída gradual de la secreción producida por tapsigargina a lo largo de todo el experimento (compárense las Fig. 14A y 16). Por lo tanto, en CCB el efecto de la tapsigargina sobre la secreción es dependiente de la temperatura. Sin duda, este resultado advierte del importante papel que juega la temperatura en los procesos fisiológicos y de la gran ventaja que supone un sistema que permita trabajar a 37°C . De hecho, hay autores que

postulan que muchos resultados obtenidos con técnicas cuya limitación radica en trabajar a temperatura ambiente, como por ejemplo el “pacht clamp”, deberían volver a estudiarse a 37°C (Dinkelacker y col., 2000).

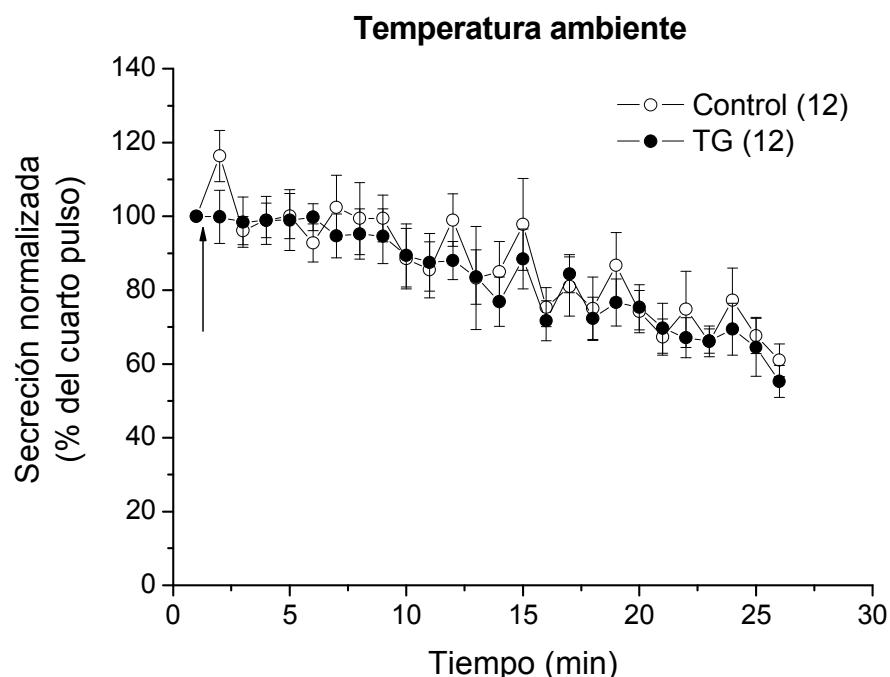


Figura 16: Curso temporal de las respuestas secretoras de liberación de catecolaminas evocadas por pulsos de $100K^+$ en células control y en células expuestas a taspigargina a temperatura ambiente. Estos experimentos se hicieron con el protocolo de la Fig. 12A. Las células se estimularon con pulsos de $100K^+$ durante 2 s a intervalos de 1 min (en presencia de 2 mM de Ca^{2+} y a 25°C). Cada día se hicieron en paralelo experimentos con dos poblaciones de células del mismo cultivo; una población se utilizó como control (células no tratadas; círculos blancos) y otra se superfundió con 0,1 μM de taspigargina (TG; círculos negros). La TG se introdujo entre los pulsos 4 y 5 (flecha ascendente). En cada experimento individual, la secreción total (el ABC de la espiga: en nA x s) obtenida en el cuarto pulso de $100K^+$ se normalizó al 100%. Así, la secreción obtenida después del cuarto pulso se expresó como el % del cuarto pulso (ordenada) con respecto al tiempo en minutos (abscisa). Los resultados son promedios \pm e. s. del número de experimentos escrito entre paréntesis. No existen diferencias estadísticamente significativas entre las curvas control y TG.

1.4. Efectos de los inhibidores de la SERCA taspigargina, ACP y BHQ sobre las respuestas secretoras inducidas por $100K^+$: extensión del análisis estadístico

Para ampliar el análisis estadístico se compararon mediante la prueba *t* de Student las respuestas secretoras a intervalos de 5 min de las curvas representadas en las Fig. 14 y 15.

El histograma de la **Fig. 17A** muestra que la tapsigargina, en presencia de Ca^{2+} extracelular (2 mM), produce una caída significativa de la secreción ya desde el minuto 5 de exposición al tratamiento. Sin embargo, en condiciones de 0Ca^{2+} nominal (**Fig. 17B**), el efecto de la tapsigargina, con respecto al control, sólo se hace significativo durante la segunda mitad del experimento, en los minutos 15 y 25. Los efectos del ACP (**Fig. 17C**) y del BHQ (**Fig. 17D**) sobre las respuestas secretoras, evocada por pulsos de 100K^+ , muestran un retraso con respecto al de la tapsigargina, ya que la caída que producen empieza a ser estadísticamente significativa a partir del min 10 en adelante. Nótese que cuando se lavan los inhibidores reversibles de la SERCA (**Fig. 17C** y **D**) las respuestas secretoras se recuperan y pierden su significación estadística con respecto a sus respectivos controles. Además, cuando se lava el BHQ (**Fig. 17D**) dicha recuperación es estadísticamente significativa con respecto a la respuesta secretora previa, obtenida en presencia de dicho compuesto.

En resumen, los inhibidores de la SERCA provocan una caída de las respuestas secretoras producidas por K^+ con respecto a las células control, que sólo empieza a ser estadísticamente significativa después de unos minutos de exposición a los tratamientos. El lavado de los inhibidores reversibles devuelve la secreción a sus niveles control.

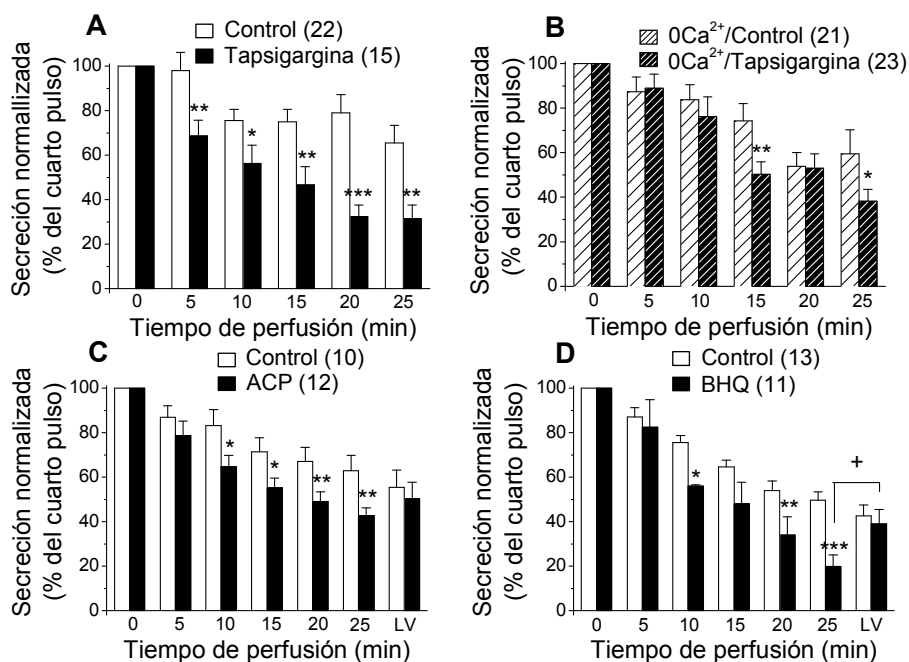


Figura 17: Caída de la respuesta secretora en CCB control o tratadas con los inhibidores de la SERCA tapsigargina, ACP y BHQ. Este histograma resume los efectos de los tratamientos explicados en las Fig. 14 y 15, sobre la secreción de catecolaminas, a intervalos de 5 min, en poblaciones de CCB. En esta figura se representa la secreción normalizada de catecolaminas (como el % del cuarto pulso previo a la introducción de un tratamiento dado en el sistema de perfusión; ordenada) con respecto al tiempo de perfusión del tratamiento correspondiente, a intervalos de 5 min (abscisa). En cada instante, se compara mediante la prueba *t* de Student el efecto del tratamiento (barra negra con o sin rayas) con respecto a la caída espontánea de su control correspondiente (barra blanca). Cada par de columnas representa las respuestas secretoras evocadas por pulsos de $100K^+/2Ca^{2+}$ en células control o células tratadas con tapsigargina ($0,1 \mu M$; panel A), tapsigargina en $0Ca^{2+}$ nominal ($0,1 \mu M$; panel B), ácido ciclopiazónico (ACP: $10 \mu M$; panel C) e hidroxibutil-hidroquinona (BHQ: $10 \mu M$; panel D). Los datos son medias \pm e. s. del número de experimentos escrito entre paréntesis realizados a partir de, al menos, cinco cultivos diferentes. Prueba *t* de Student: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ con respecto a su control correspondiente en el mismo instante. + $p \leq 0.05$ con respecto al efecto del tratamiento previo a su lavado. LV, efecto del lavado.

1.5. Efecto de la tapsigargina sobre la $[Ca^{2+}]_{RE}$ en poblaciones de células cromafines bovinas

El uso de ecurina dirigida al RE permite realizar experimentos de fotoluminiscencia para medir la $[Ca^{2+}]_{RE}$ directamente (Montero y col., 1997) en poblaciones de células cromafines bovinas (Alonso y col., 1999). La placa de cuatro pocillos con las células infectadas con er-AEQ y reconstituidas con celenteracina n se colocan directamente sobre el luminómetro termostatzado. A continuación, las CCB (de uno de los pocillos: el pocillo correspondiente) se

superfunden durante 5 min con una solución KH $0\text{Ca}^{2+}/0,5$ mM EGTA para lavar el BHQ (ver Materiales y Métodos: sección 2.2.1) y registrar la basal durante 1 min. El sistema de superfusión rápido hay que ajustarlo para perfundir las soluciones a una velocidad de 2 ml min^{-1} , a 25°C . Entonces, las células se superfunden con una solución de KH rica en Ca^{2+} (1 mM; flecha descendente) para rellenar el RE (**Fig. 18A y B**). Una vez que se ha obtenido una meseta de rellenado reticular estable (valor promedio = $272 \pm 26,3\ \mu\text{M}$; Fig. 18A) sobre el minuto 3 de experimento, se registran los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ (ordenada izquierda) hasta el final del experimento. En los paneles A y B de la Fig. 18 también está representado el curso temporal de la er-AEQ consumida (%: ordenada derecha). En condiciones control (**Fig. 18A**), la er-AEQ se consume de una manera prácticamente lineal. Al final del registro, se había consumido hasta un 59% de la er-AEQ por lo que este tipo de experimentos no se pudo extender a tiempos más largos (de 30 min) como en el caso de los experimentos de secreción.

Para poder comparar el efecto de la tapsigargina sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ con respecto al control, se normalizaron las poblaciones de datos correspondientes a la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ mostradas en las Fig. 18A y B con respecto al instante previo a la introducción del tratamiento en cuestión (**Fig. 18C**). A dicho instante se le asignó el valor 100%. En ausencia de tratamiento (control; círculos blancos) el curso temporal de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ normalizada aumenta levemente durante el primer minuto, luego cae paulatinamente hasta que se estabiliza sobre el minuto 8. Cuando las CCB se superfunden con tapsigargina ($0,1\ \mu\text{M}$; círculos negros), el RE no empieza a depletarse hasta el **minuto 1,88** de exposición. Es curioso cómo la curva tapsigargina acompaña a la curva control hasta dicho instante. Luego la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ empieza a caer hasta alcanzar un 35% de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ inicial. Nótese que este grado de vaciado reticular medido directamente con er-AEQ (65%) se corresponde con la depleción de Ca^{2+} del RE medida indirectamente con la sonda fluorescente fluo-4 tras aplicar un pulso de cafeína de 30 s (71%; Fig. 21C).

Llegados a este punto, cabe preguntarse el por qué de: 1) este retraso sobre la salida del Ca^{2+} del RE evocada por tapsigargina y 2) que en CCB tras 8 minutos de exposición a la tapsigargina el RE no se vacíe completamente.

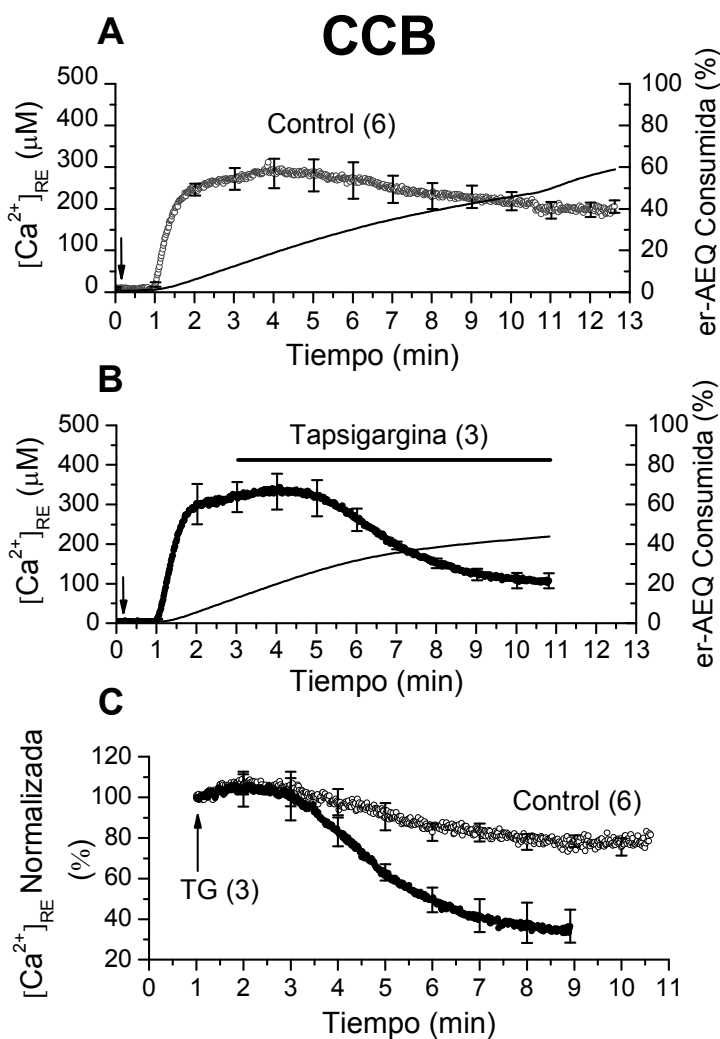


Figura 18: Curso temporal de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ en CCB control o tratadas con tapsigargina, infectadas con ecuorina dirigida al RE. Los experimentos se iniciaron en condiciones de $0\text{Ca}^{2+}/\text{EGTA}$ y tras registrar la curva basal durante 1 min se superfundió con una solución rica en Ca^{2+} (1 mM; flecha descendente). La $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ se expresa en μM (ordenada izquierda). En la ordenada derecha se representa el % de ecuorina reticular consumida a lo largo del tiempo (min; abscisa). Las células control (sin tratamiento: panel **A**) se probaron en paralelo a células tratadas con tapsigargina (0,1 μM ; panel **B**). La tapsigargina se introdujo después de alcanzar la meseta de relleno reticular (con una señal de Ca^{2+} estable), alrededor de los 3 min de experimento (barra horizontal). Para permitir la comparación entre el efecto de la tapsigargina con el control (panel **C**), la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ correspondiente a las poblaciones experimentales reflejadas en los paneles **A** y **B** se normalizó con respecto al instante previo a la introducción del tratamiento correspondiente (flecha ascendente). A dicho instante, se le asignó el 100%. La $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ está expresada en % (ordenada) frente al tiempo en minutos (abscisa). Las células control (círculos blancos) se probaron en paralelo a células tratadas con tapsigargina (TG; círculos negros). ANOVA a intervalos de 1 min (entre el minuto 4-9; panel **C**): $p \leq 0,05$ curva TG con respecto a la curva control. Los datos son medias \pm e. s. del número de experimentos entre paréntesis.

En la **Fig. 19** se han ampliado los primeros 3 minutos de la curva control representada en la Fig. 18A para resaltar otra observación interesante presente en cada uno de los 24 experimentos totales realizados con er-AEQ. Teniendo en cuenta que cuando se abre la válvula con la solución correspondiente tarda menos de 1 s en bañar las células. Nótese que desde que se reintroduce el Ca^{2+} en el segundo 8 (minuto 0,13; flecha descendente) hasta que se observa su efecto sobre el relleno del RE existe un retraso promedio de $53,7 \pm 2,1$ s (histograma dentro de la Fig. 19).

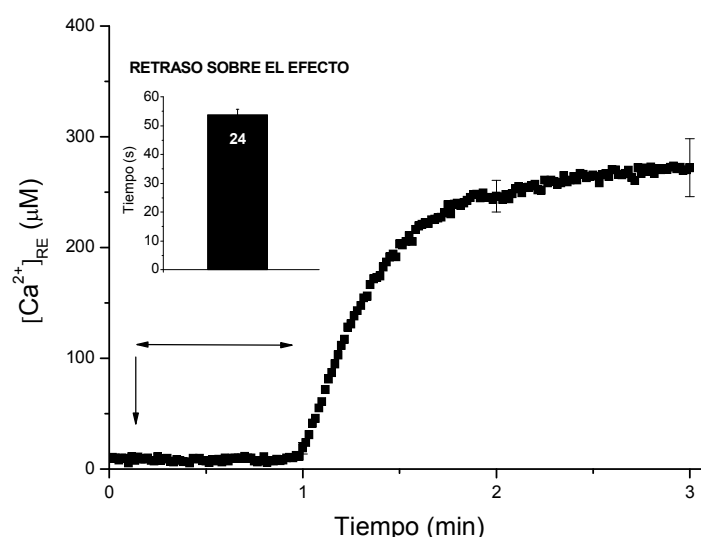


Figura 19: Retraso en el efecto de la reintroducción de Ca^{2+} sobre el relleno reticular en CCB infectadas con ecurina dirigida al RE. En esta figura se recoge el curso temporal (minutos; abscisa) del relleno del Ca^{2+} del RE (ordenada, μM) de la Fig. 18A. Los experimentos se iniciaron en condiciones de $0\text{Ca}^{2+}/\text{EGTA}$ y tras registrar la curva basal durante 8 s se superfundió con una solución rica en Ca^{2+} (1 mM; flecha descendente). El efecto de dicha reintroducción de Ca^{2+} sobre el relleno reticular sufre un retraso (doble flecha horizontal). El histograma dibujado dentro de la Fig. 19 representa el retraso promedio (barra negra) \pm e. s. del número de experimentos escrito dentro de la barra. El tiempo está representado en segundos (ordenada).

1.6. Efecto de la tapsigargina sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ en células PC12

Antes de tener la posibilidad de infectar las CCB con partículas víricas que codifican para la AEQ dirigida al RE (vector amplicón pHSVerGFP-AEQ; elaborado por la Dra. M^a Teresa Alonso), gracias a la colaboración con el grupo de la Universidad de Valladolid dirigido por el profesor Javier García

Sancho, resultaba sugerente estudiar los cambios en la $[Ca^{2+}]_{RE}$ en células PC12 transfectadas con AEQ dirigida al RE. A posteriori, estos experimentos suponen un complemento perfecto a los ya descritos con anterioridad realizados en CCB.

Antes de comenzar el experimento de fotoluminiscencia, se extrajo el cubreobjetos, con las células PC12 transfectadas con AEQ dirigida al RE, del medio de reconstitución (ver sección 1.2 en Materiales y Métodos) y se introdujo en un medio en condiciones de $0Ca^{2+}/EGTA$ ($100 \mu M$), al 2% de BSA, durante 3-4 min para favorecer el lavado de moléculas. A continuación, las células PC12 se colocaron en la cámara de perfusión. Para sellar la cámara y permitir que el flujo de perfusión fluyera de manera continua hay que colocar otro cubreobjetos cuadrado encima untado en sus bordes, o bien con grasa de caballo o bien con silicona sintética.

Entonces, las células PC12 se superfunden, mediante un sistema de superfusión rápida (a una velocidad de 2 ml min^{-1}), con una solución con $0Ca^{2+}/EGTA$ para evitar que la eucorina reticular se consuma. Tras registrar la curva basal durante unos segundos la células se superfunden con una solución rica en Ca^{2+} (1 mM) para rellenar el RE (**Fig. 20A y B**; flecha ascendente). Una vez que se alcanza la meseta de rellenado reticular sobre el minuto 2 se registra la $[Ca^{2+}]_{RE}$ (ordenada; μM) hasta el minuto 7,2 (abscisa) (**Fig. 20A**). La tapsigargina ($0,1 \mu M$: **Fig. 20B**), produce una caída inmediata y exponencial de la $[Ca^{2+}]_{RE}$, de tal manera que a los 7 min el RE se ha vaciado casi por completo y al final del registro (minuto 9,3) la señal de Ca^{2+} reticular alcanzaba los valores basales.

Al igual que en CCB en la Fig. 20, referida a células PC12, también se representa el curso temporal del consumo de AEQ reticular (%: ordenada derecha). En condiciones control (**Fig. 20A**), la AEQ reticular también se consume de una forma casi lineal (hasta un 55%) al final del experimento. Nótese cómo en presencia de tapsigargina, el consumo de AEQ deja de ser

lineal para ralentizarse casi desde el instante en que se empieza a vaciar el Ca^{2+} del RE (**Fig. 20B**).

En células PC12 también se normalizaron las poblaciones de datos correspondientes a la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ mostradas en las Fig. 20A y B con respecto al instante previo a la introducción del tratamiento en cuestión (**Fig. 20C**) para facilitar su comparación. A dicho instante se le asignó el valor 100%. En ausencia de tratamiento (Control; círculos blancos) el curso temporal de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ normalizada una vez que alcanza su meseta (minuto 2; Fig. 20A), muestra un perfil bastante estable a lo largo de los 5,2 min de registro de la señal de Ca^{2+} del RE. Nótese que a diferencia de las CCB, en células PC12 no se observa esa pequeña caída espontánea en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ (comparar Fig. 18C y 20C).

Cuando las células PC12 se superfunden con tapsigargina (TG: 0,1 μM ; círculos negros), efectivamente, la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ (Fig. 20C) empieza a disminuir inmediatamente después de su introducción. El vaciado reticular es muy rápido durante el primer minuto de exposición a la tapsigargina (hasta un 47%). Ello se refleja en la disminución que sufre la tasa de consumo de la er-AEQ (Fig. 20B) que deja de ser lineal. Sin embargo, la salida del Ca^{2+} del RE muestra ligeras diferencias si comparamos CCB y células PC12 (comparar Fig. 18C y 20C); en CCB dicha salida sufre un retraso de unos 2 min, no es tan rápida y, tras un periodo de exposición similar a la tapsigargina, el RE no llega a vaciarse totalmente.

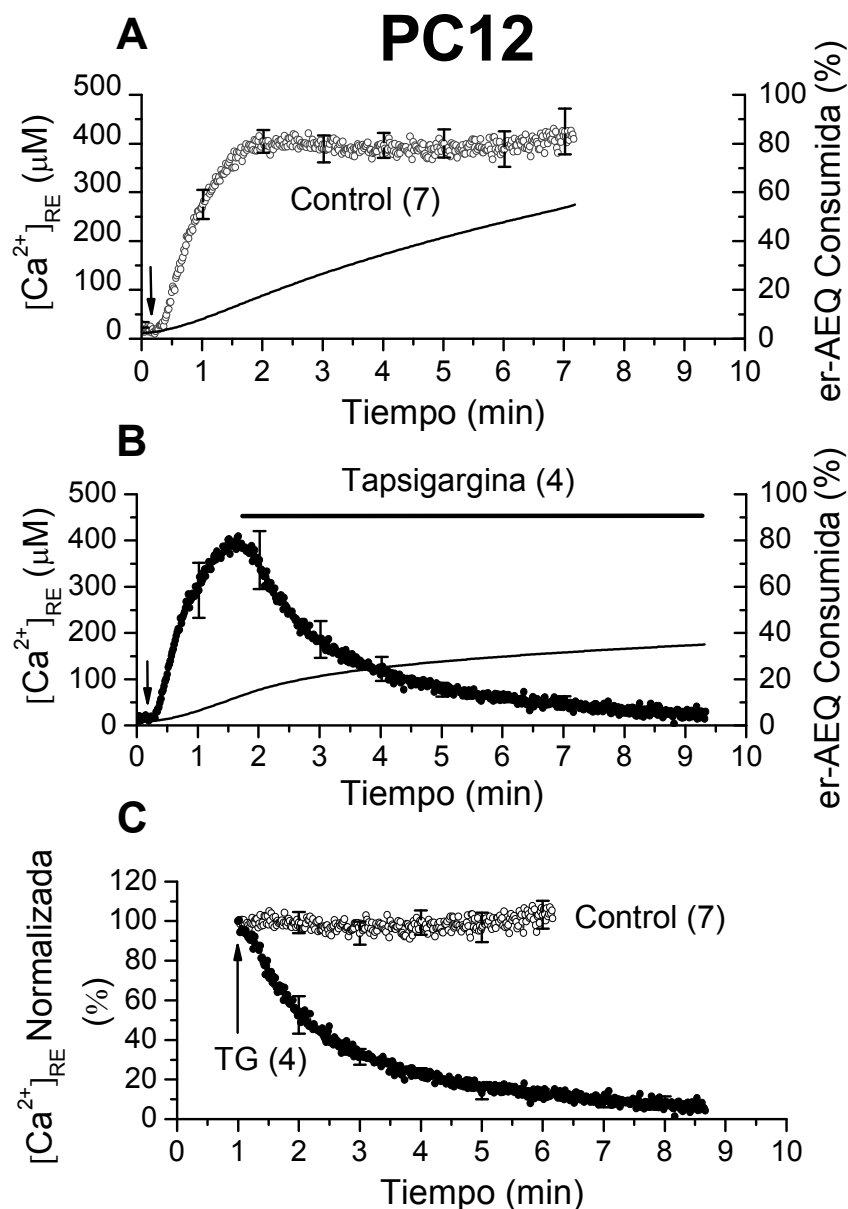


Figura 20: Curso temporal de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ en células PC12 control o tratadas con tapsigargina, transfectadas con eucorina dirigida al RE. Los experimentos se iniciaron en condiciones de $0Ca^{2+}/EGTA$ y tras registrar la curva basal durante unos segundos se superfundió con una solución rica en Ca^{2+} (1 mM; flecha descendente). La $[Ca^{2+}]_{RE}$ se expresa en μM (ordenada izquierda). En la ordenada derecha se representa el % de eucorina reticular consumida a lo largo del tiempo (min; abscisa). Las células control (sin tratamiento: panel A) se probaron en paralelo a células tratadas con tapsigargina (0,1 μM ; panel B). La tapsigargina se introdujo después de alcanzar la meseta de rellenado reticular (con una señal de Ca^{2+} estable), alrededor del 1,5 min de experimento (barra horizontal). Para permitir la comparación entre el efecto de la tapsigargina con el control (panel C), la $[Ca^{2+}]_{RE}$ correspondiente a las poblaciones experimentales reflejadas en los paneles A y B se normalizó con respecto al instante previo a la introducción del tratamiento correspondiente (flecha ascendente). A dicho instante, se le asignó el valor 100%. La $[Ca^{2+}]_{RE}$ está expresada en % (ordenada) frente al tiempo en minutos (abscisa). Las células control (círculos blancos) se probaron en paralelo a células tratadas con tapsigargina (TG; círculos negros). ANOVA a intervalos de 1 min (entre el minuto 2-6; panel C): $p \leq 0,05$ curva TG con respecto a la curva control. Los datos son medias \pm e. s. del número de experimentos entre paréntesis.

1.7. Efecto de la tapsigargina sobre los cambios en la $[Ca^{2+}]_c$ basal o producidos por cafeína

A partir de los resultados obtenidos hasta el momento pensamos que los cambios en la $[Ca^{2+}]_{RE}$ inducidos por tapsigargina deberían traducirse en cambios en la $[Ca^{2+}]_c$ basal y/o producidos por cafeína, que reflejan de forma indirecta el grado de relleno del depósito de Ca^{2+} del RE así como de la actividad de los RyR. Por lo tanto, diseñamos experimentos para explorar si existía una correlación entre los efectos de la tapsigargina sobre la $[Ca^{2+}]_c$ y el curso temporal de la secreción, y los cambios en la $[Ca^{2+}]_{RE}$.

La **Fig. 21A** muestra un experimento prototipo control en el que tras registrar una señal de Ca^{2+} citosólico basal durante 1 min, se aplica un pulso de $100K^+$ de 2 s de duración que da lugar a un transiente de Ca^{2+} característico que se recupera en apenas 1 min. En esta gráfica se representa la señal de Ca^{2+} citosólica en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF; ordenada), a lo largo del tiempo (abscisa). Después de 10 min de incubación control con una solución estándar de KH rica en Ca^{2+} (2 mM) o suplementada con tapsigargina (Fig. 21B; flecha descendente), se superfunde con cafeína 50 mM durante 30 segundos (barra horizontal) para estudiar la señal de Ca^{2+} evocada por este activador de los RyR, lo cual da una idea indirecta del grado de relleno del RE. En el experimento de la Fig. 21A, la cafeína da lugar a un transiente de Ca^{2+} con una amplitud igual a la mitad de aquella evocada por el pulso previo de K^+ .

A partir de cada experimento prototipo individual, el nivel de la $[Ca^{2+}]_c$ observado previo a la introducción de un tratamiento dado (minuto 2 en la Fig. 21A) se normalizó a 1. El resto de los datos (referidos a los niveles de la $[Ca^{2+}]_c$ basales o evocados por cafeína) se normalizaron con respecto a este valor control. Por lo tanto, en la **Fig. 21B** se representa la señal de Ca^{2+} citosólica normalizada (ordenada), a lo largo del tiempo (abscisa).

Cuando se bloquea la SERCA del RE con el inhibidor irreversible tapsigargina (0,1 μ M), en presencia de Ca^{2+} extracelular, la señal de Ca^{2+}

citósica experimenta una elevación inicial que se estabiliza 30 s después y alcanza su nivel máximo (incremento de 2,26 veces) 1 min más tarde. Después, esta señal vuelve a sus niveles basales cuando los sistemas de tamponamiento entran en acción (principalmente la mitocondria; Xu y col., 1997; Montero y col., 2000; Villalobos y col., 2002). En nuestro caso, la señal de Ca^{2+} disminuye de manera bifásica mediante una primera etapa más rápida (durante los primeros 4 min de la caída) y una segunda fase en la que la caída se hace cada vez más lenta (**Fig. 21B**; tapsigargina: **TG**). La respuesta a cafeína en estas células perfundidas con tapsigargina con respecto al control se redujo un 71% (**Fig. 21B y C**), lo que está de acuerdo con el vaciado del depósito de Ca^{2+} del RE (65%) observado con eucarina dirigida al RE (**Fig. 18C**).

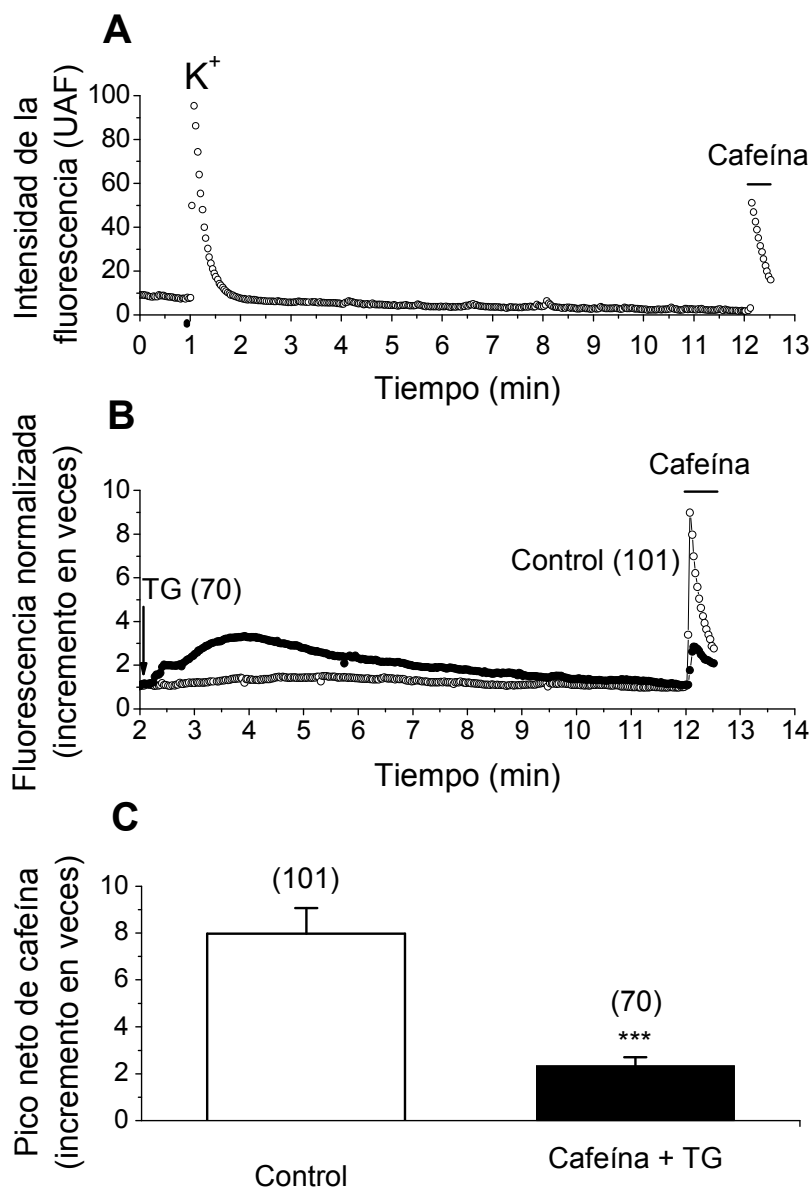


Figura 21: Cambios en la $[Ca^{2+}]_c$ basal o evocada por cafeína inducidos por taspigargin (TG). La célula cromafín bovina aislada se perfundió con una solución de KH que contiene 2 mM de Ca^{2+} (solución estándar KH/ $2Ca^{2+}$). El panel A muestra un experimento prototipo control en el que se representa la señal de Ca^{2+} citosólico (en unidades arbitrarias de fluorescencia: UAF; ordenada) con respecto al tiempo en minutos (abscisa). Así, tras un periodo de superfusión inicial de 1 min, necesario para equilibrar la señal de Ca^{2+} citosólico basal, con una solución de KH/ $2Ca^{2+}$, cada célula cromafín bovina se somete a un pulso de $100K^+/2Ca^{2+}$ de 2 s de duración (punto negro en la base del transiente de Ca^{2+}) y posteriormente a un pulso de cafeína de 30 s (50 mM; barra horizontal). En cada célula cromafín, los cambios en la $[Ca^{2+}]_c$ observados previos a la introducción de un tratamiento dado (minuto 2) se normalizaron a 1. El resto de puntos se normalizaron con respecto a dicho valor (panel B). Los cambios referidos a la $[Ca^{2+}]_c$ basal y a las respuestas evocadas por cafeína se monitorizaron en CCB superfundidas con una solución control estándar (Control) o suplementada con TG (flecha descendente). El panel C muestra datos promedio (\pm e.s. del número de células escrito entre paréntesis) referidos a las respuestas evocadas por cafeína en células control o en células pretratadas durante un periodo de 10 min con 0,1 μ M de taspigargin (TG). Prueba *t* de Student: *** $p \leq 0,001$ con respecto al control.

2. INTERACCIONES ENTRE EL Ca^{2+} DEL RE Y LA PKC EN LA REGULACIÓN DE LA EXOCITOSIS EN CCB: SEGUNDO OBJETIVO

2.1. Efecto de los moduladores de la PKC sobre el curso temporal a largo plazo de las respuestas secretoras de catecolaminas inducidas por pulsos repetidos de 100K^+

Existe un amplio y sólido sector de la literatura que sugiere que la PKC está involucrada en la regulación de determinados pasos preexocitóticos y de la exocitosis en la célula cromafin (Cuchillo-Ibáñez y col. 2004). El segundo objetivo de este trabajo se refiere al análisis del papel de la actividad PKC referido a la liberación de catecolaminas, a largo plazo, como respuesta a pulsos repetidos de 100K^+ . Para ello, se han utilizado protocolos de estimulación como el de la Fig. 12A y los registros se han representado como el la Fig. 13B. Hemos empleado herramientas como el PMA (12-miristato 13-acetato; $0,1 \mu\text{M}$) que es un éster de forbol activador de la PKC (Burgoyne y Norman, 1984; Pocotte y col., 1985; Bittner y Holz, 1990) o su inhibidor queleritrina ($1 \mu\text{M}$).

La Fig. 22A muestra datos promedio obtenidos de forma paralela a partir de células control (no tratadas) y células tratadas con PMA. Véase que, en las células control, la secreción se mantiene estable durante los seis primeros pulsos de 100K^+ , mientras que en las células tratadas con PMA, la secreción aumenta hasta alcanzar un pico de un 165% al tercer pulso de 100K^+ . A partir de este pico, la respuesta secretora empieza a decaer hasta alcanzar el nivel de la respuesta control en el pulso de 100K^+ número nueve. Desde este instante en adelante, la respuesta secretora se mantiene como aquella de las células control y se hace incluso más pequeña durante los últimos nueve pulsos de 100K^+ (ANOVA: $p \leq 0,05$).

La Fig. 22B muestra el curso temporal a largo plazo del ABC de las espigas secretoras, evocadas por pulsos repetidos de 100K^+ en células control y en células tratadas con queleritrina. En general, la curva queleritrina se separa de

la curva control de una manera estadísticamente significativa (ANOVA: $p \leq 0,05$). Aunque las respuestas secretoras tienden a permanecer juntas durante los siete primeros pulsos de $100K^+$ (después de la introducción de la queleritrina; flecha ascendente), a partir de dicho instante, las curvas tienden a separarse con un retraso y un perfil parecidos a los que se observan en células tratadas con tapsigargina (comparar Fig. 14A y 22B). Así, al final del experimento las respuestas secretoras evocadas por pulsos de $100K^+$, en presencia de queleritrina, han decaído un 61%. Curiosamente, en el rango entre los minutos 15 y 26 de la gráfica, hay una tendencia hacia la estabilización de las respuestas secretoras de las células tratadas con queleritrina que se mantiene alrededor de un 40-50% de la respuesta inicial.

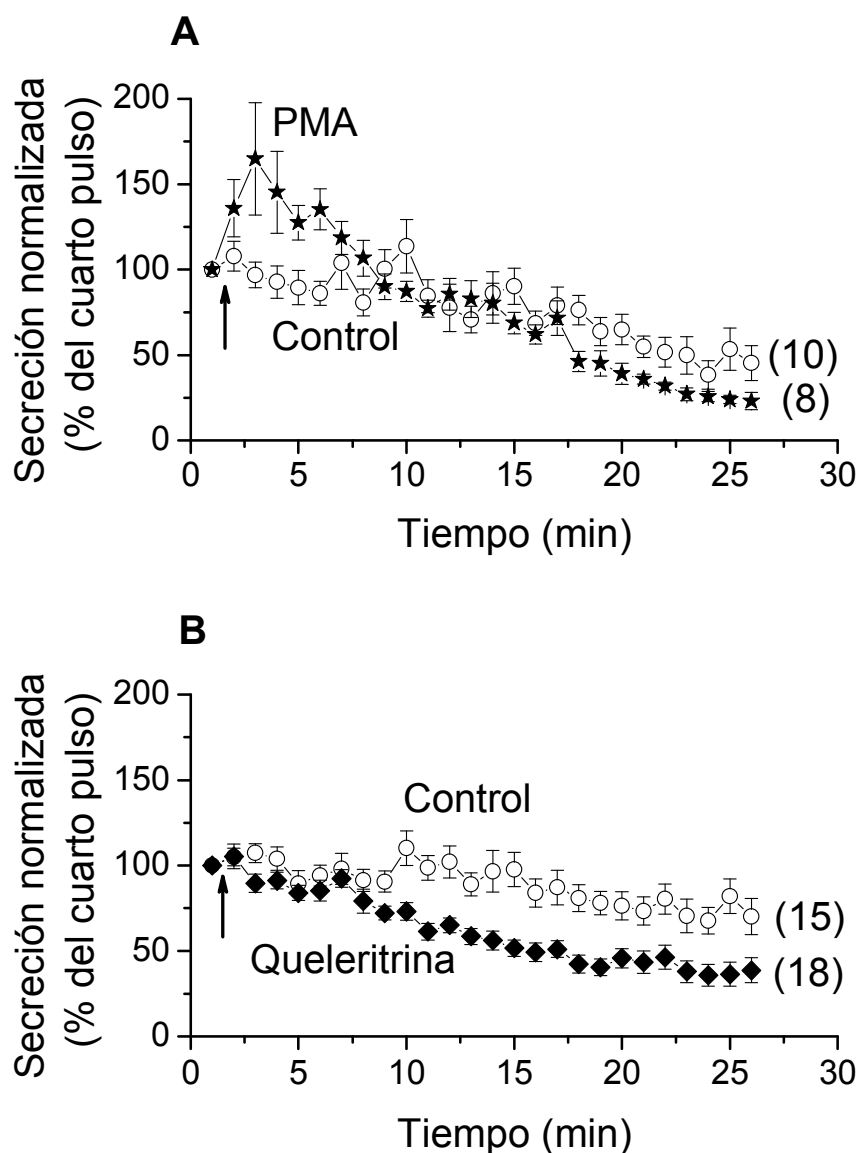


Figura 22: Curso temporal de la respuesta secretora de catecolaminas evocada por pulsos repetidos de $100K^+$ en células control, y en células expuestas a PMA $0,1 \mu M$ (panel A), o queleritrina $1 \mu M$ (panel B). Los tratamientos se introdujeron en el instante indicado por las flechas y se mantuvieron hasta el final del experimento. Las células se estimularon a intervalos de 1 min durante 2 s con pulsos repetidos de $100K^+$. Cada día se hicieron en paralelo experimentos controles y experimentos con el tratamiento indicado. El ABC de la respuesta secretora evocada por el cuarto pulso de $100K^+$ en cada experimento individual se normalizó al 100%; las respuestas sucesivas se expresaron como el % del cuarto pulso (ordenada) con respecto al tiempo en min (abscisa). Véase que las tres primeras respuestas a $100K^+$ no están representadas en la gráfica. Los resultados son promedios \pm e. s. del número de experimentos escrito entre paréntesis en cada gráfica, realizados a partir de seis cultivos diferentes de células cromafines bovinas. En el caso de la queleritrina (panel B), un ANOVA refleja la diferencia estadísticamente significativa con respecto a la curva control ($p \leq 0,05$).

2.2. La tapsigargina antagoniza la facilitación y el bloqueo generados por el PMA y la queleritrina respectivamente, sobre las respuestas secretoras inducidas por pulsos repetidos de 100K⁺

Puesto que el Ca²⁺ que se libera del RE modula la actividad de la PKC (TerBush y col., 1988), pareció interesante explorar las interacciones entre tapsigargina, PMA y queleritrina sobre la secreción como respuesta a pulsos repetidos de K⁺. Para ello, se realizaron experimentos donde la tapsigargina (0,1 µM) se administraba con PMA (0,1 µM) o queleritrina (1 µM). Dichos experimentos se llevaron a cabo con protocolos similares a los que se muestran en las Fig. 14A y 22, con la excepción de que aquí, los tratamientos administraban en combinación.

La **Fig. 23A** refleja tres curvas que representan el curso temporal del ABC de las respuestas secretoras evocadas por pulsos repetidos de 100K⁺ aplicados a células control, células tratadas con tapsigargina (0,1 µM) y células tratadas con la combinación tapsigargina más PMA (0,1 µM). La curva tapsigargina es la misma que la de la Fig. 14A y se ha representado en esta gráfica para facilitar su comparación. Véase que el aumento inicial de la secreción experimentado en la Fig. 22A, cuando se administra sólo PMA, desaparece al coadministrarlo con tapsigargina (Fig. 23A). Nótese también, que hasta el minuto 17 el ritmo de la caída de las respuestas secretoras evocadas por pulsos de 100K⁺ es similar en células tratadas sólo con tapsigargina y en células tratadas con la combinación tapsigargina más PMA, es decir, prima el efecto de la tapsigargina. Sin embargo, durante los últimos diez minutos de estimulación, en el caso de las células superfundidas con tapsigargina, las respuestas secretoras siguen disminuyendo hasta alcanzar un 32% de la respuesta inicial, pero las células tratadas con tapsigargina más PMA se estabilizan en torno al 50% de la respuesta inicial (ANOVA: $p \leq 0,05$; comparar dichos intervalos en la Fig. 23A).

En la **Fig. 23B** también se representan tres curvas con los cursos temporales de las respuestas secretoras evocadas por pulsos repetidos de

100K⁺, aplicados a células control, células tratadas sólo con tapsigargina (0,1 µM) o con la mezcla tapsigargina más queleritrina (0,1 µM y 1 µM respectivamente). De nuevo, la curva tapsigargina tomada de la Fig. 14A se vuelve a representar aquí para facilitar su comparación. Es interesante observar que las espigas secretoras evocadas por pulsos repetidos de 100K⁺ en células tratadas con la combinación tapsigargina más queleritrina, se solapan prácticamente con aquellas que dan lugar a la curva control. Por lo tanto, en las células donde se administra tapsigargina (Fig. 14A) o queleritrina (Fig. 22B) por separado, se produce una caída pronunciada de la respuesta secretora con respecto a las células control. Sin embargo, cuando los dos compuestos se administran conjuntamente, las respuestas secretoras recuerdan a aquellas obtenidas en condiciones control.

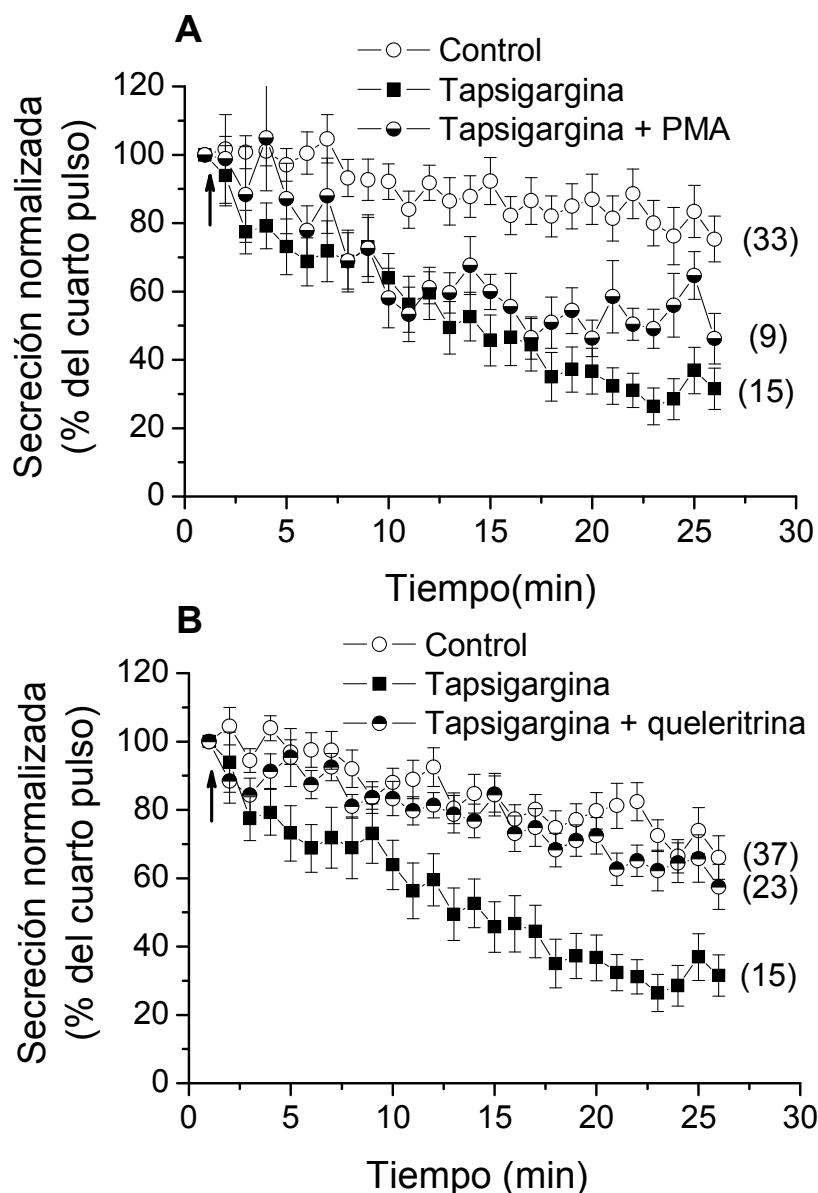


Figura 23: La tapsigargina bloquea tanto el aumento inicial de la respuesta secretora provocado por el PMA como la caída de la secreción causada por la queleritrina.

Cada día se hicieron en paralelo experimentos controles y experimentos con el tratamiento indicado. En el panel **A**, las células control (círculos blancos) son perfundidas, de manera continua, con una solución de $\text{KH}/2\text{Ca}^{2+}$ y estimuladas con pulsos de 100K^+ (de 2 s, a intervalos de 1 min y a 37°C). La curva tapsigargina ($0,1 \mu\text{M}$; cuadrados negros) se vuelve a representar aquí para permitir su comparación con el curso temporal de la curva tapsigargina + PMA ($0,1 \mu\text{M}$; círculos blancos y negros). El panel **B** muestra el curso temporal de la caída de las respuestas secretoras evocadas por pulsos repetidos de 100K^+ en células control (círculos blancos), células tratadas con tapsigargina ($0,1 \mu\text{M}$; cuadrados negros), y células tratadas con la mezcla tapsigargina + queleritrina ($0,1 \mu\text{M}$ y $1 \mu\text{M}$ respectivamente; círculos negros y blancos). La secreción se ha normalizado como el % del cuarto pulso de 100K^+ al que se le asigna el 100%. El número de experimentos que se muestra entre paréntesis a la derecha de las curvas control (tanto en el panel **A** como en el **B**), son la suma del número de controles para la población experimental tapsigargina más el número de controles para la población experimental de la mezcla correspondiente. Los datos son medias \pm e. s. del número de experimentos escrito entre paréntesis a la derecha de cada gráfica, realizados con 12 cultivos celulares diferentes (25 si se cuentan los cultivos utilizados para la realización de los controles-tapsigargina).

2.3. Efectos de la tapsigargina y de los moduladores de la PKC, PMA y queleritrina, sobre las respuestas secretoras inducidas por 100K⁺: extensión del análisis estadístico

Para ampliar el análisis estadístico se compararon mediante la prueba *t* de Student las respuestas secretoras a intervalos de 5 min de las curvas representadas en las Fig. 22 y 23.

La **Fig. 24A** muestra que tras 5 min de exposición al PMA, la potenciación inicial de la respuesta secretora sigue siendo estadísticamente significativa (prueba *t* de Student: $p \leq 0,001$). Después, dichas respuestas se igualan y finalmente caen por debajo de las respuestas control; la diferencia es significativa a los 20 y a los 25 min de perfusión (prueba *t* de Student: $p < 0,05$). Cuando se aplica la prueba *t* de Student en presencia de queleritrina, la caída que produce sobre las respuestas secretoras evocadas por 100K⁺ se hace significativa a partir del minuto 10 y hasta el final del experimento (**Fig. 24C**), es decir, se advierte un comportamiento parecido al de los inhibidores reversibles de la SERCA.

En los dos paneles restantes se resume el efecto de la tapsigargina sobre los efectos del PMA y la queleritrina. En el primer caso (**Fig. 24B**), se ve que el vaciado del Ca²⁺ del RE con tapsigargina (Fig. 26C) anula el efecto inicial del PMA sobre la secreción, primando el efecto de la tapsigargina sobre las respuestas secretoras (compárense las Fig. 24A y 24B). Cuando la tapsigargina se administra en combinación con queleritrina se produce una pequeña caída de las respuestas secretoras que sólo se hace significativa a los 10 y a los 20 min de perfusión (**Fig. 24D**). Al final del experimento (efecto máximo), la respuesta secretora en presencia de la mezcla tapsigargina más queleritrina se ha revertido significativamente con respecto a las poblaciones tapsigargina (prueba *t* de Student: $p < 0,01$) y queleritrina (prueba *t* de Student: $p < 0,05$) cuando se administran por separado (comparar barras negras, en el minuto 25 de las Fig. 24A y 24C con la barra negra, en el mismo instante, de la la Fig. 24D).

En resumen, el PMA potencia las respuestas secretoras de forma transitoria y la tapsigargina anula dicha facilitación. Después de unos minutos, la secreción en células tratadas con PMA primero se iguala y más tarde decae por debajo de los valores control. Además, cuando se administran por separado la tapsigargina y la queleritrina producen una caída de la secreción similar. Sin embargo, dicha caída se anula cuando ambos compuestos se introducen juntos en el sistema de perfusión.

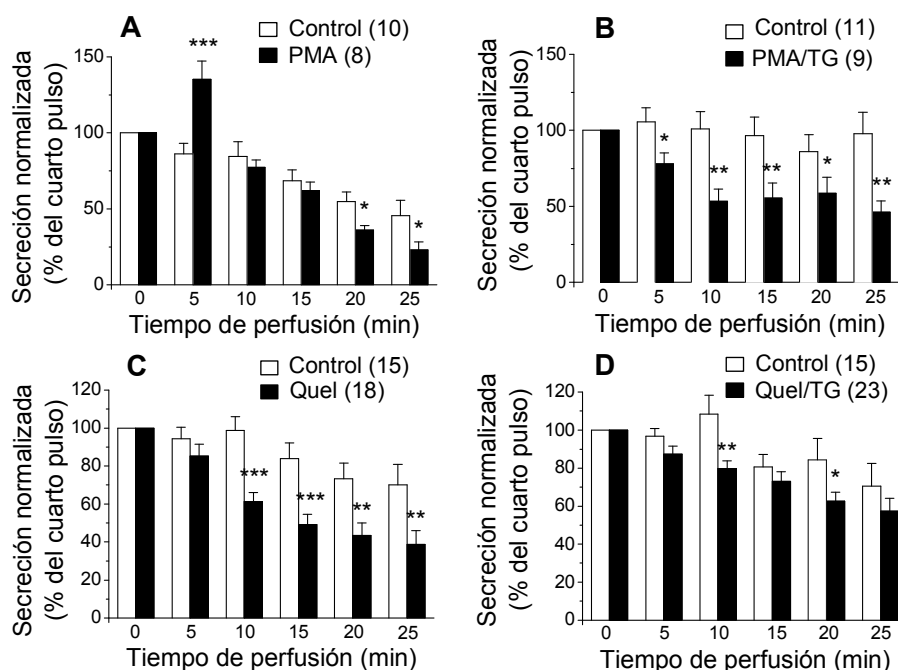


Figura 24: Histograma que resume los efectos de los tratamientos con PMA, queleritrina y tapsigargina, explicados en las Fig. 22 y 23 sobre la secreción de catecolaminas en poblaciones de CCB.

En esta figura se representa la secreción normalizada de catecolaminas (como el % del cuarto pulso previo a la introducción en el sistema de perfusión de un tratamiento dado; ordenada) con respecto al tiempo de perfusión del tratamiento correspondiente, a intervalos de 5 min (abscisa). En cada instante, se compara mediante la prueba *t* de Student el efecto del tratamiento (barra negra) con respecto a su control correspondiente (barra blanca). Cada par de columnas representa las respuestas secretoras evocadas por pulsos de $100\text{K}^+/2\text{Ca}^{2+}$ en células control o células tratadas con PMA (0,1 μM ; panel A), PMA + tapsigargina (PMA/TG; 0,1 μM ; panel B), queleritrina (Quel: 1 μM ; panel C) y queleritrina + tapsigargina (Quel/TG: 1 y 0,1 μM respectivamente; panel D). Los datos son medias \pm e. s. del número de experimentos escrito entre paréntesis realizados a partir de, al menos, tres cultivos diferentes. Prueba *t* de Student: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ con respecto a su control correspondiente en el mismo instante.

2.4. Efecto de los moduladores de la PKC, PMA y queleritrina, sobre la $[Ca^{2+}]_{RE}$ en poblaciones de células cromafines

Para monitorizar los cambios en la $[Ca^{2+}]_{RE}$ provocados por los moduladores de la PKC, PMA y queleritrina, se hicieron experimentos similares a aquellos explicados en la Fig. 18. Es decir, inicialmente las CCB se superfundieron durante 5 min con una solución de KH $0Ca^{2+}/0,5$ mM EGTA para lavar el BHQ (ver Materiales y Métodos: sección 2.2.1) y registrar la basal. Entonces, las células se superfunden con una solución de KH rica en Ca^{2+} (1 mM; flecha descendente) para rellenar el RE (**Fig. 25A y B**). Una vez obtenida una meseta de rellenado reticular estable, sobre el minuto 3 de experimento se registran los cambios en la $[Ca^{2+}]_{RE}$ (ordenada izquierda) en células tratadas con PMA (0,1 μ M; Fig. 25A) o con queleritrina (1 μ M; Fig. 25B). En los paneles A y B de la Fig. 25 también está representado el curso temporal de la er-AEQ consumida (%: ordenada derecha).

Al igual que en la Fig. 18C, en la **Fig. 25C** se ha representado la $[Ca^{2+}]_{RE}$ normalizada para facilitar la comparación entre el efecto de los tratamientos y con el control (curva Control tomada de la Fig. 18C). Cuando se prueba el efecto de la actividad PKC sobre la $[Ca^{2+}]_{RE}$, la curva PMA (Fig. 25C: círculos grises) experimenta un comportamiento parecido a aquel observado en condiciones control a lo largo de todo el registro. Al final del experimento, tras 9,63 min de exposición, la curva PMA alcanza un nivel de depleción de un 23% semejante al nivel de depleción control en el mismo instante (un 19%).

Cuando se inhibe la actividad PKC con queleritrina (Fig. 25C: Quel; círculos negros), la señal de Ca^{2+} del RE es bastante estable hasta el minuto 4,5 de exposición. En este punto, el RE empieza a vaciarse y la curva queleritrina alcanza su máximo nivel de depleción de tan sólo un 13%, en el minuto 7. Durante este tramo de incubación las curvas queleritrina y PMA discurren de forma paralela. A continuación, la curva queleritrina se recupera (distanciándose de la curva PMA) hasta alcanzar un 96% de rellenado reticular

al final del experimento. Es decir, parece que en CCB la queleritrina previene la caída espontánea de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ observada en condiciones control.

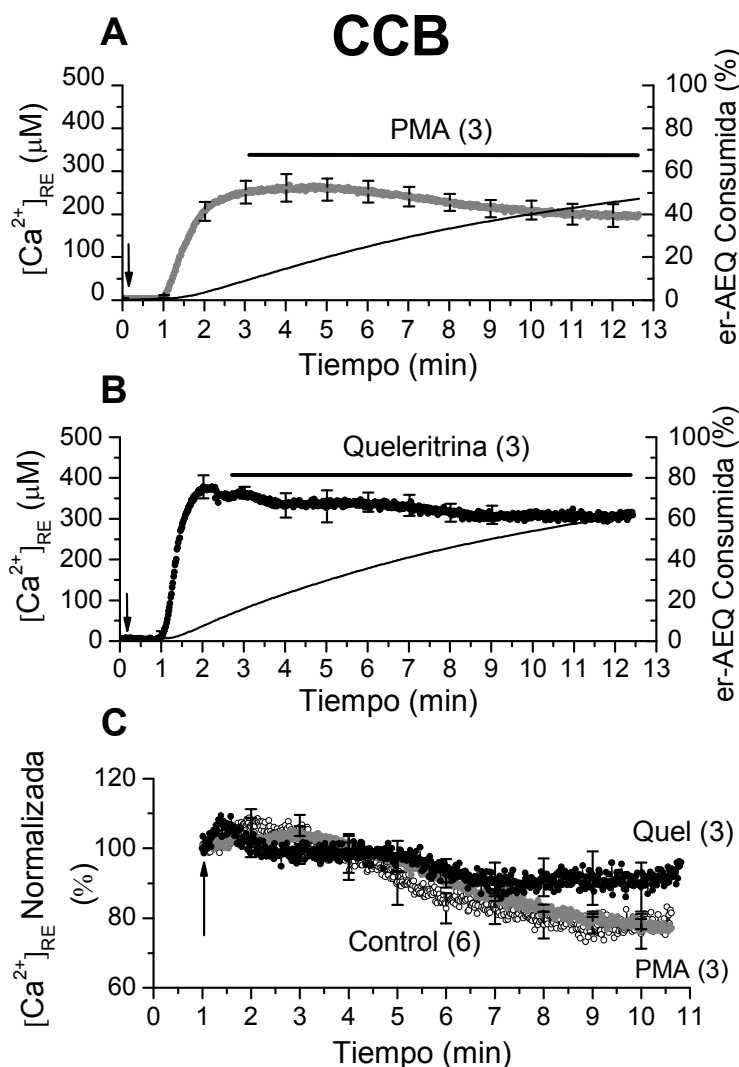


Figura 25: Curso temporal de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ en CCB tratadas con PMA o queleritrina, infectadas con eucorina dirigida al RE. Los experimentos de los paneles A y B se iniciaron en condiciones de $0Ca^{2+}/EGTA$ y tras registrar la curva basal durante unos segundos se superfundió con una solución rica en Ca^{2+} (1 mM; flecha descendente). La $[Ca^{2+}]_{RE}$ se expresa en μM (ordenada izquierda). En la ordenada derecha se representa el % de eucorina reticular consumida a lo largo del tiempo (min; abscisa). Las células se trataron con los moduladores de la PKC, PMA (panel A) o queleritrina (1 μM ; panel B). Los tratamientos se introdujeron después de alcanzar la meseta de relleno reticular (con una señal de Ca^{2+} estable), alrededor de los 3 min de experimento (barra horizontal). Para permitir la comparación entre el efecto de los tratamientos entre ellos y con el control (panel C), la $[Ca^{2+}]_{RE}$ correspondiente a las poblaciones experimentales reflejadas en los paneles A y B se normalizó con respecto al instante previo a la introducción del tratamiento correspondiente (flecha ascendente). A dicho instante, se le asignó el 100%. La $[Ca^{2+}]_{RE}$ está expresada en % (ordenada) frente al tiempo en minutos (abscisa). Las células control (círculos blancos; registro tomado de la Fig. 18C) se probaron en paralelo a células tratadas con PMA (círculos grises) o queleritrina (Quel; círculos negros). ANOVA a intervalos de 1 min (entre el minuto 8-10; panel C): $p \leq 0,01$ curva queleritrina con respecto a la curva control. Los datos son medias \pm e. s. del número de experimentos entre paréntesis.

2.5. Efecto de los moduladores de la PKC en combinación con tapsigargina sobre la $[Ca^{2+}]_{RE}$ en poblaciones de células cromafines

Para estudiar la interacción entre el Ca^{2+} del RE y la actividad PKC sobre la $[Ca^{2+}]_{RE}$ se hicieron experimentos con el mismo protocolo explicado en las Fig. 18 y 25 pero introduciendo las mezclas tapsigargina más PMA (0,1 μ M; **Fig. 26A**) o tapsigargina más queleritrina (0,1 μ M y 1 μ M respectivamente; **Fig. 26B**). Nuevamente, se representa la $[Ca^{2+}]_{RE}$ normalizada (**Fig. 26C**) para facilitar la comparación entre el efecto de los tratamientos (la curva tapsigargina se ha tomado de la Fig. 18C; TG).

Al estudiar el efecto de la actividad PKC sobre el depósito de Ca^{2+} sensible a tapsigargina (**Fig. 26C**), tanto el PMA como la queleritrina, producen un retraso adicional de unos 30 s sobre la salida del Ca^{2+} del RE evocada por tapsigargina. La señal correspondiente a la salida de Ca^{2+} del RE evocada por las mezclas tapsigargina más PMA (Fig. 26C: TP; círculos grises) y tapsigargina más queleritrina (Fig. 26C: TQ; círculos negros), es muy similar entre ellas durante su caída inicial y más lenta que la caída inicial evocada por tapsigargina.

Cuando el PMA se da en combinación con tapsigargina existe una tendencia a disminuir la tasa de depleción del Ca^{2+} del RE con respecto al efecto de la tapsigargina sola. Cuando se aplica la mezcla tapsigargina más queleritrina esta tendencia se acentúa alcanzando un nivel máximo de vaciado reticular del 51% al final del registro.

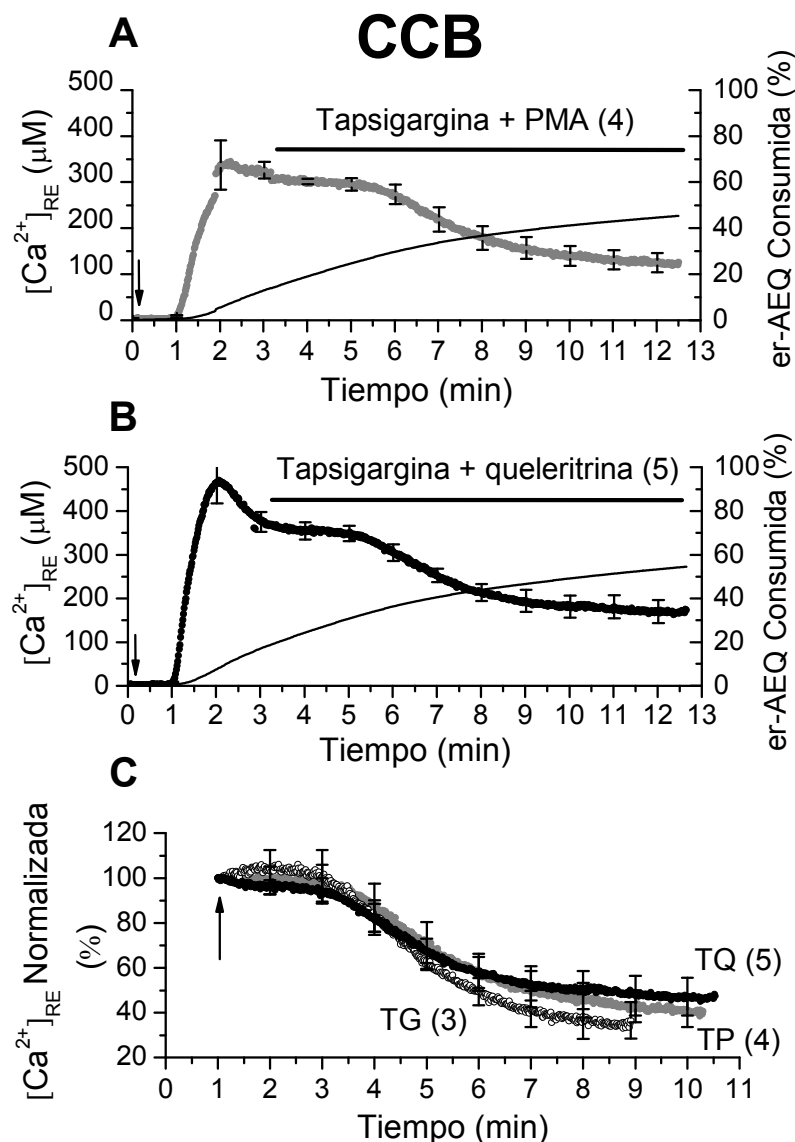


Figura 26: Curso temporal de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ en CCB tratadas con PMA o quercitrina en combinación con tapsigargina, infectadas con eucorina dirigida al RE. Los experimentos de los paneles A y B se iniciaron en condiciones de $0Ca^{2+}/EGTA$ y tras registrar la curva basal durante unos segundos se superfundió con una solución de KH rica en Ca^{2+} (1 mM; flecha descendente). La $[Ca^{2+}]_{RE}$ se expresa en μM (ordenada izquierda). En la ordenada derecha se representa el % de eucorina reticular consumida a lo largo del tiempo (min; abscisa). Las células se trataron con las mezclas, tapsigargina más PMA (0,1 μM ; panel A) o tapsigargina más quercitrina (0,1 μM y 1 μM respectivamente; panel B). Los tratamientos se introdujeron después de alcanzar la meseta de relleno reticular (con una señal de Ca^{2+} estable), alrededor de los 3 min de experimento (barra horizontal). Para permitir la comparación entre el efecto de los tratamientos (panel C), la $[Ca^{2+}]_{RE}$ correspondiente a las poblaciones experimentales reflejadas en los paneles A y B se normalizó con respecto al instante previo a la introducción del tratamiento correspondiente (flecha ascendente). A dicho instante, se le asignó el valor 100%. La $[Ca^{2+}]_{RE}$ está expresada en % (ordenada) frente al tiempo en minutos (abscisa). En esta figura se representan células tratadas con tapsigargina (TG; círculos blancos; registro tomado de la Fig. 18C) y las mezclas con tapsigargina más PMA (TP; círculos grises) o tapsigargina más quercitrina (TQ; círculos negros). Los datos son medias \pm e. s. del número de experimentos entre paréntesis.

2.6. Efecto de la queleritrina y su combinación con tapsigargina sobre la $[Ca^{2+}]_{RE}$ en células PC12

En esta sección se hicieron experimentos con células PC12 con el mismo protocolo ilustrado en la Fig. 20A. Una vez rellenado el RE y alcanzada una meseta estable se introdujo en el sistema de perfusión el inhibidor de la PKC queleritrina solo (1 μ M; **Fig. 27A**) o en combinación con tapsigargina (1 μ M y 0,1 μ M respectivamente; **Fig. 27B**). Entonces, se registró la $[Ca^{2+}]_{RE}$ (ordenada; μ M) hasta el final del experimento. En los paneles A y B de la Fig. 27 también se representa el curso temporal del consumo de AEQ reticular (%: ordenada derecha). Al igual que en CCB, se representa la $[Ca^{2+}]_{RE}$ normalizada (**Fig. 27C**) para facilitar la comparación entre el efecto de los tratamientos entre ellos y con el control (las curvas control y tapsigargina tomadas de la Fig. 20C se han vuelto al representar en esta figura para facilitar su comparación).

La ausencia de actividad PKC, cuando se inhibe con queleritrina (Quel; círculos gris claro), prácticamente no produce cambios sobre la $[Ca^{2+}]_{RE}$ con respecto al control (círculos blancos). Puede observarse que ambas curvas se acompañan durante los cuatro primeros min de incubación; a partir de aquí, la curva control se separa de la curva queleritrina (Fig. 27C). Cuando la tapsigargina y la queleritrina se administran simultáneamente (TQ; círculos gris oscuro), el RE empieza a vaciarse de forma parecida a cuando se superfunde tapsigargina sola, pero más lentamente (Fig. 27C). Es decir, la mezcla tapsigargina más queleritrina necesita casi 1 min más de exposición que la tapsigargina para vaciar el RE un 50%. Al final del registro, la $[Ca^{2+}]_{RE}$ adquiere un valor de un $23,9 \pm 4,1\%$ (valor para la curva tapsigargina en el mismo instante: $8,3 \pm 2,81\%$). Así, en células PC12 la queleritrina revierte parcialmente el vaciado del RE evocado por tapsigargina.

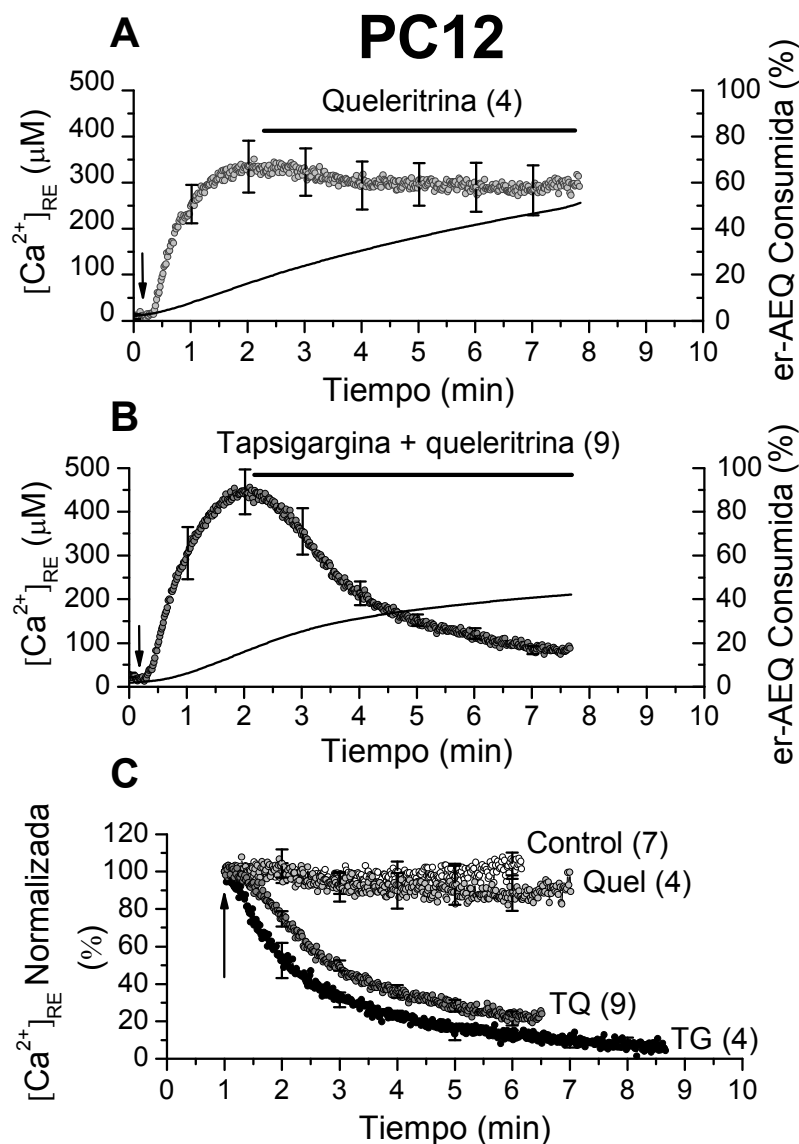


Figura 27: Curso temporal de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ en células PC12, infectadas con ecuorina dirigida al RE, tratadas con queleritrina sola o en combinación con tapsigargina. Los experimentos de los paneles A y B se iniciaron en condiciones de $0Ca^{2+}/EGTA$ y tras registrar la curva basal durante unos segundos se superfundió con una solución de KH rica en Ca^{2+} (1 mM; flecha descendente). La $[Ca^{2+}]_{RE}$ se expresa en μM (ordenada izquierda). En la ordenada derecha se representa el % de ecuorina reticular consumida a lo largo del tiempo (min; abscisa). Las células se trataron con queleritrina (1 μM ; círculos gris claro; panel A) o con la mezcla tapsigargina más queleritrina (0,1 μM y 1 μM respectivamente; círculos gris oscuro; panel B). Los tratamientos se introdujeron después de alcanzar la meseta de rellenado reticular (barra horizontal). Para permitir la comparación entre el efecto de los tratamientos (panel C), la $[Ca^{2+}]_{RE}$ correspondiente a las poblaciones experimentales reflejadas en los paneles A y B se normalizó con respecto al instante previo a la introducción del tratamiento correspondiente (flecha ascendente). A dicho instante, se le asignó el 100%. La $[Ca^{2+}]_{RE}$ está expresada en % (ordenada) frente al tiempo en minutos (abscisa). Las curvas control (círculos blancos) y tapsigarginas (TG; círculos negros) representadas en la Fig. 20C se vuelven a mostrar en la Fig. 27C para facilitar su comparación con las curvas queleritrina (Quel; círculos gris claro) y tapsigargina más queleritrina (TQ; círculos grises) ANOVA a intervalos de 1 min (entre el minuto 2-6; panel C): $p \leq 0,05$ curva tapsigargina más queleritrina con respecto a la curva tapsigargina. Los datos son medias \pm e. s. del número de experimentos entre paréntesis.

2.7. Efecto de los moduladores de la PKC, la tapsigargina y su combinación con PMA o queleritrina sobre los cambios en la $[Ca^{2+}]_c$ basal o evocados por cafeína

Como extensión de los experimentos ilustrados en la Fig. 21, también diseñamos experimentos para explorar si existía una correlación entre el efecto de la tapsigargina y la actividad PKC, sobre la $[Ca^{2+}]_c$ y el curso temporal de la secreción y los cambios en la $[Ca^{2+}]_{RE}$. Es decir, los cambios en la $[Ca^{2+}]_{RE}$ evocados por PMA y queleritrina solos o en combinación con tapsigargina, deberían traducirse en cambios en la $[Ca^{2+}]_c$ basal y/o evocados por cafeína y, en última instancia, en efectos sobre la respuesta secretora. Así, en esta sección se muestran experimentos fluorimétricos en célula cromafín bovina aislada cargada con la sonda Fluo-4, para medir la $[Ca^{2+}]_c$, a temperatura ambiente.

En la **Fig. 28A** se vuelve a representar el experimento prototipo control ilustrado y explicado en la Fig. 21A (sección 1.7 de Resultados) para recordar las pautas del protocolo utilizado. A partir de cada experimento prototipo individual, el nivel de la $[Ca^{2+}]_c$ observado previo a la introducción de un tratamiento dado (minuto 2 en la Fig. 28A) se normalizó a 1. El resto de los datos (referidos a los niveles de la $[Ca^{2+}]_c$ basales o evocados por cafeína) se normalizaron con respecto a este valor control. Por lo tanto, en las gráficas 17C-F se representa la señal de Ca^{2+} citosólica normalizada (ordenadas), a lo largo del tiempo (abscisas).

En las Fig. 28C y 28E están representados los cambios de la $[Ca^{2+}]_c$ basal observados durante los periodos de incubación de 10 min con los distintos tratamientos, que preceden a la señal de Ca^{2+} evocada por cafeína; a saber, PMA 0,1 μ M; queleritrina 1 μ M (Fig. 28C); tapsigargina 0,1 μ M y las mezclas tapsigargina más PMA (0,1 μ M) y tapsigargina más queleritrina (0,1 y 1 μ M respectivamente; Fig. 28E).

La activación de la PKC con el éster de forbol PMA favorece el aclaramiento del Ca^{2+} citosólico desde el inicio de su superfusión hasta los 6 minutos de incubación (minuto 8), momento en el que la señal se estabiliza y

deja de descender. Cuando se inhibe dicha actividad enzimática con queleritrina, la señal citosólica de Ca^{2+} , a partir de los 2 primeros min de exposición, empieza a separarse de la señal evocada por el PMA, hasta alcanzar la curva control (entre los 5 y los 6 min de incubación) para mantenerse en una meseta hasta la introducción de la cafeína (**Fig. 28C**). Por otro lado, el PMA disminuyó en un 72% el pico de Ca^{2+} citosólico evocado por cafeína (**Fig. 28B**) a la vez que enlenteció su cinética de ascenso (**Fig. 28D**). La queleritrina, sin embargo, no afectó a la respuesta evocada por cafeína (**Fig. 28B, D**).

En la **Fig. 28E** se ha vuelto a representar el registro tapsigargina (TG) para facilitar su comparación. Así, a la luz de los resultados obtenidos en presencia de Ca^{2+} extracelular, parece que la actividad PKC (**Fig. 28E**; mezcla PMA más tapsigargina: PMA/TG), modula tanto la fase ascendente como la caída tardía de la señal de Ca^{2+} citosólica evocada por tapsigargina ya que desplaza hacia la izquierda la señal en el primer caso (sólo tarda 1 min en alcanzar su punto máximo; incremento de 3,52 veces) y acentúa la caída en el segundo. En estas células tratadas con la mezcla tapsigargina más PMA, el pico de cafeína disminuyó, con respecto al control, a un nivel similar a aquel observado en células solamente tratadas con tapsigargina; sin embargo, la caída del transiente de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ fue más rápida (**Fig. 28B, F**), de acuerdo con la idea de que el PMA acelera el aclaramiento del Ca^{2+} citosólico.

La inhibición de la PKC con queleritrina (**Fig. 28E**; mezcla queleritrina más tapsigargina: Quel/TG) prolonga en el tiempo la fase ascendente de la señal de Ca^{2+} citosólica característica de la tapsigargina, ya que la señal tarda 3,5 min (más del doble de tiempo) en alcanzar su meseta. En contraposición al PMA, la queleritrina no sólo no acentúa la caída de la señal de Ca^{2+} citosólica evocada por tapsigargina sino que, sorprendentemente, anula la caída en su totalidad generándose una meseta de Ca^{2+} sostenida en el tiempo, elevada unas 4,5 veces sobre la basal. Además, la respuesta a cafeína fue significativamente mayor (**Fig. 28B, F**) lo que sugiere que la queleritrina estaría previniendo parcialmente la depleción del Ca^{2+} del RE evocada por tapsigargina.

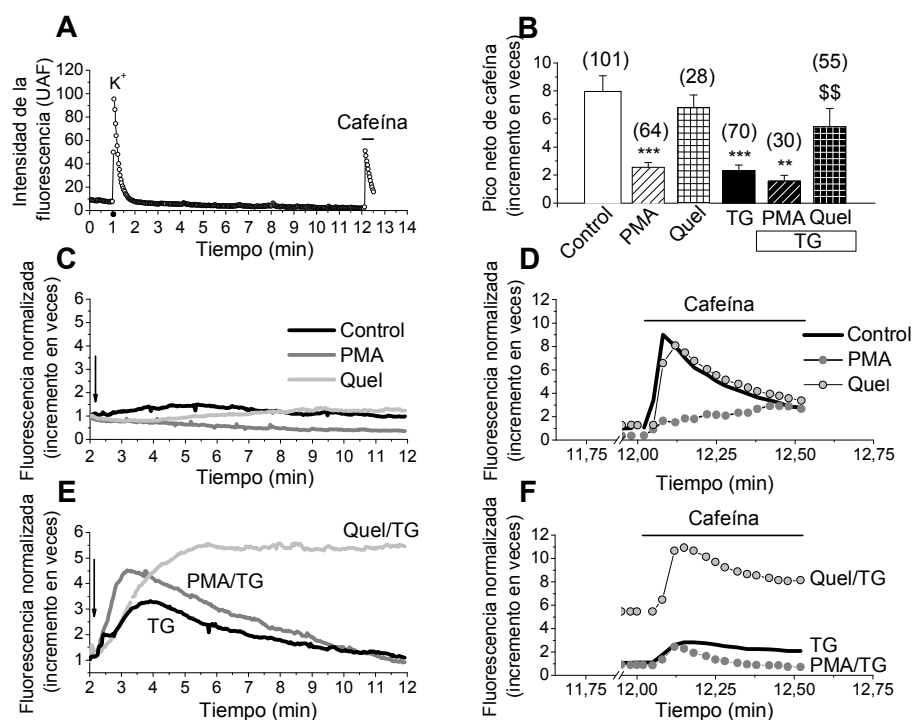


Figura 28: Cambios en la [Ca²⁺]_i basal o evocada por cafeína inducidos por el PMA y la queleritrina (Quel) administrados solos o en combinación con la tamsigargina (TG). La célula cromafín bovina aislada, se superfundió con una solución de KH que contiene 2 mM de Ca²⁺ (solución estándar KH/2Ca²⁺). El panel A muestra un experimento prototipo control en el que se representa la señal de Ca²⁺ citosólica (en unidades arbitrarias de fluorescencia: UAF; ordenada) con respecto al tiempo en minutos (abscisa). Así, tras un periodo de superfusión inicial de 1 min, necesario para equilibrar la señal de Ca²⁺ citosólico basal, con una solución de KH/2Ca²⁺, cada célula cromafín bovina se somete a un pulso de 100K⁺/2Ca²⁺ de 2 s de duración (punto negro en la base del transiente de Ca²⁺) y posteriormente a un pulso de cafeína de 30 s (50 mM; barra horizontal). En cada célula cromafín, los cambios en la [Ca²⁺]_i, observados previos a la introducción de un tratamiento dado (minuto 2), se normalizaron a 1. El resto de puntos se normalizaron con respecto a dicho valor. El panel B muestra datos promedio (± e.s. del número de células escrito entre paréntesis) referidos a las respuestas evocadas por cafeína en células control o en células pretratadas durante un periodo de 10 min con 0,1 μM de PMA, 1 μM de queleritrina (Quel), 0,1 μM de tamsigargina (TG), o las mezclas PMA más tamsigargina (PMA/TG; 0,1 μM) y queleritrina más tamsigargina (Quel/TG; 1 μM y 0,1 μM respectivamente). Prueba *t* de Student: ** *p* ≤ 0,01; *** *p* ≤ 0,001 con respecto al control. \$\$ *p* ≤ 0,01 con respecto a la TG. Los cambios referidos a la [Ca²⁺]_i basal (paneles C y E) y a las respuestas evocadas por cafeína (paneles D y F) se monitorizaron en CCB superfundidas con una solución control estándar (Control) o suplementada con un tratamiento dado (flecha descendente; véase panel B). Los registros de los paneles D y F son continuación de aquellos representados en los paneles C y E respectivamente. Nótese que presentan escalas diferentes para facilitar su visualización. Los resultados representados en los paneles C-F son promedios del número de células escrito entre paréntesis en el panel B, obtenidos a partir de 2 a 4 cultivos primarios de CCB.

3. CONTRIBUCIÓN DE LOS CCDV A LA EXOCITOSIS EN CCB TRATADAS CON OUABAÍNA: TERCER OBJETIVO

3.1. Efecto de la ouabaína sobre las respuestas secretoras inducidas por pulsos de $2Ca^{2+}$ en células cromafines bovinas

Para explorar el tercer objetivo de esta tesis, se analizó la respuesta de liberación de catecolaminas evocada por pulsos de 2 mM de Ca^{2+} ($2Ca^{2+}$), de 10 s de duración, aplicados a intervalos de 3 min, en CCB superfundidas con una solución de KH libre de Ca^{2+} ($0Ca^{2+}$ nominal). Este protocolo ya lo utilizaron Esquerro y col. (1980) en glándula adrenal de gato. Ellos concluyeron que en estas condiciones el NCX del plasmalema trabaja en su forma reversa; por tanto, al introducir los pulsos de $2Ca^{2+}$, el Ca^{2+} entra en la célula por el intercambiador. Nosotros, quisimos reexplorar esta hipótesis y quizá ampliarla mediante una nueva estrategia.

En la **Fig. 29A** se ilustra un experimento control en donde los pulsos de $2Ca^{2+}$ producen pequeñas espigas en torno a los 25-30 nA, de amplitud que se mantienen estables a lo largo de los 24 pulsos aplicados (72 min de experimento). Los experimentos control se hicieron en paralelo con otros (**Fig. 29B**) en los que tras aplicar cuatro pulsos de $2Ca^{2+}$ se introduce el inhibidor de la bomba de Na^+ ouabaína (10 μ M; Aunis y García, 1981). Tres minutos después, las respuestas secretoras evocadas por pulsos de $2Ca^{2+}$ empiezan a aumentar gradualmente hasta alcanzar una meseta 48 min más tarde (pulso número 20). En la **Fig. 29C** se representan las respuestas promedio control o en presencia de ouabaína 10 μ M, calculadas a intervalos de 3 min. Compárense las respuestas secretoras en células control con aquellas obtenidas en células superfundidas con ouabaína que llegan a ser unas nueve veces más grandes tras aplicar 19 pulsos de $2Ca^{2+}$. Nótese que las respuestas secretoras control permanecen bajas durante todo el experimento.

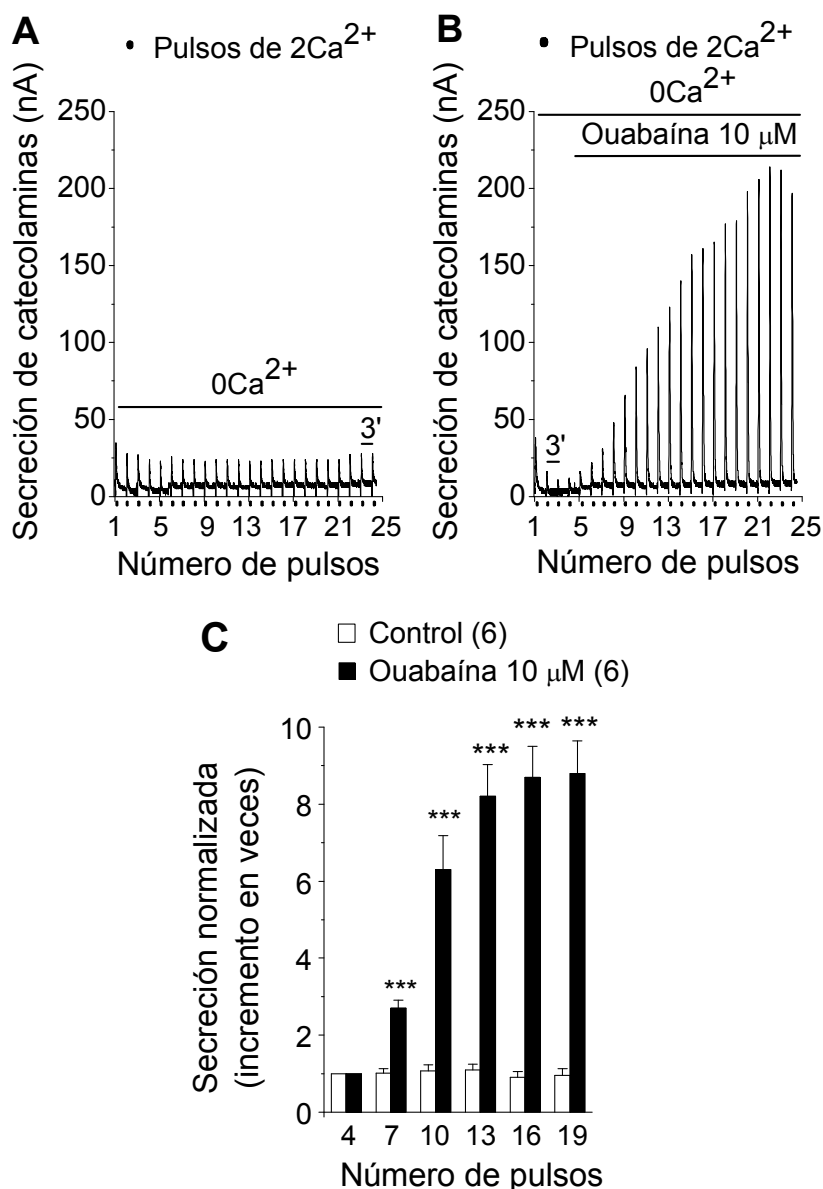


Figura 29: La ouabaína aumenta paulatinamente las respuestas secretoras evocadas por pulsos repetidos de $2Ca^{2+}$ en CCB. Las células se superfundieron con una solución de KH en ausencia de Ca^{2+} extracelular ($0Ca^{2+}$; barra superior) mediante un sistema de perfusión rápido a temperatura ambiente. Pasados 10 min para permitir que se equilibrase la señal, las CCB se estimularon con una solución de KH en presencia de 2 mM de Ca^{2+} (pulsos de $2Ca^{2+}$; puntos negros), durante 10 s, a intervalos de 3 min (3'). En el panel **A** se representan las espigas secretoras que resultan de la oxidación de las catecolaminas en nA (ordenada), evocadas por pulsos de $2Ca^{2+}$ repetidos (abscisa). Para realizar el experimento que se muestra en el panel **B** se utiliza el mismo protocolo de estimulación que en la Fig. 29A. Tras aplicar cuatro pulsos de $2Ca^{2+}$ se introduce ouabaína $10 \mu M$ en el sistema de perfusión hasta el final del experimento (barra). El panel **C** muestra las respuestas secretoras promedio normalizadas (expresadas como la amplitud de cada espiga; ordenada) durante la aplicación de 24 pulsos de $2Ca^{2+}$ (abscisa). El cuarto pulso previo a la introducción de la ouabaína se normalizó a 1. El resto de los picos de cada experimento individual se normalizó con respecto a dicho valor. Los resultados son promedios \pm e. s. del número de experimento escrito entre paréntesis en el panel C, realizados a partir de al menos 3 cultivos diferentes. Prueba t de Student: * * * $p \leq 0.001$ con respecto a su control correspondiente en el mismo instante.

3.2. Efecto del FPL 64176 y de los bloqueantes de los distintos subtipos de los CCDV, nifedipino, ω -conotoxina GVIA y ω -agatoxina IVA sobre la potenciación de las respuestas secretoras inducidas por ouabaína

Una vez caracterizadas las repuestas secretoras evocadas por pulsos de $2Ca^{2+}$ en presencia de ouabaína, se utilizaron bloqueantes específicos para encontrar el CCDV involucrado en la potenciación de dichas respuestas. Los experimentos de las Fig. 30A y 30B se realizaron con el mismo protocolo que se describe en la Fig. 29B. Así, una vez que las respuestas secretoras evocadas por pulsos de $2Ca^{2+}$ han alcanzado su meseta tras la potenciación con ouabaína, el bloqueante de los CCDV del subtipo L, nifedipino (10 μ M), se introduce entre los pulsos 20 y 21 en el sistema de perfusión en presencia de ouabaína. Como consecuencia de esta acción, la magnitud de las respuestas secretoras vuelve inmediatamente a sus valores iniciales (**Fig. 30A**). Por el contrario, el activador de dicho subtipo de CCDV, FPL 64176 (0,3 μ M), sigue aumentando la secreción por encima de la potenciación observada en presencia de ouabaína (**Fig. 30B**). En el histograma de la **Fig. 30C**, se representan valores promedio que muestran que tras la aplicación de veinte pulsos de $2Ca^{2+}$, la ouabaína vuelve a producir un aumento de la secreción en torno al 10% ($11,3 \pm 1,7$ %). Efectivamente, la introducción de 10 μ M de nifedipino devuelve las respuestas secretoras a sus valores iniciales. En contraposición, el FPL 64176 aumenta del orden de 3 veces (hasta el $33 \pm 2,1$ %) la potenciación provocada por la ouabaína.

La Fig. 31 muestra, a modo de ejemplo, un par de experimentos en los que las CCB se preincubaron durante 1 h con una solución de KH $0Ca^{2+}$ en presencia de ω -conotoxina GVIA (1 μ M) y ω -agatoxina IVA (1 μ M), para bloquear irreversiblemente los CCDV de los subtipos N y P/Q respectivamente. En estas células la ouabaína produjo una potenciación de las respuestas secretoras evocadas por pulsos de $2Ca^{2+}$ similar a cuando las CCB no se habían preincubado con las ω -toxinas (compare las Fig. 29B y **31A**). De

igual manera, el nifedipino bloqueó la potenciación por ouabaína (**Fig. 31B**). En el histograma de la **Fig. 31C**, se representan valores promedio que muestran que, efectivamente, tras haber preincubado las CCB con la mezcla de ω -toxinas, la ouabaína (después de aplicar diecisiete pulsos de $2Ca^{2+}$), vuelve a producir un aumento de la secreción en torno al 10% ($8,8 \pm 0,6$ %). Además, la introducción de $10 \mu\text{M}$ de nifedipino devuelve las respuestas secretoras a sus valores iniciales. Estos resultados sugieren de manera convincente que la facilitación de la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV del subtipo L podría ser responsable de la potenciación de la secreción por ouabaína, sin que los CCDV de los subtipos N y P/Q jugaran ningún papel.

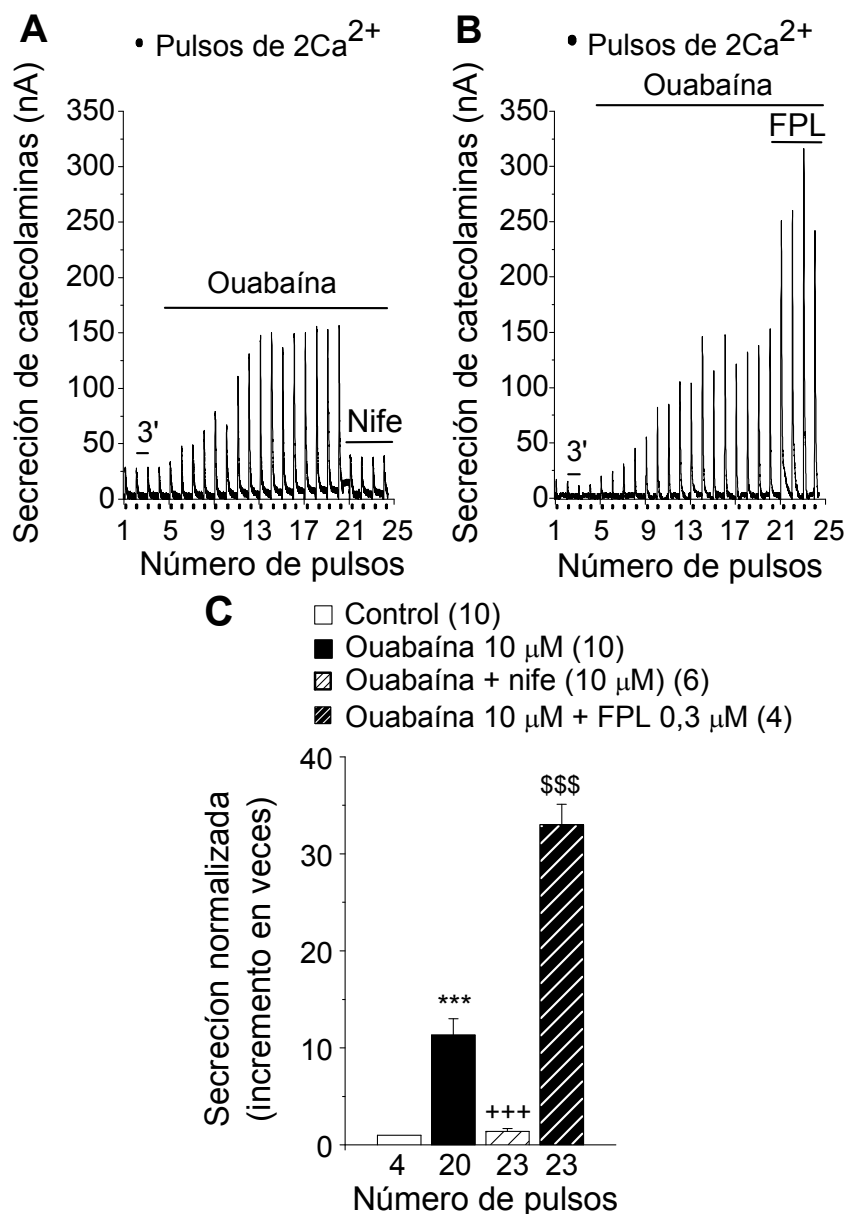


Figura 30: El bloqueante de los CCDV del subtipo L nifedipino inhibe, y su activador FPL 64176 aumenta la potenciación por ouabaína evocada por pulsos repetidos de $2Ca^{2+}$ en CCB. Los experimentos de los paneles A y B se realizaron y representaron como se describe en la Fig. 29B. En el experimento que se muestra en el panel A las células se sometieron a cuatro pulsos de $2Ca^{2+}$ tras los cuales se introdujo la ouabaína (10 μ M) hasta el final del registro (barra). Después de aplicar 20 pulsos de $2Ca^{2+}$ en presencia de ouabaína se introdujo en el sistema de perfusión (como lo indica la barra correspondiente), el bloqueante del subtipo L de los CCDV nifedipino (nife; 10 μ M). El panel B muestra el mismo tipo de experimento pero introduciendo sobre la ouabaína el activador del subtipo L de los CCDV FPL 64176 (FPL; 0,3 μ M). En el panel C se representan las respuestas secretoras promedio normalizadas como en la Fig. 29C. Los resultados son promedios \pm e. s. del número de experimento escrito entre paréntesis en el panel C, realizados a partir de al menos 3 cultivos diferentes. ANOVA: * * * $p \leq 0,001$, ouabaína (barra negra) con respecto al control (barra blanca); +++ $p \leq 0,001$, ouabaína más nifedipino (barra blanca a rayas) en comparación a la ouabaína sola; \$\$\$ $p \leq 0,001$, ouabaína más FPL 64176 (barra negra a rayas) con respecto a la ouabaína sola.

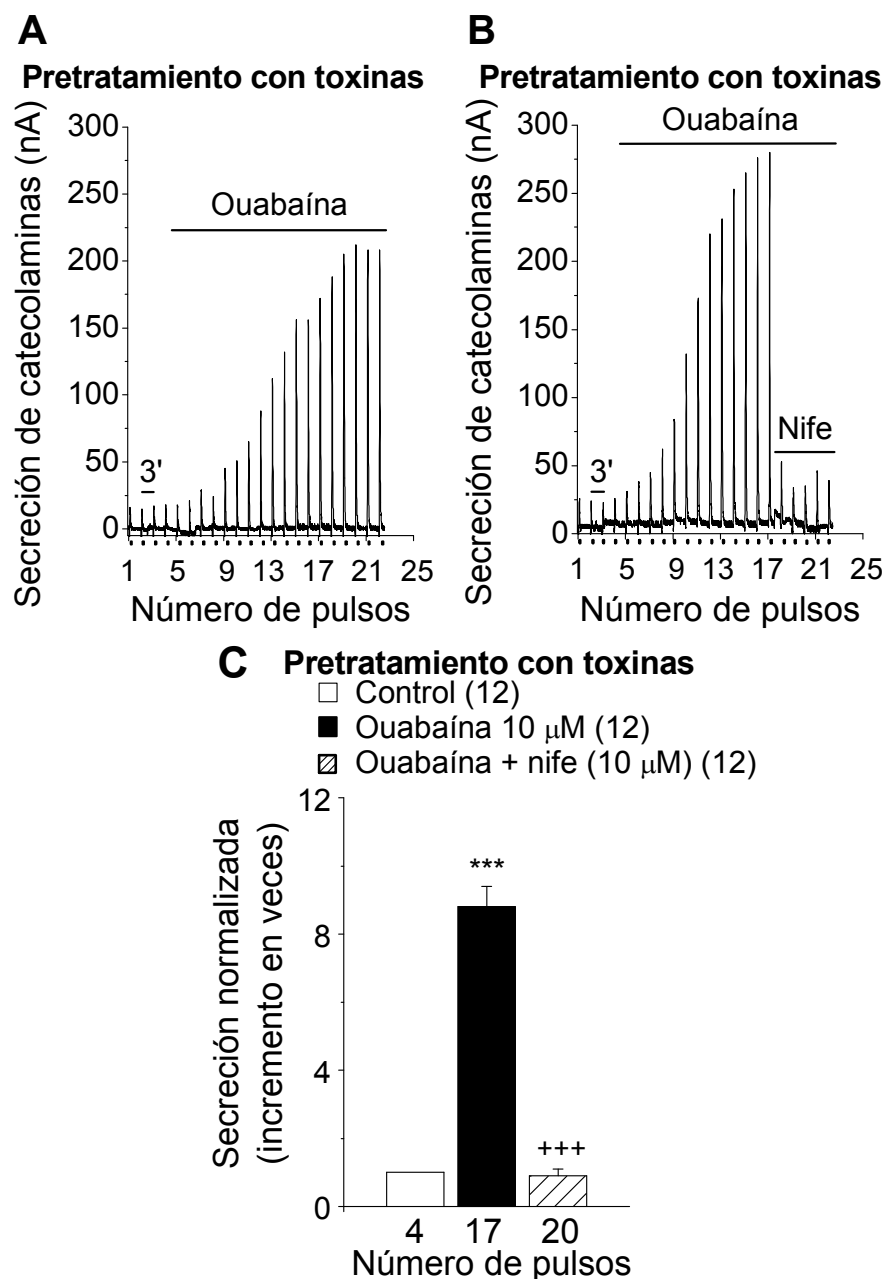


Figura 31: El bloqueo irreversible de los CCDV de los subtipos N y P/Q no afecta a la potenciación por ouabaína evocada por pulsos de 2Ca^{2+} repetidos en CCB.

Las células se preincubaron durante 1 h en una solución de KH que contenía una mezcla a base de 1 μM de ω -conotoxina GVIA y 1 μM de ω -agatoxina IVA (pretratamiento con toxinas). A continuación, los experimentos de los paneles A y B se realizaron y representaron como se describe en la Fig. 29B. En el experimento que se muestra en el panel A las células se sometieron a cuatro pulsos de 2Ca^{2+} tras los cuales se introdujo la ouabaína (10 μM) hasta el final del registro (barra). El panel B muestra el mismo tipo de experimento pero, después de aplicar 17 pulsos de 2Ca^{2+} en presencia de ouabaína, se introdujo en el sistema de perfusión (como lo indica la barra correspondiente), el bloqueante del subtipo L de los CCDV nifedipino (nife; 10 μM). En el panel C se representan las respuestas secretoras promedio normalizadas como en la Fig. 29C. Los resultados son promedios \pm e. s. del número de experimento escrito entre paréntesis en el panel C, realizados a partir de al menos 3 cultivos diferentes. ANOVA: * * * $p \leq 0,001$, ouabaína (barra negra) con respecto al control (barra blanca); +++ $p \leq 0,001$, ouabaína más nifedipino (barra blanca a rayas) en comparación a la ouabaína sola.

3.3. Efecto del nifedipino sobre la potenciación por ouabaína de los transientes de Ca^{2+} inducidos por pulsos de $2Ca^{2+}$

La **Fig. 32A**, muestra cómo los pulsos de $2Ca^{2+}$ aplicados a intervalos de 3 min producen pequeñas elevaciones en la $[Ca^{2+}]_c$ en torno a las 10 UAF de amplitud. Dichos transientes de Ca^{2+} citosólico son reproducibles durante al menos un periodo de 30 min de estimulación con pulsos de $2Ca^{2+}$ (datos no mostrados). Así, tras aplicar dos pulsos de $2Ca^{2+}$ se introduce una solución de KH en presencia de 10 μ M de ouabaína lo que favorece de forma inmediata el aumento de las amplitudes de los transientes de Ca^{2+} hasta unas tres veces (Fig. 32A).

En la **Fig. 32B** se muestra un experimento similar al del panel A. Sin embargo, en esta figura, tras aplicar cinco pulsos de $2Ca^{2+}$ en presencia de ouabaína, se introduce en el sistema de perfusión una solución de KH con la mezcla ouabaína más nifedipino (10 μ M). Al igual que en los experimentos de secreción el nifedipino redujo los transientes de Ca^{2+} citosólico a valores incluso por debajo de los valores control previos a la introducción de la ouabaína. Además, al lavar el nifedipino las amplitudes de las respuestas evocadas por pulsos de $2Ca^{2+}$ se recuperaron, percibiéndose de nuevo la facilitación por ouabaína.

En el histograma de la **Fig. 32C** se representan valores promedio que muestran que la ouabaína (tras aplicar cinco pulsos de $2Ca^{2+}$) produce un aumento significativo en las amplitudes de los transientes de Ca^{2+} en torno a 1,5 veces con respecto a la respuesta control. Además, la introducción de 10 μ M de nifedipino reduce los transientes de Ca^{2+} citosólico y su lavado los restablece inmediatamente a sus valores iniciales, también de forma estadísticamente significativa.

Por lo tanto, estos experimentos de medición de la $[Ca^{2+}]_c$ con fluo-4 avalaron la conclusión obtenida a partir de los experimentos de secreción, es decir, que la ouabaína facilita la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV del subtipo L.

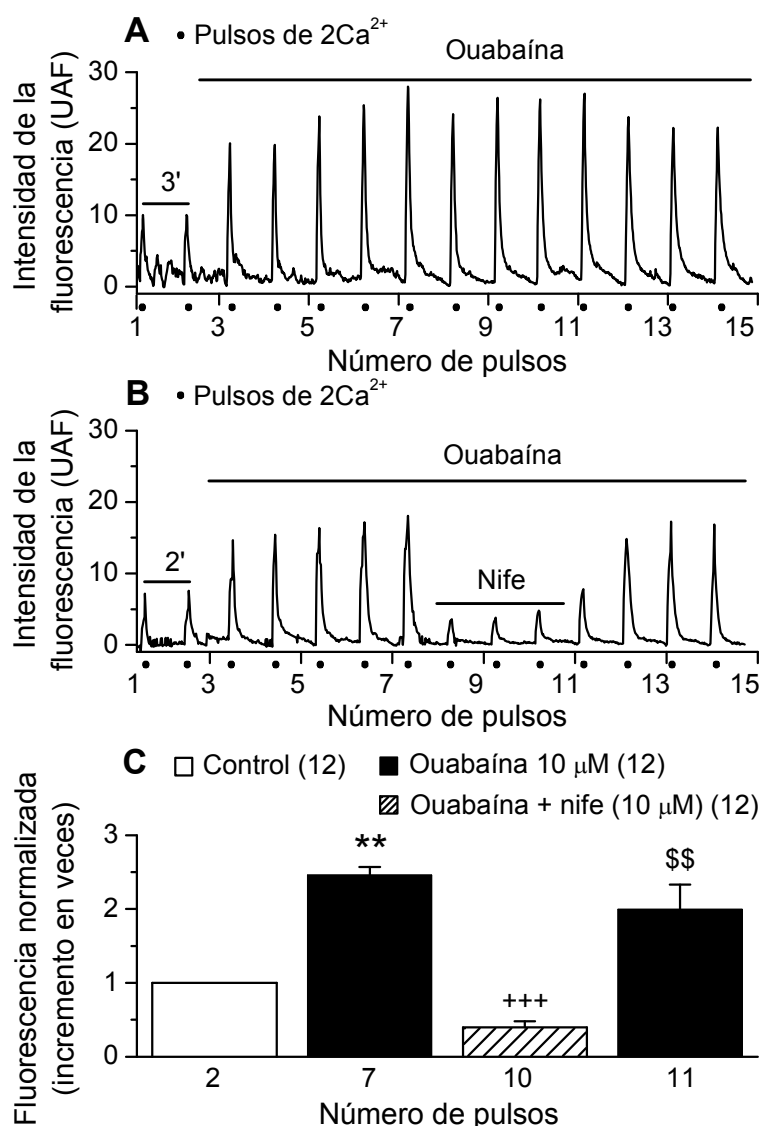


Figura 32: El bloqueante de los CCDV del subtipo L nifedipino inhibe de manera reversible la potenciación por ouabaína evocada por pulsos de $2Ca^{2+}$ repetidos en CCB. Las CCB cargadas con la sonda fluorescente fluo-4 se superfundieron con una solución de KH en ausencia de Ca^{2+} extracelular ($0Ca^{2+}$ nominal?) mediante un sistema de perfusión rápido a temperatura ambiente. El panel **A** muestra un registro original en el que las células se estimularon con una solución de KH en presencia de 2 mM de Ca^{2+} (pulsos de $2Ca^{2+}$; puntos negros), durante 10 s, a intervalos de 3 min ($3'$). Tras aplicar dos pulsos de $2Ca^{2+}$ se introdujo la ouabaína (10 μ M) hasta el final del registro (barra). El panel **B** muestra el mismo tipo de experimento pero después de aplicar 5 pulsos de $2Ca^{2+}$ en presencia de ouabaína se introdujo en el sistema de perfusión (como lo indica la barra correspondiente), el bloqueante del subtipo L de los CCDV nifedipino (nife; 10 μ M) que se lava tres pulsos más tarde. Nótese que en el panel **B** los pulsos de $2Ca^{2+}$ se aplican cada 2 min ($2'$) para poder alargar el experimento y estudiar la reversibilidad del nifedipino sin que decayeran los transientes de Ca^{2+} . En cada célula cromafín, los cambios en la $[Ca^{2+}]_c$ observados previos a la introducción de la ouabaína (pulso 2) se normalizaron a 1. El resto de puntos se normalizaron con respecto a dicho valor. En el panel **C** se representan datos promedio normalizados \pm e. s. del número de experimento escrito entre paréntesis en el panel **C**, realizados a partir de al menos 3 cultivos diferentes. ANOVA: * * * $p \leq 0,001$, ouabaína (barra negra) con respecto al control (barra blanca); +++ $p \leq 0,001$, ouabaína más nifedipino (barra blanca a rayas) en comparación a la ouabaína sola; \$\$ $p \leq 0,01$, ouabaína después del lavado del nifedipino (barra negra, pulso 11) con respecto a la mezcla ouabaína más nifedipino.

D *SCUSIÓN*

DISCUSIÓN

Referente a los dos primeros objetivos de esta tesis, se sabe que en las CCB el Ca^{2+} del RE y la actividad PKC regulan el tráfico vesicular entre las poblaciones RP y RRP (Smith 1999); sin embargo, todavía hay aspectos no explorados sobre cómo interaccionan o cómo afectan a la plasticidad de la maquinaria exocitótica. En cuanto al tercer objetivo de estudio, se quiso explorar la contribución de los distintos subtipos de CCDV al control de la entrada de Ca^{2+} para disparar el proceso exocitótico de liberación de catecolaminas, durante la despolarización de CCB superfundidas con ouabaína.

Ya en un trabajo del grupo de 1997, Lara y sus colaboradores observaron que al perfundir poblaciones de CCB con una solución libre de Ca^{2+} (0Ca^{2+} nominal), cuando se depletaba el depósito de Ca^{2+} del RE con cafeína las respuestas secretoras evocadas por K^+ disminuían.

Posteriormente, otros autores estudiaron el efecto de la depleción del depósito de Ca^{2+} del RE de CCB pretratadas con tapsigargina sobre las respuestas de liberación de catecolaminas evocadas por estímulos despolarizantes consecutivos; dicho estudio produjo resultados contradictorios. Mollard y col., (1995) no obtuvieron ningún efecto, Pan y Fox, (2000) observaron un aumento inicial seguido de la depresión de la respuestas secretoras y, finalmente, Cuchillo-Ibáñez y col (2002) sólo obtuvieron un aumento de dichas respuestas. Estos hallazgos contradictorios quizá se deban a las diferentes técnicas y protocolos utilizados, para medir la liberación de catecolaminas a partir de células control o con su depósito de Ca^{2+} del RE depletado. Por ejemplo, la temperatura ambiente y las altas concentraciones de tapsigargina (1-3 μM). Además, estos experimentos se llevaron a cabo con células pretratadas durante al menos 1 h, lo que impedía seguir el curso temporal de la depleción del Ca^{2+} del RE y discernir si afectaba inmediatamente a la secreción o no.

En esta tesis, los experimentos se diseñaron para correlacionar el grado de relleno del depósito de Ca^{2+} del RE y las respuestas secretoras evocadas por pulsos repetidos de K^+ , a intervalos de 1 min. Parece que a 37°C y bajo estas condiciones experimentales, las células control fueron capaces de mantener respuestas secretoras saludables durante 30 pulsos de K^+ (Fig. 12 y 13). Esto indica que cuando el depósito de Ca^{2+} del RE de las células cromafines está lleno o intacto, el flujo de vesículas cromafines se mantiene para asegurar dichas respuestas secretoras saludables durante largos periodos de estimulación repetida (**Fig. 33A**). Además, se utilizó una concentración de tapsigargina al menos 10 veces menor ($0,1 \mu\text{M}$), aplicada una vez que las células ya se habían sometido a pulsos de K^+ . Los experimentos muestran que $0,1 \mu\text{M}$ de tapsigargina provoca una caída gradual de las respuestas secretoras (Fig. 14A). Sin embargo, dicha caída sólo se hace visible una vez que se alcanza el máximo nivel de depleción de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ evocada por tapsigargina, y cuando la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ concomitante ha vuelto a sus niveles basales (**Fig. 33B**).

El hecho de que la secreción no cayera inmediatamente después de la introducción de la tapsigargina en el sistema de perfusión, implica que el tráfico vesicular se mantiene durante el periodo inicial de exposición. Dicho tráfico debería mantenerse gracias a la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ durante los primeros minutos de tratamiento con tapsigargina (Fig. 21B). A este respecto, se sabe que en CCB (con fijación de voltaje) a las que se les aplicaba un pulso despolarizante, la liberación de Ca^{2+} del RE en el citosol inducida por histamina facilitaba el flujo vesicular hacia la población RRP anclada en el subplasmalema para potenciar la exocitosis (von Rüden y Neher, 1993). Sin embargo, en esta tesis la liberación de Ca^{2+} del RE evocada por tapsigargina, que aumentó la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$, no produjo un aumento inicial de la secreción (Fig. 33B). En vez de eso, las respuestas secretoras se estabilizaron del pulso 3 al 9 (Fig. 14A y 22B). Sólo el BHQ produjo un aumento transitorio inicial en la secreción evocada por pulsos de K^+ (Fig. 14C) probablemente debido a la alta

concentración elegida (10 μM). Debe considerarse que el depósito de Ca^{2+} sensible a BHQ es un subconjunto del depósito de Ca^{2+} sensible a tapsigargina (Robinson y col., 1992), quizás ello pueda explicar la diferencia de comportamiento de ambos compuestos en lo que se refiere a la modulación de las respuestas secretoras inducidas por pulsos repetidos de K^+ .

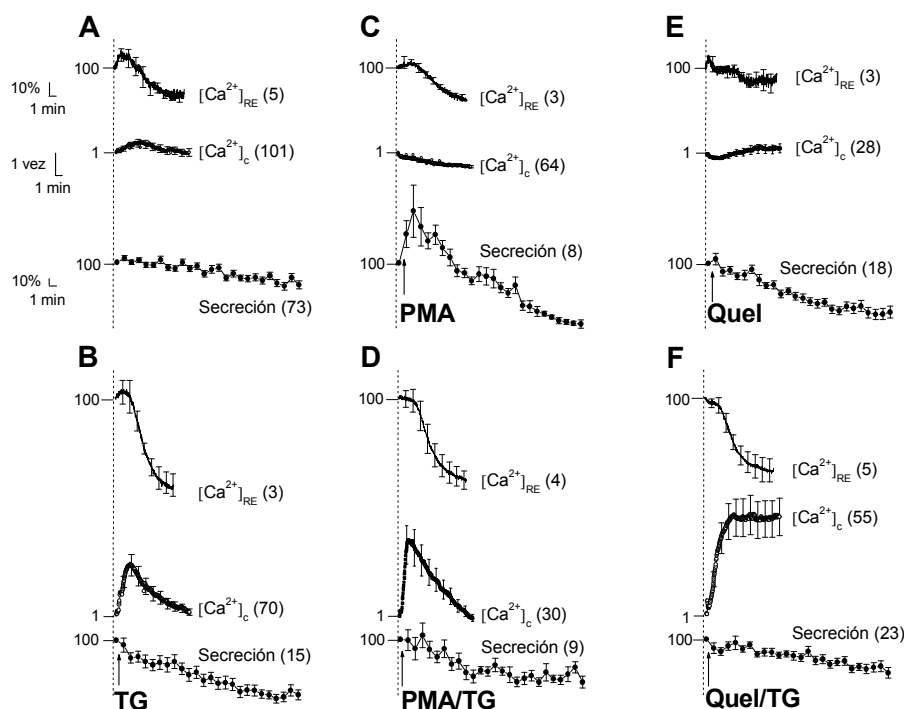


Figura 33: Curso temporal de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$, en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ basal y en las respuestas secretoras evocadas por pulsos de K^+ repetidos en células control o tratadas con tapsigargina (TG), PMA, queleritrina (Quel) y las mezclas tapsigargina más PMA (PMA/TG) o tapsigargina más queleritrina (Quel/TG). En esta figura las curvas normalizadas relativas a la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ (recogidas de las Fig. 18C, 25C y 26C), la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ basal (recogidas de las Fig. 21B, 28C y 28E) y las respuestas secretoras (recogidas de las Fig. 14A, 22 y 23) se han representado juntas para facilitar su comparación. Las células control (panel A) se probaron en paralelo con células tratadas (flecha ascendente) con 0,1 μM de TG (panel B), 0,1 μM de PMA (panel C), 1 μM de Quel (panel E) y las mezclas PMA/TG (0,1 μM ; panel D) o Quel/TG (1 y 0,1 μM respectivamente; panel F). Los datos son medias \pm e.s del número de experimentos entre paréntesis.

Por otro lado, en presencia de Ca^{2+} extracelular (2 mM) la tapsigargina provocó una caída tardía en la secreción; esta caída fue significativamente mayor (Fig. 15 y 17A) que cuando la misma solución se superfundía en ausencia de Ca^{2+} (0Ca^{2+} nominal; Fig. 15 y 17B). Es difícil explicar este resultado teniendo en cuenta que nuestro grupo es el primero en estudiar, en

CCB, la correlación entre el depósito sensible a tapsigargina y la secreción **mientras** que el depósito de Ca^{2+} del RE se está depletando. **Durante la secreción temprana (Fig. 34A)**, al inhibir la SERCA con tapsigargina el depósito de Ca^{2+} sensible a tapsigargina puede salir del RE tanto vía RyR (Wei y Perry, 1996; Yoshida y col., 2006) como vía IP_3R (Robinson y col., 1992). Ambas vías van a contribuir tanto al fenómeno de CICR como a la activación de la CCE (en presencia de Ca^{2+} extracelular; Berridge, 1995; McKenzie y Marley, 2002). A ese respecto Kim y col. (1999) explican cómo la estimulación por bradicinina activa la CCE que a su vez es capaz de activar la fosfolipasa C (PLC) generándose IP_3 y DAG. En dicho trabajo, el IP_3 activó los IP_3R lo que resultó en un aumento de la respuesta secretora. Sin embargo, con nuestras condiciones experimentales de inhibición de la SERCA por tapsigargina, el CICR y la CCE generados son capaces de mantener la respuesta secretora pero no de potenciarla (Fig. 33B), posiblemente porque bajo estas condiciones el RE puede liberar Ca^{2+} pero no puede captarlo y por lo tanto no se recicla. En todo caso en nuestro trabajo, en presencia de Ca^{2+} extracelular, tanto el CICR como la CCE (la entrada de Ca^{2+} y la posible producción de IP_3 que ello conlleva) podrían estar favoreciendo que el vaciado reticular fuera más rápido y que el CICR se aboliera más deprisa que por ejemplo en condiciones de 0Ca^{2+} extracelular (en las que no existe CCE). Por lo tanto, una posible explicación es que la CCE inducida por la tapsigargina, en presencia de Ca^{2+} extracelular y presente entre cada pulso de K^+ , podría estar aumentando la tasa de vaciado reticular, anulándose antes el fenómeno de CICR, y por lo tanto el flujo de vesículas y la secreción (Fig. 34B).

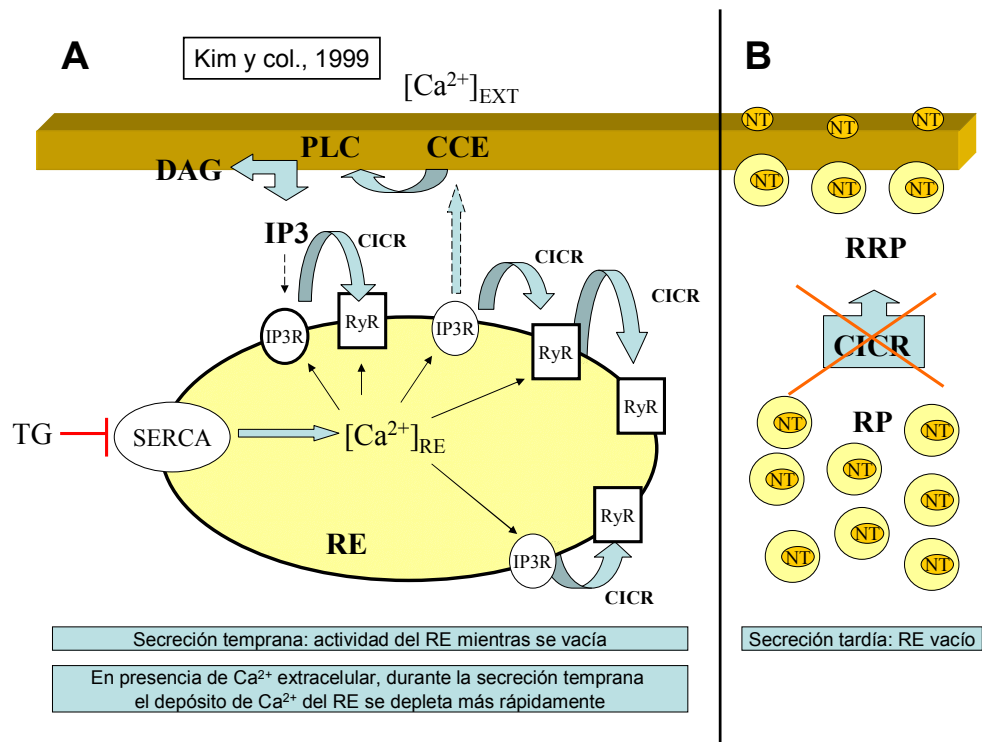


Figura 34: En presencia de Ca^{2+} extracelular ($[Ca^{2+}]_{EXT}$) la tapsigargina (TG) depleta más rápidamente el depósito de Ca^{2+} del RE: efecto sobre la secreción. Durante la secreción temprana (panel A), el depósito sensible a TG puede liberarse tanto vía IP₃R como RyR lo que favorece el fenómeno de CICR. En presencia de $[Ca^{2+}]_{EXT}$, el vaciado del RE activa la CCE. La CCE favorece la generación de IP₃ y la activación de nuevos IP₃R (Kim y col., 1999). En consecuencia, el RE se vacía más activamente, el CICR se anula antes y la caída de la secreción tardía es más prematura que en condiciones de $0Ca^{2+}$ nominal. Durante la secreción tardía (panel B), el RE llega a su máximo nivel de depleción, el CICR desaparece y no es capaz de mantener el flujo vesicular de la RP a la RRP.

Es curioso que a temperatura ambiente y en presencia de Ca^{2+} extracelular no se observase el efecto de la tapsigargina sobre la secreción evocada por pulsos de K^+ (Fig. 16); quizá por eso Mollard y sus colaboradores (1995) tampoco encontraron ningún efecto. Bittner y Holz en su trabajo de 1992a hablan de un paso dependiente de la temperatura en la secreción tardía posterior al paso dependiente del ATP, pero que precede al paso final de maduración vesicular dependiente de Ca^{2+} . Así, nuestros hallazgos también podrían sugerir que los depósitos sensibles a tapsigargina son relevantes en estadios tardíos de la secreción sujetos a un componente dependiente de la temperatura, dado que a $25^{\circ}C$ también se depleta de Ca^{2+} el RE (Fig. 18C y 33B).

Como ya se ha comentado arriba, la histamina aumenta el tamaño de la población RRP y la exocitosis (von Rüden y Neher, 1993), lo que sugiere que la liberación del Ca^{2+} del RE a través de una vía mediada por IP_3 podría ser relevante para mantener una respuesta de catecolaminas saludable bajo situaciones de estrés prolongadas, fisiológicas o fisiopatológicas. Sin embargo, en esta tesis se sugiere que la liberación de Ca^{2+} del RE a través del fenómeno de CICR (inicialmente ligado a la liberación de Ca^{2+} del RE vía RyR pero más tarde también relacionado con los IP_3R) sería más relevante (Fig. 34A).

Hace algunos años nuestro grupo descubrió, mediante el empleo de AEQ dirigida al RE de CCB, que su estimulación repetida con pulsos de K^+ provocaba liberaciones de Ca^{2+} del RE transitorias (Alonso y col., 1999). A partir de este hallazgo sugerimos que la liberación de Ca^{2+} del RE en el citosol mediada por el fenómeno de CICR podría servir para mantener el flujo vesicular durante la despolarización celular (Fig. 12, 13 y 35A). Los experimentos que se muestran en esta tesis avalan esta idea, ya que debido a la depleción del Ca^{2+} del RE de las CCB con los inhibidores de la SERCA taspigargina (Fig. 18B), ACP (Novalbos y col., 1999) y BHQ las respuestas secretoras correspondientes evocadas por K^+ cayeron gradualmente. Además, el lavado de los inhibidores reversibles devolvió la secreción a sus valores control (Fig. 14).

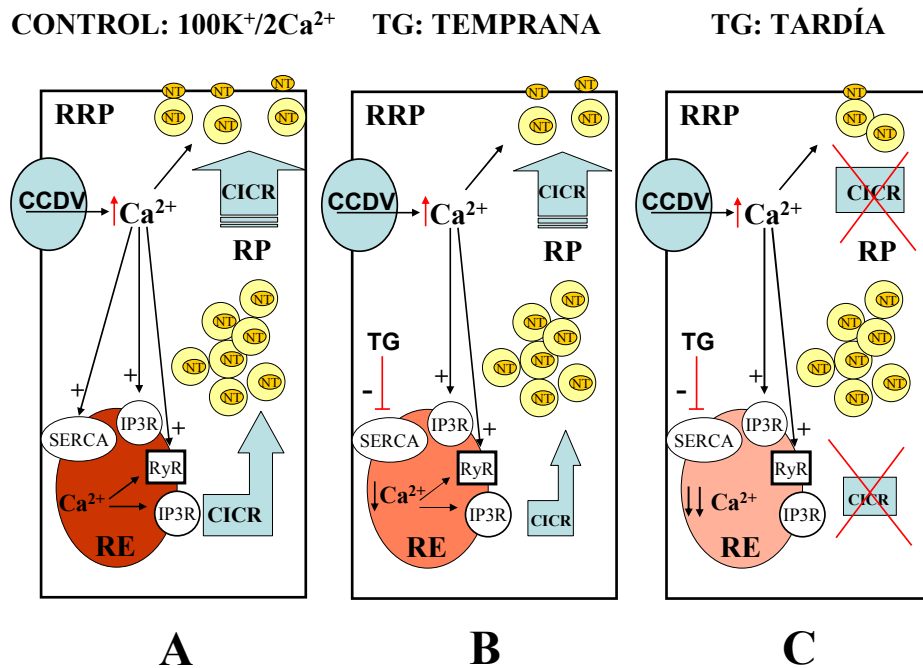


Figura 35: Esquema que representa una posible explicación para la influencia del depósito de Ca²⁺ del RE sobre la secreción. En condiciones control (panel A), la estimulación con pulsos repetidos de 100K⁺/2Ca²⁺ favorece la entrada de Ca²⁺ a través de los CCDV, la liberación de la RRP, y el mantenimiento del flujo vesicular; la RP rellena la RRP a través del fenómeno de CICR y la onda de Ca²⁺ citosólico que genera gracias a la despolarización celular (Alonso y col., 1999). Durante el tratamiento con tapsigargina (TG) y mientras el RE se depleta (panel B) el CICR es capaz de mantener el flujo vesicular durante la secreción temprana. Cuando el depósito de Ca²⁺ del RE alcanza su nivel máximo de vaciado el CICR se anula, la RRP no es capaz de reciclarse y la exocitosis cae (panel C).

Sin embargo, el curso temporal de la depleción del Ca²⁺ del RE no se corresponde con la caída de las respuestas secretoras evocadas por K⁺, en presencia de tapsigargina. Parece que el depósito del Ca²⁺ del RE tiene que alcanzar su máximo grado de vaciado para que se disminuya el ritmo del flujo vesicular y la secreción (Fig. 33B). En esta tesis, intentamos explicar el retraso que ocurre entre la depleción del Ca²⁺ del RE y la caída gradual de la secreción. Es plausible que durante la secreción temprana (hasta el pulso número 9; Fig. 14A) y debido al efecto de la tapsigargina, el fenómeno de CICR (Fig. 35B) y la CCE estén funcionando mientras el RE se está depletando. Paralelamente, la liberación de Ca²⁺ por la mitocondria (Montero y col., 2001b), que atrapa el Ca²⁺ del citosol de las CCB durante los periodos de

estimulación con K^+ (Montero y col., 2000; Villalobos y col., 2002), podría sustituir inicialmente al depósito de Ca^{2+} del RE en su papel de facilitar la migración vesicular para rellenar el depósito de vesículas subplasmalemal y mantener la exocitosis. Sin embargo, a medio o largo plazo el RE es necesario para mantener las respuestas secretoras de catecolaminas saludables evocadas por pulsos de K^+ (Fig. 33B y 35C).

En cuanto a la actividad PKC (segundo objetivo), se sabe que se activa con el éster de forbol PMA lo que potencia la secreción en las CCB (Knight y Baker 1983; Burgoyne y col., 1984; Brocklehurst y Pollard, 1985; Pocotte y col., 1985; TerBush y Holz, 1986; Bittner y Holz., 1990; Negishi y col., 1990; Vitale y col., 1992, 1995; Gillis y col., 1996; Smith y col., 1998; Rosé y col., 2001; Cuchillo-Ibáñez y col., 2004). Sin embargo, descubrimos que durante exposiciones largas al PMA la potenciación inicial de la secreción se seguiría de una caída gradual de la misma (Fig. 22A y 24A). Es interesante comprobar que la potenciación inicial de la secreción es transitoria lo que se corresponde tanto con el perfil de translocación de la actividad PKC a la MbP como con la formación de DAG inducidos por la prostaglandina E_2 (PGE_2) (Negishi y col., 1990).

Por otro lado, la caída tardía de la secreción provocada por el PMA no se veía en trabajos previos, al no utilizar un protocolo a base de pulsos repetidos de K^+ durante periodos de tiempo prolongados. Este comportamiento bifásico del PMA no se correlaciona con los cambios en las $[Ca^{2+}]_{RE}$ y $[Ca^{2+}]_c$ observados (Fig. 33C); en todo caso, el PMA produjo una caída gradual en la $[Ca^{2+}]_c$ basal probablemente debido a la activación de la Ca^{2+} -ATPasa de la MbP mediada por la PKC y el correspondiente aumento del aclaramiento de la $[Ca^{2+}]_c$ (Zylinska y Soszynski, 2000; Usachev y col., 2002). Además, parece que el depósito de Ca^{2+} del RE debe mantenerse intacto (Fig. 25C) para que se produzca el aumento inicial de la secreción.

Por último, la PKC retrasó y disminuyó la elevación en la $[Ca^{2+}]_c$ evocada por cafeína (Fig. 28 B y D), lo que podría explicarse por la disminución en la

tasa de liberación de Ca^{2+} del RE obtenida como consecuencia de la fosforilación de los RyR por la actividad PKC (Takasago y col., 1991) y la subsiguiente disminución en su actividad (Bonev y col., 1997).

Es curioso que al igual que la taspigargina, la queletrina también produjo una caída retrasada de la secreción (compárense Fig. 33B y **33E**). Este retraso podría explicarse (1) si una pequeña elevación en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ se mantuviera a medio o largo plazo (panel central de la Fig. 33E) y (2) debido a un aclaramiento incompleto del Ca^{2+} citosólico entre pulsos despolarizantes (véase Fig.7 en de Diego y col., 2008a). Esta señal sostenida de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ residual podría alimentar la vía dependiente de Ca^{2+} , escinderina y así mantener el tráfico vesicular durante unos minutos incluso en ausencia de actividad PKC. Sin embargo, periodos prolongados de exposición a la queletrina provocan, inminentemente, la caída de las respuestas secretoras evocadas por pulsos repetidos de K^+ . La inhibición de la actividad PKC, directamente con queletrina o indirectamente mediante la depleción del Ca^{2+} del RE, y la subsiguiente estabilización del citoesqueleto de actina (Cuchillo-Ibáñez y col., 2004), podrían explicar, en parte, dicha caída tardía de la secreción. Bajo estas condiciones, se podría mantener el flujo de vesículas a través de un mecanismo independiente de la actividad PKC pero dependiente de Ca^{2+} , como sugirieron Smith y sus colaboradores (1998) también en CCB. Estos autores descubrieron que el inhibidor de la PKC bisindolilmaleimida I (Bis) deprimía parcialmente el tamaño de la población RRP que había sido previamente aumentada por una pequeña elevación en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$.

Con los tres primeros paneles de la Fig. 36 se propone un posible mecanismo que explique los hallazgos señalados arriba. En condiciones control (**Fig. 36A**), la estimulación con pulsos repetidos de $100\text{K}^+/2\text{Ca}^{2+}$ favorece la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV lo que regula el citoesqueleto de filamentos de actina (línea roja) a través de: 1) el mecanismo dependiente de Ca^{2+} , escinderina y; 2) la vía PKC-MARKS (Trifaró, 1999) parcialmente activada por el fenómeno de CICR y la onda de Ca^{2+} citosólico

que genera gracias a la despolarización celular (Alonso y col., 1999). Ambos mecanismos aumentan la liberación de la RRP. Cuando se sobreestimula la PKC con PMA (Fig. 36B) la vía PKC-MARKS se activa al máximo transitoriamente favoreciendo la potenciación inicial de la secreción; al final del experimento, cuando toda la actividad PKC se localiza en el citosol, la respuesta secretora decae. Por el contrario, cuando la actividad PKC se inhibe con queleritrina (Fig. 36C), el CICR no es capaz de sostener la vía PKC-MARKS (inexistente) y el citoesqueleto de filamentos de actina se regula únicamente a través del mecanismo dependiente de Ca^{2+} vía escinderina. Así, a partir del segundo tercio del experimento, las respuestas secretoras decaen en un 20-30% al inhibirse la vía PKC-MARKS (Trifaró y col., 2000) bien por la reducción en el aporte de vesículas a la RRP, bien por la estabilización parcial del citoesqueleto de filamentos de actina.

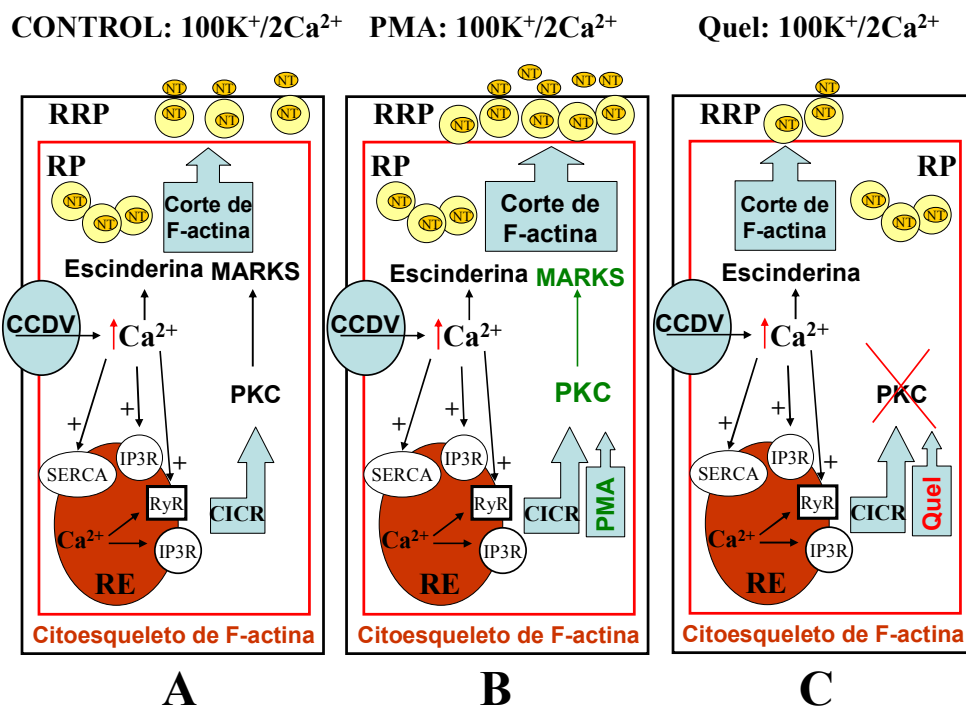


Figura 36: Esquema que representa una posible explicación para la interacción entre el depósito de Ca^{2+} del RE y la actividad PKC y su papel regulador sobre la secreción (ver texto). Las células control (panel A) se probaron en paralelo con células tratadas con 0,1 μ M de PMA (panel B) o 1 μ M de queleritrina (Quel; panel C).

Fue interesante descubrir que la tapsigargina truncara la facilitación sobre la secreción evocada por el PMA (Fig. 23A y 24B) y revirtiera la caída de la secreción evocada por queleritrina (Fig. 23B y 24D). La combinación de PMA/tapsigargina (**Fig. 33D**) no previno la depleción del Ca^{2+} del RE (Fig. 26A). Además, a pesar de que dicha mezcla no aceleró la tasa de salida de Ca^{2+} del RE (Fig. 26C), el PMA sí aceleró la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ evocada por tapsigargina (Fig. 28E); la sobreestimulación de la PKC por el PMA y el subsiguiente desensamblaje del citoesqueleto de actina podría aumentar la CCE (Patterson y col., 1999; Kondo y col., 2000) cuya existencia se ha demostrado en CCB en presencia de Ca^{2+} extracelular (Robinson y col., 1992; Powis y col., 1996; Zerbes y col., 1998; Fomina y Nowicky, 1999). Por lo tanto, esta potenciación de la CCE podría ser responsable de la elevación más rápida que sufre la señal de Ca^{2+} citosólica en presencia de la mezcla PMA/tapsigargina, observada en la Fig. 28E, si además se tiene en cuenta que el Ca^{2+} que entra por dicha vía no puede ser secuestrado por un RE no funcional. Como el uso combinado de PMA/tapsigargina trunca la facilitación sobre la secreción evocada por PMA (comparar Fig. 33C y D), concluimos que la sobreestimulación de la PKC por el PMA requiere un depósito de Ca^{2+} del RE funcional.

Como se ha dicho arriba, otro resultado sorprendente fue que la combinación queleritrina/tapsigargina no produjera una caída de la secreción evocada por pulsos de K^+ repetidos a pesar de que la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ sí cayera (**Fig. 33F**). Atribuimos este fenómeno a la elevación sostenida en el tiempo de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ causada por la combinación de ambos compuestos (panel central de la Fig. 33F). Dicha elevación podría estar alimentando a la vía dependiente de Ca^{2+} , escinderina, presente en cada estimulación con K^+ (Trifaró y col., 2000, 2002), y mantener así el tráfico vesicular de una forma independiente a la vía PKC-MARKS. Nuevamente, un mal aclaramiento del Ca^{2+} citosólico podría explicar el origen de la elevación sostenida de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Teniendo en cuenta que en las CCB se ha descrito que la mitocondria atrapa ávidamente el Ca^{2+}

(Montero y col., 2000), dicho fenómeno se podría explicar, por ejemplo, a través de una alteración en la regulación del flujo de Ca^{2+} mitocondrial mediada por la actividad PKC. Así, se ha descrito que hay cinasas (MAPK) capaces de fosforilar el uniportador mitocondrial para regular su función (Montero y col., 2002b).

Cuchillo-Ibáñez y col. (2004) concluyeron que un secuestro rápido del Ca^{2+} por la mitocondria como se percibe en la Fig. 33D (panel central; nótese que en presencia de PMA, predomina el efecto de la tapsigargina sobre el transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_c$), podría proteger a la célula de una sobreactivación de la PKC, limitando así la magnitud de las respuestas secretoras (compárense los paneles inferiores de las Fig. 33C y D). Por el contrario, un secuestro más lento del Ca^{2+} por la mitocondria podría explicar la elevación sostenida en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ representada en la Fig. 33F (panel central) y la correspondiente recuperación de las respuestas secretoras (Fig. 33F; panel inferior).

En resumen, durante el tratamiento con tapsigargina y la depleción de Ca^{2+} del RE, el PMA (TG/PMA; **Fig. 36D**) no es capaz de sobreestimular la PKC; la potenciación inicial de la secreción desaparece y prima el efecto de la TG sobre la liberación de catecolaminas. Cuando se anula la vía PKC-MARKS mediante el tratamiento tapsigargina más queleritrina (TG/Quel/ **Fig. 36E**) se genera una señal de Ca^{2+} citosólico sostenida en el tiempo (Fig. 28E; quizás a través de un equilibrio entre el Ca^{2+} del RE y el Ca^{2+} mitocondrial) que es capaz de abastecer a la vía dependiente de Ca^{2+} escinderina; las respuestas secretoras se restablecen a los niveles control.

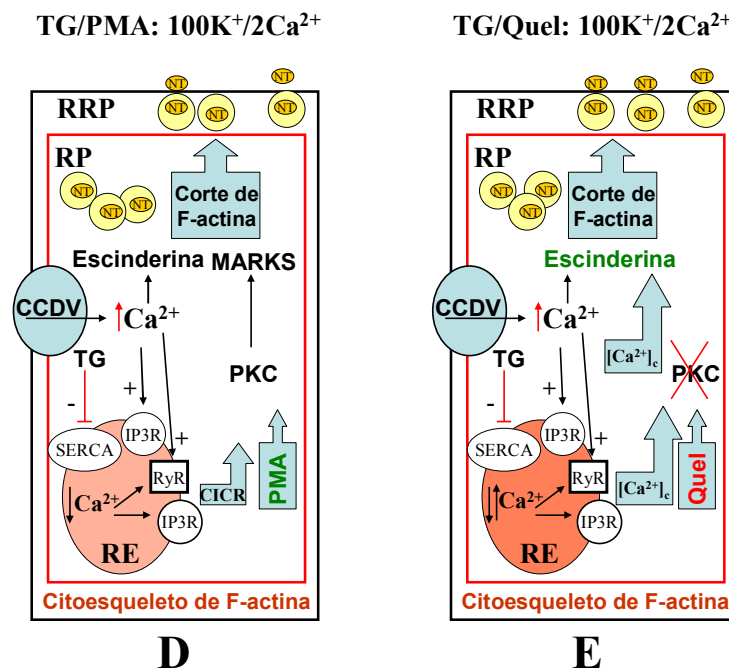


Figura 36: Esquema que representa una posible explicación para la interacción entre el depósito de Ca²⁺ del RE y la actividad PKC y su papel regulador sobre la secreción (ver texto). Las células se trataron con las mezclas PMA más tapsigargina (PMA/TG; 0,1 μM; panel D) o queleritrina más tapsigargina (Quel/TG; 1 y 0,1 μM respectivamente; panel E).

Finalmente, me gustaría exponer una consideración fisiológica sugerida por los resultados obtenidos referidos a los dos primeros objetivos desarrollados en esta tesis.

En las CCB, la histamina y la cafeína aumentan el tráfico vesicular, el tamaño de la población RRP, y las respuestas exocitóticas generadas por estímulos despolarizantes (von Rüden y Neher, 1993). Durante la estimulación fisiológica de las terminaciones del nervio espláncnico que inervan las células cromafines de la médula adrenal, la liberación de ACh provoca la despolarización celular, potenciales de acción, y el aumento de la entrada de Ca²⁺ vía CCDV (de Diego y col., 2008b). Esta rápida entrada de Ca²⁺ aumenta cerca del plasmalema la [Ca²⁺]_c al rango de 10 μM o más para disparar, en última instancia, la exocitosis rápida (Neher, 1998). La cuestión es si este Ca²⁺ también sirve para activar el tráfico vesicular y recargar la RRP bajo las condiciones experimentales empleadas para desarrollar los dos primeros

objetivos de esta tesis, es decir, mediante pulsos despolarizantes repetidos, durante largos periodos de tiempo, a 37°C que mimetizarían mejor las situaciones de estrés fisiológicas o fisiopatológicas.

En las CCB, el fenómeno de CICR evoca ondas de Ca^{2+} que viajan desde las zonas más subplasmalemales hacia zonas más internas de la célula (Alonso y col., 1999). Así, proponemos que este mecanismo (en vez de la liberación de Ca^{2+} del RE mediada por IP_3 y evocada por histamina) podría servir para mantener el tráfico vesicular a través de vías dependientes e independientes de la actividad PKC, durante la estimulación fisiológica de las CCB mediante la despolarización evocada por potenciales de acción repetidos. Nuestra propuesta concuerda con la del grupo de Trifaró y col. (2000) y Smith y col. (1998), con la excepción de que el fenómeno de CICR constituiría, en vez de la liberación de Ca^{2+} del RE evocada por histamina, la fuente de Ca^{2+} que mantendría el tráfico vesicular y una liberación de catecolaminas adecuada a las situaciones de estrés durante periodos prolongados.

Por último, me gustaría exponer algunas observaciones referidas a los experimentos realizados con CCB tratadas con ouabaína (tercer objetivo). Partiendo de la base de que la despolarización celular es necesaria para que se produzca la apertura de los CCDV del subtipo L, las CCB tratadas con ouabaína sufrirán una despolarización como consecuencia de la inhibición de la Na^+/K^+ -ATPasa y el correspondiente aumento de la $[\text{Na}^+]_c$.

En las CCB, los CCDV del subtipo L contribuyen en un 15-20% a la corriente total de Ca^{2+} medida en la configuración de célula entera; los CCDV del subtipo N un 30%, y los del subtipo P/Q un 50-55% (García y col., 2006). Además, los CCDV de los subtipos N y P/Q se inactivan de una forma dependiente de voltaje y de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Sin embargo, los CCDV del subtipo L son resistentes a dicha inactivación (Hernández-Guijo y col., 1997, 2001; Villarroya y col., 1999). Esto permite concluir que las células expuestas a ouabaína tienen sus CCDV de los subtipos N y P/Q en su estado inactivado

debido a la gran entrada de Ca^{2+} y a la despolarización celular experimentadas por el tratamiento con ouabaína.

Para explicar cómo los CCDV del subtipo L controlan la entrada de Ca^{2+} y la secreción es plausible pensar que la ouabaína endógena sintetizada y liberada en la corteza adrenal (Inagami y Tamura, 1988; Schneider y col., 1998; Kawamura y col., 1999), bañe la superficie de las células cromafines en su camino hacia el torrente sanguíneo como ocurre con los corticoesteroides que controlan la expresión de la actividad enzimática PNMT y la síntesis de catecolaminas. (Wurtman y Axelrod, 1965). Así, dicha ouabaína endógena podría llevar a cabo un papel modulador sobre el potencial de membrana, a través de la inhibición parcial de la Na^+/K^+ -ATPasa, para mantener a las células cromafines de la médula adrenal en un estado de despolarización parcial. Esto mantendría a los CCDV del subtipo N y P/Q en su estado inactivado de tal manera que las respuestas secretoras disparadas por la ACh estarían controladas por los CCDV del subtipo L, como se observa en los resultados utilizando pulsos de Ca^{2+} presentados en esta tesis. Por lo tanto, los CCDV de los subtipos N y P/Q sólo se reclutarían a través de los trenes de potenciales de acción típicos de las situaciones de estrés (Chan y col., 2005).

CONCLUSIONES

En base a los objetivos planteados inicialmente en esta tesis hemos obtenido resultados que nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

- 1 La depleción del Ca^{2+} del RE por exposición a tapsigargina $0,1 \mu\text{M}$ (1) no modifica las respuestas secretoras evocada por pulsos de K^+ a corto plazo; y (2) provoca una caída tardía de la secreción a 37°C .
- 2 El depósito de Ca^{2+} del RE intacto y funcional es necesario para la regulación por parte de la PKC del tráfico vesicular durante periodos prolongados de estimulación de las células cromafines bovinas.
- 3 Las respuestas secretoras saludables, inducidas por 30 pulsos de K^+ secuenciales, y el tráfico vesicular se mantuvieron incluso con el RE depletado y la actividad PKC inhibida, debido a que esta combinación de compuestos produjo una elevación sostenida de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$.
- 4 La ouabaína potenció drásticamente la entrada de Ca^{2+} y la liberación de catecolaminas disparada por pulsos de 2Ca^{2+} . Dicho efecto se asoció a la activación específica de los CCDV del subtipo L porque bajo estas condiciones experimentales los CCDV de los subtipos N y P/Q estaban inactivados.

La médula adrenal tiene que descargar las catecolaminas al torrente sanguíneo para mantener la homeostasia cardiovascular durante la respuesta de “lucha o huida” en situaciones de estrés prolongadas; para ello necesita mecanismos reguladores redundantes. Bajo estas circunstancias el Ca^{2+} del RE podría jugar un papel crítico en el mantenimiento del flujo de las vesículas secretoras para asegurar la recarga eficiente y constante de la RRP en las zonas más subplasmalemales. Nuestros hallazgos también son relevantes en el contexto de la hipótesis de que la ouabaína endógena pueda regular la liberación de catecolaminas de las células cromafines lo que generaría un vínculo con la patogénesis de enfermedades ligadas al SNS.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Albillos, A., Artalejo, A. R., López, M. G., Gandía, L., García, A. G. y Carbone, E. (1994). Ca²⁺ channels subtypes in cat chromaffin cells. *J. Physiol.* 447: 197-213.
2. Albillos, A., Carbone, E., Gandía, L., García, A. G. y Pollo, A. (1996a). Opioid inhibition of Ca²⁺ channel subtypes in bovine chromaffin cells: selectivity of action and voltage-dependence. *Eur. J. Neurosci.* 8: 1561-1570.
3. Albillos, A., Dernick, G., Horstmann, H., Almers, W., Álvarez de Toledo, G. y Lindau, M. (1997). The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature* 389: 509-512.
4. Albillos, A., Gandía, L., Michelena, P., Gilabert, J. A., del Valle, M., Carbone, E. y García, A. G. (1996b). The mechanism of Ca²⁺ channel facilitation in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* 494: 687-695.
5. Albillos, A., García, A. G. y Gandía, L. (1993). ω -Agatoxin-IVA-sensitive Ca²⁺ channels in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett.* 336: 259-262.
6. Albillos, A., García, A. G., Olivera, B. y Gandía, L. (1996c). Re-evaluation of P/Q Ca²⁺ channel components of Ca²⁺ currents in bovine chromaffin cells superfused with solutions containing low and high Ca²⁺ concentrations. *Pflügers Arch.* 432: 1030-1038.
7. Albillos, A., Neher, E. y Moser, T. (2000). R-Type Ca²⁺ channels are coupled to the rapid component of secretion in mouse adrenal slice chromaffin cells. *J. Neurosci.* 20: 8323-8330.
8. Aldea, M., Jun, K., Shin, H. S., Andrés-Mateos, E., Solís-Garrido, L. M., Montiel, C., García, A. G. y Albillos, A. (2002). A perforated patch-clamp study of Ca²⁺ currents and exocytosis in chromaffin cells of wild-type and $\alpha(1A)$ knockout mice. *J. Neurochem.* 81: 911-921.
9. Allen, D. G. y Blinks, J. R. (1978). Ca²⁺ transients in aequorin-injected frog cardiac muscle. *Nature* 273: 509-513.
10. Allen, D. G., Blinks, J. R. y Prendergast, F. G. (1977). Aequorin luminescence relation of light emission to Ca²⁺ concentration: a Ca²⁺-independent component. *Science* 195: 996-998.

11. Alonso, M. T., Barrero, M. J., Carnicero, E., Montero, M., García-Sancho, J. y Álvarez, J. (1998). Functional measurements of $[Ca^{2+}]$ in the endoplasmic reticulum using herpes virus to deliver targeted aequorin. *Cell Calcium* 24: 87-96.
12. Alonso, M. T., Barrero, M. J., Michelena, P., Carnicero, E., Cuchillo-Ibáñez, I., García, A. G., García-Sancho, J., Montero, M. y Álvarez, J. (1999). Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release from chromaffin cell seen from inside the ER with targeted aequorin. *J. Cell Biol.* 144: 241-254.
13. Álvarez, J. y Montero, M. (2002). Measuring $[Ca^{2+}]$ in the endoplasmic reticulum with aequorin. *Cell Calcium* 32: 251-260.
14. Appel, E. D. y Elde, R. P. (1988). The intermediolateral cell column of the thoracic spinal cord is comprised of target-specific subnuclei: evidence from retrograde transport studies and immunohistochemistry. *J. Neurosci.* 8: 1767-1775.
15. Artalejo, A. R. (1995). Electrical properties of adrenal chromaffin cells. En: "The electrophysiology of neuroendocrine cells". Schreübl, H. & Hescheler, H. (eds.) CRC Press Boca Raton, F. L. 259-299.
16. Artalejo, C. R., Adams, M. E. y Fox, A. P. (1994). Three types of Ca^{2+} channels trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. *Nature* 367: 72-76.
17. Artalejo, C. R., García, A. G., Neher, E. (1993). Small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels in bovine chromaffin cells. *Pflügers Arch.* 423: 97-103.
18. Artalejo, C. R., Perlman, R. L. y Fox, A. P. (1992a). ω -conotoxin GVIA blocks a Ca^{2+} current in bovine chromaffin cells that is not of the "classic" N type. *Neuron* 8: 85-95.
19. Artalejo, C. R., Rossie, S., Perlman, R. L. y Fox, A. P. (1992b). Voltaje-dependent phosphorylation may recruit Ca^{2+} current facilitation in chromaffin cells. *Nature* 358: 63-66.
20. Ashery, U., Varoqueaux, F., Voets, T., Betz, A., Thakur, P., Koch, H., Neher, E., Brose, N. y Rettig, J. (2000). Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *EMBO J.* 19: 3586-3596.
21. Augustine, G. J. y Neher, E. (1992). Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* 450: 247-271.

22. Aunis, D. (1998). Exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Int. Rev. Cytol.* 181: 213-320.
23. Aunis, D. y García, A. G. (1981). Correlation between catecholamine secretion from bovine isolated chromaffin cells and [3H]-ouabain binding to plasma membranes. *Br. J. Pharmacol.* 72: 31-40.
24. Aunis, D. y Langley, K. (1999). Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta Physiol. Scand.* 167: 89-97.
25. Babcock, D. F., Herrington, J., Park, Y. B. y Hille, B. (1997). Mitochondrial participation in the intracellular Ca²⁺ network. *J. Cell Biol.* 136: 833-843.
26. Banks, P. (1967). The effect of ouabain on the secretion of catecholamines and on the intracellular concentration of potassium. *J. Physiol.* 193: 631-637.
27. Barbara, J. G., Poncer, J. C., McKinney, R. A. y Takeda, K. (1998). An adrenal slice preparation for the study of chromaffin cells and their cholinergic innervation. *J. Neurosci. Methods* 80: 181-189.
28. Barbara, J. G. y Takeda, K. (1996). Quantal release at a neuronal nicotinic synapse from rat adrenal gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 9905-9909.
29. Basu, A. (1993). The potential of protein kinase C as a target for anticancer treatment. *Pharmacol. Ther.* 59: 257-280.
30. Becherer, U., Moser, T., Stuhmer, W. y Oheim, M. (2003). Ca²⁺ regulates exocytosis at the level of single vesicles. *Nat. Neurosci.* 6: 846-853.
31. Berridge, M. J. (1995). Capacitative Ca²⁺ entry. *Biochem. J.* 312: 1-11.
32. Berridge, M. J., Bootman, M. D. y Lipp, P. (1998). Ca²⁺-a life and death signal. *Nature* 395: 645-648.
33. Berridge, M. J., Bootman, M. D. y Roderick, H. L. (2003). Ca²⁺ signaling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 517-529.
34. Bittner, M. A. y Holz, R. W. (1990). Phorbol esters enhance exocytosis from chromaffin cells by two mechanisms. *J. Neurochem.* 54: 205-210.

35. Bittner, M. A. y Holz, R. W. (1992a). A temperature-sensitive step in exocytosis. *J. Biol. Chem.* 267: 16226-16229.
36. Bittner, M. A. y Holz, R. W. (1992b). Kinetic analysis of secretion from permeabilized adrenal chromaffin cells reveals distinct components. *J. Biol. Chem.* 267: 16219-16225.
37. Blinks, J. R., Prendergast, F. G. y Allen, D. G. (1976). Photoproteins as biological Ca^{2+} indicators. *Pharmacol. Rev.* 28: 1-93.
38. Blinks, J. R., Rudel, R. y Taylor, S. R. (1978). Ca^{2+} transients in isolated amphibian skeletal muscle fibres: detection with aequorin. *J. Physiol.* 277: 291-323.
39. Bonev, A. D., Jaggar, J. H., Rubart, M. y Nelson, M. T. (1997): Activators of protein kinase C decrease Ca^{2+} spark frequency in smooth muscle cells from cerebral arteries. *Am. J. Physiol.* 273: C2090-C2095.
40. Borges, R., Sala, F. y García, A. G. (1986). Continuous monitoring of catecholamine release from perfused cat adrenals. *J. Neurosci. Methods* 16: 289-300.
41. Bossu, J. L., de Waard, M. y Feltz, A. (1991a). Inactivation characteristics reveal two Ca^{2+} currents in adult bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* 437: 603-620.
42. Bossu, J. L., de Waard, M. y Feltz, A. (1991b). Inactivation characteristics reveal two Ca^{2+} currents in adult bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* 437: 621-634.
43. Bournaud, R., Hidalgo, J., Yu, H., Jaimovich, E. y Shimahara, T. (2001). Low threshold T-type Ca^{2+} current in rat embryonic chromaffin cells. *J. Physiol.* 537: 35-44.
44. Brandt, B. L., Hagiwara, S., Kidokoro, Y. y Miyazaki, S. (1976). Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *J. Physiol.* 263: 417-439.
45. Brini, M., Marsault, R., Bastianutto, C., Álvarez, J., Pozzan, T. y Rizzuto R. (1995). Transfected aequorin in the measurement of cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$). A critical evaluation. *J Biol. Chem.* 270: 9896-9903.
46. Brini, M., Murgia, M., Pasti, L., Picard, D., Pozzan, T. y Rizzuto, R. (1993). Nuclear Ca^{2+} concentration measured with specifically targeted recombinant aequorin. *EMBO J.* 12: 4813-4819.

47. Brose, N., Rosenmund, C. y Rettig, J. (2000). Regulation of transmitter release by Unc-13 and its homologues. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10: 303-311.
48. Bruns, D. y Jahn, R. (1995). Real-time measurement of transmitter release from single synaptic vesicles. *Nature* 377: 62-65.
49. Buck, E., Zimanyi, I., Abramson, J. J. y Pessah, I. N. (1992). Ryanodine stabilizes multiple conformational states of the skeletal muscle Ca^{2+} release channel. *J. Biol. Chem.* 267: 23560-23567.
50. Burgos, M, Pastor, M. D., González, J. C., Martínez-Galán, J. R., Vaquero, C. F., Fradejas, N., Benavides, A., Hernández-Guijo, J. M., Tranque, P. y Calvo, S. (2007). PKCepsilon upregulates voltage-dependent Ca^{2+} channels in cultured astrocytes. *Glia* 55: 1437-1448.
51. Burgoyne, R. D., Geisow, M. J., y Barron, J. (1982). Dissection of stages in exocytosis in the adrenal chromaffin cells with use of trifluoperazine. *Proc. R. Soc. Lond.* 216: 111-115.
52. Burgoyne, R. D., Norman, K. M. y O'Sullivan, A. J. (1984). Effect of calmidazolium and phorbol ester on catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells. *Biochim. Biophys. Acta* 805: 37-43.
53. Camacho, M., Machado, J. D., Álvarez, J. y Borges, R. (2008). Intravesicular Ca^{2+} release mediates the motion and exocytosis of secretory organelles: a study with adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 283: 22383-22389.
54. Carbone, E. y Lux, H. D. (1984a). A low voltage-activated Ca^{2+} conductance in embryonic chick sensory neurons. *Biophys. J.* 46: 413-418.
55. Carbone, E. y Lux, H. D. (1984b). A low voltage-activated, fully inactivating Ca^{2+} -channel in vertebrate sensory neurons. *Nature* 310: 501-502.
56. Carbone, E. y Lux, H. D. (1987). Kinetics and selectivity of a low-voltage-activated Ca^{2+} current in chick and rat sensory neurons. *J. Physiol.* 386: 547-570.
57. Carmichael, S. W., Brooks, J. C., Malhotra, R. K., Wakade, T. D. y Wakade, A. R. (1989). Ultrastructural demonstration of exocytosis in the intact rat adrenal medulla. *J. Electron. Microsc. Tech.* 12: 316-322.

58. Carmichael, S. W. y Stoddard, S. L. (1993). "The adrenal medulla". CRC Press Inc. Boca Ratón. Florida, USA. pp. 1989-1991.
59. Caspersen, C. y Treiman, M. (1995). Thapsigargin discriminates strongly between Ca^{2+} -ATPase phosphorylation intermediates with different subcellular distributions in bovine adrenal chromaffin cells. *FEBS Letters* 375: 31-36.
60. Chan, S. A., Polo-Parada, L. y Smith, C. (2005). Action potential stimulation reveals an increased role for P/Q- Ca^{2+} channel-dependent exocytosis in mouse adrenal tissue slices. *Arch. Biochem. Biophys.* 435: 65-73.
61. Chan, S. A. y Smith, C. (2001). Physiological stimuli evoke two forms of endocytosis in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* 537: 871-885.
62. Cheek, T. R., Moreton, R. B., Berridge, M. J., Stauderman, K. A., Murawsky, M. M. y Bootman, M. D. (1993). Quantal Ca^{2+} release from caffeine-sensitive stores in adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 268: 27076-27083.
63. Cheek, T. R., O'Sullivan, A. J., Moreton, R. B., Berridge, M. J. y Burgoyne R. D. (1990). The caffeine-sensitive Ca^{2+} stores in bovine adrenal chromaffin cells: an examination of its role in triggering secretion and Ca^{2+} homeostasis. *FEBS Lett.* 266: 91-95.
64. Chern, Y. J., Chueh, S. H., Lin, Y. J., Ho, C. M. y Kao, L. S. (1992). Presence of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange activity and its role in regulation of intracellular Ca^{2+} concentration in bovine adrenal chromaffin cells. *Cell Calcium* 13: 99-106.
65. Cocchia, D. y Michetti, F. (1981). S-100 antigen in satellite cells of the adrenal medulla and the superior cervical ganglion of the rat. An immunochemical and immunocytochemical study. *Cell Tissue Res.* 215: 103-112.
66. Coupland, R., E. (1965). Electronic microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla. I. The ultrastructure and organization of chromaffin cells in the normal adrenal medulla. *J. Anat.* 99: 231-254.
67. Coupland, R. E. y Hopwood, D. (1966). The mechanism of the differential staining reaction for adrenaline-and noradrenaline-storing granules in tissues fixed in glutaraldehyde. *J. Anat.* 100: 227-243.

68. Crespi, F. (1991). In vivo voltammetric detection of neuropeptides with micro carbon fiber biosensors: possible selective detection of somatostatin. *Anal. Biochem.* 194: 69-76.
69. Cuchillo-Ibáñez, I., Lejen, T., Albillos, A., Rosé, S. D., Olivares, R., Villarroya, M., García, A. G. y Trifaró, J. M. (2004). Mitochondrial Ca^{2+} sequestration and protein kinase C cooperate in the regulation of cortical F-actin disassembly and secretion in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* 560: 63-76.
70. Cuchillo-Ibáñez, I., Olivares, R., Aldea, M., Villarroya, M., Arroyo, G., Fuentealba, J., García, A. G. y Albillos, A. (2002). Acetylcholine and potassium elicit different patterns of exocytosis in chromaffin cells when the intracellular Ca^{2+} handling is disturbed. *Pflügers Arch.* 444: 133-142.
71. Dekker, L. V. y Parker, P. J. (1994). Protein kinase C a question of specificity. *Trends Biochem. Sci.* 19: 73-77.
72. Demaurex, N., Lew, D. P. y Krause, K. H. (1992). Cyclopiazonic acid depleted intracellular Ca^{2+} stores and activates an influx pathway for divalent cations in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* 267: 2318-24.
73. de Diego, A. M. G., Arnáiz, J. J., Gandía, L., Hernández-Guijo, J. M. y García, A. G. (2006). A comparison between acetylcholine-like action potentials and square depolarizing pulses in triggering Ca^{2+} entry and exocytosis in bovine chromaffin cells. *J. Mol. Neurosci.* 30: 57-58.
74. de Diego, A. M. G., Arnáiz-Cot, J. J., Hernández-Guijo, J. M., Gandía, L. y García, A. G. (2008a). Differential variations in the Ca^{2+} entry, cytosolic Ca^{2+} and membrane capacitance upon steady or action potential depolarising stimulation of bovine chromaffin cells. *Acta. Physiol. (Oxf)*. (In the press).
75. de Diego, A. M. G., Gandía, L., y García, A. G. (2008b). A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta Physiol. (Oxf)*. 192: 287-301.
76. Dinkelacker, V., Voets, T., Neher, E. y Moser, T. (2000). The readily releasable pool of vesicles in chromaffin cells is replenished in a temperature-dependent manner and transiently overfills at 37°C. *J. Neurosci.* 20: 8377-8383.
77. Diverse-Pierluissi, M., Dunlap, K. y Westhead, E. W. (1991). Multiple actions of extracellular ATP on Ca^{2+} currents in cultured bovine chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1261-1265.

78. Douglas, W. W. (1968). Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br. J. Pharmacol.* 34: 451-474.
79. Douglas, W. W. y Poisner, A. M. (1961). Stimulation of uptake of Ca^{2+} in the adrenal gland by acetylcholine. *Nature* 192: 1299.
80. Douglas, W. W. y Poisner, A. M. (1965). Preferential release of adrenaline from the adrenal medulla by muscarine and pilocarpine. *Nature*. 208: 1102-1103.
81. Douglas, W. W. y Rubin, R. P. (1961a). Mechanism of nicotinic action at the adrenal medulla: Ca^{2+} as a link in stimulus-secretion coupling. *Nature*. 192: 1087-1089.
82. Douglas, W. W. y Rubin, R. P. (1961b). The role of Ca^{2+} in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J. Physiol.* 159: 40-47.
83. Douglas, W. W. y Rubin, R. P. (1963). The mechanism of catecholamine release from adrenal medulla and the role of Ca^{2+} in stimulus-secretion coupling. *J. Physiol.* 167: 288-310.
84. Duan, K., Yu, X., Zhang, C. y Zhou, Z. (2003). Control of secretion by temporal patterns of action potentials in adrenal chromaffin cells. *J. Neurosci.* 23: 11235-11243.
85. Duchen, M. R. (1999). Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to Ca^{2+} signaling and cell death. *J. Physiol.* 516: 1-17.
86. Elhamdani, A., Palfrey, H. C. y Artalejo, C. R. (2001). Quantal size is dependent on stimulation frequency and Ca^{2+} entry in calf chromaffin cells. *Neuron* 31: 819-830.
87. Enyedi, A., Verma, A. K., Filoteo, A. G. y Penniston J. T. (1996). Protein kinase C activates the plasma membrane Ca^{2+} pump isoform 4b by phosphorylation of an inhibitory region downstream of the calmodulin-binding domain. *J. Biol. Chem.* 271: 32461-32467.
88. Eränkő, O. (1952). On the histochemistry of the adrenal medulla of the rat, with special reference to acid phosphatase. *Acta Anat. (Basel)* 3: 3-60.
89. Esquerro, E., García, A. G., Hernández, M., Kirpekar, S. M. y Prat, J. C. (1980). Catecholamine secretory response to Ca^{2+} reintroduction in the perfused cat adrenal gland treated with ouabain. *Biochem. Pharmacol.* 29: 2669-2673.

90. Fabiato, A. (1983). Ca^{2+} -induced release of Ca^{2+} from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* 245: 1-14.
91. Feldberg, W., Minz, B. y Tsudzimura, H. (1934). The mechanism of the nervous discharge of adrenaline. *J. Physiol.* 81: 281-304.
92. Fenwick, E. M., Marty, A. y Neher, E. (1982a). A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J. Physiol.* 331: 577-597.
93. Fenwick, E. M., Marty, A. y Neher, E. (1982b). Na^+ and Ca^{2+} channels in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* 331: 599-639.
94. Finnegan, J. M., Pihel, K., Cahill, P. S., Huang, L., Zerby, S. E., Ewing, A. G., Kennedy, R. T. y Wightman, R. M. (1996). Vesicular quantal size measured by amperometry at chromaffin, mast, pheochromocytoma, and pancreatic beta-cells.
95. Fitzpatrick, S. y Waisman, D. M. (1996). The uptake of Ca^{2+} by isolated chromaffin granules of the adrenal medulla. *Mol. Cell Biochem.* 155: 121-130.
96. Fleckenstein, A. (1983). History of Ca^{2+} antagonists. *Circ. Res.* 52: 3-16.
97. Fomina, A. F. y Nowycky, M. C. (1999). A current activated on depletion of intracellular Ca^{2+} stores can regulate exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J. Neurosci.* 19: 3711-3722.
98. Forsberg, E. J., Rojas, E. y Pollard, H. B. (1986). Muscarinic receptor enhancement of nicotine-induced catecholamine secretion may be mediated by phosphoinositide metabolism in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 261: 4915-4920.
99. Fox, A. P., Nowycky, M. C. y Tsien, R. W. (1987a). Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of Ca^{2+} -channels in chick sensory neurons. *J. Physiol.* 394: 149-172.
100. Fox, A. P., Nowycky, M. C. y Tsien, R. W. (1987b). Single-channel recordings of three types of Ca^{2+} -channels in chick sensory neurons. *J. Physiol.* 394: 173-200.
101. Fujita, H., Tanizawa, Y. y Hiura, M. (1976). Ontogenesis of granule formation in adrenal chromaffin cells of the chick. En: Coupland, R., Fujita, H. (eds), "Chromaffin, enterochromaffin and related cells". Elsevier, Amsterdam, 191-208.

102. Fujita, T., Kanno, T. y Kobayashi, S. (1988). Adrenal chromaffin cells. En: "The paraneuron". Ed. Springer-Verlag, Tokio, 135-144.
103. Gandía, L., Albillos, A. y García, A. G. (1993a). Bovine chromaffin cells possess FTX-sensitive Ca^{2+} channels. *Biochem. Biophys. Res. Comun.* 194: 671-676.
104. Gandía, L., García, A. G. y Morad, M. (1993b). ATP modulation of Ca^{2+} channels in chromaffin cells. *J. Physiol.* 470: 55-72.
105. García, A. G., de Diego, A. M. G., Gandía, L., Borges, R. y García-Sancho, J. (2006). Ca^{2+} signalling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol. Rev.* 86: 1093-1131.
106. García, A. G., Gandía, L., López, M. G. y Montiel, C. (2000). Ca^{2+} channels for exocytosis: functional modulation with toxins. En: "Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection". Edited by Botana, L. New York: Dekker 91-124.
107. García, A. G., Sala, F., Reig, J. A., Viniegra, S., Frías, J., Fontériz, R. y Gandía, L. (1984). Dihydropyridine Bay-K-8644 activates chromaffin cell Ca^{2+} channels. *Nature* 309: 69-71.
108. García-Palomero, E., Cuchillo-Ibáñez, I., García, A. G., Renart, J., Albillos, A. y Montiel, C. (2000). Greater diversity than previously thought of chromaffin cell Ca^{2+} channels, derived from mRNA identification studies. *FEBS Lett.* 481: 235-239.
109. Gee, K. R., Brown, K. A., Chen, W-N. U., Bishop-Stewart, J., Gray, D. y Johnson, I. (2000). Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca^{2+} -indicator dyes. *Cell Calcium* 27: 97-106.
110. Gerasimenko, O. V., Gerasimenko, J. V., Belan, P. V. y Petersen, O. H. (1996). Inositol triphosphate and cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca^{2+} from single isolated pancreatic zymogen granules. *Cell* 84: 473-480.
111. Gillis, K. D., Mossner, R. y Neher, E. (1996). Protein kinase C enhances exocytosis from chromaffin cells by increasing the size of the readily releasable pool of secretory granules. *Neuron* 16: 1209-1220.
112. Goldstein, M., Fuxe, K., Hökfelt, T. y Joh, T. H. (1971). Immunohistochemical studies of phenylethanolamine N-methyltransferase, dopa decarboxylase and dopamine- β -hydroxylase. *Experientia Basel* 27: 951-952.

113. Green, D. J. y Perlman, R. L. (1981). On-line measurement of catecholamine secretion. *Anal Biochem.* 110: 270-276.
114. Grynszpan-Wynograd, O. y Nicolas, G. (1980). Intracellular junctions in the adrenal medulla: a comparative freeze-fracture study. *Tissue Cell* 12: 661-72.
115. Günter, T. E., Buntinas, L., Sparagna, G., Eliseev, R. y Günter, K. (2000). Mitochondrial Ca²⁺ transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium* 28: 285-296.
116. Haass, M., Serf, C., Gerber, S. H., Krüger, C., Haunstetter, A., Vahl, C. F., Nobiling, R. y Kübler, W. (1997). Dual effect of digitalis glycosides on norepinephrine release from human atrial tissue and bovine adrenal chromaffin cells: differential dependence on [Na⁺]_i and [Ca²⁺]_i. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29: 1615-1627.
117. Haigh, J. R., Parris, R. y Phillips, J. H. (1989). Free concentrations of sodium, potassium and calcium in chromaffin granules. *Biochem. J.* 259: 485-491.
118. Hans, M., Illes, P. y Takeda, K. (1990). The blocking effects of ω-conotoxin on Ca²⁺ current in bovine chromaffin cells. *Neurosci. Lett.* 114: 63-68.
119. Heinemann, C., von Rüden, L., Chow, R. H. y Neher, E. (1993). A two-step model of secretion control neuroendocrine cells. *Pflügers Arch.* 424: 105-112.
120. Hernández-Guijo, J. M., Gandía, L., de Pascual, R. y García, A. G. (1997). Differential effects of the neuroprotectant lubeluzole on bovine and mouse chromaffin cell Ca²⁺ channel subtypes. *Br. J. Pharmacol.* 122: 275-285.
121. Hernández-Guijo, J. M., Maneu-Flores, V. E., Ruíz-Nuño, A., Villarroya, M., García, A. G. y Gandía, L. (2001). Ca²⁺-dependent inhibition of L, N, and P/Q Ca²⁺ channels in chromaffin cells: role of mitochondria. *J. Neurosci.* 21: 2553-2560.
122. Herrera, M., Kao, L. S., Curran, D. J. y Westhead, E. W. (1985). Flow-injection analysis of catecholamine secretion from bovine adrenal medulla cells on microbeads. *Anal. Biochem.* 144: 218-227.
123. Herrington, J., Park, Y. B., Babcock, D. F. y Hille, B. (1996). Dominant role of mitochondria in clearance of large Ca²⁺ loads from rat adrenal chromaffin cells. *Neuron* 16: 219-228.

124. Hilarp, N. A. y Hökfelt, T. B. (1953). Evidence of adreanline and noradrenaline in separate adrenal medullary cells. *Acta Physiol. Scand.* 30: 55-68.
125. Hillarp, N. A. (1946). Functional organitation of the peripheral autonomic innervation. *Acta Anat.* 4: Suppl., 1.
126. Holets, V., y Elde, R. (1982). The differential distribution and relationship of serotonergic and peptidergic fibers to sympathoadrenal neurons in the intermediolateral cell column of the rat: a combined retrograde axonal transport and immunofluorescence study. *Neuroscience* 7: 1155-1174.
127. Holgert, H., Aman, K., Cozzari, C., Hartman, B. K., Brimijoin, S., Emson, P., Goldstein, M. y Hökfelt, T. (1995). The cholinergic innervation of the adrenal gland and its relation to enkephalin and nitric oxide synthase. *NeuroReport* 6: 2576-2580.
128. Hollins, B. e Ikeda, S. R. (1996). Inwards currents underlying action potentials in rat adrenal chromaffin cells. *J. Neurophysiol.* 76: 1195-1211.
129. Hoshi, T., Rothlein, J. y Smith, S. J. (1984). Facilitation of Ca²⁺ channel currents in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81: 5871-5875.
130. Hryshko, L. V., Nicoll, D. A., Weiss, J. N. y Philipson, K. D. (1993). Biosynthesis and initial processing of the cardiac sarcolemmal Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Biochim. Biophys. Acta* 1151: 35-42.
131. Ikeda, S. R. (1991). Double-pulse Ca²⁺-channel current facilitation in adult rat sympathetic neurones. *J. Physiol.* 439: 181-214.
132. Inagami, T. y Tamura, M. (1988). Purification and characterization of specific endogenous ouabainlike substance from bovine adrenal. *Am. J. Med. Sci.* 295: 400-405.
133. Inoue, M., Lin, H., Imanaga, I., Ogawa, K. y Warashina, A. (2004). InsP₃ receptor type 2 and oscillatory and monophasic Ca²⁺ transients in rat adrenal chromaffin cells. *Cell Calcium* 35: 59-70.
134. Jiménez, R. R., López, M. G., Sancho, C., Maroto, R. y García, A. G. (1993). A component of the catecholamine secretory response in the bovine adrenal gland is resistant to dihydropyridines and omega-conotoxin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191: 1278-1283.

135. Kajiwara, R. Sand, O., Kidokoro, Y., Barish, M. E. y Lijita, T. (1997). Functional organization of chromaffin cells and cholinergic synaptic transmission in rat adrenal medulla. *Jpn. J. Physiol.* 47: 449-464.
136. Kanno, T. (1998). Intra- and intercellular Ca^{2+} signaling in paraneurons and other secretory cells. *Jpn. J. Physiol.* 48: 219-227.
137. Kawamura, A., Guo, J., Itagaki, Y., Bell, C., Wang, Y., Hauptert, G. T. Jr., Magil, S., Gallagher, R. T., Berova, N. y Nakanishi, K. (1999). On the structure of endogenous ouabain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 6654-6659.
138. Kidokoro, Y. (1992). Initial uncoordinated expression of three types of voltage-gated currents in cultured *Xenopus* myocytes. *Neurosci. Res.* 13: 189-197.
139. Kidokoro, Y. 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.
140. Kijima, Y., Ogunbunmi, E. y Fleischer, S. (1991). Drug action of thapsigargin on the Ca^{2+} pump protein of sarcoplasmic reticulum. *J. Bio. Chem.* 266: 22912-22918.
141. Kim, Y. H., Park, T. J., Lee, Y. H., Baek, K. J., Suh, P. G., Ryu, S. H. y Kim, K. T. (1999). Phospholipase C- δ 1 is activated by capacitative Ca^{2+} entry that follows phospholipase C- β activation upon bradykinin stimulation. *J. Biol. Chem.* 274: 26127-26134.
142. Knight, D. E. y Baker, P. F. (1983). The phorbol ester TPA increases the affinity of exocytosis for Ca^{2+} in 'leaky' adrenal medullary cells. *FEBS Lett.* 160: 98-100.
143. Kobayashi, S. (1977). Adrenal medulla: chromaffin cells as paraneurons. *Aech. Histol. Jpn.* 40: 61-79.
144. Kondo, I. (2000). Protein kinase C potentiates capacitative Ca^{2+} entry that links to steroidogenesis in bovine adrenocortical cells. *J. Pharmacol.* 82: 210-217.
145. Kosk-Kosicka, D. y Zylinska, L. (1997). Protein kinase C and calmodulin effects on the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase from excitable and nonexcitable cells. *Mol. Cell Biochem.* 173: 79-87.

146. Koval, L. M., Yavorskaya, E. N. y Lukyanetz, E. A. (2001). Electron microscopic evidence for multiple types of secretory vesicles in bovine chromaffin cells. *Gen Comp. Endocrinol.* 121: 261-277.
147. Lara, B., Gandía, L., Martínez-Sierra, R., Torres, A. y García, A. G. (1998). Q-type Ca^{2+} channels are located closer to the secretory sites than L-type channels: functional evidence in chromaffin cells. *Pflügers Arch.* 435: 472-478.
148. Lara, B., López, M. G., Villarroya, M., Gandía, L., Cleeman, L., Morad, M y García, A. G. (1997). A caffeine-sensitive Ca^{2+} store modulates K^{+} -evoked secretion in chromaffin cells. *Am. J. Physiol.* 272: C1211-C1221.
149. Lee, A. G. y East, J. M. (2001). What the structure of a Ca^{2+} pump tells us about its mechanism. *Biochem. J.* 356: 665-683.
150. Lin, L. F., Kao, L. S. y Westhead, E. W. (1994). Agents that promote protein phosphorylation inhibit the activity of the Na^{+}/Ca^{2+} exchanger and prolong Ca^{2+} transients in bovine chromaffin cells. *J. Neurochem.* 63: 1941-1947.
151. Linnoila, R. I., Diaugustine, R. P., Hervonen, A. y Miller, R. J. (1980). Distribution of [Met5]- and [Leu5]-enkephalin-, vasoactive intestinal polypeptide- and substance P-like immunoreactivities in human adrenal glands. *Neuroscience* 5: 2247-2259.
152. Liu, P. S., Lin, Y. J. y Kao, L. S. (1991). Caffeine-sensitive Ca^{2+} stores in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.* 56: 172-177.
153. Liu, Z. y Kao, L. S. (1990). Na^{+} -dependent Ca^{2+} influx in bovine adrenal chromaffin cells. *Cell Calcium* 11: 573-579.
154. Livett, B. G. (1984). Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol. Rev.* 64: 1103-1161.
155. Livett, B. G., Day, R., Elde, R. P. y Howe, P. R. (1982). Co-storage of enkephalins and adrenaline in the bovine adrenal medulla. *Neuroscience* 7: 1323-1332.
156. Livett, B. G. y Marley P. D. (1986). Effects of opioid peptides and morphine on histamine-induced catecholamine secretion from cultured, bovine adrenal chromaffin cells. *Br. J. Pharmacol.* 89: 327-334.

157. López, M. G., Villarroya, M., Lara, B., Martínez-Sierra, R., Albillos, A., Gandía, L. y García, A. G. (1994). Q- and L-type Ca^{2+} channels dominates the control of secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett.* 349: 331-337.
158. Lytton, J., Westlin, M. y Hanley, M. R. (1991). Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase family pumps. *J. Biol. Chem.* 266: 17067-17071.
159. Malgaroli, A. y Meldolesi, J. (1991). $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations from internal stores sustain exocytic secretion from the chromaffin cells of the rat. *FEBS. Lett.* 283: 169-172.
160. Malhotra, R. K. y Wakade, A. R. (1987). Vasoactive intestinal polypeptide stimulates the secretion of catecholamines from de rat adrenal gland. *J. Physiol.* 388: 285-294.
161. Malhotra, R. K., Wakade, T. D. y Wakade, A. R. (1988). Vasoactive intestinal polypeptide and muscarine mobilize intracellular Ca^{2+} through breakdown of phosphoinositides to induce catecholamine secretion. Role of IP_3 in exocytosis. *J. Biol. Chem.* 263: 2123-2126.
162. Martin, A. O., Mathieu, M. N., Chevillard, C. y Guérineau, N. C. (2001). Gap junctions mediate electrical signalling and ensuing cytosolic Ca^{2+} increases between chromaffin cells in adrenal slices: a role in catecholamine release. *J. Neurosci.* 21: 5397-5405.
163. Mathiasen, D., Rossum, L. M., Robinson, I. M., Burgoyne, R. D., East, J. M., Moller, M., Rasmussen, H. N. y Treiman, M. (1993). Isolation of chromaffin cell thapsigargin-sensitive Ca^{2+} store in light microsomes from bovine adrenal medulla. *Int. J. Biochem.* 25: 641-652.
164. McKenzie, S. y Marley, P. D. (2002). Caffeine stimulates Ca^{2+} entry through store-operated channels to activate tyrosine hydroxylase in bovine chromaffin cells. *Eur. J. Neurosci.* 15: 1485-1492.
165. Meissner, G., Darling, E. y Eveleth, J. (1986). Kinetics of rapid Ca^{2+} release by sarcoplasmic reticulum. Effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} , and adenine nucleotides. *Biochemistry* 25: 236-244.
166. Meldolesi, J. y Pozzan, T. (1998). The endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: a view from the lumen. *Trends Biochem. Sci.* 23: 10-14.

167. Mellor, H. y Parker, P. J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* 332: 281-292.
168. Michel-Béchet, M., Cotte, G. V., Picard, D. y Haon, A. M. (1963). Ultrastructure cytology of the adrenal medulla of the golden hamster. *Ann. Endocrinol. (Paris)* 24: 1044-1048.
169. Michelena, P., de la Fuente, M. T., Vega, T., Lara, B., López, M. G., Gandía, L. y García, A. G. (1997). Drastic facilitation by alpha-latrotoxin of bovine chromaffin cell exocytosis without measurable enhancement of Ca^{2+} entry or $[\text{Ca}^{2+}]_i$. *J. Physiol.* 502: 481-496.
170. Michelena, P., Vega, T., Montiel, C., López, M. G., García-Pérez, L. E., Gandía, L. y García, A. G. (1995). Effects of tyramine and Ca^{2+} on the kinetics of secretion in intact and electroporated chromaffin cells superfused at high speed. *Pflügers Arch.* 431: 283-296.
171. Miyakawa, T., Mizushima, A., Hirose, K., Yamazawa, T., Bezprozvanny, I., Kurosaki, T. y Iino, M. (2001). Ca^{2+} -sensor region of IP_3 receptor controls intracellular Ca^{2+} signaling. *EMBO J.* 20: 1674-1680.
172. 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. USA* 92: 3065-3069.
173. Montero, M., Alonso, M. T., Albillos, A., Cuchillo-Ibáñez, I., Olivares, R., García, A. G., García-Sancho, J. y Álvarez, J. (2001a). Control of secretion by mitochondria depends on the size of the local $[\text{Ca}^{2+}]$ after chromaffin cell stimulation. *Eur. J. Neurosci.* 13: 2247-2254.
174. Montero, M., Alonso, M. T., Albillos, A., Cuchillo-Ibáñez, I., Olivares, R., Villalobos, C. y Álvarez, J. (2002a). Effect of inositol 1,4,5-triphosphate receptor stimulation on mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$ and secretion in chromaffin cells. *Biochem. J.* 365: 451-459.
175. Montero, M., Alonso, M. T., Albillos, A., García-Sancho, J. y Álvarez, J. (2001b). Mitochondrial Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mediated by the Ca^{2+} uniporter. *Mol. Biol. Cell* 12: 63-71.
176. Montero, M., Alonso, M. T., Carnicero, E., Cuchillo-Ibáñez, I., Albillos, A., García, A. G. y Álvarez, J. (2000). Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion. *Nat. Cell Biol.* 2: 57-61.

177. Montero, M., Barrero, M. J. y Álvarez, J. (1997). $[Ca^{2+}]$ microdomains control agonist-induced Ca^{2+} release in intact HeLa cells. *FASEB J.* 11(11): 881-885.
178. Montero, M., Brini, M., Marsault, R., Álvarez, J., Sitia, R., Pozzan, T. y Rizzuto, R. (1995). Monitoring dynamic changes in free Ca^{2+} concentration in the endoplasmic reticulum in intact cells. *EMBO J.* 14: 5467-5475.
179. Montero, M., Lobatón, C. D., Gutiérrez-Fernández, S., Moreno, A. y Álvarez, J. (2003). Modulation of histamine-induced Ca^{2+} release by protein kinase C. Effects on cytosolic and mitochondrial $[Ca^{2+}]$ peaks. *J. Biol. Chem.* 278: 49972-49979.
180. Montero, M., Lobatón, C. D., Moreno, A. y Álvarez, J. (2002b). A novel regulatory mechanism of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter revealed by the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor sb202190. *FASEB J.* 16: 1955-1957.
181. Moore, G. A., McConkey, D. J., Kass, G. E., O'Brien, P. J. y Orrenius, S. (1987). 2,5-di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone: a novel inhibitor of liver microsomal Ca^{2+} sequestration. *FEBS Lett.* 224: 331-336.
182. Moro, M. A., López, M. G., Gandía, M., Michelena, P. y García, A. G. (1990). Separation and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medullae. *Anal. Biochem.* 185: 243-248.
183. Moro, M. A., Michelena, P., Sánchez-García, P., Palmer, R., Moncada, S. y García, A. G. (1993). Activation of adrenal medullar L-arginine: nitric oxide pathway by stimuli which induce the release of catecholamines. *Eur. J. Pharmacol.* 246: 213-218.
184. Moser, T. (1998). Low-conductance intercellular coupling between mouse chromaffin cells in situ. *J Physiol* 506: 195-205.
185. Moser, T. y Neher, E. (1997). Rapid exocytosis in single chromaffin cells recorded from mouse adrenal slices. *J. Neurosci.* 17: 2314-2323.
186. Mundorf, M. L., Troyer, K. P., Hochstetler, S. E., Near, J. A. y Wightman, R. M. (2000). Vesicular Ca^{2+} participates in the catalysis of exocytosis. *J. Biol. Chem.* 275: 9136-9142.
187. Negishi, M., Ito, S. y Hayaishi, O. (1990). Involvement of protein kinase C in prostaglandin E_2 -induced catecholamine release from culture bovine adrenal chromaffin cell. *J. Biol. Chem.* 265: 6182-6188.

188. Neher, E. (1998). Vesicle pools and Ca^{2+} microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* 20: 389-399.
189. Neher, E. y Augustine, G. J. (1992). Ca^{2+} gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* 450: 273-301.
190. Newton, A. (1995). Protein kinase C: structure, function and regulation. *J. Biol. Chem.* 270: 28495-28498.
191. Newton, A. y Johnson, J. E. (1998). Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. *Biochim. Biophys. Acta* 1376: 155-177.
192. Nicoll, D. A., Longoni, S. y Philipson, K. D. (1990). Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. *Science* 250: 562-565.
193. Nicoll, D. A., Quednau, B. D., Xia, Y. R., Lusic, A. J. y Philipson, K. D. (1996). Cloning of a third mammalian $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, NCX3. *J. Biol. Chem.* 271: 24914-24921.
194. Nishizuka, Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 9: 484-496.
195. Noble, E. P., Bommer, M., Liebisch, D. y Herz, A. (1988). H1-histaminergic activation of catecholamine release by chromaffin cells. *Biochem. Pharmacol.* 37: 221-228.
196. Novalbos, J., Abad-Santos, F., Zapater, P., Álvarez, J., Alonso, M. T., Montero, M. y García, A. G. (1999). Novel antimigraineur dotarizine release Ca^{2+} from caffeine-sensitive Ca^{2+} stores of chromaffin cells. *Br. J. Pharmacol.* 128: 621-626.
197. Novara, M., Baldelli, P., Cavallari, D., Carabelli, V., Giaccipolli, A. y Carbone, E. (2004). Exposure to cAMP and β -adrenergic stimulation recruits Ca_v3 T-type channels in rat chromaffin cells through Epac cAMP-receptor proteins. *J. Physiol.* 558: 433-449.
198. Núñez, L., de la Fuente, M. T., García, A. G. y García-Sancho, J. (1995). Differential Ca^{2+} responses of adrenergic and noradrenergic chromaffin cells to various secretagogues. *Am. J. Physiol.* 269: 1540-1546.

199. O'Farrell, M., Ziogas, J. y Marley, P. D. (1997). Effects of N- and L-type Ca^{2+} channel antagonists and (+/-)-Bay K8644 on nerve-induced catecholamine secretion from bovine perfused adrenal glands. *Br. J. Pharmacol.* 121: 381-388.
200. Okita, M., Watanabe, Y., Taya, K., Utsumi, H. y Hayashi, T. (2000). Presynaptic L-type Ca^{2+} channels on excessive dopamine release from rat caudate putamen. *Physiol. Behav.* 68: 823-867.
201. Olivera, B. M., Miljanich, G. P., Ramachandran, J. y Adams, M. E. (1994). Ca^{2+} channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 823-867.
202. Ornberg, R. L., Furuya, S., Goping, G. y Kuijpers, G. A. J. (1995). Granule swelling in stimulated bovine adrenal chromaffin cells: regulation by internal granule pH. *Cell Tissue Res.* 279: 85-92.
203. Orozco, C., de Diego, A. M. G., Arias, E., Hernández-Guijo, J. M., García, A. G., Villarroja, M. y López, M. G. (2006). Depolarization preconditioning produces cytoprotection against veratridine-induced chromaffin cell death. *Eur. J. Pharmacol.* 553: 28-38.
204. Pan, C. Y., Chu, Y. S. y Kao, L. S. (1998). Molecular study of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem. J.* 336: 305-310.
205. Pan, C. Y. y Fox, A. P. (2000). Rundown of secretion after depletion of intracellular Ca^{2+} stores in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.* 75: 1132-1139.
206. Pan, C. Y., Huang, C. H. y Lee, C. H. (2006). Ca^{2+} elevation elicited by reverse mode $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange activity is facilitated by intracellular Ca^{2+} stores in bovine chromaffin cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342: 589-595.
207. Parekh, A. B., y Putney, J. W. Jr. (2005). Store-operated Ca^{2+} channels. *Physiol. Rev.* 85: 757-810.
208. Parsons, T. D., Coorssen, J. R., Horstmann, H. y Almers, W. (1995). Docked granules, the exocytic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells. *Neuron* 15: 1085-1096.

209. de Pascual, R., García, A. G. (2007). Ouabain augments and maintains the catecholamine release responses evoked by repetitive pulses of potassium, caffeine or histamine in perfused bovine chromaffin cells. *Eur. J. Pharmacol.* 568: 99-105.
210. Patterson, R. L., van Rossum, D. B. y Gill, D. L. (1999). Store-operated Ca^{2+} entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell* 98: 487-499.
211. Pelto-Huikko, M., Salminen, T. y Hervonen, A. (1985). Localization of enkephalins in adrenaline cells and the nerves innervating adrenaline cells in rat adrenal medulla. *Histochemistry* 82: 377-383.
212. Perney, T. M., Hirning, L. D., Leeman, S. E., Miller, R. J. (1986). Multiple Ca^{2+} channels mediate neurotransmitter release from peripheral neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6656-6659.
213. Phillips, J. H. (1982). Dynamic aspects of chromaffin granule structure. *Neurosci.* 7: 1595-1609.
214. Pivovarova, N. B., Hongpaisan, J., Andrews, S. B. y Friel D. D. (1999). Depolarization-induced mitochondrial Ca^{2+} accumulation in sympathetic neurons: spatial and temporal characteristics. *J. Neurosci.* 19: 6372-6384.
215. Plattner, H., Artalejo, A. R. y Neher, E. (1997). Ultrastructural organization of bovine chromaffin cell cortex-analysis by cryofixation and morphometry of aspects pertinent to exocytosis. *J. Cell Biol.* 139: 1709-1717.
216. Pocotte, S. L., Frye, R. A., Senter, R. A., TerBush, D. R., Lee, S. A. y Holz, R. W. (1985). Effect of phorbol ester on catecholamines secretion and protein phosphorylation in adrenal medullary cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 930-934.
217. Poulsen, J. C., Caspersen, C., Mathiasen, D., East, J. M., Tunwell, R. E., Lal, F. A., Maeda, N., Mikishiba, K. y Treiman, M. (1995). Thapsigargin-sensitive Ca^{2+} -ATPases account for Ca^{2+} uptake to inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive and caffeine-sensitive Ca^{2+} stores in adrenal chromaffin cells. *Biochem. J.* 307: 749-758.
218. Powis, D. A., Clark, C. L. y O'Brien, K. J. (1996). Depleted internal stores-activated Ca^{2+} entry can trigger neurotransmitter release in bovine chromaffin cells. *Neurosci. Lett.* 204: 165-168.
219. Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P. y Meldolesi, J. (1994). Molecular and cellular physiology of intracellular Ca^{2+} stores. *Physiol. Rev.* 74: 595-636.

220. Putney, J. W. Jr. (2003). Capacitative Ca^{2+} entry in the nervous system. *Cell Calcium* 34: 339–344.
221. Randall, A. y Tsien, R. W. (1995). Pharmacological dissection of multiple types of Ca^{2+} channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* 15: 2995-3012.
222. Reeves, J. P. y Hale, C. C. (1984). The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange system. *J. Biol. Chem.* 259: 7733-7739.
223. Ridgway, E. B. y Ashley, C. C. (1967). Ca^{2+} transients in single muscle fibers. *BBRC.* 29: 229-234.
224. Ridgway, E. B., Gilkey, J. C. y Jaffe, L. F. (1977). Free Ca^{2+} increases explosively in activating medaka eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 623-627.
225. Rittenhouse, A. R. y Zigmond, R. E. (1999). Role of N- and L-type Ca^{2+} channels in depolarization-induced activation of tyrosine hydroxylase and release of norepinephrine by sympathetic cell bodies and nerve terminals. *J. Neurobiol.* 40: 137-148.
226. Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M. y Pozzan, T. (1993). Microdomains with high Ca^{2+} close to IP_3 -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* 262: 744-747.
227. Rizzuto, R., Simpson, A. W., Brini, M., Pozzan, T. (1992). Rapid changes of mitochondrial Ca^{2+} revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature* 358: 325-327.
228. Robinson, I. M., Cheek, T. R. y Burgoyne, R. D. (1992). Ca^{2+} influx induced by the Ca^{2+} -ATPase inhibitors 2,5-di-(t-butyl)-1,4-benzohydroquinone and thapsigargin in bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem. J.* 288: 457-463.
229. Rodríguez del Castillo, A., Lemaire, S., Tchakarov, L., Jeyapragasan, M., Doucet, J. P., Vitale, M. L. y Trifaró, J. M. (1990). Chromaffin cell scinderin, a novel Ca^{2+} -dependent actin filament-severing protein. *EMBO J.* 9: 43-52.
230. Rodríguez del Castillo, A., Vitale, M. L. y Trifaró, J. M. (1992). Ca^{2+} and pH determine the interaction of chromaffin cell scinderin with phosphatidylserine and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and its cellular distribution during nicotinic-receptor stimulation and protein kinase C activation. *J. Cell Biol.* 119: 797-810.

231. Rosé, S. D., Lejen, T., Zhang, L. y Trifaró, J. M. (2001). Chromaffin cell F-actin disassembly and potentiation of catecholamine release in response to protein kinase C activation by phorbol esters is mediated through miristoyleated alanine-rich C kinase substrate phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 276: 36757-36763.
232. von Rüden, L. y Neher, E. (1993). Ca^{2+} -dependent early step in the release of catecholamines from adrenal chromaffin cells. *Science* 262: 1061-1064.
233. Sather, W. A., Tanabe, T., Ahang, J. F., Mori, Y., Adams, M. E. y Tsien, R. W. (1993). Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) Ca^{2+} channels α_1 subunits. *Neuron* 11: 291-303.
234. Schneider, R., Wray, V., Nimtz, M., Lehmann, W. D., Kirch, U., Antolovic, R. y Schoner, W. (1998). Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump. *J. Biol. Chem.* 273: 784-792.
235. Shimomura, O. (1986). Isolation and properties of various molecular forms of aequorin. *Biochem. J.* 234: 271-277.
236. Smith A. D. (1968). The storage of hormones. *Biochem. J.* 109: 17P-19P.
237. Smith, C. (1999). A persistent activity-dependent facilitation in chromaffin cells is caused by Ca^{2+} activation of protein kinase C. *J. Neurosci.* 19: 589-598.
238. Smith, C., Moser, T., Xu, T. y Neher, E. (1998). Cytosolic Ca^{2+} acts by two separate pathways to modulate the supply of release-competent vesicles in chromaffin cells. *Neuron* 20: 1243-1253.
239. Spedding, M. (1985). Ca^{2+} antagonists subgroups. *Trends Pharmacol. Sci.* 6: 109-114.
240. Sörensen, J. B. (2004). Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflügers Arch.* 448: 347-362.
241. Sörensen, J. B., Nagy, G., Varoqueaux, F., Nehring, R. B., Brose, N., Wilson, M. C, y Neher, E. (2003). Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23. *Cell* 114: 75-86.
242. Stauderman, K. A. y Pruss, R. M. (1990). Different patterns of agonist-stimulated increases of ^3H -inositol phosphate isomers and cytosolic Ca^{2+} in bovine adrenal

chromaffin cells: comparison of the effects of histamine and angiotensin II. *J. Neurochem.* 54: 946-953.

243. Steyer, J. A., Horstmann, H. y Almers, W. (1997). Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature* 388: 474-478.

244. Takasago, T., Imagawa, T., Furukawa, K., Ogurusu, T. y Shigekawa, M. (1991). Regulation of the cardiac ryanodine receptor by protein kinase-dependent phosphorylation. *J. Biochem.* 109: 163-170.

245. Taylor, C. W. (1998). Inositol triphosphate receptors: Ca^{2+} -modulated intracellular Ca^{2+} channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1436: 19-33.

246. Taylor, C. W. y Laude, A. J. (2002). IP_3 receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca^{2+} . *Cell Calcium* 32: 321-334.

247. Teraoka, H., Nakazato, Y. y Ohga, A. (1991). Ryanodine inhibits caffeine-evoked Ca^{2+} mobilization and catecholamine secretion from cultured bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.* 57: 1884-1890.

248. TerBush, D.R., Bittner, M. A., Holz, R. W. (1988). Ca^{2+} influx causes rapid translocation of protein kinase C to membranes. Studies of the effects of secretagogues in adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 263: 18873-18879.

249. TerBush, D. R. y Holz, R. W. (1986). Effects of phorbol esters, diglyceride, and cholinergic agonists on the subcellular distribution of protein kinase C in intact or digitonin-permeabilized adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 261: 17099-17106.

250. Thapstrup, O. (1990). Role of Ca^{2+} -ATPases in the regulation of cellular Ca^{2+} signalling, as studied with the selective microsomal Ca^{2+} -ATPase inhibitor, thapsigargin. *Agents Actions.* 29: 8-15.

251. Thapstrup, O., Cullen, P. J. Drobak, B. K., Hanley, M. R. y Dawson, A. P. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 2466-2470.

252. Thomas, D., Tovey, S. C., Collins, T. J., Bootman, M. D., Berridge, M. J. y Lipp, P. (2000). A comparison of fluorescent Ca^{2+} indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca^{2+} signals. *Cell Calcium.* 28: 213-223.

253. Tokumura, A., Okuno, M., Fukuzawa, K., Houchi, H., Tsuchiva, K. y Oka, M. (1998). Positive and negative controls by protein kinases of Na⁺-dependent Ca²⁺ efflux from cultured bovine adrenal chromaffin cells stimulated by lysophosphatidic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1389: 67-75.
254. Trifaró, J. M. (1999). Chromaffin cell cortical F-actin dynamics is controlled by two pathways: A) Ca²⁺-scinderin and B) Protein Kinase C-MARKS. 10th Int. Symp. Chromaffin Cell Biology, Bergen, Norway, 64p.
255. Trifaró, J. M., Rosé, S. D., Lejen, T. y Elzagallaai, A. (2000). Two pathways control chromaffin cortical F-actin dynamics during exocytosis. *Biochimie* 82: 339-352.
256. Trifaró, J. M., Rosé, S. D., Pene, T. D., Barkar, N. D. y Seward, E. P. (2002). Pathways that control cortical F-actin dynamics during secretion. *Neurochem. Res.* 27: 1371-1385.
257. Trifaró, J. M. y Vitale, M. L. (1993). Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *Trends Neurosci.* 16: 466-472.
258. Török, T. L. y Powis, D. A. (1990). Catecholamine release from bovine chromaffin cells: the role of Na⁺/Ca²⁺ exchange in ouabain-evoked release. *Exp. Physiol.* 75: 573-586.
259. Tsien., R. W., Ellinor, P. T. y Horne, W. A. (1991). Molecular diversity of voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Trends. Pharmacol. Sci.* 12: 349-354.
260. Unsicker, K., Rieffert, B. y Ziegler, W. (1980). Effects of cell culture conditions, nerve growth factor, dexamethasone, and cyclic AMP on adrenal chromaffin cells *in vitro*. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 25: 51-59.
261. Usachev, Y. M., DeMarco, S. J., Campbell, C., Strehler, E. E. y Thayer, S. A. (2002). Bradykinin and ATP accelerate Ca²⁺ efflux from rat sensory neurons via protein kinase C and de plasma membrane Ca²⁺ pump isoform 4. *Neuron* 33: 113-122.
262. Usachev, Y. M., Marsh, A. J., Johanns, T. J., Lemke, M. M. y Thayer, S. A. (2006). Activation of protein kinase C in sensory neurons accelerates Ca²⁺ uptake into the endoplasmic reticulum. *J. Neurosci.* 26: 311-318.

263. Verdaguer, N., Corbalán-García, S, Ochoa, W. F., Fita, I. y Gómez-Fernández, J. C. (1999). Ca^{2+} bridges the C2 membrane-binding domain of protein kinase $\text{C}\alpha$ directly to phosphatidylserine. *EMBO J.* 18: 6329-6338.
264. Villalobos, C., Núñez, L., Montero, M., García, A. G., Alonso, M. T., Chavero, P., Álvarez, J. y García-Sancho, J. (2002). Redistribution of Ca^{2+} among cytosol and organelle during stimulation of bovine chromaffin cells. *FASEB J.* 16: 343-353.
265. Villarroya, M., Olivares, R., Ruíz-Nuño, A, Cano-Abad M. F., de Pacual, R., Lomax, R. B., López, M. G., Mayorgas, I., Gandía, L. y García, A. G. (1999). Voltage inactivation of Ca^{2+} entry and secretion associated with N- and P/Q type but no L-type Ca^{2+} channels of bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* 516: 421-432.
266. Vitale, M. L., Rodríguez del Castillo, A., Tchakarov, L. y Trifaró, J. M. (1991). Cortical filamentous actin disassembly and scinderin redistribution during chromaffin cell stimulation precede exocytosis, a phenomenon not exhibited by gelsolin. *J. Cell Biol.* 113: 1057-1067.
267. Vitale, M. L., Rodríguez del Castillo, A. y Trifaró, J. M. (1992). Protein kinase C activation by phorbol esters induces chromaffin cell cortical filamentous actin disassembly and increases the initial rate of exocytosis in response to nicotinic receptor stimulation. *Neuroscience* 51: 463-474.
268. Vitale, M. L., Seward, E. P. y Trifaró, J. M. (1995). Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron* 14: 353-363.
269. Voets, T. (2000) Dissection of three Ca^{2+} -dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron* 28: 537-545.
270. Voets, T., Moser, T., Lund, P. E., Chow, R. H., Geppert, M., Sudhof, T. C. y Neher, E. (2001). Intracellular Ca^{2+} dependence of large dense-core vesicle exocytosis in the absence of synaptotagmin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11680-11685.
271. Voets, T., Neher, E. y Moser, T. (1999). Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron* 23, 607-615.
272. Wei, H. y Perry, D. C. (1996). Dantrolene is cytoprotective in two models of neuronal cell death. *J. Neurochem.* 67: 2390-2398.

273. Werth, J. L. y Thayer, S. A. (1994). Mitochondria buffer physiological Ca^{2+} loads in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* 14: 346-356.
274. Wheeler, D. B., Randall, A. y Tsien, R. W. (1994). Roles of N-type and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 264: 107-111.
275. White, R. J. y Reynolds, I. J. (1997). Mitochondria accumulate Ca^{2+} following intense glutamate stimulation of cultured rat forebrain neurons. *J. Physiol.* 498: 31-47.
276. Wilson, S. P. and Kirshner, N. (1977). The acetylcholine receptor of the adrenal medulla. *J. Neurochem.* 24: 687-695.
277. Winkler, H. (1976). The composition of adrenal chromaffin granules: an assessment of controversial results. *Neuroscience* 1: 65-80.
278. Winkler, H. (1993). The adrenal chromaffin granule: a model for large dense core vesicles of endocrine and nervous tissue. *J. Anat.* 183: 237-252.
279. Winkler, H. y Fisher-Colbrie, R. (1998). Regulation of the biosynthesis of large dense-core vesicles in chromaffin cells and neurons. *Cell. Mol. Neurobiol.* 18: 193-209.
280. Wurtman, R. J. y Axelrod, J. (1965). Adrenaline synthesis: control by the pituitary gland and adrenal glucocorticoids. *Science* 150: 1464-1465.
281. Xu, T., Naraghi, M., Kang, H y Neher, E. (1997). Kinetic studies of Ca^{2+} binding and Ca^{2+} clearance in the cytosol of adrenal chromaffin cells. *Biophys. J.* 73: 532-545.
282. Yanagita, T., Kobayashi, H., Yamamoto, R., Kataoka, H., Yokoo, H., Shiraishi, S., Minami, S., Koono, M. y Wada, A. (2000). Protein kinase C- α y - ϵ down-regulate cell surface Na^+ channels via differential mechanisms in adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.* 74: 1674-1684.
283. Yang, D. M. y Kao, L. S. (2001). Relative contribution of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) and endoplasmic reticulum in the regulation of cytosolic Ca^{2+} and catecholamine secretion of bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.* 76: 210-216.
284. Yang, Y., Udausankar, S., Dunning, J., Chen, P. y Gillis, K. D. (2002). A highly Ca^{2+} -sensitive pool of vesicles is regulated by protein kinase C in adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 17060-17065.

285. Yeung, H. M., Kravtsov, G. M., Ng, K. M., Wong, T. M. Y Fung, M. L. (2007). Chronic intermittent hypoxia alters Ca^{2+} handling in rat cardiomyocytes by augmented $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange and ryanodine receptor activities in ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292: C2046-C2056.
286. Yoshida, I., Monji, A., Tashiro, K., Nakamura, K., Inouke, R. y Kanba, S. (2006). Depletion of intracellular Ca^{2+} stores itself may be a major factor in thapsigargin-induced ER stress and apoptosis in PC12 cells. *Neurochem. Int.* 48: 696-702.
287. Zerbes, M., Bunn, S. J. y Powis, D. A. (1998). Histamine causes Ca^{2+} entry via both a store-operated and a store-independent pathway in bovine adrenal chromaffin cells. *Cell Calcium* 23: 379-386.
288. Zerby, S. E. y Ewing, A. G. (1996). The Latency of Exocytosis Varies with the Mechanism of Stimulated release in PC12 Cells. *Journal of Neurochemistry* 66, 651-657.
289. Zhang, L., Rodríguez del Castillo, A. y Trifaró, J. M. (1995). Histamine-evoked chromaffin cell scinderin redistribution, F-actin disassembly, and secretion: in the absence of cortical F-actin disassembly, an increase in intracellular Ca^{2+} fails to trigger exocytosis. *J. Neurochem.* 65: 1297-1308.
290. Zhou, Z. y Mislser, S. (1995). Action potential-induced quantal secretion of catecholamines from rat adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 270: 3498-3505.
291. Zucchi, R. y Ronca-Testoni, S. (1997). The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol. Rev.* 49, 1-51.
292. Zylinska, L., Kozaczuk, A., Szemraj, J., Kargas, C. y Kowalska, I. (2007). Functional importance of PMCA isoforms in growth and development of PC12 cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1099, 254-269.
293. Zylinska, L., Soszynski, M. (2000). Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in excitable and nonexcitable cells. *Acta Biochim. Pol.* 47:529-539.

