

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Fonente: Dr. D^a. Juana Benedi Gontalez

TRIBUNAL

Presidente: Sr. Dr. Rafael Cadorniga Carro

Vocal: Sr. Dr. Angel H^o Villar del Fresno

Vocal: Sr. Dr. Jesus Fries Iniesta

Vocal: Sr. Dr. Carmen Montiel

Secretario: Sr. Dr. Maite Tepezina Sanchez

UN CANAL DE POTASIO ACTIVADO
POR CALCIO REGULA LA SECRECION
MUSCARINICA EN LA
CELULA CROMAFIN FELINA.

TESIS DOCTORAL
GRACIA UCEDA PEREA
MADRID, 1993

Abreviaturas

ACh	Acetilcolina
AD	Adrenalina
ATP	Trifosfato de adenosina
B _{max}	Máximo número de centros de unión para un ligando
Ca _e ²⁺	Calcio extracelular
Ca _i ²⁺	Calcio intracelular
DHP	Dihidropiridina
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DTC	D-tubocurarina
Fura-2-AM	Ester de acetoximetilo del fura-2
NA	Noradrenalina
TEA	Tetraetilamonio

INDICE

INDICE.....	1
INTRODUCCION.....	6
I. La médula adrenal y el proceso secretor.....	7
I.1. La glándula adrenal y las catecolaminas.....	7
I.2. La célula cromafín como modelo de paraneurona....	9
I.3. El proceso secretor en la célula cromafín.....	9
II. El receptor muscarínico en las células cromafines.....	13
II.1. Caracterización mediante ensayos de fijación de radioligandos.....	13
II.2. El receptor muscarínico de la médula adrenal bovina. Variaciones del calcio intracelular.....	14
II.3. El receptor muscarínico y la secreción de catecolaminas.....	17
II.3.1. La médula adrenal de rata y de pollo.....	17
II.3.2.- La médula adrenal de gato.....	18
III. Canales de potasio en la médula adrenal.....	20
III.1. Clases de canales de potasio.....	20
III.2. Canales de potasio modulados por calcio.....	21
III.2.1. Tipos de canales de potasio modulados por calcio.....	24
III.3. Moduladores de los canales de potasio.....	26
III.3.1. Toxinas.....	26
III.3.2. Agentes farmacológicos.....	28
IV. Corrientes iónicas asociadas a la estimulación muscarínica.....	29
JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.....	33
MATERIALES Y METODOS.....	36
I. Estudios de la liberación de catecolaminas en la glándula adrenal de gato perfundida "in vitro".....	37
I.1. Aislamiento y preparación de la glándula adrenal para su perfusión.....	37
I.2. Perfusión y recogida de muestras.....	39
I.3. Determinación de catecolaminas en las muestras del líquido de perfusión.....	39
I.3.1. Medida de las catecolaminas totales.....	39
I.3.2. Determinación del contenido diferencial de catecolaminas.....	42

II. Monitorización de los niveles de calcio citosólico en células cromafines felinas.....	43
II.1. Aislamiento y cultivo de células cromafines de la médula adrenal de gato.....	43
II.2. Medida de la concentración de calcio libre citosólico en células cargadas con fura-2.....	44
III. Soluciones y fármacos utilizados.....	48
IV. Análisis estadístico.....	49
RESULTADOS.....	50
I. Modulación por los canales de potasio dependientes de calcio de la respuesta secretora mediada por el receptor muscarínico en la médula adrenal de gato.....	51
I.1. Efecto de los distintos bloqueantes de los canales de potasio dependientes de calcio sobre la respuesta secretora producida por la estimulación del receptor muscarínico en la glándula adrenal de gato perfundida.....	51
I.1.1. Respuesta secretora producida por la activación repetida del receptor muscarínico.....	51
I.1.2. Efecto de la d-tubocurarina sobre la respuesta secretora muscarínica.....	53
I.1.2.1. Potenciación por la d-tubocurarina de la respuesta secretora producida por estimulación del receptor muscarínico.....	53
I.1.2.2. Ausencia de un efecto nicotínico en la potenciación por d-tubocurarina de la respuesta secretora muscarínica.....	57
I.1.2.3. Dependencia de la respuesta muscarínica y su potenciación por la d-tubocurarina del calcio extracelular. Efecto del Bay K 8644 y de la isradipina.....	59
I.1.3. Efecto de apamina sobre la respuesta secretora producida por estimulación del receptor muscarínico.....	63
I.1.4. Efecto del tetraetilamonio.....	66

I.1.5. Efecto de la apamina, la d-tubocurarina y el tetraetilamonio sobre la secreción basal de catecolaminas.....	68
I.2. Efecto de la apamina y la d-tubocurarina sobre la señal de calcio intracelular.....	68
II. Componentes fásico y tónico de la secreción muscarínica. Origen del calcio requerido para cada uno de ellos.....	73
II.1. Estudio del curso temporal de la respuesta secretora mediada por estimulación del receptor muscarínico en la glándula adrenal de gato.....	73
II.2. Modulación por la apamina de los componentes fásico y tónico de la respuesta muscarínica.....	75
II.3. Efecto de la apamina sobre la secreción diferencial de catecolaminas.....	79
II.4. Existencia de un componente fásico y uno tónico en el incremento de calcio intracelular mediado por metacolina.....	81
II.5. Contribución relativa del calcio extracelular e intracelular a los componentes fásico y tónico de la respuesta muscarínica.....	84
II.5.1. Efecto de distintas situaciones de oferta de calcio sobre la secreción mediada por la estimulación del receptor muscarínico.....	84
II.5.2 Efecto de distintas situaciones de oferta de calcio sobre la señal de calcio intracelular mediada por la estimulación del receptor muscarínico.....	86
II.5.3. Efecto de la apamina en distintas condiciones de oferta de calcio sobre la señal de calcio intracelular y en la secreción de catecolaminas mediadas por estimulación del receptor muscarínico.....	88
DISCUSION.....	92
I. Los canales de potasio dependientes de calcio modulan la secreción muscarínica en las células cromafines de gato.....	93

II. Evidencias farmacológicas sobre el tipo de canales de potasio dependientes de calcio que modulan la respuesta secretora muscarínica.....	94
III. Participación de los canales de calcio de tipo L en la respuesta secretora muscarínica y en su potenciación por la d-tubocurarina.....	95
IV. Existencia de un patrón común a la respuesta secretora y de calcio intracelular inducidas por la estimulación muscarínica	97
V. Las fuentes de calcio en la respuesta secretora muscarínica.....	97
VI. Modelo propuesto para la respuesta muscarínica en la médula adrenal de gato.....	100
CONCLUSIONES.....	103
BIBLIografía.....	105

INTRODUCCION

I.- LA MEDULA ADRENAL Y EL PROCESO SECRETOR

I.1.- LA GLANDULA ADRENAL Y LAS CATECOLAMINAS.

La glándula suprarrenal consta de dos regiones bien diferenciadas: la corteza y la médula. La corteza suprarrenal secreta un grupo de hormonas llamadas corticosteroides, todas ellas sintetizadas a partir del colesterol. Hay dos tipos principales de corticosteroides, los mineralocorticoides, que actúan fundamentalmente sobre los electrolitos de los líquidos extracelulares (sodio, potasio y cloruro) y los glucocorticoides (por ejemplo el cortisol) con distintos efectos en el metabolismo de los lípidos, proteínas e hidratos de carbono. La corteza suprarrenal secreta también hormonas sexuales (andrógenos).

La médula suprarrenal está constituida por las células cromafines, denominadas así por su afinidad por las sales de cromo, con las que se tiñen. En estas células se sintetizan y almacenan las catecolaminas, que eventualmente se liberan al torrente circulatorio. Estas son la adrenalina, la noradrenalina y la dopamina que se secretan en cantidades que varían mucho de una especie a otra; en concreto para el hombre la proporción es aproximadamente de un 20% de noradrenalina, un 80% de adrenalina, siendo la dopamina muy baja.

La médula adrenal está inervada por fibras colinérgicas que proceden directamente de la médula espinal. La estimulación de los nervios simpáticos trae como consecuencia que las catecolaminas liberadas a la sangre se repartan por todos los tejidos, uniéndose a los receptores adrenérgicos de los distintos órganos diana. La descarga simpática masiva prepara al organismo para desarrollar una actividad física enérgica a través de una serie de cambios adaptativos entre los que se encuentran: aumento de la presión arterial, aumento del riego sanguíneo en músculos activos y disminución de éste en los órganos que no son requeridos para una actividad rápida, aumento del metabolismo celular en todo el

cuerpo, aumento de la concentración de glucosa en la sangre; aumento de la glucólisis muscular; aumento de la actividad mental y aumento de la coagulación sanguínea. Esta serie de eventos constituye la denominada reacción de alarma simpática por la cual el individuo puede desarrollar una actividad física más intensa en un momento determinado.

La síntesis de las catecolaminas se inicia desde un aminoácido precursor que se encuentra en la sangre, la tirosina. Esta es captada por la célula y transformada en 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) por la enzima tirosina hidroxilasa, que es muy específica y limitante en la síntesis de catecolaminas. Esta enzima requiere oxígeno molecular, hierro y el coenzima pteridina. El producto final, la noradrenalina citosólica, inhibe a este enzima. Este es el paso más lento de toda la síntesis. La L-DOPA se transforma rápidamente en dopamina por obra de la dihidroxifenilalanina descarboxilasa (DOPA-descarboxilasa). La dopamina así generada es captada por los gránulos y origina noradrenalina merced a la dopamina B-hidroxilasa (DBH). La DBH requiere oxígeno molecular y ácido ascórbico y el cobre actúa como cofactor. En las células cromafines adrenérgicas, la noradrenalina se transforma en el citosol en adrenalina por la feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT). Esta catecolamina es captada en muy alta proporción por las vesículas. La PNMT es regulada por las hormonas corticales.

Las catecolaminas se encuentran almacenadas en el interior de los gránulos cromafines. La ATPasa Mg^{2+} -dependiente de la membrana del gránulo actúa como una bomba de protones que forma un gradiente de pH esencial en la captación de estas moléculas desde el citosol. Las catecolaminas se encuentran en las vesículas acompañadas de varios otros compuestos: proteínas como las cromograninas, neuropéptidos como las encefalinas, nucleótidos, Ca^{2+} , DBH, ácido ascórbico. La membrana granular tiene a su vez, DBH, Mg^{2+} ATPasa, citocromo b_{561} , actina, fosfolípidos, colesterol y mucopolisacáridos (Winkler y Westhead, 1980).

I.2.- LA CELULA CROMAFIN COMO MODELO DE PARANEURONA

La médula adrenal puede ser utilizada como modelo experimental para el estudio del funcionamiento de las células nerviosas, dado que las células cromafines son paraneuronas, es decir, células no consideradas neuronas pero que se encuentran relacionadas con éstas en términos de origen embriológico, estructura, función y metabolismo.

Fujita y Kobayashi en 1975, definen las características que ha de poseer una célula para ser considerada paraneurona: requieren poseer sustancias idénticas o relacionadas con los neurotransmisores o neurohormonas. La célula cromafín en ese sentido produce adrenalina que actúa como una neurohormona y noradrenalina, que es el neurotransmisor típico de los nervios simpáticos. Otro requisito es poseer vesículas de secreción, en este caso los gránulos cromafines. Deben secretar en respuesta a un estímulo, aquí, la acetilcolina liberada por el nervio esplácnico que activa sus receptores de membrana. Las células cromafines además, tienen un origen neuroectodérmico común con las neuronas simpáticas, y en cultivo emiten prolongaciones.

I.3.- EL PROCESO SECRETOR EN LA CELULA CROMAFIN.

La secreción de catecolaminas por las células cromafines se conoce desde las primeras décadas de este siglo. Ya en 1934, Feldberg y Minz demostraron que la estimulación del nervio esplácnico producía liberación de acetilcolina (ACh) y que esta molécula era responsable de la secreción de adrenalina por la médula suprarrenal. El ciclo secretor en la médula suprarrenal se describe con el término "acoplamiento excitación-secreción" (Douglas y Rubin, 1961, 1963) que alude a la estrecha relación que

existe entre la estimulación de los receptores y la liberación de las catecolaminas a la sangre, y el papel crítico que posee el Ca^{2+} entre estos dos fenómenos.

El ciclo secretor se pone en marcha cuando la acetilcolina liberada por el nervio esplácnico (Douglas y col., 1975; Wakade y col., 1981.) estimula los receptores nicotínicos (Lee y col., 1972; Schiavone y col., 1982; Kirpekar y col., 1982a y b; Role y Perlman, 1983; Ladona y col., 1984; Artalejo y col., 1985) y muscarínicos (Douglas y Poisner, 1965; Lee y Tredelenburg, 1967; Dixon y col., 1975; Wakade y Wakade, 1983; Warashina y col., 1989) situados en la membrana celular. Los gránulos cromafines entonces se aproximan a la membrana, se funden con ella y liberan las catecolaminas junto a todo el contenido soluble de los mismos mediante un proceso de exocitosis (Smith y Winkler, 1972).

La elevación del Ca^{2+} en el citosol es la señal intracelular que dispara todo este proceso. El receptor muscarínico al ser estimulado produce la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (Ca_i^{2+}), pero requiere una entrada de Ca^{2+} extracelular (Ca_e^{2+}) para potenciar y sostener esta elevación. Este aspecto será estudiado con más detenimiento más adelante. En el caso del receptor nicotínico, este incremento de Ca_i^{2+} se produce gracias a la entrada masiva de Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje (Douglas y col., 1967; Kidokoro y col., 1982; Fenwick y col., 1982a; Hirano y col., 1987; Ladona y col., 1987; Fonteriz y col., 1987; Lopez y col., 1989). Estos canales se abren como respuesta a una despolarización de la membrana plasmática debida a la entrada de sodio por el ionóforo asociado al receptor.

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje han sido ampliamente estudiados en la médula adrenal (Fenwick y Neher, 1982b; García y col., 1984 a y b; Ceña y col., 1989; Artalejo y col., 1991 a y b; Bossu y col., 1991 a y b). Su densidad en las células cromafines es de 1-10 canales por μm^2 (García y col., 1986). Se han realizado estudios tanto de secreción como de captación de ^{45}Ca , en los que se comprueba su implicación en ambos fenómenos cuando

se utilizan fármacos antagonistas orgánicos o inorgánicos de los canales de Ca^{2+} (Holz y col., 1982; Kirpekar y col., 1982a; Ceña y col., 1989) y agonistas del tipo de las dihidropiridinas (García y col., 1984 a y b). Estos canales se abren a ráfagas separadas entre sí por intervalos en los que el canal permanece cerrado. Se ha sugerido que el Ca^{2+} entra en el canal y se fija a uno o más sitios de unión a lo largo de éste, pasando de uno a otro consecutivamente (Hess y Tsien, 1984). Los canales de Ca^{2+} sufren un fenómeno de inactivación que parece ser dependiente tanto del voltaje (Reuter y col., 1982) como del ion portador de la corriente (Hagiwara y Byerly, 1981; Tsien y col., 1983; Artalejo y col., 1987).

Se conocen una serie de fármacos capaces de impedir de una forma más o menos selectiva el paso de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} . También se conocen compuestos activadores de los mismos, aunque en menor cantidad.

Los inhibidores inorgánicos de los canales de Ca^{2+} , en orden de mayor a menor potencia, son los siguientes: Zn^{2+} , Cd^{2+} , La^{3+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} (Gandia y col., 1987). Todos ellos son metales que poseen características fisicoquímicas similares al Ca^{2+} .

Los inhibidores orgánicos de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes son un grupo de fármacos químicamente heterogéneo cuya característica común es reducir la captación de Ca^{2+} por las células excitables cuando estas se despolarizan. Difieren no sólo en su estructura química, sino también en su especificidad tisular, lugares de fijación a la membrana y mecanismo de acción. Se clasifican en:

CLASE I: Está constituido por el grupo de las dihidropiridinas (DHP) que se fijan a un receptor situado en la macromolécula del canal de Ca^{2+} originando su cierre. Incluye la nifedipina, la nimodipina, la nitrendipina y el PN 200-110. Estos fármacos son más eficaces cuando la membrana se encuentra ligeramente despolarizada. Existen también fármacos dihidropiridínicos con acción agonista o activadora de los canales de Ca^{2+} . Con frecuencia

se trata de enantiómeros de compuestos antagonistas. Así, el (-) Bay K 8644 y el (+)-(s)-202-791 son agonistas, mientras que el (+) Bay K 8644 y el (-)-(R)-202-791 son antagonistas (Kokubun y col., 1986; Fonteriz y col., 1987; García y col., 1984a, Lopez y col., 1991).

CLASE II: Incluye al verapamil, diltiazem, D-600 y la diclofurima.

CLASE III: Son difenilalquilaminas. La cinaricina, la flunaricina o la prenilamina son componentes de este grupo.

Tras el proceso de entrada del Ca_e^{2+} al citosol y el desencadenamiento de la respuesta secretora, se ponen en marcha los sistemas homeostáticos de mantenimiento de la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$).

La $[Ca^{2+}]_i$ en el citosol en estado de reposo es de 50-100 nM, y la del medio extracelular es de 2,5 mM. Cuando se produce un aumento del Ca_i^{2+} hacia niveles μ M durante la excitación celular, los sistemas de tamponamiento intracelular como las mitocondrias (Carafoli y Lehninger, 1971), el retículo endoplásmico liso (Kendrick y col. 1977), las vesículas cromafines (Borowitz y col., 1967; Kostron y col., 1977), las proteínas fijadoras de Ca^{2+} y los sistemas de transporte de la membrana (ATPasa Ca^{2+} , Mg^{2+} -dependiente, sistemas de intercambio Na^+/Ca^{2+} y Ca^{2+}/Ca^{2+}) tienden a mantener constantes estas bajas concentraciones.

II.- EL RECEPTOR MUSCARINICO EN LAS CELULAS CROMAFINES.

II.1.- CARACTERIZACION MEDIANTE ENSAYOS DE FIJACION DE RADIOLIGANDOS.

Numerosos ensayos de fijación de ligandos marcados radioactivamente evidencian la existencia de receptores muscarínicos en la médula adrenal de distintas especies.

Así, en la médula adrenal del gato Ballesta y col., en 1989 hacen un estudio en el que describen que el [³H]QNB ([³H]quinuclidinil bencilato) se une a membranas purificadas con una curva de saturación monofásica que sugiere un solo sitio de unión con una K_d de 23 pM y una B_{max} de 67 fmol. mg prot⁻¹. Además, es desplazado con mayor potencia por la atropina que por la pirenzepina, lo cual apunta a que sea un receptor de tipo M_2 . En la médula adrenal bovina el [³H]QNB se une con una K_d de 29 pM y una B_{max} de 83 fmol (mg prot)⁻¹. El desplazamiento por pirenzepina sugiere dos sitios de unión con una K_{i1} de 39 nM y una K_{i2} de 2.734 nM.

Kayaalp y Neff (1979a y 1979b) estudian los receptores muscarínicos tanto en la médula adrenal de vaca como en la de rata y encuentran 20 veces más sitios de unión en esta última, aunque se debe tener en cuenta que los estudios se realizan sobre distinto material, pues, mientras que en la de rata se usa homogenizado de médula, en la de vaca, la fracción cruda de membrana. Los receptores en ambos animales poseen una K_d parecida.

II.2.- EL RECEPTOR MUSCARINICO DE LA MEDULA ADRENAL BOVINA. VARIACIONES DEL CALCIO INTRACELULAR.

En la médula adrenal de bovino, la secreción de catecolaminas puede ser mediada por una gama de agentes. Entre ellos se encuentran los agonistas nicotínicos, o concentraciones altas de K^+ , que producen despolarización de la membrana, generando potenciales de acción que, a su vez, abren los canales de Ca^{2+} , con lo que se incrementa el Ca_i^{2+} y se dispara la secreción. Otras sustancias capaces de producir secreción son la bradikinina, la angiotensina II (O' Sullivan y Burgoyne, 1984), o la histamina (Noble y col., 1987).

La estimulación del receptor muscarínico en la médula adrenal de bovina produce un incremento de $[Ca^{2+}]_i$ que es independiente del Ca_e^{2+} .

Kao y Schneider (1985) estudiaron el aumento de Ca_i^{2+} con la sonda fluorescente Quin-2 en células cromafines bovinas estimuladas con distintos secretagogos. Comprobaron que la ACh produce un aumento del Ca_i^{2+} desde los niveles de reposo hasta el rango μM , que es parcialmente bloqueado por hexametonio o por la retirada del Ca^{2+} extracelular, mientras que la porción resistente, se bloquea por atropina. Agonistas muscarínicos como la muscarina y la metacolina, producen a su vez un aumento del Ca_i^{2+} que se bloquea por atropina y es independiente del Ca_e^{2+} .

Sin embargo, en general, no se ha descrito una secreción de catecolaminas pareja al incremento de Ca_i^{2+} , o ésta ha sido muy pobre.

En 1985 Cheek y col. estimularon células cromafines bovinas con agonistas nicotínicos y muscarínicos y midieron incrementos en el Ca_i^{2+} (con Quin-2) y en la secreción de catecolaminas. Así como cuando utilizan los agonistas nicotínicos encuentran un aumento del

$[Ca^{2+}]_i$ dependiente del Ca_e^{2+} , los agonistas muscarínicos (la metacolina), producen un aumento del $[Ca^{2+}]_i$ independiente del $[Ca^{2+}]_e$, sensible a atropina y cuatro veces menor. Esta respuesta tarda en producirse 10 s, supuestamente necesarios para la génesis de IP_3 . La metacolina no produce secreción de catecolaminas, aunque a concentraciones superiores a 1 mM disminuye la secreción nicotínica por acción directa sobre este receptor. Concluyen, pues, que la activación del receptor muscarínico moviliza Ca^{2+} de depósitos intracelulares, que aunque eleva el Ca_i^{2+} es insuficiente para producir la secreción de catecolaminas.

O'Sullivan y Burgoine (1989) hablan de una pequeña secreción de catecolaminas producida por la acción de la metacolina sobre el receptor muscarínico. En su trabajo estudian también la secreción producida por la bradikina y la angiotensina II, que actúan movilizando el Ca^{2+} de los depósitos intracelulares. El orden de potencias de estos fármacos como secretagogos es, de mayor a menor: bradikina, angiotensina II y metacolina. Los tres fármacos son menos potentes que la nicotina. La medida con fura-2 de la elevación de Ca_i^{2+} , indica que con los tres compuestos hay un aumento del $[Ca^{2+}]_i$ independiente del Ca_e^{2+} , presumiblemente por generación de IP_3 (como se ha demostrado para el receptor muscarínico). En el caso de la bradikina, al estimular los receptores B_2 se produce un aumento del $[Ca^{2+}]_i$ independiente del $[Ca^{2+}]_e$ y además hay una entrada de Ca_e^{2+} . Asocian las diferentes eficacias de los tres secretagogos como tales a la cantidad de Ca^{2+} que son capaces de liberar de los depósitos intracelulares. Este Ca^{2+} sería, menos efectivo que el Ca_e^{2+} para producir secreción de catecolaminas.

Parece tener gran importancia la distribución espacial de Ca_i^{2+} que se produce tras la estimulación con distintos agentes de las células cromafines bovinas. Cheek y col. (1989) y O'Sullivan y col. (1989) realizan sendos estudios en los que utilizan técnicas de digitalización de la imagen en video de células cargadas con fura-2, que permiten representar la distribución espacial de los cambios de $[Ca^{2+}]_i$ en las mismas. En estos estudios, la utilización de agonistas

nicotínicos o concentraciones despolarizantes de K^+ originaba un aumento rápido y transitorio de Ca_i^{2+} en la zona adyacente a la membrana plasmática, coherente con una entrada de este ion a través de los canales de Ca^{2+} . En una fase posterior, tras 1 ó 2 segundos, se producía un aumento homogéneo del $[Ca^{+2}]_i$ en toda la extensión de la célula, quizá debido a simple difusión, y finalmente, tras 4 s de estimulación se producía una marcada elevación de $[Ca^{+2}]_i$, mucho mayor que las anteriormente vistas, localizada en una región interna de la célula que en el 50% de los casos se dió en un polo de ésta. Esta subida parecía deberse a los almacenes intracelulares de Ca^{2+} pues ocurrió en la zona donde los agonistas liberaban Ca^{2+} de estos depósitos.

Los agonistas que actúan a través de la producción de inositoles fosfato (metacolina, bradikinina o angiotensina II) producían una elevación en $[Ca^{+2}]_i$ que tardaba en producirse unos segundos y que no era homogénea en toda la célula. La respuesta inicial consistía en un aumento del $[Ca^{+2}]_i$ en un polo de la célula que después se expandía hacia el otro polo. Los depósitos intracelulares responsables de esta cesión de Ca^{2+} son el retículo endoplásmico o el calciosoma, que en algunas células esta asociado a éste, y que con microscopía electrónica suele verse justo en un polo de la célula.

Se puede deducir del trabajo de este equipo que la distribución de $[Ca^{+2}]_i$ inducida por estímulos despolarizantes (nicotina o concentraciones despolarizantes de K^+) es marcadamente diferente de aquella inducida por agonistas muscarínicos, pues mientras que los primeros originan una elevación del Ca^{2+} más importante bajo el plasmalema, los agonistas muscarínicos producen un aumento de Ca^{2+} confinado exclusivamente a un polo de la célula. Estos autores sugieren que esta elevación localizada del Ca^{2+} es incapaz de producir los eventos necesarios para disparar la excitación.

Estos estudios se complementan con otro realizado por Yamagami y col. (1991). En este trabajo encuentran que el Ca^{2+} liberado de los depósitos intracelulares no es eficaz para disparar la secreción de catecolaminas a menos que el Ca^{2+} entre del exterior a través de la

membrana plasmática. Estos autores realizan un estudio en paralelo del aumento de $[Ca^{2+}]_i$ y de la secreción de catecolaminas en células cromafines de gato y de vaca y observan cómo en células cromafines de gato, la metacolina aumenta la $[Ca^{2+}]_i$ activando tanto la entrada de Ca^{2+} desde el exterior como la movilización del Ca^{2+} intracelular, provocando la secreción. Por otro lado, en células bovinas la metacolina causa un aumento de Ca^{2+} por movilización intracelular, pero no hay secreción. El aumento de Ca^{2+} producido por la metacolina en las células de gato era notablemente superior al producido en las de bovinas, pero cuando se bloqueaba la entrada de Ca^{2+} , el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ en el gato resultaba equiparable al de la vaca, con la consiguiente pérdida de secreción. La movilización de Ca^{2+} debida al estímulo muscarínico aumentaba notablemente la secreción en células despolarizadas de gato y bovinas, donde el $[Ca^{2+}]_i$ se mantenía elevado la entrada continua del Ca_e^{2+} .

De todos estos resultados concluyen que la secreción de catecolaminas depende de que se produzca un incremento de Ca_i^{2+} en una región cercana a la membrana plasmática.

II.3.- EL RECEPTOR MUSCARINICO Y LA SECRECION DE CATECOLAMINAS.

II.3.1.- Médula adrenal de rata y de pollo.

Al contrario de lo que ocurre en la médula adrenal bovina la activación del receptor muscarínico de la médula adrenal de rata es eficaz para producir la secreción de catecolaminas. En 1981, Wakade y col. describen la secreción de catecolaminas debida a la estimulación del receptor muscarínico por la ACh.

Harish y col. (1987), hicieron un estudio en el que observaron que la secreción de catecolaminas mediada por el receptor muscarínico de la médula adrenal de rata puede producirse en condiciones de deprivación de Ca_e^{2+} en las que la secreción

producida por estimulación del receptor nicotínico o por estimulación eléctrica transmural resultarían suprimidas (soluciones de perfusión en cero Ca^{2+} nominal, estas mismas con EGTA o bien con verapamil). Piensan que esto es debido a la utilización de los depósitos de Ca_i^{2+} .

Un modelo experimental en el que el receptor nicotínico no es funcional, es la médula adrenal de pollo. En esta especie, toda la secreción se debe a la estimulación del receptor muscarínico. Knight y Baker (1986) estudiaron la secreción de catecolaminas en células cultivadas de la médula adrenal del pollo y encontraron que se activan por la actuación de la ACh sobre los receptores muscarínicos exclusivamente, dado que la secreción inducida por ésta se inhibía por la atropina y no por el hexametonio. Esta secreción dependía absolutamente del Ca_e^{2+} y parecía implicar canales de Ca^{2+} . La metacolina, la muscarina y la oxotremorina eran buenos secretagogos.

II.3.2.- La médula adrenal de gato.

La médula adrenal de gato constituye un excelente modelo para el estudio de la secreción producida tanto por el receptor muscarínico como por el nicotínico.

Ballesta y col. (1989) hicieron un estudio para caracterizar bioquímica y funcionalmente al receptor muscarínico de la médula adrenal de este animal. Tras ensayar distintos agonistas muscarínicos en glándulas adrenales de gato perfundidas observaron que la secreción de catecolaminas se produce según el siguiente orden de potencias, de mayor a menor: metacolina, oxotremorina, pilocarpina, betanecol y muscarina. Así mismo, bajas concentraciones de estos agonistas potencian la respuesta secretora provocada por la nicotina o el K^+ .

Cualitativamente hablando, la secreción de catecolaminas mediada por la estimulación del receptor nicotínico y muscarínico son diferentes en cuanto a la proporción de catecolaminas liberadas. Ya en 1965, Douglas y Poisner hablan de que los agonistas muscarínicos liberan preferentemente adrenalina, mientras que la estimulación con agonistas como la nicotina, implica la liberación de los dos en cantidades parecidas. En este estudio se cuantificó la distinta proporción de adrenalina secretada por estimulación del receptor muscarínico, siendo para muscarina un 65% del total, para metacolina un 78%, para oxotremorina un 69%, para pilocarpina un 69% y para betanecol un 82%. La respuesta a la estimulación por metacolina no produce desensibilización y cae a niveles basales ante la retirada de Ca^{2+} .

El receptor muscarínico de las células cromafines de gato parece ser del tipo M_2 pues el [^3H]QNB se une a membranas en una curva monofásica con una K_d de 23 pM y una B_{max} de 67 fmol. mg proteína $^{-1}$, siendo desplazado con mayor afinidad por la atropina que por la pirenzepina.

Hoy día está claramente establecida la dependencia del Ca_e^{2+} de la respuesta secretora mediada por el receptor muscarínico. Se pone de manifiesto en un trabajo de Abad y col. (1992), que permite concluir que el Ca^{2+} requerido para la secreción de catecolaminas por el estímulo nicotínico o altas concentraciones de K^+ parece venir exclusivamente del medio extracelular, mientras que un depósito intracelular, probablemente el retículo endoplásmico, contribuye a la respuesta secretora producida por el receptor muscarínico, siendo, no obstante la movilización de Ca^{2+} desde éste, incapaz por sí sola de producir una respuesta secretora.

En cuanto a la vía de entrada de Ca^{2+} , Borges y col. (1987) sugieren la existencia de un ionóforo asociado al receptor muscarínico por el cual accedería el Ca^{2+} al citosol, que sería diferente de los canales de Ca^{2+} , dado que, ni un bloqueante de dichos canales, el (+)PN 200-110, ni un activador como el (-)BAY K-

8644 producían efectos notorios en la respuesta secretora evocada por metacolina.

III.- CANALES DE POTASIO EN LA MEDULA ADRENAL

Los canales de K^+ son diversos en variedad y función, resultando su estudio cada día más detallado. Las técnicas de "patch-clamp" constituyen una valiosa herramienta para el conocimiento de los mismos, junto al empleo de toxinas que bloquean potente y selectivamente tipos particulares de canales de K^+ , permitiéndonos indagar sobre su papel fisiológico. Es notable la relevancia farmacológica y terapéutica de estos canales. Fármacos tales como las sulfonilureas antidiabéticas y algunos antiarrítmicos los bloquean; además, se ha encontrado una nueva clase de agentes, los activadores de los canales de K^+ con unas posibilidades terapéuticas interesantes en el campo cardiovascular, neuronal y endocrino.

III.1.- CLASES DE CANALES DE POTASIO.

Existen varias clases fundamentales de canales de K^+ y los descubrimientos más recientes indican que se encontrarán más con ayuda de las técnicas de electrofisiología y de biología molecular (Tabla I).

Uno de los tipos de canales de K^+ está constituido por aquellos que se activan por voltaje. Estos canales se abren y cierran en respuesta a cambios en el potencial de membrana, de forma que señales de despolarización o de hiperpolarización pueden aumentar su apertura generando una corriente de rectificación de salida o de entrada respectivamente. Ejemplos de estos son el rectificador tardío (I_K) y el rectificador anómalo (I_R).

Existen también canales de K^+ acoplados a un receptor, o acoplados a proteínas G. Estos son sensibles a ligandos que actúan sobre receptores hormonales y para neurotransmisores. Ejemplo de estos canales lo constituye el que origina la "corriente M" (I_M) relacionada con la estimulación del receptor muscarínico.

Otro grupo está constituido por los canales de K^+ sensibles a ATP; ejemplo de ellos lo constituyen los canales de K^+ que regulan la secreción de insulina en las células beta pancreáticas. Estas acciones no están ligadas a una proteína G.

Otro grupo de canales se activa por incrementos en la concentración intracelular de Ca^{2+} . Estos los veremos con detenimiento más adelante ya que son el centro de la hipótesis de trabajo de este estudio. La mayoría de las clases de canales de K^+ mencionados pueden existir en varias subclases. Así, existen canales que son sensibles a ligandos y a voltaje como los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} de alta conductancia.

III.2.- CANALES DE POTASIO MODULADOS POR CALCIO.

La primera prueba de la existencia de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} se obtuvo a raíz de la observación del incremento dependiente de Ca^{2+} de la permeabilidad al K^+ en la membrana de eritrocitos y neuronas. Tras esas observaciones iniciales, se han encontrado en gran cantidad de tejidos.

TABLA 1. TIPOS Y CARACTERISTICAS DE LOS CANALES DE POTASIO

Canal o Corriente	Activación	Conductancia Unitaria
<i>Activados por voltaje:</i>		
Rectificador tardío(I_K)	Lenta por despolarización	17-64 pS
Rectificador anómalo(I_R)	Abierto normalmente al potencial de reposo	5-28 pS
Canal A (I_A)	Se abre rápidamente y generalmente de forma transitoria tras una despolarización.	20 pS
<i>Acoplados a un Receptor:</i>		
Canales acoplados a proteínas G (ej. I_{ACh})	Por unión del ligando al receptor y sin intervención de un segundo mensajero	35-55 pS
Corriente M (I_M)	Por activación del receptor muscarínico, para bradikinina y de sustancia P	?
<i>Sensibles a ATP</i> ($I_{K(ATP)}$)	El ATP inhibe su apertura. Algunos son sensibles a voltaje	20-90 pS
<i>Activables por Na^+</i> ($I_{K(Na)}$)	Activación por $[Na^+]_i > 20mM$.	220 pS

TABLA 1. TIPOS Y CARACTERISTICAS DE LOS CANALES DE POTASIO

(Continuación)

Canal o Corriente	Activación	Conductancia Unitaria
<i>Activados por Calcio:</i>		
De alta conductancia, canales BK o Maxi K(IC)	Se activan por la $[Ca^{+2}]_i$ en un rango de 10^{-8} - 10^{-5} M. La despolarización facilita la apertura a una $[Ca^{+2}]_i$ determinada	100-250 pS
De conductancia intermedia, canales IK.	Se activan por la $[Ca^{+2}]_i$ en un rango 10^{-8} - 10^{-6} M. A veces son dependientes de voltaje	18-60 pS
De baja conductancia, canales SK.	Insensibles a voltaje. A potencial de reposo son más sensibles a $[Ca^{+2}]_i$ que los BK	6-14 pS

Tabla tomada de Castle y col., 1989.

III.2.1.- Tipos de canales de potasio modulados por calcio.

Existen diversos tipos de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} que difieren en sus conductancias iónicas y en su sensibilidad a la activación por Ca^{2+} o por voltaje.

Los tipos fundamentales de estos canales son:

- a) Canales de K^+ activados por Ca^{2+} de alta conductancia (BK o "maxi" K).*
- b) Canales de K^+ activados por Ca^{2+} de baja conductancia (SK).*
- c) Otros.*

a) Canales de K^+ activados por Ca^{2+} de alta conductancia.

Los primeros canales de K^+ activados por Ca^{2+} identificados electrofisiológicamente a nivel de canal único fueron los de alta conductancia iónica, encontrados en la células cromafines de la médula adrenal bovina (Marty, 1981), túbulos transversales del músculo de conejo (Barret y col., 1982) y en neuronas simpáticas de rana (Adams y col., 1982).

Estos canales poseen una conductancia unitaria de 200 a 300 pS. Fueron denominados por Alain Marty "big K channels" (Marty, 1981) y canales "maxi-K" por Ramón Latorre (Latorre y Miller, 1983). Los canales BK se activan directamente por Ca^{2+} y no a través de segundos mensajeros solubles, ya que su actividad es dependiente de Ca^{2+} aún en parches de membrana aislados y cuya cara interior ha permanecido inmersa en una solución renovada durante varias horas. Los canales BK, además de activarse por Ca^{2+} , dependen del potencial de membrana. A una determinada $[Ca^{2+}]_i$, los BK se abren más a menudo y permanecen más tiempo en estado abierto cuando la membrana está despolarizada. Algo muy interesante de los BK es que a pesar de poseer una elevada conductancia, son muy selectivos para el K^+ , y fundamentalmente excluyen el paso de otros iones fisiológicos, excepto el ion amonio.

Los canales BK se bloquean por TEA que es un bloqueante clásico poco específico de los canales de K^+ , siendo mucho más efectivo aplicado en el exterior de la membrana celular. También los bloquea la quinina, la d-tubocurarina, la caribdotoxina, la noxiustoxina y el Ba^{2+} (Tabla II).

Parece ser que los canales de alta conductancia desempeñan un importante papel en la fase de repolarización del potencial de acción en muchos tipos de células (Adams y col., 1982; Lancaster y Pennefather, 1987; Lang y Ritchie, 1990a y b). Podrían, por ello, contribuir a modular la duración del potencial de acción y la entrada de Ca_c^{2+} durante el mismo.

b) Canales de K^+ activados por Ca^{2+} de baja conductancia.

Estos canales se caracterizan por su alta sensibilidad al Ca_i^{2+} (activación semimáxima a 200-500 nM), por no ser dependientes del potencial de membrana y por que tienen una baja conductancia iónica (6-14 pS). Se conocen como canales SK ("Small K channels"). Se bloquean por la neurotoxina apamina, la toxina LqVIII, pero no por el TEA.

Estos canales se hayan involucrados en el aumento de la permeabilidad al K^+ inducido por neurotransmisores y hormonas en muchos tipos celulares (músculo liso visceral, células glomerulares de la corteza adrenal y hepatocitos). Están involucrados en la fase de post-hiperpolarización lenta que sigue a los potenciales de acción en muchas células excitables, en estas células tras la espiga se produce una repolarización, que se desglobo en la que se denomina una fase de rápida posthiperpolarización que dura 50-100 ms y una posterior más lenta de 500-1000 ms en la que participan los canales SK de lenta posthiperpolarización. Esto ocurre en neuronas del glánglio simpático y motoneuronas del la médula espinal entre otras. Esta fase de lenta posthiperpolarización depende del calcio extracelular, anulándose si este no está presente, o si se bloquea su entrada (Hille, 1992).

El patrón de disparo de potenciales de acción de una célula puede afectarse por la fase de lenta posthiperpolarización. Cuando una corriente mantenida induce un tren de potenciales de acción la acumulación de fases de lenta posthiperpolarización puede enlentecer gradualmente la tasa de potenciales de acción que se disparan e incluso impedir a la célula alcanzar el umbral de disparo de nuevo. Este enlentecimiento no ocurre si se bloquea la entrada de calcio impidiendo la activación de los canales SK.

Estudios autorradiográficos y de fijación de radioligandos realizados con [^{125}I]-apamina muestran que los sitios de unión de apamina (presumiblemente el canal de K^+ dependiente de Ca^{2+}) se localizan en diversas regiones del sistema nervioso central, y también en muchos tejidos periféricos, como hígado, glándula adrenal, riñón y músculo liso intestinal.

c) Otros canales de K^+ activables por Ca^{2+} .

Existen además de los SK, otros canales de K^+ que poseen conductancias menores que los BK. Así, por ejemplo, en músculo cultivado de rata hay un canal de una conductancia muy baja, 4 pS y que es aún más sensible al Ca^{2+} que los SK y los BK.

III.3.- MODULADORES DE LOS CANALES DE POTASIO.

III.3.1.- Toxinas

La apamina. La apamina es un pequeño polipéptido de 18 aminoácidos aislado del veneno de la abeja (*Apis mellifera*). La apamina actúa a una concentración 1-10 nM sobre los canales SK (Blatz y Magleby, 1986; Cook y Haylett, 1985). Es muy selectiva en su acción, no actuando en los canales de tipo BK (Pennefater y col., 1985). Se ha aislado también una toxina tipo apamina, la LqVIII, del veneno del escorpión *Leiurus quinquestriatus*, que bloquea los

canales sensibles a apamina y compite con ella por sus sitios de unión en el hígado.

La caribdotoxina. Es un polipéptido básico de 37 aminoácidos, aislado también del veneno del *Leiurus quinquestriatus*, muy útil en el estudio de canales de K^+ activados por Ca^{2+} no bloqueados por apamina. La caribdotoxina bloquea los canales BK en gran cantidad de células (Miller y col., 1985; Storm, 1987). En neuronas del hipocampo de rata prolonga la duración del potencial de acción, lo que indica que los canales BK están involucrados en la fase de repolarización de éste (Storm, 1987). En la mayoría de los casos actúa en el rango nanomolar, uniéndose a la cara interna del canal. No afecta a los canales SK sensibles a apamina.

La noxiustoxina. Procede del veneno de otro escorpión, el *Centruroides nuxius*. Bloquea entre otras la corriente de K^+ rectificadora anómala en el axón gigante de calamar (Carbone y col., 1982).

La dendrotoxina. Aislada del veneno de la serpiente *Dendroaspis angusticeps*. Por su acción sobre los canales de K^+ dependientes de voltaje facilita la liberación de ACh en la unión neuromuscular (Harvey y Anderson, 1985).

El péptido de degranulación de mastocitos (MCDP). El MCDP se aisló del veneno de la abeja (*Apis mellifera*). Es un polipéptido de 22 aminoácidos extremadamente básico con una potente acción antiinflamatoria, y que produce la liberación de histamina de los mastocitos. Bloquea selectivamente, a concentraciones submicromolares los canales de K^+ dependientes de voltaje neuronales (Stansfeld, y col., 1987).

III.3.2.- Agentes farmacológicos.

Antiarrítmicos de la clase III. Actúan prolongando el tiempo de repolarización ventricular por bloqueo de canales de K^+ en el corazón. Entre ellos se encuentran el clofilinium (un amonio cuaternario derivado del TEA), el sotalol y sus análogos sematilida y risotilida, el UK-68798, y la N-acetilprocainamida que es un metabolito de la procainamida.

Sulfonilureas hipoglucemiantes. Incluyen la tolbutamida, tolazamida, clorpropamida, y las más modernas, glibenclamida (gliburida) y glipizida. Actúan por interacción con el canal de K^+ dependiente de ATP. La secreción de insulina depende de Ca^{2+} . La glucosa despolariza la membrana de las células beta pancreáticas y permite la entrada de Ca^{2+} por los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. El incremento de ATP producido por el metabolismo intracelular de la glucosa, disminuye el número de canales abiertos de potasio sensibles a ATP, por bloqueo del canal, originando una despolarización. Las sulfonilureas ejercen un efecto similar al del ATP.

Activadores de los canales de potasio. Son, actualmente, objeto de mucha atención. Incluyen un grupo de vasodilatadores entre los que se encuentran el nicorandil, pinacidil y cromakalin. Dan lugar a la relajación del músculo liso por apertura de canales de K^+ . El nicorandil fue el primero para el que se conoció su acción como vasodilatador coronario, si bien este efecto se produce además por el grupo nitro de su molécula. El diazóxido, el minoxidil, el RP 49356 y la dihidropiridina 1,4, nifedipina, son también fármacos activadores de los canales de K^+ . La nifedipina posee dos isómeros, siendo el enantiómero (+) activador de los canales de K^+ y el (-) antagonista de canales de Ca^{2+} de tipo L.

Otros agentes farmacológicos. Existen otros agentes que bloquean los canales de K^+ y que se utilizan mucho para su estudio. El tetraetilamonio (TEA), que actúa sobre los canales de K^+

dependientes de voltaje y los canales activados por Ca^{2+} de alta conductancia (BK), entre otros; algunas aminopiridinas (APs) a las que son sensibles ciertos tipos de canales sensibles a voltaje; la quinina, bloqueante de canales dependientes de Ca^{2+} ; la tetrahydroaminoacridina (THAC), que actúa en la corriente I_A ; la d-tubocurarina, bloqueante de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} tanto de alta como de baja conductancia. También existen iones capaces de bloquear estos canales como el Ba^{2+} , el Cs^+ o el Na^+ .

IV.- CORRIENTES IONICAS ASOCIADAS A LA ESTIMULACION MUSCARINICA.

Los efectos de los agonistas muscarínicos en las propiedades eléctricas de las células cromafines se han estudiado poco. Se han descrito tanto corrientes iónicas de entrada como de salida asociadas a la estimulación de las células cromafines con agonistas muscarínicos. Kubo y Kidokoro (1989) observaron una lenta corriente de salida de K^+ en respuesta a muscarina en células cromafines de rata cuyo potencial de membrana se fijó a 0 o -20 mV.

En cambio, en otros tres estudios se concluye que la estimulación del receptor muscarínico activa corrientes de entrada despolarizantes. Knight y Maconochie (1987) sugirieron que los receptores muscarínicos despolarizan la célula cromafín de pollo abriendo canales catiónicos no selectivos que generan una corriente inespecífica de entrada, lenta, que se produce varios segundos, después de la estimulación del receptor muscarínico.

Akaike y col. (1990) concluyen que la muscarina induce una lenta despolarización y una corriente aparentemente de entrada en células cromafines de rata, mediante el bloqueo de canales de K^+ que están abiertos a potenciales cercanos al potencial de reposo de la membrana.

**TABLA II. ACTIVADORES Y BLOQUEANTES DE LOS
CANALES DE POTASIO.**

Tipo de canal	Toxina	Agente Farmacológico	Ión
<u>a) Activado por voltaje:</u>			
Rectificador tardío I _K	Dendrotoxina Noxiustoxina	TEA, Quinina, 9-aminoacridina	Ba ²⁺ , Cs ⁺
Rectificador anómalo I _{K1}	-	TEA	Ba ²⁺ , Cs ⁺
Canal A, I _A	Dendrotoxina MCDP	TEA(poco) APS (potente) THAC	Cs ⁺
<u>b) Acoplados a un receptor:</u>			
Acoplados a prot. G Ej. I _K (Ach)	-	APS	Ba ²⁺ , Cs ⁺
Corriente M, I _M	-	TEA	Ba ²⁺
<u>c) Sensibles a ATP:</u>			
I _(KATP)	-	Sulfonilureas Glibenclamida Quinina 9-aminoacridina TEA, Diazóxido	-
<u>d) Activados por calcio:</u>			
De alta conductancia BK	Caribdotoxina Noxiustoxina	TEA, Quinina d-tubocurarina	Ba ²⁺
De conductancia intermedia, I _K	Caribdotoxina I _K <BK	Quinina	Ba ²⁺ , Cs ⁺
De baja conductancia SK	Apamina Lq VIII	Quinina d-tubocurarina 9-aminoacridina	-

Abreviaturas: TEA: Tetretilamonio; MCDP: Péptido de la degranulación celular; APS: aminopiridinas; THAC: tetrahidroaminoacridina. Tabal tomada de Triggle, 1990.

Finalmente, Inoue y Kuriyama (1991) observaron que la muscarina y la oxotremorina producen una corriente de entrada a un potencial de mantenimiento de -40 mV en células cromafines de cobaya, y concluyen que la activación del receptor muscarínico aumenta la conductancia a los cationes Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ por mediación de una proteína G sensible a la toxina pertusis, y que el receptor involucrado posee alta afinidad por la pirenzepina y por el AF-DX-116.

Neely y Lingle han descrito los canales de K⁺ BK y SK en la médula adrenal de rata, y además han demostrado su relación con la activación del receptor muscarínico. En un primer trabajo, (Neely y Lingle, 1992a), describen la existencia de una corriente de salida de potasio dependiente de Ca²⁺ a potenciales que van desde -30 mV a +50 mV. Esta corriente tiene dos componentes. El primero de ellos que es bloqueada por TEA (1-5 mM), se activa por despolarización a una concentración de Ca_i²⁺ fijo y se desactiva de forma dependiente del voltaje. Estas características se asocian normalmente a la activación de los canales de K⁺ BK (Adams y col., 1982; Pallota, 1985; Lancaster y Pennefather, 1987; Blatz y Magleby, 1987).

El otro componente de la corriente activada por Ca²⁺ se inhibe por curare y apamina, posee poca dependencia de voltaje y está asociado a una corriente de cola lenta y dependiente de Ca²⁺. Todos estos son característicos de las corrientes a través de los canales SK encontradas en las células GH3 (Ritchie, 1987 a y b; Lang y Ritchie, 1990 a y b; Blatz y Magleby, 1987).

En un segundo trabajo, (Neely y Lingle, 1992b), describen que la muscarina es capaz de activar una corriente de salida de potasio con dos componentes, que basándose en criterios farmacológicos y en la dependencia de voltaje, resultan idénticos a los anteriormente descritos. A potenciales por debajo de -40 mV, la corriente activada por muscarina es ampliamente bloqueada por curare o apamina y variablemente por TEA. Esta corriente es similar a la mediada por

los canales SK de otras células (Romey y col, 1984; Blatz y Magleby, 1986; Lang y Ritchie, 1987) y a la I_{ahp} de las neuronas del ganglio simpático (Nohomi y Kuba, 1984; Pennefather y col., 1985; Kawai y Watanabe, 1986; Goh y Pennefather, 1987). A potenciales por encima de -40 mV, se activa un componente dependiente de voltaje de la corriente de muscarina. Este se bloquea casi por completo con el TEA, y parece idéntico a aquella corriente activada por Ca^{2+} y dependiente de voltaje, llamada a menudo corriente BK, encontrada en esas y otras células (Marty, 1981; Barret y col., 1982; Magleby y Pallota, 1983; Yellen, 1984; Marty y Neher, 1985; Lang y Ritchie 1987; Neely y Linge, 1992).

Artalejo y col. (1993), hacen un estudio en células cromafines bovinas cultivadas y concluyen la existencia de canales SK en ellas, basándose en la siguientes resultados:

a) La histamina, que produce un aumento del Ca_i^{2+} por interacción con receptores H_1 , movilizándolo de los depósitos dependientes de inosítoles fosfato (retículo endoplásmico), genera una corriente de salida en paralelo con el ascenso de Ca^{2+} a un potencial de -48 mV. A -78 mV solo se observa el ascenso en la concentración de Ca^{2+} .

b) Los valores de los potenciales de reversión sugirieron que se trataba de corrientes de K^+ como se comprobó modificando la concentración extracelular de éste.

c) La conductancia unitaria de los canales que mediaban esta corriente fué de 3-5 pS.

d) Esta corriente se bloqueaba por apamina.

JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

Desde los trabajos pioneros de Dale (1914) y Feldberg (1934), la médula adrenal de gato perfundida ha constituido un excelente modelo para el estudio de la liberación de catecolaminas en respuesta a la estimulación del receptor muscarínico de la célula cromafín (Lee, 1972; Kirpekar y col., 1982a y b; Borges y col., 1986; Ballesta y col., 1989; Abad y col., 1992). Sin embargo, los mecanismos íntimos implicados en la respuesta muscarínica no están del todo esclarecidos.

Aunque el Ca^{2+} de los depósitos intracelulares contribuye a la respuesta secretora, la mayoría del Ca^{2+} requerido para disparar y mantener la respuesta muscarínica procede del medio extracelular (Abad y col., 1992). Un hecho que está poco claro, es como este Ca^{2+} (Ca_e^{2+}) llega al interior de la célula, a través de la membrana plasmática, hasta la maquinaria secretora. Hace algunos años se sugirió la posibilidad de la existencia de un ionóforo asociado a éste receptor (Borges y col., 1987). Sin embargo, también podría ocurrir que el Ca_e^{2+} accediese al interior celular a través de los canales de calcio dependientes de voltaje, tan importantes en las entradas de Ca^{2+} en estas células. Sería, pues, interesante conocer como se produce el aporte de Ca^{2+} de origen tanto intracelular, como extracelular en la respuesta muscarínica.

Por otro lado, se han descrito y caracterizado canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} de alta conductancia (BK) y de pequeña conductancia (SK) en las células cromafines de la médula adrenal bovina (Marty, 1981; Marty y Neher, 1985; Artalejo y Neher, 1993) y de rata (Neely y Linge, 1992b). Estos canales juegan un importante papel controlando el comportamiento eléctrico de la membrana celular durante el potencial de acción. En consecuencia, podría ocurrir que los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} estuvieran regulando la permeabilidad al Ca^{2+} y por ello, el proceso secretor en las células cromafines de gato estimuladas con agonistas muscarínicos. Por lo tanto, resultaría interesante indagar sobre la existencia de estos canales SK en la célula cromafín del gato y su papel en la respuesta muscarínica.

Además de la técnicas de perfusión mencionadas, utilizaremos la medida de las variaciones en la concentración de Ca_i^{2+} en célula única aislada con la sonda fluorescente fura-2. Esto se realizará paralelamente al estudio de la secreción de catecolaminas provocada por la estimulación muscarínica. De esta manera, podremos estudiar la movilización de Ca_i^{2+} ante el estímulo muscarínico en distintas condiciones experimentales y establecer paralelismos con la secreción.

A la vista de estos hechos en esta tesis doctoral nos proponemos los siguientes objetivos :

1) Indagar sobre la existencia de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} en las células cromafines de la médula adrenal de gato, intentando encuadrarlos en los tipos descritos en células cromafines de otras especies, o sea, canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} de alta (BK) o de baja (SK) conductancia iónica.

2) Estudiar el control de el posible papel de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} en la secreción de catecolaminas mediada por estimulación del receptor muscarínico de las células cromafines de la médula adrenal de gato.

3) Profundizar en el mecanismo de la respuesta secretora muscarínica estableciendo un paralelismo con las modificaciones de la $[Ca_i]^{2+}$ e intentar con estos datos distinguir el origen, bien extracelular, bien intracelular, del Ca^{2+} requerido para el mantenimiento de la respuesta secretora en el tiempo.

MATERIALES Y METODOS

Los experimentos realizados en este trabajo, se llevaron a cabo en gatos de ambos sexos que pesaban 2'5-4 Kg. Estos animales, se mantuvieron estabulados a temperatura controlada (20-22°C) con agua y alimentación "ad libitum".

I.- ESTUDIOS DE LA LIBERACION DE CATECOLAMINAS EN LA GLANDULA ADRENAL DE GATO PERFUNDIDA "IN VITRO".

I.1.- AISLAMIENTO Y PREPARACION DE LA GLANDULA ADRENAL PARA SU PERFUSION.

Los animales se anestesiaron mediante la administración, vía intraperitoneal, de pentobarbital sódico (50 mg.Kg⁻¹) disuelto en etanol y agua destilada (1:4). Este anestésico no ejerce ningún efecto sobre la secreción de catecolaminas.

Una vez que el animal se encontraba completamente anestesiado, se procedía a practicarle una incisión a lo largo de la línea media abdominal, para posteriormente retirar las asas intestinales y dejar ambas glándulas adrenales a la vista. La extracción de éstas se realizaba tras la colocación de un cánula de polietileno en la vena adrenolumbar y la ligadura de todas las vías de acceso de sangre a las glándulas (Dixon y col., 1975).

A continuación, la glándula canulada se perfundía retrógradamente mediante una bomba peristáltica (Eyela), con soluciones nutricias situadas en un baño a 37°C. El líquido de perfusión drenaba a través de pequeñas incisiones realizadas en la corteza adrenal con una aguja hipodérmica, siendo recogido en tubos de ensayo. Durante todo el tiempo que transcurría desde la extracción de las glándulas hasta que finalizara el experimento, éstas se colocaban en el interior de una cámara formada por un pequeño embudo y tapada con "parafilm" para mantener la temperatura y evitar la desecación (Fig. 1).

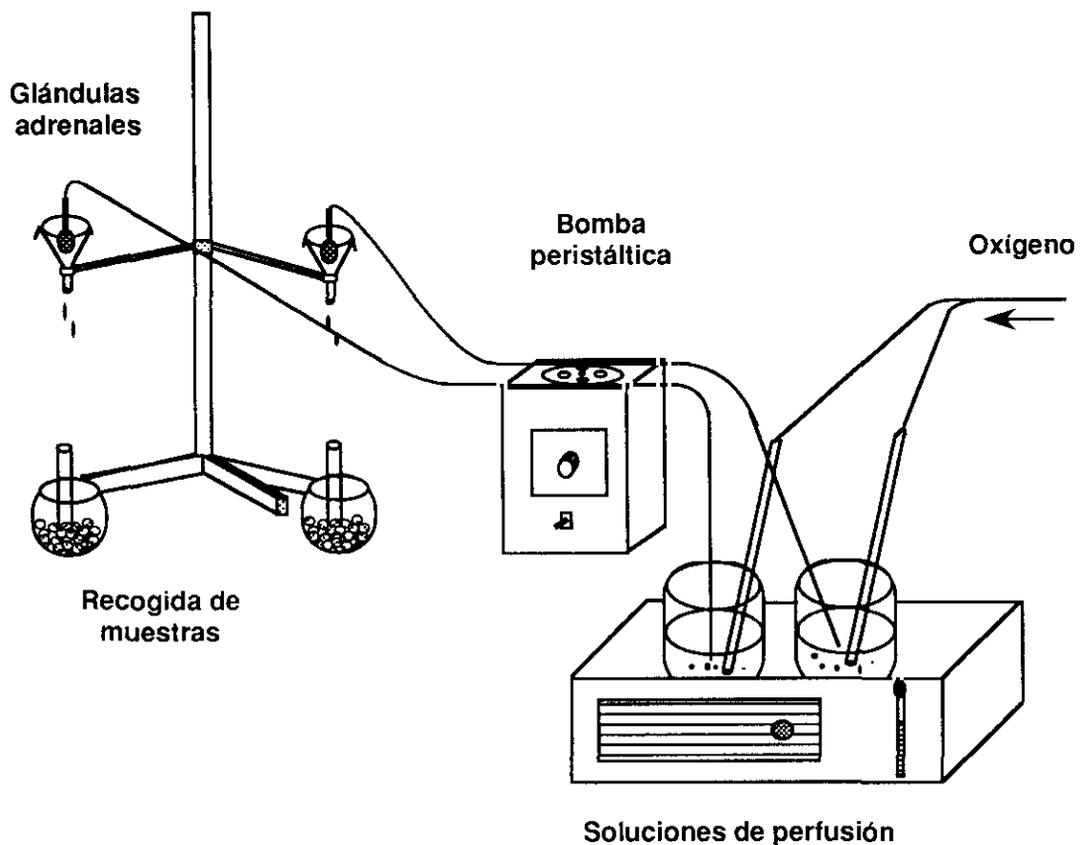


Fig. 1. Perfusión de glándulas adrenales "in vitro". Las glándulas adrenales canuladas se colocaron en un sistema de perfusión propulsado por una bomba peristáltica que llevaba las soluciones desde un baño a 37 °C donde permanecían sumergidas y continuamente oxigenadas hasta las camaritas en las que se colocaban las glándulas. El líquido que salía se recogía en tubos de ensayo sumergidos en hielo y que contenían ácido perclórico suficiente para obtener una concentración en la muestra de 0,05 N.

I.2.- PERFUSION Y RECOGIDA DE MUESTRAS.

Las glándulas se perfundieron a un flujo de 6 ml.min⁻¹, el cual permite la recogida de muestras a intervalos muy cortos. Antes de iniciar los experimentos, se dejaban transcurrir 90 min a fin de que la liberación espontánea de catecolaminas se estabilizara.

Todos los protocolos experimentales fueron precedidos por la administración de dos pulsos de "preparación" con el secretagogo que se pretendiera emplear posteriormente, a fin de obtener una respuesta secretora uniforme con la repetición de los estímulos durante el experimento (Cárdenas y col., 1988). Los protocolos experimentales concretos se describen detalladamente en el apartado de Resultados.

Las muestras se recogieron a intervalos de 30 s en unos casos y de 5 s en otros, en tubos sumergidos en hielo, que contenían ácido perclórico en una concentración suficiente para alcanzar una final de 0'05 N, con objeto de evitar la oxidación espontánea de catecolaminas.

I.3.- DETERMINACION DE CATECOLAMINAS EN LAS MUESTRAS DEL LIQUIDO DE PERFUSION.

I.3.1.- Medida de las catecolaminas totales.

El contenido total de catecolaminas (noradrenalina más adrenalina) se determinó por fluorimetría según la técnica de Shellenberger y Gordon, (1971) con algunas modificaciones. El fundamento de la determinación de catecolaminas por este método consiste en la oxidación con iodo de la totalidad de las catecolaminas a pH 7, transformándolas en compuestos fluorescentes (noradrenolutina y adrenolutina) que pueden ser medidos con un

espectrofluorómetro a una longitud de onda de excitación de 380 nm y de 495 nm de emisión. Este método tiene la ventaja de que se pueden procesar muchas muestras a la vez y de que es bastante rápido.

El procedimiento consiste en tomar una alícuota de la muestra que contiene las catecolaminas y llevarla hasta un volumen total de 1 ml con ácido perclórico 0'05 N. Para mantener el pH 7 se adicionan 1'5 ml de tampón fosfato (la composición de los reactivos se detalla en la Tabla III), a continuación se añaden 0'2 ml de solución de iodo 0'1 N que actúa como agente oxidante. Transcurridos exactamente 2 min se añaden 0'5 ml de sulfito sódico en solución alcalina, esperando otros 2 min, tiempo tras el cual se añaden 400 μ l de ácido acético glacial para estabilizar la fluorescencia. En este momento, se introducen las muestras en una estufa a 100 °C durante 3 min y, seguidamente se enfrían en nevera o hielo para incrementar la fluorescencia de los productos de oxidación. Tras un tiempo en que alcanzan la temperatura ambiente, se procede a la lectura de la fluorescencia, que se realizó con un espectrofluorómetro Aminco-Bowman.

En los casos en los que se sospechaba la existencia de fluorescencia intrínseca en los fármacos utilizados, se preparaba una serie paralela de alícuotas de las muestras y se trataban de manera análoga a las anteriores, con una sola diferencia, la adición del sulfito sódico era anterior a la del iodo. De esta manera se valoraba la posible fluorescencia del fármaco sin obtener los compuestos fluorescentes derivados de las catecolaminas. Ninguno de los fármacos utilizados poseía fluorescencia.

Simultáneamente a la oxidación de las alícuotas de las muestras, se prepararon estándares externos de concentración conocida de catecolaminas que se procesaron de manera análoga a las muestras problema. Estos estándares llevaban 100 μ g (100 μ l de 1 ng. μ l⁻¹) de catecolaminas totales de las cuales un 70% era noradrenalina y un 30% adrenalina.

TABLA III. SOLUCIONES UTILIZADAS PARA LA DETERMINACION FLUOROMETRICA DE CATECOLAMINAS.

Tampón fosfato-EDTA

Na ₂ PO ₄ H	4'27 g
KPO ₄ H ₂	9'52 g
EDTA	9'0 g
H ₂ O	cps 1.000 ml

Solución I₂ (0'1N)

IK	2 g
I ₂	0'5 g
H ₂ O	40 ml

Solución alcalina de Sulfito Sódico (1'25%)

Na ₂ SO ₃	0'63 g
NaOH (5N)	45 ml
H ₂ O	5 ml

Esta proporción se calculó a partir de la secreción diferencial de catecolaminas obtenida con distintos agonistas muscarínicos en la glándula adrenal de gato (Borges y col., 1986). Se utilizó también cuando se empleaban concentraciones despolarizantes de K^+ , ya que la proporción de catecolaminas fue similar. La relación entre la concentración de catecolaminas y la fluorescencia emitida por los productos de su oxidación es lineal en un amplio rango de concentraciones como se ha comprobado mediante la realización de rectas de calibración.

El cálculo de la concentración de catecolaminas de las muestras a partir de la fluorescencia que emiten se obtuvo teniendo en cuenta la fluorescencia emitida por el estándar que corresponde a 200 ng de catecolaminas. Los resultados se expresan como $ng.30 s^{-1}$ o como $ng.5 s^{-1}$, según el tiempo de recogida de muestras empleado.

I.3.2.- Determinación del contenido diferencial de catecolaminas.

La determinación de la proporción de adrenalina y noradrenalina en las muestras se realizó con la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). El equipo que utilizamos constaba de una bomba cromatográfica Perkin Elmer Series 10, un inyector automático Gilson Model 401, con una válvula Rheodyne 7125 con bucle de 50 μ l y una columna rellena de Spherisorb ODS2 (C18) de 5 μ m de tamaño de partícula y de una longitud de 5 cm y diámetro interno de 4,6 mm. Este sistema estaba acoplado a un detector electroquímico.

Para determinar el contenido en las distintas catecolaminas, se utilizaron patrones externos de concentración conocida a partir de los cuales el aparato realiza una curva patrón. En nuestro caso se introdujeron dos puntos por duplicado, uno que contenía 50 $ng.ml^{-1}$ de noradrenalina y 50 $ng.ml^{-1}$ de adrenalina, y otro con 200 $ng.ml^{-1}$ de cada una de ellas. Además se utiliza un patrón interno, la

dihidroxibencilamina (DHBA), una amina sintética, cuya concentración en los estándares y en las muestras era de 200 ng.ml⁻¹.

Las muestras, en las que previamente se habían determinado las catecolaminas totales por fluorescencia, se diluían con ácido perclórico 0'05 N de forma que alcanzasen una concentración final que se encontrase en el rango de los estándares externos. La cuantificación de las catecolaminas era realizada por un integrador de áreas que nos ofrecía los resultados en ng.ml⁻¹ mediante un programa que comparaba los tiempos de retención y las áreas de los distintos picos problema con las de los patrones.

II.- MONITORIZACION DE LOS NIVELES DE CALCIO CITOSOLICO EN CELULAS CROMAFINES FELINAS.

II.1.- AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CELULAS CROMAFINES DE LA MEDULA ADRENAL DE GATO.

Las dos glándulas adrenales del mismo gato se aislaron y canularon siguiendo la técnica quirúrgica descrita anteriormente. No se practicaron agujeros en la corteza. Con objeto de eliminar los eritrocitos y de preparar los vasos para el paso siguiente, se inyectó a las glándulas, a través de la cánula, medio Locke sin Ca²⁺ ni Mg²⁺. A continuación, se llevó a cabo la digestión de la médula inyectando tres veces, a intervalos de 15 min, 1 ml de medio de Locke sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ que contenía un 0'25 % de colagenasa, un 0'5 % de albúmina sérica bovina y un 0'01 % de inhibidor de tripsina de semilla de soja. Las glándulas se mantuvieron todo ese tiempo a 37°C.

Tras abrir longitudinalmente las glándulas, se raspó la médula licuada, separándola de la corteza. La colagenasa se lavó tres veces con solución de Locke sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ por centrifugaciones sucesivas de las células a 120xg durante 10 min; finalmente, las

células se resuspendieron en medio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal de ternera y que también llevaba 10 μM de citosina arabinósido, 10 μM de fluorodeoxiuridina, 50 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ de penicilina y 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de estreptomina. Las células así obtenidas se sembraron en cubreobjetos circulares y se incubaron a 37 °C en atmósfera saturada de agua con un 5% de CO_2 y un 95% de aire. El medio se cambió a las 24 h y después cada dos días.

II.2.- MEDIDA DE LA CONCENTRACION DE CALCIO LIBRE CITOSOLICO EN CELULAS CARGADAS CON FURA-2.

El fura-2 es un indicador fluorescente para el estudio de la señal intracelular de Ca^{2+} (Grynkiewicz y col., 1985). Se hace entrar en la célula en forma de éster de acetoximetilo (fura-2-AM); una vez en el interior de la célula, el compuesto se hidroliza por esterasas liberando el fura-2 ácido que queda así retenido en el interior celular (Fig. 2).

Para realizar nuestro experimentos, las células cromafines se cargaron incubándolas con fura-2/AM (2'5 μM en solución de Krebs) durante 45 min a temperatura ambiente, tiempo tras el cual se lavaron varias veces con medio de Krebs. Acto seguido, se tuvieron durante 10 min en la incubadora a 37°C con objeto de facilitar la entrada del fura-2/AM al interior celular.

Las células así preparadas se utilizaron para repetir algunos de los protocolos experimentales de secreción de catecolaminas realizados en las glándulas perfundidas para estudiar esos aspectos desde el punto de vista del Ca_i^{2+} . Para ello, colocamos las células en una camarita sobre la platina de un microscopio invertido Nikon Diaphot mod. TMD para epifluorescencia, a la que acoplamos un sistema de perfusión en el que el líquido llegaba a las células por medio de una bomba peristáltica y se retiraba por aspiración mediante vacío (Fig. 3).

La superfusión se realizó con Krebs-Tris a temperatura ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$). Las células se estimularon individualmente con secretagogos introducidos en finas pipetas de vidrio cuyo extremo, de 2-4 μm de diámetro, se situaba con la ayuda de un micromanipulador a una distancia aproximada de 20 μm de la superficie celular. Estas pipetas van conectadas a un sistema de eyección neumática de fármacos (Picospritzer II, General Valve Corp.). Cuando se requería la incubación de fármacos, estos se introducían con anterioridad al estímulo también en el líquido de perfusión.

La medida de la fluorescencia debida al fura-2 unido al calcio se realizó, mediante un fotomultiplicador, en una sola célula cargada con fura-2 que era excitada alternativamente con luz de longitudes de onda de 360 y 390 nm. La concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se calculó a partir de la razón de las señales fluorescentes obtenidas con las dos longitudes de onda de excitación (360 sobre 390) utilizando la ecuación establecida por Grynkiewicz y col. (1985):

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_{\text{eff}} (R-R_0) / (R_1-R) \quad (1)$$

en la que K_{eff} es la "constante de afinidad efectiva" para el Ca^{2+} , R_0 es la razón de las fluorescencias emitidas cuando la concentración de calcio es cero, y R_1 corresponde a la razón obtenida a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que saturan al indicador. Estas constantes de calibración se determinaron experimentalmente para nuestro equipo siguiendo el procedimiento descrito por Almers y Neher (1985). Para ello, se realizaron tres determinaciones en diferentes células dializadas en la configuración de "célula entera" en la técnica de "patch clamp" (Hamill y col., 1981), con varios tampones EGTA- Ca^{2+} que se añadieron a la solución intracelular que rellena la pipeta. La adición al medio intracelular de 10 mM EGTA o de 10 mM CaCl_2 nos permitió medir directamente los valores de R_0 y R_1 . Por otro lado, K_{eff} se determinó mediante la ecuación (1), llevando a cabo una

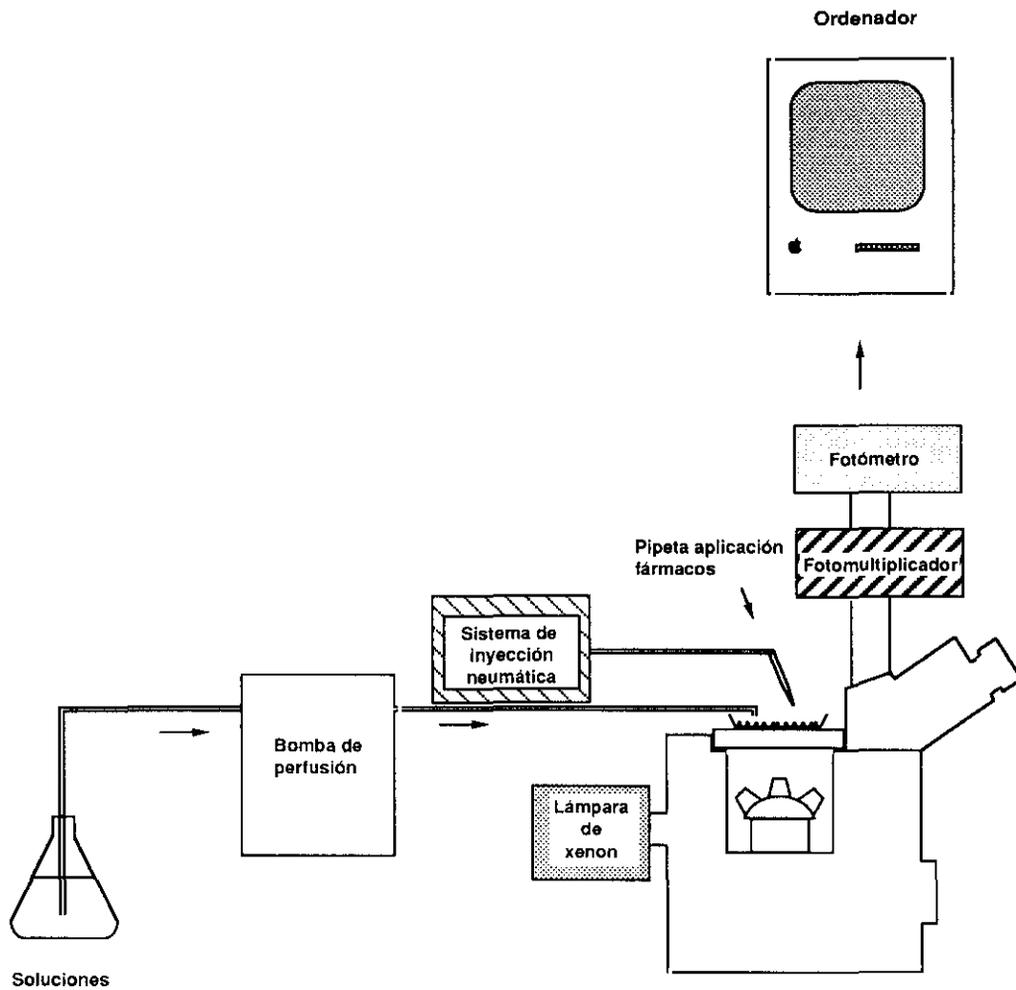


Fig. 3. Medida de la concentración de calcio intracelular con la sonda fluorescente fura-2. Las células cargadas se colocaban en la platina de un microscopio y se excitaban alternativamente con luz de longitudes de onda de 360 y 390 nm. La fluorescencia emitida se recogía en un fotomultiplicador y se analizaba en un ordenador. Las soluciones se superfundían con una bomba peristáltica y se retiraban por aspiración mediante vacío.

tercera medida de la razón de la fluorescencia emitida por una célula que había sido dializada con una solución que contenía 6'6 mM de EGTA-Ca²⁺ y 3'3 mM de EGTA que proporcionaba una [Ca²⁺]_i de 0'3 μM. Las señales de fluorescencia se recogieron cada 0'5 s en un ordenador que convertía continuamente las relaciones de fluorescencia en valores de [Ca²⁺]_i.

III.- SOLUCIONES Y FARMACOS UTILIZADOS

Tanto para la perfusión de glándulas como para la superfusión de células, la solución base utilizada fue la de Krebs-Tris, los fármacos se disolvieron en esta solución.

La solución de Krebs-Tris tenía la composición siguiente (mM):

NaCl	134
KCl	5'9
MgCl ₂	1'2
CaCl ₂	2'5
Glucosa	11
Tris-(hidroximetil)-aminometano	10

Una vez preparada la solución, se gasificó con O₂ puro y se mantuvo en un baño a 37±2 °C hasta que alcanzó esta temperatura. Después se ajustó el pH a 7'4 con HCl.

Cuando se requirió utilizar soluciones con concentraciones de K⁺ de 59 mM, se retiraron del medio cantidades equiosmóticas de NaCl a las de KCl. Cuando se trabajó en ausencia de Ca²⁺, se retiró el CaCl₂ sin que este catión se reemplazase por sustancia alguna, pues el cambio en la osmolaridad que se produce es tan pequeño que no afecta a la respuesta secretora (Ladona y col., 1984).

Cuando se trabajó con el Bay K 8644 ó con la isradipina se utilizó luz de sodio pués debido al grupo nitro presente en el grupo arilo, éstas moléculas son fotosensibles.

La sonda fluorescente fura-2/AM se disolvió inicialmente en dimetilsulfóxido (DMSO) y posteriormente, se diluyó con sonicación en un baño de ultrasonidos en una solución de Krebs.

IV.- ANALISIS ESTADISTICO

Los datos aparecen expresados como la media \pm error estándar de la media. La significación estadística de la diferencia entre la medias de dos grupos de datos se obtuvo aplicando el test de la t de Student. Los valores de p menores de 0'05 se consideraron significativos.

RESULTADOS

I.- MODULACION POR LOS CANALES DE POTASIO DEPENDIENTES DE CALCIO DE LA RESPUESTA SECRETORA MEDIADA POR EL RECEPTOR MUSCARINICO EN MEDULA ADRENAL DE GATO.

I.1.- EFECTO DE LOS DISTINTOS BLOQUEANTES DE LOS CANALES DE POTASIO DEPENDIENTES DE CALCIO SOBRE LA RESPUESTA SECRETORA PRODUCIDA POR LA ESTIMULACION DEL RECEPTOR MUSCARINICO EN GLANDULA ADRENAL DE GATO PERFUNDIDA.

I.1.1.- Respuesta secretora producida por la activación repetida del receptor muscarínico.

Para realizar este estudio, el primer paso seguido fue la elección de un protocolo experimental que permitiera la estimulación repetida de las glándulas adrenales perfundidas de gato y la obtención de respuestas secretoras de magnitud similar. También se buscó que la liberación de catecolaminas fuera suficientemente grande como para que se pudiera observar con claridad su variación como consecuencia de las distintas condiciones experimentales en las que era estudiada.

Seleccionamos un agente muscarínico, la metacolina, sobre el cual existe abundante literatura en la que se corrobora su eficacia como agonista puro del receptor muscarínico de glándula adrenal de gato (Abad y col., 1992; Borges y col., 1987). Para elegir un tiempo de estimulación adecuado, se realizó un protocolo en que se aplicaban pulsos de metacolina 100 μM de 5, 10, 20, 30 y 60 s de duración, recogiéndose del líquido de perfusión que manaba de la glándula durante 90 s (Fig. 4). Con 10 s de estimulación encontramos que la respuesta era adecuada y reproducible.

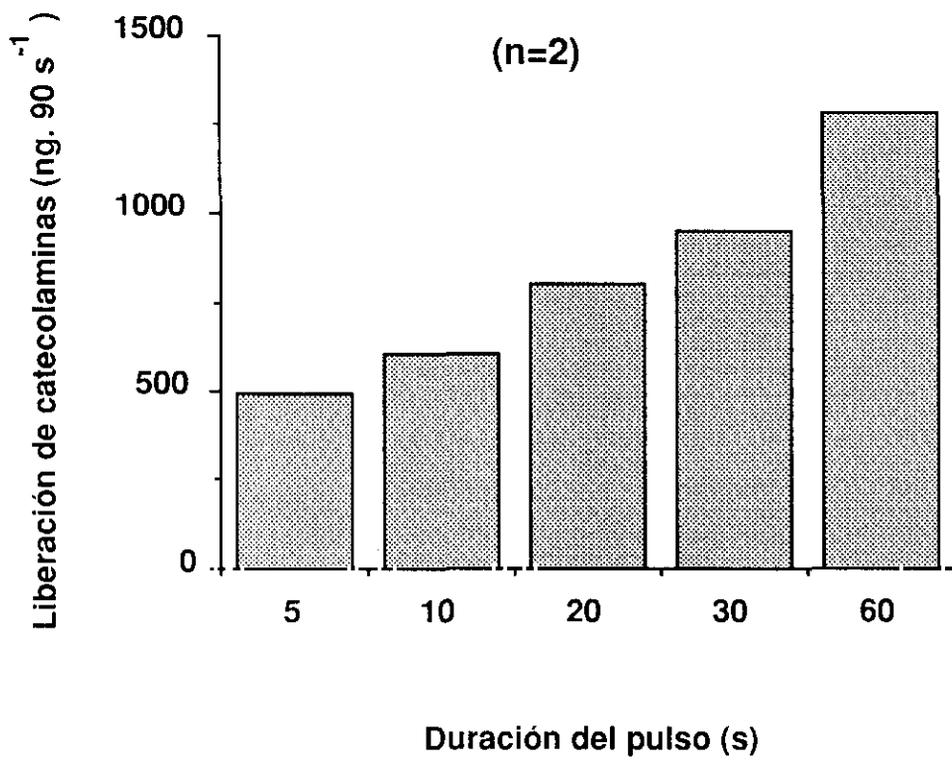


Fig.4. Secreción de catecolaminas producida por pulsos de metacolina (100 μ M) de distinta duración. Tras un tiempo de estabilización de 1 h, cada glándula se estimuló con metacolina a intervalos de 15 min durante distintos tiempos recogiendo un total de 90 s en muestras de 30 s (abcisas). Los datos son medias de dos glándulas.

En la Fig. 5A, se representa el perfil de la respuesta secretora producida por un pulso de 10 s de 100 μM de metacolina. Al tiempo cero se muestra el valor de la secreción basal debida a la liberación espontánea de catecolaminas durante los 30 s previos al pulso ($78 \pm 7 \text{ ng} \cdot 30 \text{ s}^{-1}$). Los tres puntos siguientes corresponden a la respuesta producida por la metacolina; como se puede observar, la secreción aumenta hasta un pico en los 30 primeros segundos, cayendo rápidamente en las dos muestras posteriores. La mayor parte de la secreción producida se recoge en la primera muestra, siendo el contenido de la última ya cercano a la secreción basal.

La liberación neta de catecolaminas se calculó restando la secreción basal al conjunto de las tres muestras que corresponden al pulso. Tras repetir el experimento 32 veces, fue de $805 \pm 164 \text{ ng} \cdot \text{pulso}^{-1}$ (media \pm error estándar).

El mantenimiento de un mismo nivel de secreción tras estimular repetidas veces las glándulas durante 10 s con metacolina, se comprobó aplicando seis pulsos iguales con un intervalo entre ellos de 15 min. Como se puede observar en la Fig. 5B, se obtiene una buena reproducibilidad de las respuestas, con un error detectable de estímulo a estímulo de un 10%.

I.1.2.- Efecto de la d-tubocurarina sobre la respuesta secretora muscarínica.

I.1.2.1.- Potenciación por la d-tubocurarina de la respuesta secretora producida por estimulación del receptor muscarínico.

La d-tubocurarina (DTC) es un inhibidor de la conductancia al K^+ dependiente de Ca^{2+} en células de ganglio simpático de sapo (Nohmi

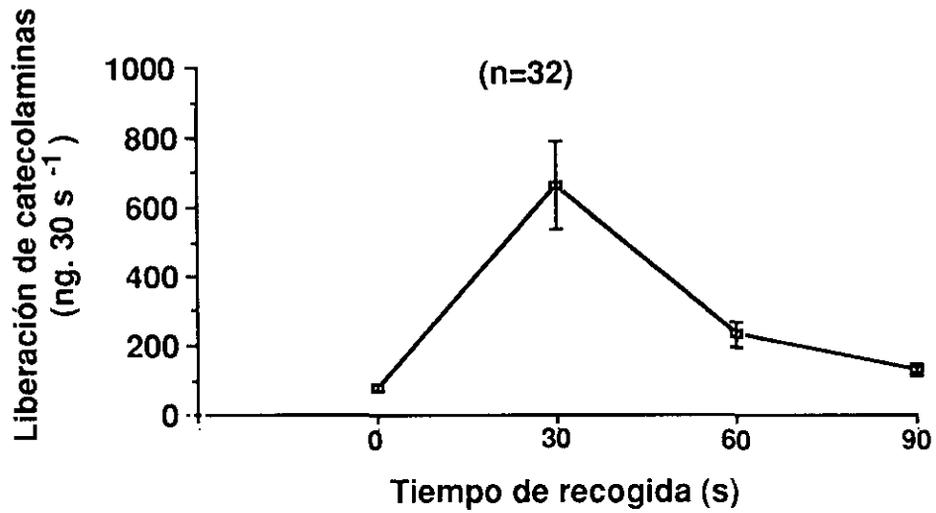
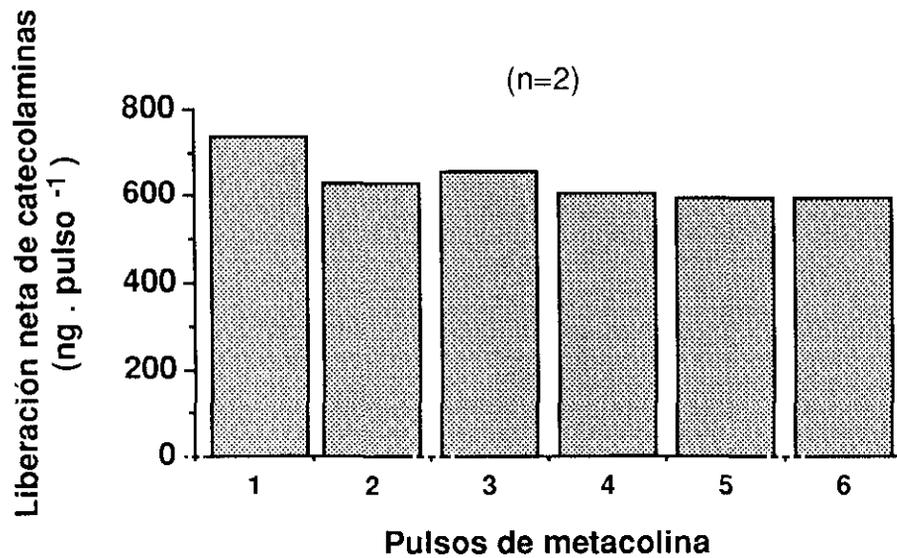
A**B**

Fig. 5. (A): Perfil correspondiente a la liberación de catecolaminas producida por un pulso de 10 s de metacolina (100 μ M) administrado a glándulas adrenales de gato perfundidas. Tras recoger los 30 s previos al pulso para determinar la secreción basal (0 en abcisa), se recogieron tres muestras más de 30 s, la primera de ellas durante los 10 s de estimulación y 20 s más en Krebs-Tris, y las otras dos en Krebs-Tris. El area bajo la curva se obtuvo tras sustraer la liberación basal a cada una de las tres muestras de 30 s. Los datos son media \pm error estándar de 32 pulsos de metacolina en diferentes glándulas. (B): Liberación neta de catecolaminas producida por pulsos sucesivos de metacolina (100 μ M durante 10 s) administrados a intervalos de 15 min. Los datos son medias de 2 glándulas.

y Kuba, 1984), de corrientes de salida de K^+ inducidas por inyecciones de Ca^{2+} en células híbridas NG 108-15 de neuroblastoma x glioma de ratón (Brown y Higasida, 1988) y de la salida de K^+ mediada por Ca^{2+} en hepatocitos de cobaya (Cook y Haylett, 1985). Parecía, por lo tanto, interesante ensayar el efecto de esta molécula sobre la liberación de catecolaminas producida por la estimulación muscarínica de la glándula adrenal de gato.

Para realizar este estudio (Fig. 6), elegimos un protocolo en que estimulamos cada 15 min las glándulas con metacolina. Un primer pulso control evidenciaba la respuesta secretora de la metacolina sola. En los cuatro pulsos siguientes se introdujeron concentraciones crecientes de DTC en un rango comprendido entre 10^{-7} y 10^{-4} M, puesto que los efectos de DTC descritos anteriormente se observaban a concentraciones micromolares. Cada concentración estuvo presente 5 min antes del pulso y a lo largo de las tres muestras de 30 s en que se valoraba la respuesta producida.

Como se puede observar, la DTC incrementa la secreción de catecolaminas mediada por la metacolina y este efecto depende de la concentración. Ya con 10^{-6} M de DTC se puede apreciar un visible incremento en la señal secretora. Cuando la concentración utilizada fue de 10^{-5} M la secreción se duplicó (1.646 ± 171 ng), y cuando fue de 10^{-4} M la señal alcanzó 1.966 ± 232 ng.

Con estos resultados se puede hacer un cálculo aproximado de la EC_{50} para la DTC como potenciador de la secreción, obteniéndose un valor de 10 μ M, cifra que se encuentra en el rango descrito en la literatura para bloquear canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (Nohmi y Kuba, 1984; Cook y Haylett, 1985).

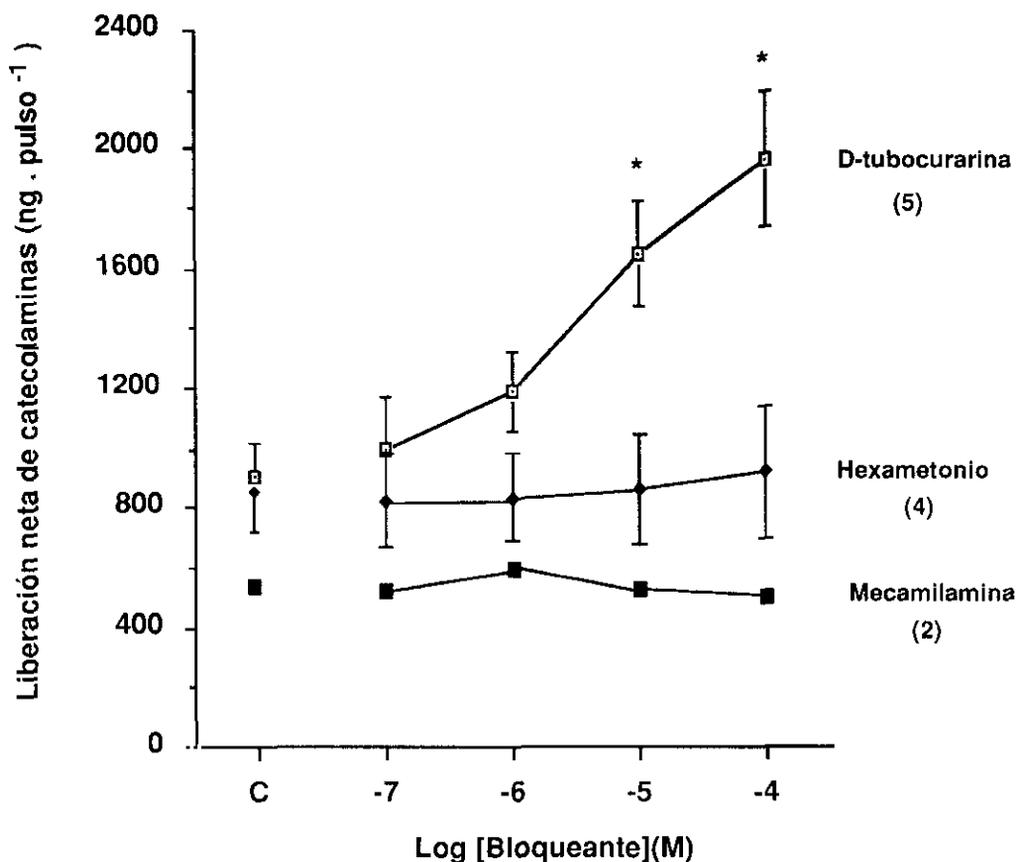


Fig. 6. Efecto de la d-tubocurarina, el hexametonio y la mecamilamina sobre la secreción de catecolaminas provocada por la metacolina. Las glándulas se estimularon cinco veces con metacolina (100 μ M, 10 s). La d-tubocurarina, el hexametonio, y la mecamilamina, que se ensayaron a las concentraciones indicadas en el eje de abscisas, estuvieron presentes 5 min antes, durante el pulso de metacolina y durante la recogida de muestras de 30 s. Los datos son la media o la media \pm error estándar del número de glándulas mostrado entre paréntesis, * $p < 0.01$ respecto del control (C) en presencia de metacolina. sola.

I.1.2.2.- Ausencia de un efecto nicotínico en la potenciación por d-tubocurarina de la respuesta secretora muscarínica

Se sabe que tanto la DTC (Abad y col., 1992) como el hexametonio (Jaanus y col., 1967) y la mecamilamina (Borges y col., 1986), bloquean totalmente la respuesta nicotínica en médula adrenal de gato. Por este motivo pensamos en la posibilidad de que la potenciación de la respuesta secretora inducida por la metacolina estuviera relacionada con una inhibición por la DTC del receptor nicotínico en la célula cromafín felina.

Para explorar esa posibilidad se utilizó el mismo protocolo anterior en el que se ensayaron concentraciones crecientes de hexametonio y de mecamilamina, entre 10^{-7} M y 10^{-4} M. Estas moléculas bloquean la respuesta mediada por el receptor nicotínico ganglionar en ese rango de concentraciones. Los resultados se incluyen también en la Fig. 6. Se puede observar una ausencia de efectos sobre la secreción de catecolaminas mediada por el receptor muscarínico, tanto para el hexametonio como para la mecamilamina. Estos resultados son coherentes con el hecho de que el hexametonio bloquea la salida de K^+ mediada por Ca^{2+} en hepatocitos de cobaya con mucha menos potencia de lo que lo hace la DTC (Cook y Haylett, 1985).

Otra forma de confirmar que el receptor nicotínico no está implicado en la potenciación de la respuesta muscarínica por la DTC consistió en estudiar la posible interacción entre ésta, el hexametonio, y la mecamilamina (Fig. 7). Para ello, estimulamos las glándulas ocho veces con pulsos de metacolina de las características habituales, a intervalos de 15 min. Hemos denominado P_1 al pulso control con metacolina. P_2 , P_3 y P_4 son pulsos de metacolina que han sido acompañados desde 5 min antes y durante la recogida de muestras con hexametonio, mecamilamina y DTC respectivamente, (100 μ M en los tres casos).

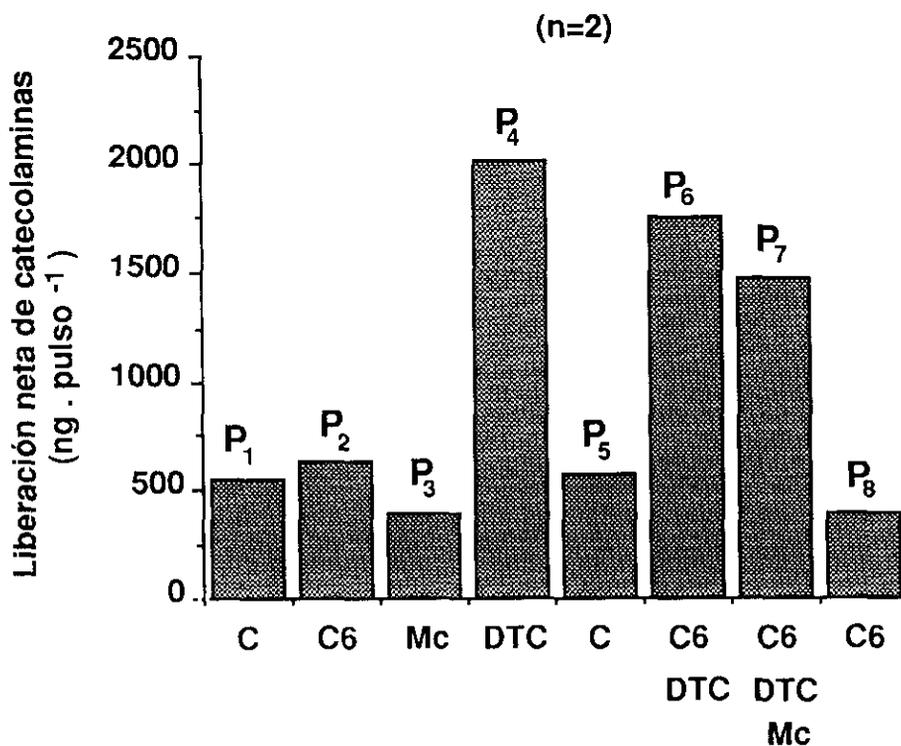


Fig. 7. Efecto del uso combinado del hexametonio (C₆), la mecamilamina (Mc) y la d-tubocurarina (DTC) sobre la liberación de catecolaminas provocada por pulsos de metacolina. Las glándulas se estimularon 8 veces (P₁ a P₈) con pulsos de metacolina (100 μM durante 10 s) a intervalos de 15 min. Las columnas P₁, P₅, y P₈ reflejan respuestas secretoras a metacolina y se emplean como controles (C); el resto, representa la secreción en presencia de 100 μM de las otras moléculas, o de sus combinaciones, mostradas debajo de cada columna. C₆, Mc y DTC estuvieron presentes 5 min antes, durante el pulso de metacolina y durante la recogida de 3 muestras de 30 s. Los datos representan la media de las secreciones netas obtenidas en dos glándulas separadas.

Como se puede observar, P₂ y P₃ son equiparables al control (P₁) en cuanto a la magnitud de la respuesta secretora. Sin embargo, P₄, pulso de metacolina acompañado por DTC, alcanzó un valor cuatro veces superior al del control. Cuando se combinó DTC con hexametonio (P₆), o hexametonio con mecamilamina (P₇), no vimos una mayor potenciación que en el caso de la DTC sola.

En estos experimentos se estudió también la reversibilidad del efecto de la DTC. Para ello se aplicaron dos pulsos, P₅ y P₈, después de aquellos en los que la metacolina acompañaba a la DTC. En ellos el valor de la secreción era análogo al control, comprobándose así que la DTC es una molécula que se "lava" perfectamente en el tiempo de 15 min que transcurrió entre los diferentes pulsos.

I.1.2.3.- Dependencia de la respuesta muscarínica y su potenciación por d-tubocurarina del calcio extracelular. Efecto del Bay K 8644 y de la isradipina.

Es sabido que la respuesta secretora mediada por metacolina en las glándulas adrenales de gato perfundidas depende en gran manera del Ca²⁺ extracelular (Ca_e²⁺) (Borges y col., 1987; Ballesta y col., 1989; Abad y col., 1992). Por este motivo, se pensó que sería importante saber hasta que punto la potenciación de la señal muscarínica por la DTC dependía de esta fuente de Ca²⁺.

Con esta finalidad, se diseñó un protocolo experimental muy sencillo. Se aplicó una pareja de pulsos, el primero de 10 s con metacolina (100 µM) y el segundo, 15 min después, con metacolina más DTC (100 µM) incorporada en el líquido de perfusión 5 min antes del pulso. Esta secuencia se repitió en ausencia de Ca²⁺ en el medio extracelular desde 10 min antes de la entrada del secretagogo. En el pulso control inicial se secretaron alrededor de 500 ng de catecolaminas (P₁ en la Fig. 6), mientras que en P₂, la DTC potenció esta señal dos veces y media aproximadamente. La retirada del Ca_e²⁺ 10 min antes y durante el estímulo, suprimió la

respuesta secretora tanto para metacolina sola (P₃), como para metacolina más DTC (P₄). La reintroducción del Ca²⁺ en la solución de perfusión durante los 15 min siguientes, produjo la recuperación completa de la respuesta durante el pulso siguiente, dato no reflejado en la Fig. 8.

Si el Ca_e²⁺ es crítico para el control de la respuesta secretora producida por metacolina y su potenciación por la DTC, existe la posibilidad de que en la estimulación muscarínica en presencia de DTC, el Ca²⁺ accediera a la maquinaria secretora a través de una vía de entrada sensible a dihidropiridinas (DHP). En este sentido se utilizaron dos, la isradipina, un bloqueante selectivo de los canales de Ca²⁺ tipo L (Hof y col., 1984) y el Bay K 8644, un activador de estos mismos canales (Schramm y col., 1983).

Para estudiar este aspecto, se estimularon las glándulas adrenales ocho veces alternando dos secretagogos, la metacolina (100 μM durante 10 s) y una concentración despolarizante de K⁺, (35 mM, durante 10 s), separados 20 min (Fig. 9). En la primera pareja de pulsos la respuesta secretora a metacolina alcanzó 924 ± 109 ng (P₁) mientras que el K⁺ (P₂) produjo una secreción de 2.466 ± 916 ng de catecolaminas. Estas secreciones iniciales debidas a metacolina y a K⁺ se normalizaron al 100% y el resto de los pulsos se expresaron como porcentajes de sus respectivas señales secretoras iniciales.

En la segunda pareja de pulsos se introdujo la DTC (100 μM) de la manera habitual, y potenció a 187 ± 22 % y a 186 ± 57% las señales de metacolina y de K⁺ respectivamente (P₃ y P₄ en Fig. 9). La siguiente pareja de pulsos se aplicó en presencia continua de isradipina (10⁻⁷ M). En esas condiciones, las respuestas secretoras cayeron a un 32 ± 8 % (con metacolina) y hasta un 18 ± 2 % (con K⁺). Cuando los secretagogos se aplicaron en presencia de DTC, las señales disminuyeron a un 29 ± 4 % para la metacolina y a un 16 ± 7 % para el K⁺.

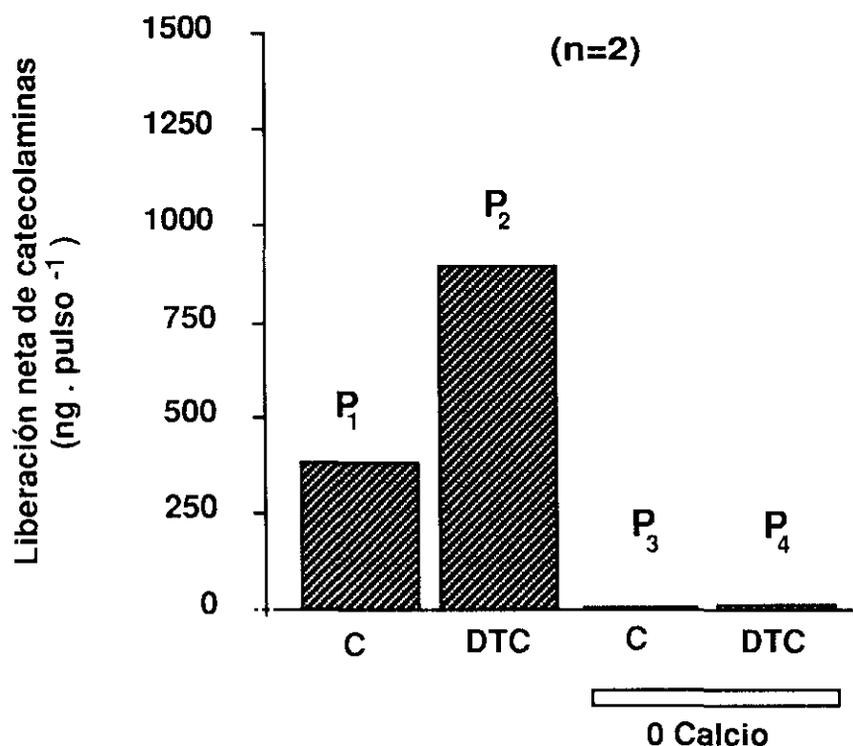


Fig. 8. Influencia del Ca_c^{2+} sobre la potenciación producida por la d-tubocurarina (DTC) de la respuesta secretora inducida por la metacolina. Cuatro pulsos de metacolina ($100 \mu\text{M}$ durante 10 s) se aplicaron sucesivamente a una glándula a intervalos de 15 min (P_1 - P_4). El pulso P_1 se utilizó como control, P_2 muestra la potenciación de la respuesta secretora en presencia de DTC ($100 \mu\text{M}$). Estas dos estimulaciones se repitieron en ausencia de Ca^{2+} en el medio de perfusión desde 10 min antes del pulso (P_3 y P_4). Los datos representan la liberación neta de catecolaminas producida por cada pulso de metacolina y son media de dos experimentos.

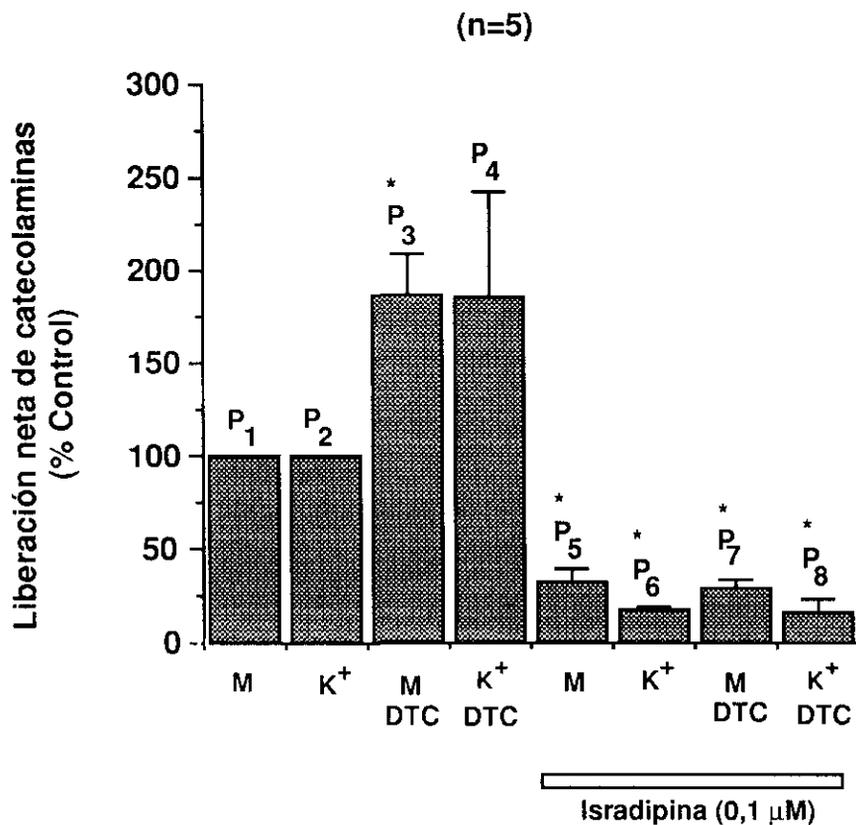


Fig. 9. Efecto de isradipina sobre la secreción de catecolaminas provocada por metacolina ó K⁺, en presencia o ausencia de d-tubocurarina (DTC). Cuatro pulsos de metacolina (100 μM durante 10 s) se alternaron con cuatro de K⁺ (35 mM durante 10 s). La secreción obtenida en los dos pulsos controles (P₁ y P₂) se consideró como 100 y la de los seis pulsos siguientes se expresó como porcentaje de sus respectivas señales secretoras iniciales (metacolina o potasio). Las condiciones experimentales correspondientes a cada pulso se señalan bajo cada columna (M, metacolina; K⁺, potasio; DTC, de d-tubocurarina). La isradipina (0,1 μM) estuvo presente desde 15 min antes de P₅ y hasta el final del experimento. Los pulsos se daban cada 20 min. Los datos son media ± error estándar del número de glándulas indicado entre paréntesis. * p<0'01 respecto al control.

En la Fig. 10 se muestra un experimento similar al anterior pero en el que se utilizó Bay K 8644 (10^{-6} M). Esta molécula estuvo presente continuamente en los cuatro últimos pulsos. Esta DHP agonista aumenta la respuesta a metacolina a un 188 ± 20 % (P5) y a potasio 35 mM a un 661 ± 162 % (P6). Es interesante señalar que la potenciación por el Bay K 8644 de la respuesta a la metacolina fue mucho mayor en presencia de DTC (407 ± 82 %) que cuando la metacolina se utilizó sola (compárense los pulsos P7 con P5 en la Fig. 10). Finalmente, el aumento por Bay K 8644 de la respuesta secretora de la combinación DTC más K^+ fue similar (646 ± 154 %) a la obtenida cuando el K^+ se utilizó solo.

En conclusión, parece que las respuestas secretoras mediadas por el K^+ son sustancialmente más sensibles a las DHPs que las inducidas por la metacolina. Sin embargo, la conducta de el Bay K 8644 respecto a la combinación de la DTC más metacolina recuerda mucho a la respuesta con el K^+ . Da la impresión de que la DTC sensibiliza la respuesta muscarínica a los efectos potenciadores de el Bay K 8644, probablemente porque los canales de Ca^{2+} sensibles a las DHPs están siendo reclutados mejor en esas condiciones que cuando se utiliza la metacolina sola.

I.1.3.- Efecto de apamina sobre la respuesta secretora producida por estimulación del receptor muscarínico.

Se ha demostrado recientemente que la apamina inhibe las corrientes SK en células cromafines bovinas (Artalejo y col., 1992). Por ese motivo parecía interesante probar su efecto sobre la respuesta secretora muscarínica de la glándula adrenal de gato.

En el protocolo experimental diseñado con ese fin se aplicaban cuatro pulsos de metacolina (100 μ M) de 10 s de duración. Los dos primeros eran controles y originaban una secreción de catecolaminas aproximada de 600 ng (Fig. 11). En presencia de apamina (10^{-6} M), presente 2 min antes del pulso y durante la

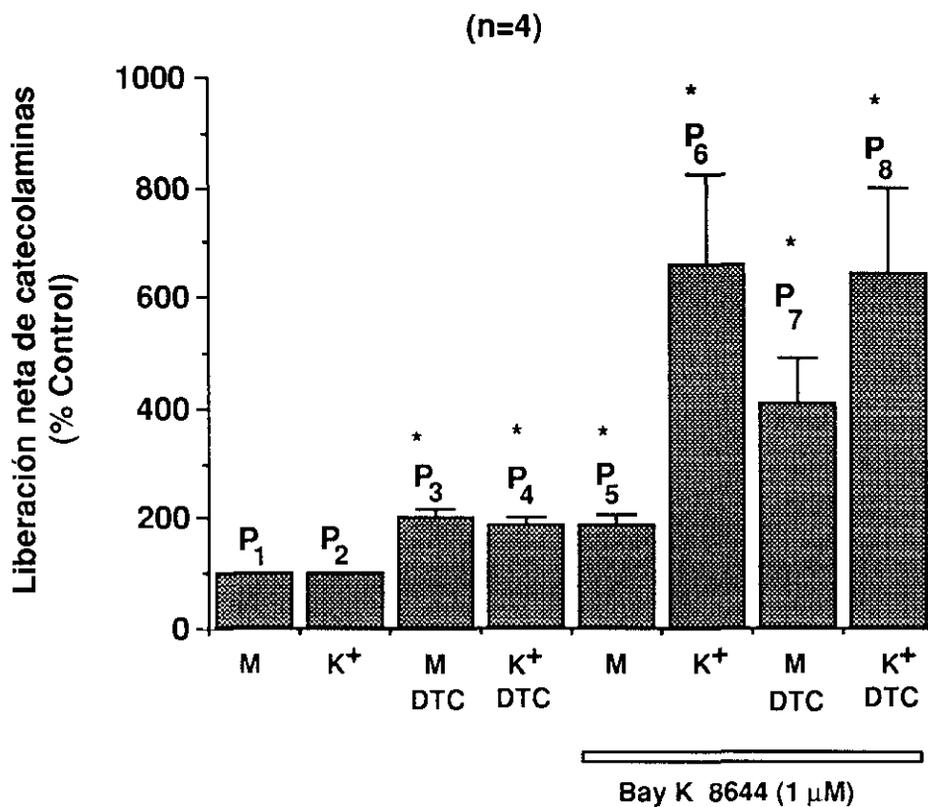


Fig. 10. Efecto de Bay K 8644 sobre la secreción de catecolaminas provocada por metacolina, K⁺ en presencia o ausencia de d-tubocurarina. Cuatro pulsos de metacolina (100 μM durante 10 s) se alternaron con cuatro de K⁺ (35 mM durante 10 s). La secreción obtenida en los dos pulsos controles (P₁ y P₂) se normalizó como el 100% de la secreción y la de los seis pulsos siguientes se expresó como porcentaje de sus respectivas señales secretoras iniciales (metacolina o K⁺). Las condiciones experimentales correspondientes a cada pulso se señalan bajo cada columna (M, metacolina; K⁺, potasio; DTC, d-tubocurarina). El Bay K 8644 (1 μM) estuvo presente desde 15 min antes de P₅ y hasta el final del experimento. Los pulsos se daban cada 20 min. Los datos son media ± error estándar del número de glándulas indicadas entre paréntesis. * p<0'01 respecto al control.

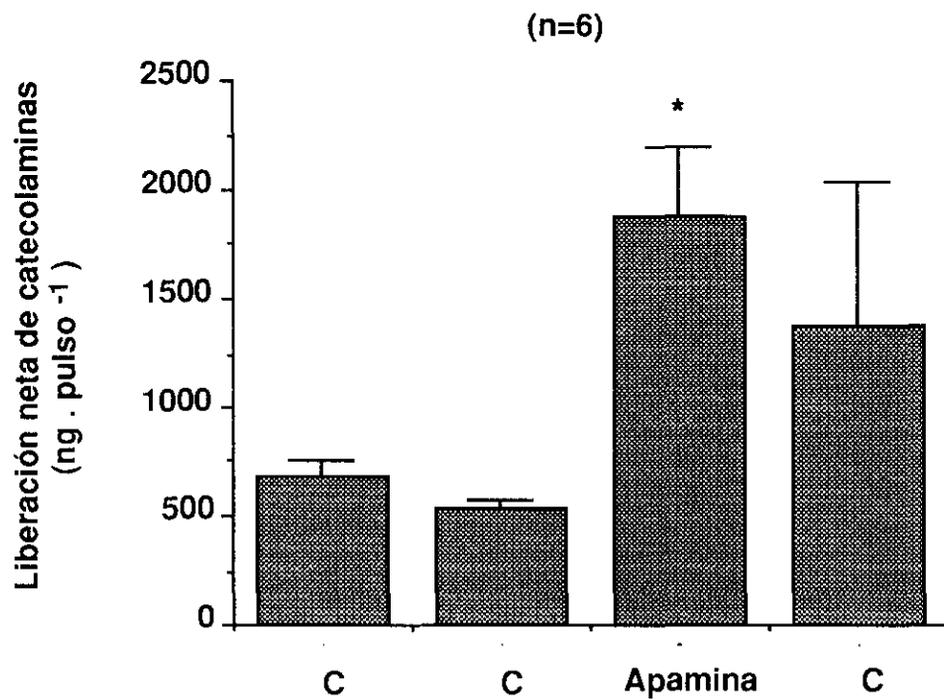


Fig. 11. Efecto de la apamina sobre la secreción de catecolaminas producida por la metacolina (100 μ M durante 10 s). Se administraron cuatro pulsos de metacolina a intervalos de 15 min. Los dos primeros son controles de la respuesta secretora (C), el tercero se dió en presencia de apamina (10^{-6} M) presente desde 2 min antes, durante el pulso de metacolina y durante la recogida de las tres muestras de 30 s, y el cuarto pulso se aplicó con metacolina sola 15 min después del lavado de la apamina. Los resultados son la media \pm error estándar de seis experimentos. * $p < 0.01$ respecto al control.

recogida de muestras correspondiente, la respuesta secretora se vió incrementada 5 veces, hasta 2.000 ng aproximadamente. Tras el lavado de la apamina un nuevo pulso control dio una respuesta extremadamente elevada (1.379 ± 658 ng), quizás porque la apamina se lave muy lentamente. La apamina, pues, causó un drástico aumento de la respuesta secretora inducida por la estimulación del receptor muscarínico.

I.1.4.- Efecto del tetraetilamonio.

El tetraetilamonio (TEA) es un clásico bloqueante de los canales BK en varios tipos celulares (Blatz y Magleby, 1987), entre ellos las células cromafines bovinas (Marty y Neher, 1985).

Con objeto de estudiar su efecto sobre la respuesta secretora mediada por metacolina, se administraron a las glándulas adrenales ocho pulsos de metacolina (100 μ M) de 10 s de duración a intervalos de 15 min (Fig. 12). Los dos primeros pulsos se tomaron como controles; los cinco siguientes iban acompañados por TEA en concentraciones crecientes de 1, 3, 10, 20 y 30 mM, desde 10 min antes del pulso, durante éste y todo el tiempo de recogida de las muestras correspondientes. Ninguna de las tres primeras concentraciones de TEA modificaban la cantidad de catecolaminas secretadas respecto del control. Sin embargo, a 20 y 30 mM se potenciaba intensamente la señal secretora, siendo a 30 mM la secreción de catecolaminas cuatro veces el valor del control. Este efecto era totalmente reversible tras el lavado del TEA, obteniéndose unos valores equiparables a los dos primeros en el octavo pulso.

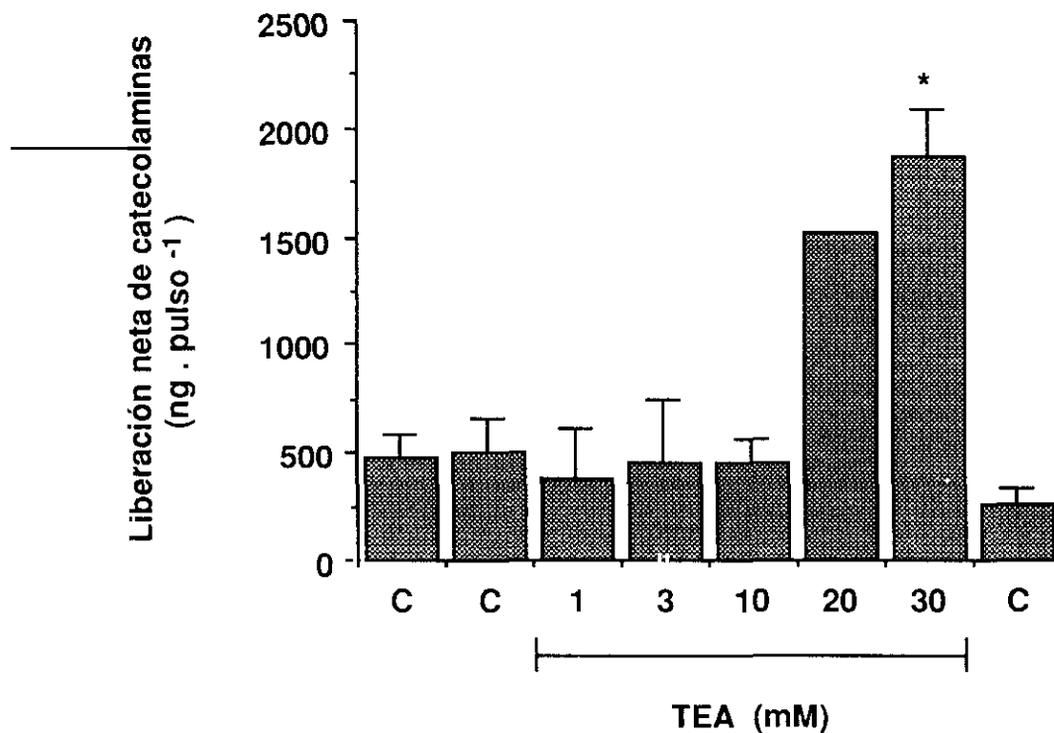


Fig. 12. Efecto del tetraetilamonio (TEA) sobre la secreción de catecolaminas producida por metacolina ($100 \mu\text{M}$ durante 10 s). Se aplicaron 8 pulsos de metacolina a intervalos de 15 min. Los dos primeros se utilizaron como controles y en los cinco siguientes se introdujeron concentraciones crecientes de TEA (desde 5 min antes del estímulo y durante toda la recogida de muestras correspondientes a éste). El último muestra la reversibilidad del efecto. Los datos son media \pm error estándar de tres glándulas, excepto para TEA 20 mM que procede de una sola glándula. * $p < 0.01$ respecto a los controles iniciales.

I.1.5.- Efecto de la apamina, la d-tubocurarina y el tetraetilamonio sobre la secreción basal de catecolaminas.

En la Fig. 13 se reflejan los resultados de los experimentos encaminados a estudiar una posible acción de estas moléculas bloqueantes de canales de K^+ sobre la liberación espontánea de catecolaminas. En el protocolo experimental se administraban tras el tiempo de equilibrado, el TEA (30 mM), la DTC (100 μ M) o la apamina (0'1 μ M) durante 330 s, mientras se recogían muestras de 30 s de forma continua. Antes de la introducción de cada uno de ellos se tomaban dos muestras de 30 s para determinar la secreción basal, que era de $40 \pm 3'8 \text{ ng.30 s}^{-1}$ (n=26).

La gráfica demuestra que ni la apamina ni la DTC modificaban la secreción basal. En contraste, el TEA aumentó 20 veces la liberación espontánea de catecolaminas, hasta un pico de 800 ng.30 s^{-1} que luego declinó a una meseta de aproximadamente 400 ng.30 s^{-1} .

I.2.- EFECTO DE APAMINA Y D-TUBOCURARINA SOBRE LA SEÑAL DE CALCIO INTRACELULAR.

La secreción de catecolaminas producida por estimulación del receptor muscarínico va siempre pareja a un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$. Por ello, quisimos saber qué ocurría con el Ca_i^{2+} al estimular el receptor muscarínico con la metacolina y cuando potenciábamos la acción de esta con la DTC o la apamina.

Para estudiar un posible efecto de la DTC sobre la concentración de $[Ca^{2+}]_i$ se aplicaron dos pulsos de metacolina de 10 s de duración separados 15 min, y en el segundo de ellos se introdujo la DTC desde 5 min antes del pulso (Fig. 14). El primer pulso originó una subida de la $[Ca^{2+}]_i$ inmediatamente después de la aplicación de la metacolina que alcanzó un pico de aproximadamente 1 μ M y que

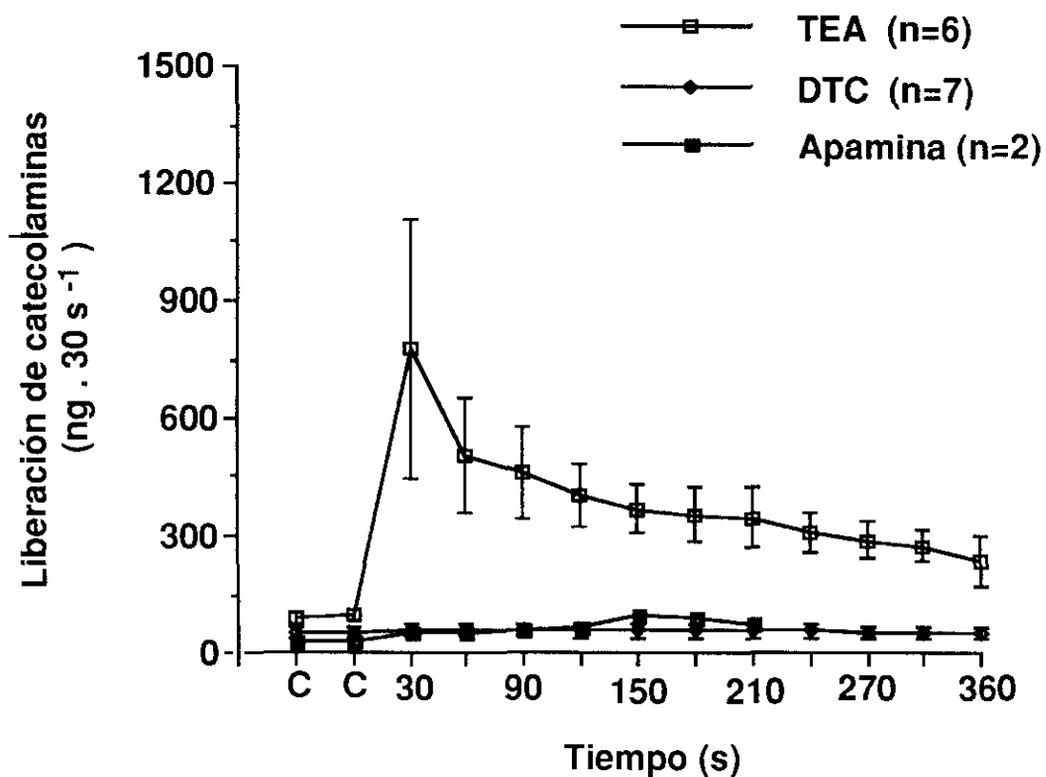


Fig. 13. Efectos de la d-tubocurarina, la apamina y el tetraetilamonio sobre la liberación espontánea de catecolaminas de la glándula adrenal de gato. Tras la estabilización de las glándulas se introdujeron el tetraetilamonio (TEA, 30 mM), la d-tubocurarina (DTC, 100 μ M) y la apamina (0'1 μ M) durante 330 s, recogiendo continuamente muestras de 30 s. Los datos son la media \pm error estándar de los experimentos señalados entre paréntesis.

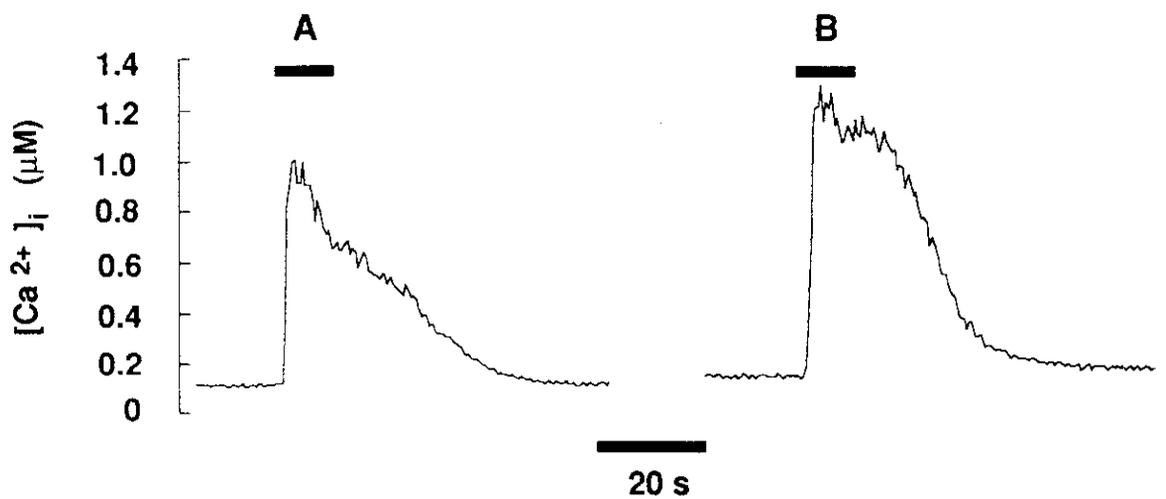


Fig. 14. Variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ en una célula cromafín de gato cargada con fura-2 y estimulada con metacolina en presencia y ausencia de apamina. La célula cargada con fura-2 se estimuló 2 veces desde una pipeta situada cerca de su superficie; la primera vez con metacolina sola ($100 \mu M$, 10 s), (A) y la segunda con metacolina más $0.1 \mu M$ de apamina presente desde 2 min antes y durante todo el tiempo de este segundo registro (B). Las barras horizontales que aparecen encima de los trazados indican la aplicación de la metacolina y en la parte inferior se indica el tiempo.

cayó paulatinamente hasta los niveles basales de $[Ca^{2+}]_i$ (100 nM) en los 30 s siguientes al pulso de metacolina (Fig. 14A).

La superfusión con DTC (100 μ M), no modificó los niveles basales de $[Ca^{2+}]_i$; sin embargo, modificó claramente el perfil del pulso de metacolina respecto del control. En este segundo pulso se produjo una subida de $[Ca^{2+}]_i$ ligeramente superior a la del primero (1.300 nM), pero el curso temporal de la señal de Ca^{2+} era bastante diferente, ya que la $[Ca^{2+}]_i$ permanecía elevada hasta 10 s después de que el pulso de metacolina terminara (Fig. 14B). Este efecto de la DTC era reversible pues tras 10 min de lavado un nuevo pulso control produjo un perfil similar al primero (no se muestra).

En la Fig. 15 se representan los resultados obtenidos al repetir este mismo protocolo utilizando la apamina, en lugar de la DTC. En el primer pulso, la metacolina produjo un ascenso de la $[Ca^{2+}]_i$ hasta un pico de 2 μ M que fue seguido por la usual fase de caída (Fig. 15A). La apamina (0'1 μ M) no varió la $[Ca^{2+}]_i$ basal; sin embargo, produjo un incremento del pico de hasta 3'5 μ M tras la aplicación de la metacolina (Fig. 15B). Aparecía de nuevo la meseta después del pico, como en el caso de la DTC y posteriormente la $[Ca^{2+}]_i$ caía gradualmente hasta los niveles basales. Es asimismo de destacar la aparición de oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ que eran mayores en presencia de apamina. Tras lavar 15 min la apamina, el pico de $[Ca^{2+}]_i$ se mantenía potenciado (no se muestra).

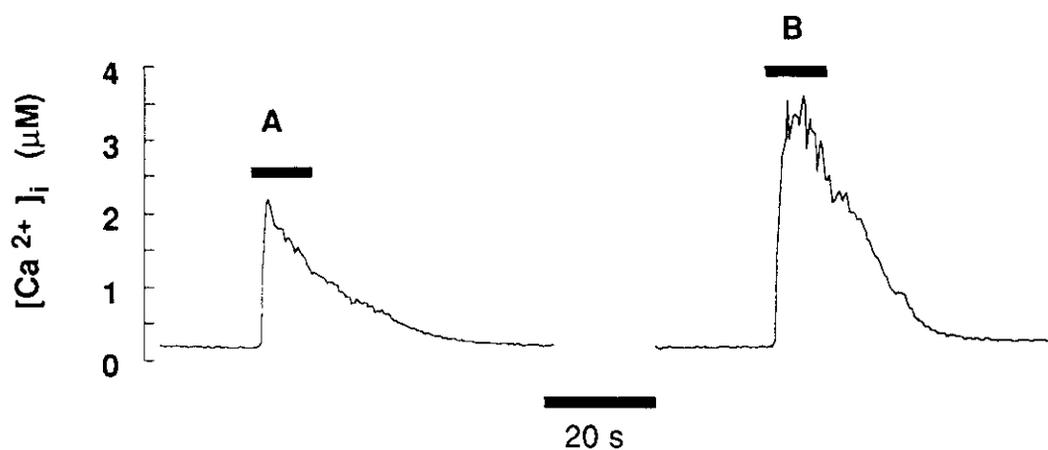


Fig. 15. Variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ en una célula cromafín de gato cargada con fura-2 y estimulada con metacolina en presencia y ausencia de la DTC. La célula cargada con fura-2 se estimuló 2 veces desde una pipeta situada cerca de su superficie; la primera vez con metacolina sola (100 μM , 10 s) (A), y la segunda con metacolina más 100 μM DTC, presente desde 5 min antes y durante todo el tiempo de este segundo registro (B). Las barras horizontales que aparecen encima de los trazados indican la aplicación de metacolina y en la parte inferior se indica el tiempo.

II.- COMPONENTES FASICO Y TONICO DE LA SECRECION MUSCARINICA. ORIGEN DEL CALCIO REQUERIDO PARA CADA UNO DE ELLOS.

II.1.- ESTUDIO DEL CURSO TEMPORAL DE LA RESPUESTA SECRETORA MEDIADA POR ESTIMULACION DEL RECEPTOR MUSCARINICO EN LA GLANDULA ADRENAL DE GATO.

Para realizar este estudio se diseñaron protocolos que permitían dibujar con precisión el perfil secretor que se desarrolla tras la estimulación del receptor muscarínico de la glándula adrenal de gato perfundida. En otros trabajos, esta observación no se había llevado a cabo, probablemente debido a que las condiciones experimentales no eran lo suficientemente sensibles como para ello, bien, porque la velocidad de perfusión era baja ($1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$), o bien, porque las muestras fueron recogidas a intervalos de tiempo demasiado largos (2 min) (Kirpekar y col., 1982; Ladona y col., 1987).

En nuestro trabajo, utilizamos una velocidad de perfusión de $6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Con este flujo es posible recoger muestras de 5 s que equivalen a un volumen de $500 \mu\text{l}$ de líquido. La recogida de muestras a tiempos tan cortos se realizaba midiendo el número de gotas que manaban de la glándula en cinco segundos y colectando éste número por tubo. De esta manera se recogían volúmenes homogéneos en todas las muestras. El tiempo durante el que se estimulaba con metacolina ($100 \mu\text{M}$) fue generalmente de 3 min.

El perfil secretor así obtenido en un experimento tipo se recoge en la Fig. 16A. Tras 1 hora de perfusión con Krebs normal para equilibrar las glándulas, se aplicaron dos pulsos "fantasmas" de metacolina ($100 \mu\text{M}$) de 5 min separados 30 min, cuya secreción no era analizada. Las estimulaciones sucesivas iban precedidas de la recogida de diez muestras que se valoraban con

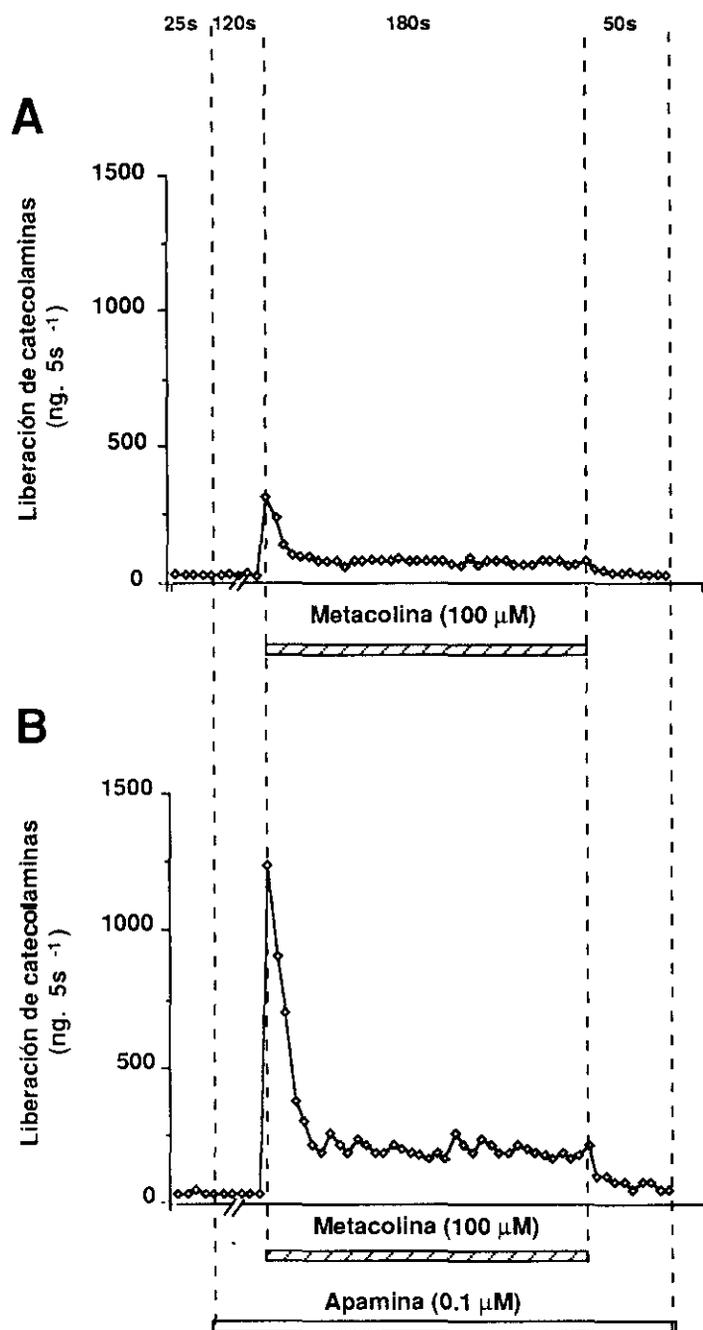


Fig.16. Experimento que muestra el perfil secretor que se dibuja por la estimulación con metacolina durante 180 s en ausencia y en presencia de apamina. (A): La glándula se estimuló durante 180 s con metacolina (100 μ M) y se recogieron muestras de 5 s durante todo ese tiempo. (B): 30 min después, se estimuló con metacolina acompañada por apamina (10^{-6} M), desde 2 min antes y hasta el final del experimento). Se recogieron 10 muestras antes y después del estímulo para valorar la liberación basal y el lavado del fármaco respectivamente.

objeto de conocer la liberación espontánea de catecolaminas, que era de $30 \text{ ng} \cdot 5 \text{ s}^{-1}$.

La introducción de la metacolina en el líquido de perfusión, causaba un rápido incremento en la cantidad de catecolaminas secretadas, formando un pico de aproximadamente $300 \text{ ng} \cdot 5 \text{ s}^{-1}$ durante primera muestra recogida. La metacolina, por lo tanto, elevaba la secreción diez veces sobre la basal. Durante los siguientes 10 s de estimulación, la velocidad de secreción caía rápidamente hasta una meseta de $138 \text{ ng} \cdot 5 \text{ s}^{-1}$. A partir de aquí, la secreción declinaba muy lentamente y al final, a los 180 s de estimulación, alcanzó un valor de unos $75 \text{ ng} \cdot 5 \text{ s}^{-1}$. El lavado de la metacolina, tras ser retirada del líquido de perfusión, llevaba rápidamente la secreción a los valores basales.

Con estas condiciones experimentales quedó claramente establecido que la respuesta secretora producida por la estimulación del receptor muscarínico de médula adrenal de gato se puede desdoblarse en dos componentes: un primer componente fásico de corta duración, formado por un pico que cae rápidamente, y un segundo componente tónico, continuación del anterior, que forma una meseta y que se desensibiliza muy lentamente.

Es de señalar cómo esta lenta desensibilización de la respuesta secretora muscarínica contrasta con la brusca caída que se observa cuando se estimula el receptor nicotínico de la médula adrenal (Kirpekar y col., 1982b; Ladona y col., 1987).

II.2.- MODULACION POR LA APAMINA DE LOS COMPONENTES FASICO Y TONICO DE LA RESPUESTA MUSCARINICA.

La observación de que la respuesta secretora muscarínica poseía dos fases despertó nuestro interés por conocer como influirían las moléculas bloqueantes de canales de potasio dependientes de Ca^{2+}

en las mismas. Dada la llamativa potenciación de la respuesta muscarínica que se había encontrado con la apamina, se pensó que sería interesante su utilización con este propósito.

Para ello, se estimuló una glándula adrenal con metacolina (100 μM durante 180 s) en presencia de apamina 0'1 μM , 30 min después de haber sido estimulada con metacolina durante el mismo periodo de tiempo (Fig. 16B). Una vez recogidas cinco muestras basales, se introdujo la apamina 0'1 μM , 2 min antes del pulso, comprobándose de nuevo que no modificaba la secreción basal de catecolaminas. Tras la introducción de la metacolina junto a la apamina, la secreción basal (30 $\text{ng}\cdot 5\text{ s}^{-1}$) aumentó aproximadamente 40 veces hasta 1.234 $\text{ng}\cdot 5\text{ s}^{-1}$. En los siguientes 15 s, la liberación de catecolaminas cayó hasta 350-370 $\text{ng}\cdot 5\text{ s}^{-1}$. Durante el restante periodo de estimulación, esta cantidad se mantuvo estable, con ligeras oscilaciones entre 160 y 300 $\text{ng}\cdot 5\text{ s}^{-1}$. Tras el lavado de la metacolina, la secreción fue cayendo rápidamente. Esta caída no fue tan marcada como en el caso en que la estimulación se había realizado solamente con metacolina.

En la Fig. 17 se recogen los resultados de diecisiete experimentos realizados estimulando con la metacolina sola y de nueve con metacolina en presencia de apamina, utilizando el protocolo descrito anteriormente. Como se puede observar, cuando se utilizó la metacolina sola, el pico de la fase inicial de la estimulación muscarínica alcanzaba $349 \pm 74\text{ ng}\cdot 5\text{ s}^{-1}$ y la meseta oscilaba entre 200 y 250 $\text{ng}\cdot 5\text{ s}^{-1}$. En presencia de apamina el pico aumentó hasta $704 \pm 91\text{ ng}\cdot 5\text{ s}^{-1}$ y la meseta oscilaba entre 400 y 500 $\text{ng}\cdot 5\text{ s}^{-1}$ de catecolaminas.

Para cuantificar la potenciación de la secreción fásica y tónica producida por la apamina, calculamos separadamente las áreas correspondientes al pico y la meseta, tanto en el caso de producirse con metacolina sola, como cuando iba acompañada por apamina. En la Fig. 18 se reflejan los resultados. Consideramos 30 s como la duración del componente fásico y calculamos su magnitud sumando

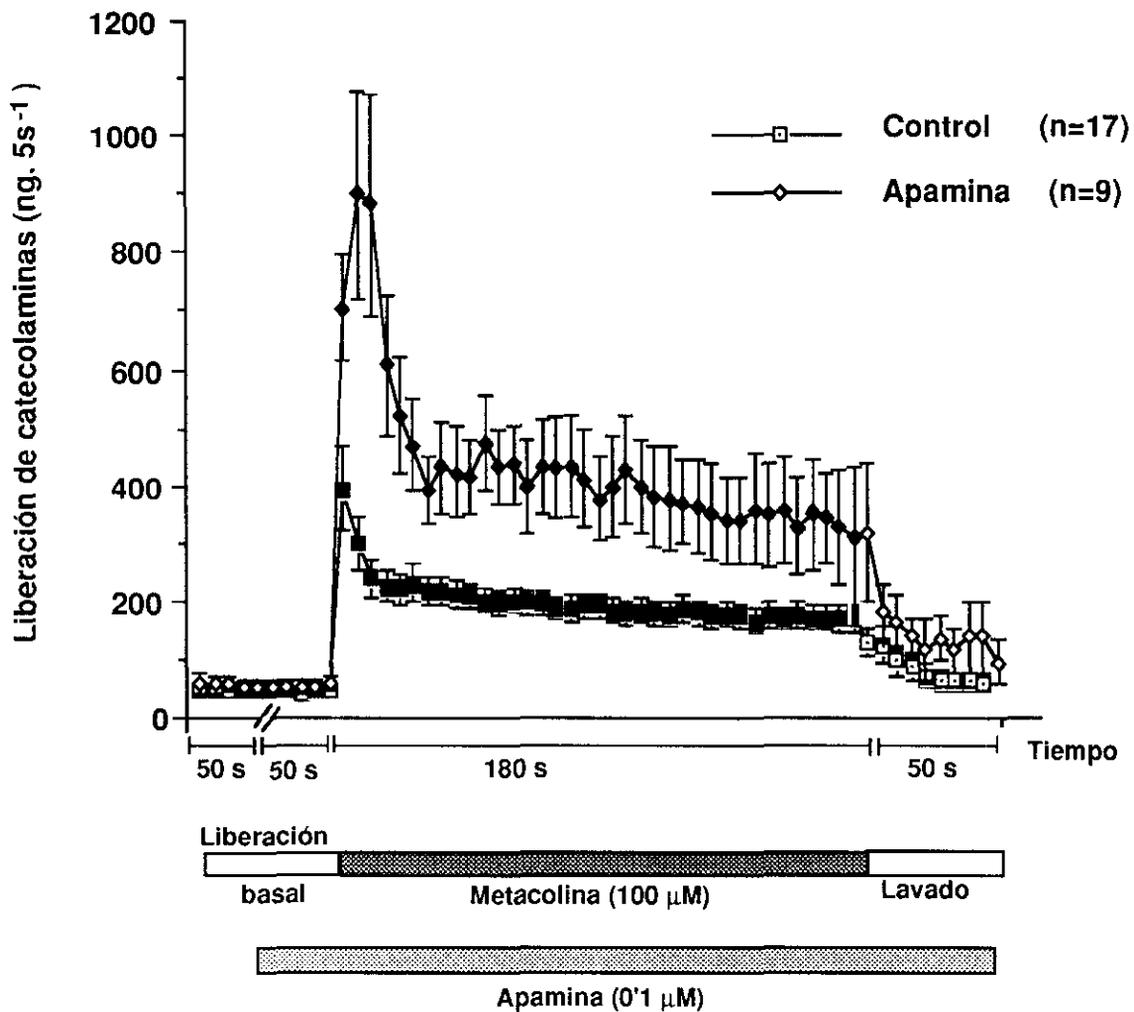


Fig. 17. Efecto de la apamina (0.1 μM) sobre el curso temporal de la secreción de catecolaminas producida por metacolina (100 μM). Los datos de esta figura proceden de experimentos en los que se estimularon las glándulas con metacolina, en ausencia (control) y presencia de la apamina en experimentos análogos a los descritos en la Fig. 13. Los datos son media \pm error estándar del número de glándulas que se muestran en la figura.

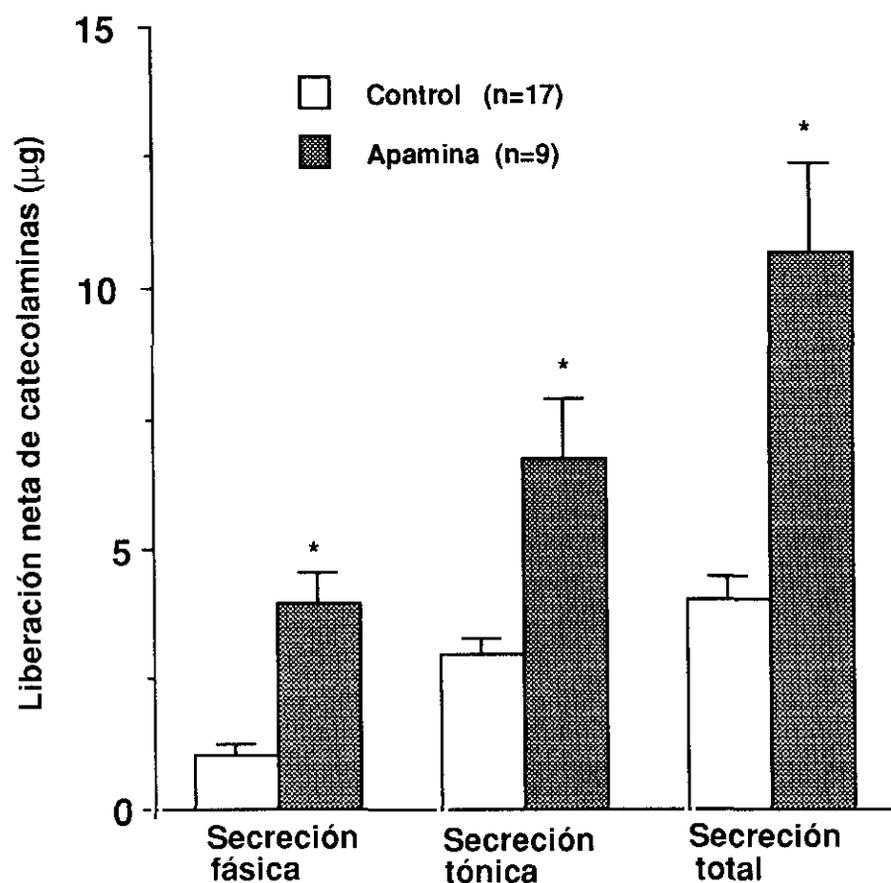


Fig. 18. Análisis cuantitativo de los componentes fásico y tónico de las curvas de secreción (representadas en la Fig. 17) debidas a la estimulación con metacolina durante 180 s en presencia y ausencia de apamina. Para estimar las áreas del pico de secreción transitorio, se sumó la secreción correspondiente a las 6 primeras muestras (30 s) de la estimulación muscarínica tras restar de ellas la liberación basal. La secreción debida a la fase tónica se calculó de la misma manera utilizando las 30 muestras siguientes al pico, y antes de empezar el periodo de lavado. Los datos son media \pm error estándar del número de experimentos mostrados entre paréntesis. * $p < 0.001$ respecto a los controles.

las seis muestras que lo componían, y restándoles la secreción basal. Las muestras que constituían los restantes 150 s, es decir, la fase tónica, se trataron de igual manera.

Los resultados de estos cálculos mostraban que tras la introducción de metacolina, el pico inicial alcanzaba $1'06 \pm 0'18$ μg , mientras que en presencia de apamina era de $3'94 \pm 0'36$ μg ($p < 0'01$). La meseta o fase tónica era de $2'95 \pm 0'36$ μg en el primer caso y de $6'73 \pm 1'22$ μg en presencia de apamina ($p < 0'01$). Las áreas de las curvas de secreción completas tras restar la secreción basal eran de $4'01 \pm 0'48$ μg y de $10'67 \pm 1'9$ μg sin y con apamina, respectivamente ($p < 0'01$).

Con estos datos observamos que la potenciación de la respuesta secretora de la metacolina por la apamina se produce más marcadamente en el componente fásico (4 veces) que en el tónico (2 veces).

II.3.- EFECTO DE APAMINA SOBRE LA SECRECIÓN DIFERENCIAL DE CATECOLAMINAS.

Se ha descrito en la glándula adrenal de gato perfundida que la estimulación del receptor muscarínico libera preferentemente adrenalina (Douglas y Poisner, 1965; Borges y col., 1986). De hecho, un 65 % de las catecolaminas secretadas por metacolina es adrenalina y un 35 % noradrenalina (Ballesta y col., 1989). Resulta por tanto interesante saber, si la proporción adrenalina/noradrenalina se mantiene cuando se estimulan las glándulas con metacolina en presencia de apamina.

En la Fig. 19 representamos el resultado de un experimento, realizado por duplicado, en el que se estimularon las glándulas primero con metacolina (100 μM) durante 35 s, y 30 min después con metacolina más apamina (0'1 μM), introducida ésta desde 2 min antes y durante el resto del experimento. Las catecolaminas

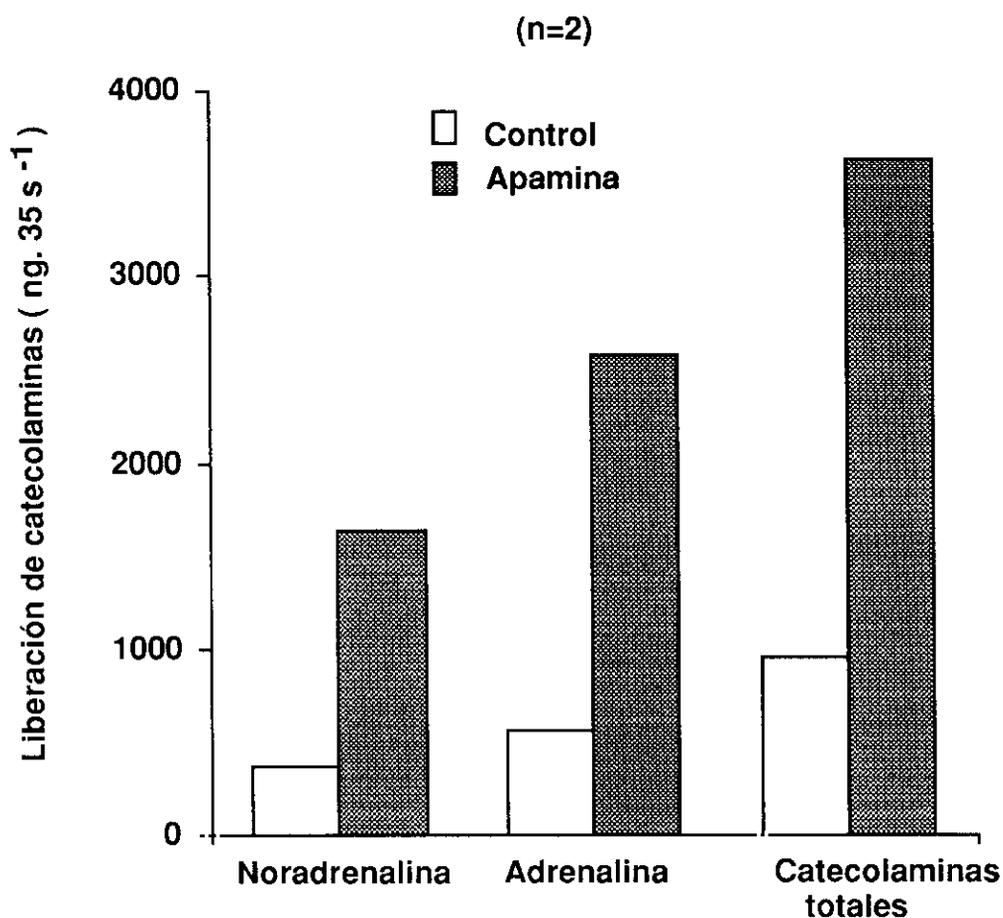


Fig. 19. Efecto de la apamina sobre la secreción de adrenalina y noradrenalina tras la estimulación de las glándulas adrenales con la metacolina. El protocolo experimental es análogo al mostrado en la Fig. 15. Se midió el contenido total de catecolaminas por fluorometría en una alícuota de las muestras (7 de 5 s de duración, cuyo valor acumulado se muestra en la figura) En otras alícuotas de las mismas muestras se determinaron las cantidades de adrenalina y noradrenalina con técnicas de HPLC. Los datos son media de los resultados obtenidos en dos glándulas.

totales presentes en las muestras se midieron fluorométricamente y luego se analizó la secreción diferencial por HPLC acoplado a un detector electroquímico.

Como se puede observar, la apamina potenció tanto la liberación de adrenalina como la de noradrenalina. La proporción de adrenalina/noradrenalina tanto en la situación control como en el caso en que participó la apamina era aproximadamente de 1,5. Expresando el contenido de catecolaminas como porcentaje de adrenalina respecto al total de catecolaminas (adrenalina más noradrenalina), las cantidades secretadas en el pico inicial eran un 60% en ausencia de apamina y de un 60 % en su presencia.

II.4.- EXISTENCIA DE UN COMPONENTE FASICO Y UNO TONICO EN EL INCREMENTO DE CALCIO INTRACELULAR MEDIADO POR METACOLINA.

Si la respuesta a la estimulación muscarínica posee un comportamiento bifásico en la secreción de catecolaminas, la siguiente pregunta que se plantea es si este mismo patrón se repite a nivel de Ca_i^{2+} cuando la célula se estimula con metacolina.

Para estudiar este aspecto, repetimos los protocolos para el estudio de la secreción en células cromafines felinas cargadas con fura-2. Estas células se cultivaron en los 2-3 días previos a la realización del experimento. Tras un tiempo de superfusión con Krebs normal a temperatura ambiente (25 ± 2 °C), se estimuló una sola célula con metacolina (100 μ M) procedente del interior de una micropipeta de vidrio. En la Fig. 20 se muestra el perfil de la señal de Ca_i^{2+} así originada. Se puede apreciar en esta figura como la $[Ca^{2+}]_i$ asciende en un pico rápido inicial, para posteriormente caer hacia una meseta. Los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ se elevaron desde un nivel basal de aproximadamente 0'12 μ M a 1'2 μ M durante los 5 primeros segundos de estimulación con metacolina. A partir de ese momento, el pico cae a 0'6 μ M y se mantiene en ese nivel durante

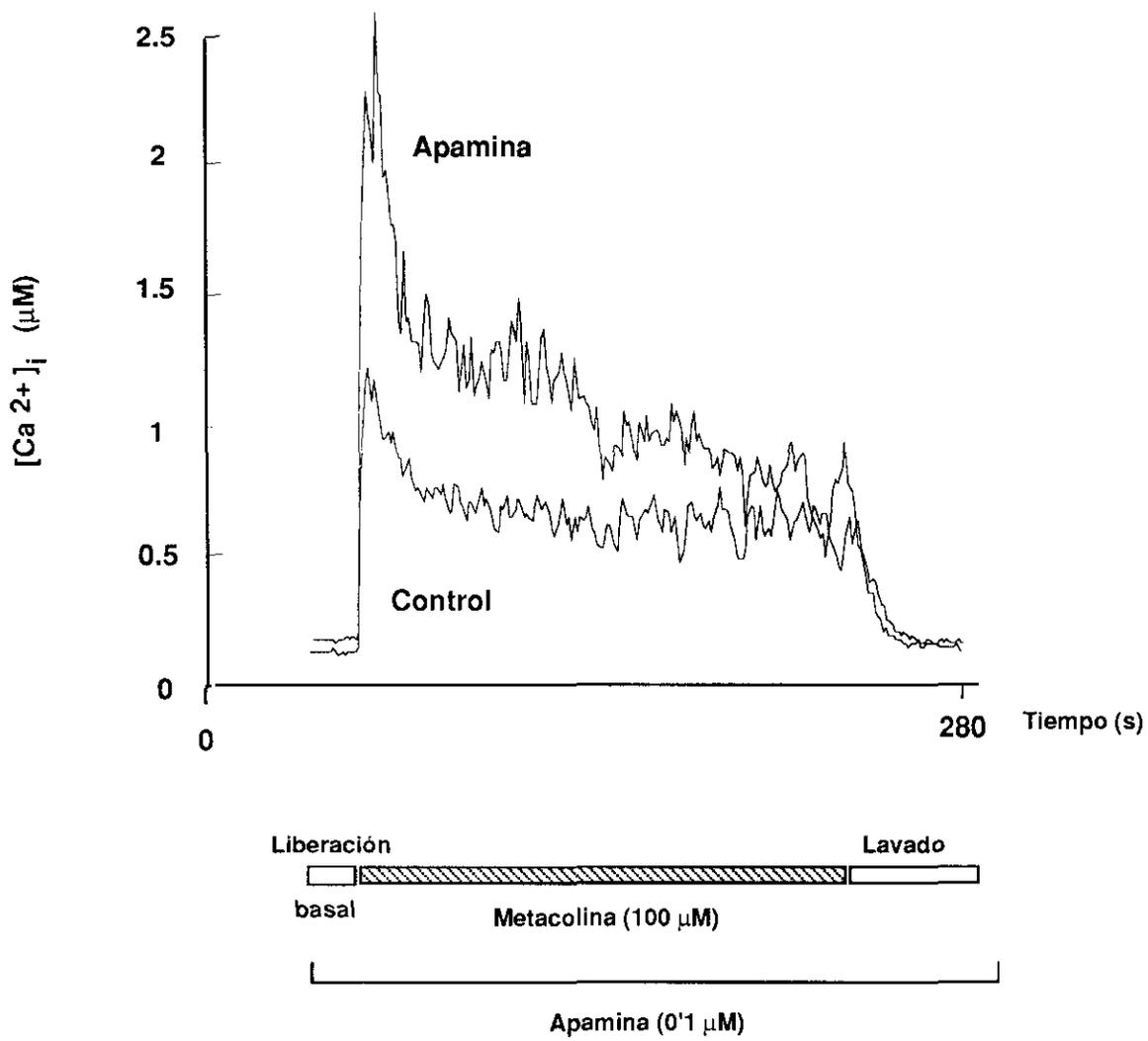


Fig. 20. Cambios citosólicos de calcio producidos por estimulación con metacolina en células cargadas con fura-2. Tras cargar las células se superfundieron con Krebs-normal. En el control, la metacolina (100 μM) se aplicó desde una micropipeta de vidrio, durante un periodo de 3 min (barra rayada horizontal). Tras un lavado de 20 min, se introdujo la apamina 0.1 μM en el sistema de superfusión, durante el tiempo indicado en la base de la figura y se repitió la estimulación con metacolina. Tras ese tiempo, la célula se superfundió con krebs normal. Los dos registros se obtuvieron sucesivamente pero los superponemos para facilitar la comparación entre ellos.

el resto de los 3 min de estimulación. Tras finalizar la aplicación de metacolina, la $[Ca^{2+}]_i$ cae rápidamente a los niveles basales que teníamos antes de estimular.

La misma célula se volvió a superfundir de nuevo con Krebs normal durante 20 min con objeto de permitir una estabilización de la misma, y tras ese tiempo se introdujo en el medio de perfusión la apamina (0'1 μ M), que se mantuvo hasta el final del experimento. La apamina no modificaba los niveles basales de $[Ca^{2+}]_i$. Diez minutos después de la introducción de la apamina, se aplicó la metacolina (100 μ M) durante un periodo de 3 min. La respuesta a este segundo estímulo fue un pico transitorio inicial de Ca_i^{2+} que alcanzó los 2'5 μ M, un valor equivalente a 2'2 veces el nivel basal de Ca_i^{2+} . Este pico cayó a una meseta que oscilaba entre 1'2 y 0'8 μ M. Una vez que se hubo interrumpido la aplicación de metacolina, se recuperaron los niveles basales de Ca_i^{2+} .

Como podemos observar, en presencia de apamina el aumento de Ca_i^{2+} es mucho mayor que si no existe ésta en el medio. Además, el comportamiento fásico-tónico que veíamos en los experimentos de secreción, se repite también con metacolina y con ésta más la apamina. Durante la aplicación de la metacolina y especialmente durante la fase de meseta se producen oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$. Esas oscilaciones alcanzan una amplitud de aproximadamente 0'2 μ M con la metacolina, y en presencia de apamina son mayores llegando hasta 0'4 μ M.

II.5.- CONTRIBUCION RELATIVA DEL CALCIO EXTRACELULAR E INTRACELULAR A LOS COMPONENTES FASICO Y TONICO DE LA RESPUESTA MUSCARINICA.

II.5.1.- Efecto de distintas situaciones de oferta de calcio sobre la secreción mediada por la estimulación del receptor muscarínico.

Tras observar la existencia de estos dos componentes del curso temporal de la respuesta a la metacolina tanto en secreción de catecolaminas como en movilización de Ca_i^{2+} , pensamos que era lógico tratar de asociarlos con distintas fuentes de Ca^{2+} . El siguiente paso en nuestro trabajo se orientó a definir este origen, diseñando para ello un protocolo experimental en el que se pudiera separar la contribución del Ca_e^{2+} y del Ca_i^{2+} a las respuestas estudiadas.

Con ese objeto, en experimentos de perfusión de la glándula adrenal sometimos a las células a distintas situaciones de oferta de Ca^{2+} , estudiando el perfil secretor producido por la estimulación con metacolina en esas condiciones. Para empezar, y con objeto de indagar sobre el efecto de la retirada del Ca_e^{2+} en las fases tónica y fásica del perfil secretor muscarínico, y dado que la eliminación del Ca_e^{2+} se puede conseguir perfundiendo las células con soluciones carentes de Ca^{2+} y con una concentración de 1 mM de EGTA ($0Ca^{2+}/1EGTA$; Abad y col., 1992), decidimos realizar un experimento en el que tras 1 h de estabilización con Krebs normal introdujimos la metacolina (100 μM) en un Krebs $0Ca^{2+}/1EGTA$ durante 5 min (Fig. 21A). La secreción de catecolaminas así producida originó un pequeño pico de 32 $ng \cdot 5s^{-1}$ desde una secreción basal de 15 $ng \cdot 5s^{-1}$. Esta secreción suponía sólo el doble de la basal en $0Ca^{2+}/1EGTA$, y caía hasta la basal al cabo de 200 s de estimulación.

A continuación, se perfundió durante 15 min la misma glándula con una solución de Krebs normal para hacerlo después con solución $0Ca^{2+}/1EGTA$ durante otros 15 min.

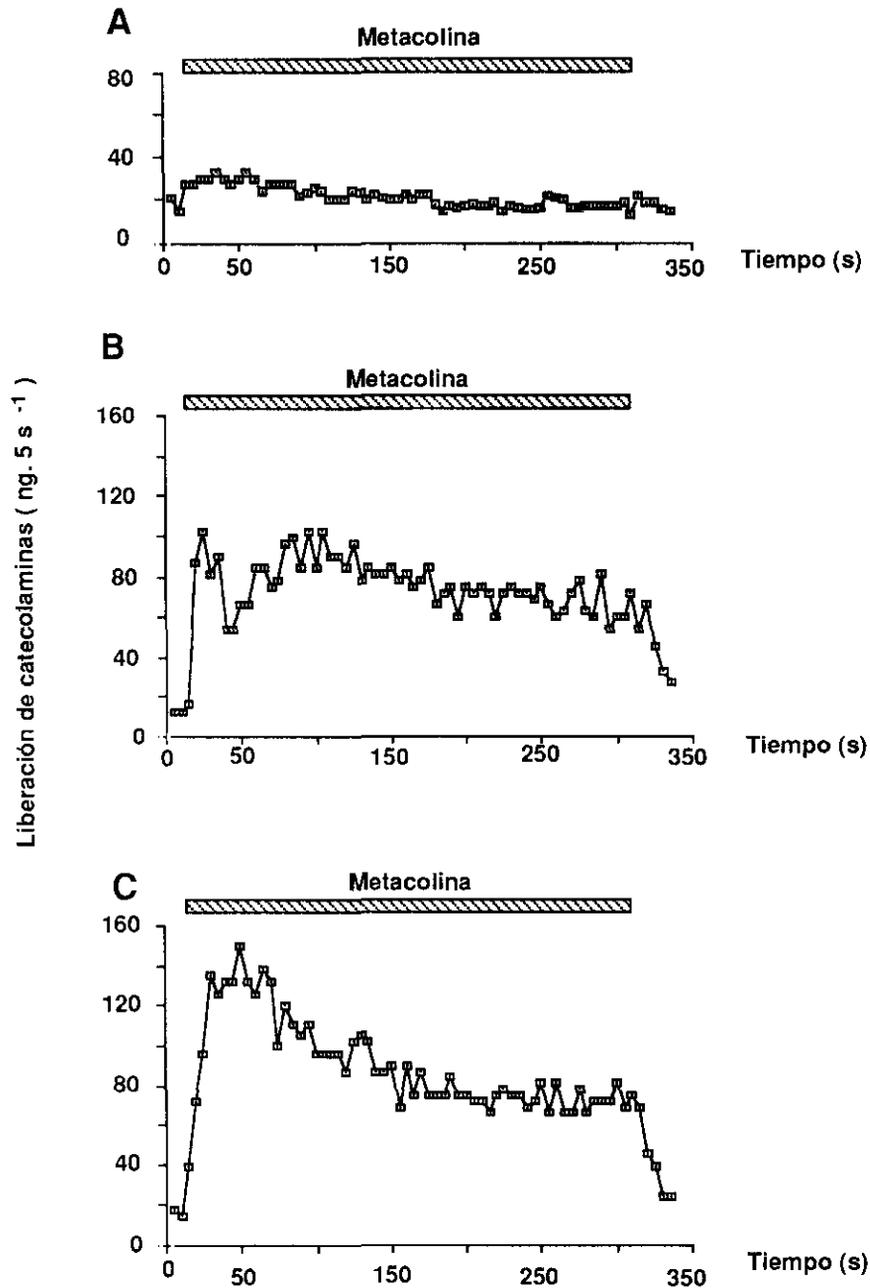


Fig. 21. Perfiles secretores producidos por la estimulación con metacolina en glándulas adrenales sometidas a distintas condiciones de oferta de Ca^{2+} . Tras una hora inicial de estabilización con Krebs normal, las glándulas se perfundieron y estimularon como sigue. En (A), se perfundió con Krebs normal y se estimuló con metacolina ($100 \mu\text{M}$, 5 min) en una solución que contenía $0\text{Ca}^{2+}/1\text{EGTA}$. En B, la glándula se perfundió primero durante 15 min con Krebs normal y luego con solución $0\text{Ca}^{2+}/1\text{EGTA}$ los otros 15 min previos a la estimulación con metacolina en Krebs normal (2.5 mM de Ca^{2+}). En C, la misma glándula se perfundió 30 min con Krebs normal y se estimuló con metacolina en la misma solución..

Con esta maniobra experimental se pretendía conseguir una disminución importante del contenido de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares de la médula adrenal y comprobar como se producía la secreción en esas condiciones si estimulábamos en presencia de Ca_e^{2+} . Por tanto, la estimulación con metacolina en este caso, se produjo simultáneamente a la reintroducción de 2'5 mM de Ca^{2+} (solución de Krebs normal) en el medio de perfusión. La Fig. 21B muestra como la secreción producida en estas condiciones es substancialmente mayor, y además mantenida en el tiempo, que la observada en la parte A de la misma figura.

Para concluir el experimento, la misma glándula se perfundió con Krebs normal durante 30 min y entonces, con los depósitos recuperados y en presencia de Ca_e^{2+} , se estimuló con metacolina en la misma solución. En este caso obtuvimos un pico inicial de 150 ng. 5 s^{-1} seguido de una meseta de alrededor de 80 ng. 5 s^{-1} (Fig. 21C).

II.5.2.- Efecto de distintas situaciones de oferta de calcio sobre la señal de calcio intracelular mediada por la estimulación del receptor muscarínico.

Intentando trasladar estas pruebas al campo de la medida del Ca_i^{2+} , realizamos los mismos protocolos experimentales de la Fig. 21 en células cargadas con fura-2. Los resultados se muestran en la Fig. 22.

Al igual que en los experimentos de perfusión de la glándula adrenal, las células se superfundieron primero con Krebs normal y posteriormente se les aplicó la metacolina (100 μM) en una solución $0\text{Ca}^{2+}/1\text{EGTA}$ (Fig. 22A). La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se elevó hasta un pico de 0'7 μM desde unos niveles basales de 0'05 μM . El pico fué transitorio y en 100 s aproximadamente cayó hasta los valores de reposo. En ausencia de Ca_e^{2+} , se pierde la meseta de Ca_i^{2+} que aparece durante la estimulación prolongada con la metacolina.

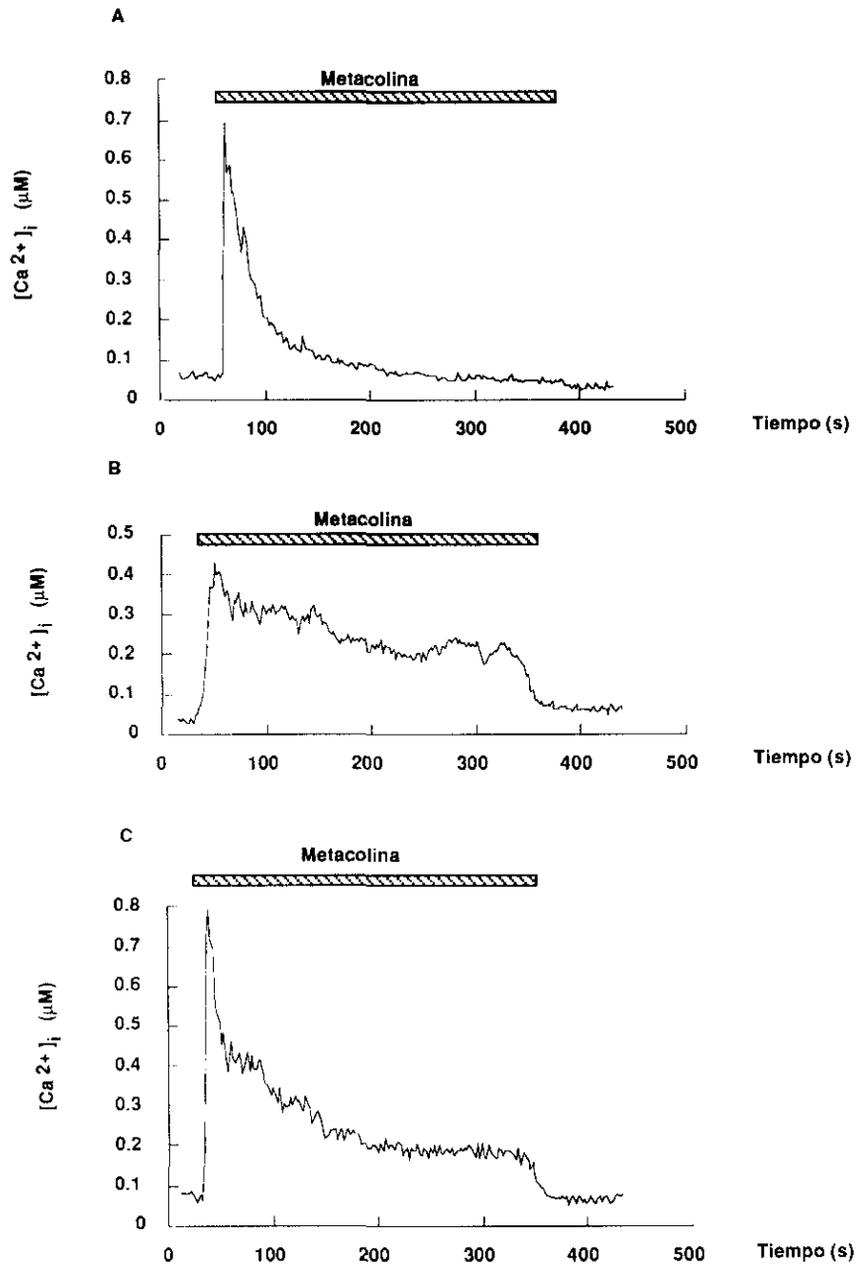


Fig. 22. Separación de los componentes fásico y tónico de los cambios de calcio intracelular producidos por la estimulación con metacolina en una célula cromafín. En (A), la célula se superfundió 15 min con Krebs normal y luego se aplicó la metacolina ($100\mu M$, 5 min) disuelta en una solución $0Ca^{2+}/1EGTA$. En (B), la célula se superfundió durante 15 min con Krebs normal, 15 min con solución $0Ca^{2+}/1EGTA$, y se estimuló con metacolina disuelta en Krebs normal. En (C), tras 30 min de superfusión con Krebs normal, se estimuló la célula con metacolina disuelta en la misma solución.

En estas condiciones, el pico transitorio pudo originarse por la movilización de Ca_i^{2+} de los depósitos intracelulares.

Tras este primer estímulo, la misma célula se superfundió con Krebs normal durante 15 min y con solución $0Ca^{2+}/1EGTA$ durante otros 15 min. Acto seguido se aplicó metacolina (100 μM) disuelta en Krebs con una concentración normal de Ca^{2+} durante 5 min (Fig 22B). Desde unos niveles basales de $[Ca^{2+}]_i$ de 0'03 μM éste aumentó hasta una meseta de 0'2-0'4 μM . Podemos observar que en condiciones de reducción del Ca_i^{2+} , se pierde el pico inicial de elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la estimulación por metacolina; solamente la meseta, que parece depender de la entrada de Ca_e^{2+} del exterior, se mantiene.

En la Fig. 22C se muestra el resultado de superfundir las células con Krebs normal durante 30 min y estimular de nuevo con metacolina (100 μM). La respuesta consiste en un pico transitorio inicial de Ca^{2+} de unos 0,8 μM seguido de una caída hasta una meseta de alrededor de 0,2-0,3 μM . Vemos aquí como en presencia de 100 nM de apamina tanto la respuesta fásica como la tónica en secreción y en $[Ca^{2+}]_i$ se vieron incrementadas.

II.5.3.- Efecto de la apamina en distintas condiciones de oferta de calcio sobre la señal de calcio intracelular y en la secreción de catecolaminas mediadas por estimulación del receptor muscarínico.

En experimentos previos habíamos comprobado que la apamina, un bloqueante selectivo de los canales SK, favorecía la entrada de Ca^{2+} a la célula cromafín felina durante la estimulación con metacolina. Por consiguiente, pensamos que la utilización de apamina en protocolos similares a los descritos en las Fig. 21 y 22, podría ofrecer datos adicionales sobre el origen del Ca^{2+} responsable de los componentes fásico y tónico de la respuesta secretora y de

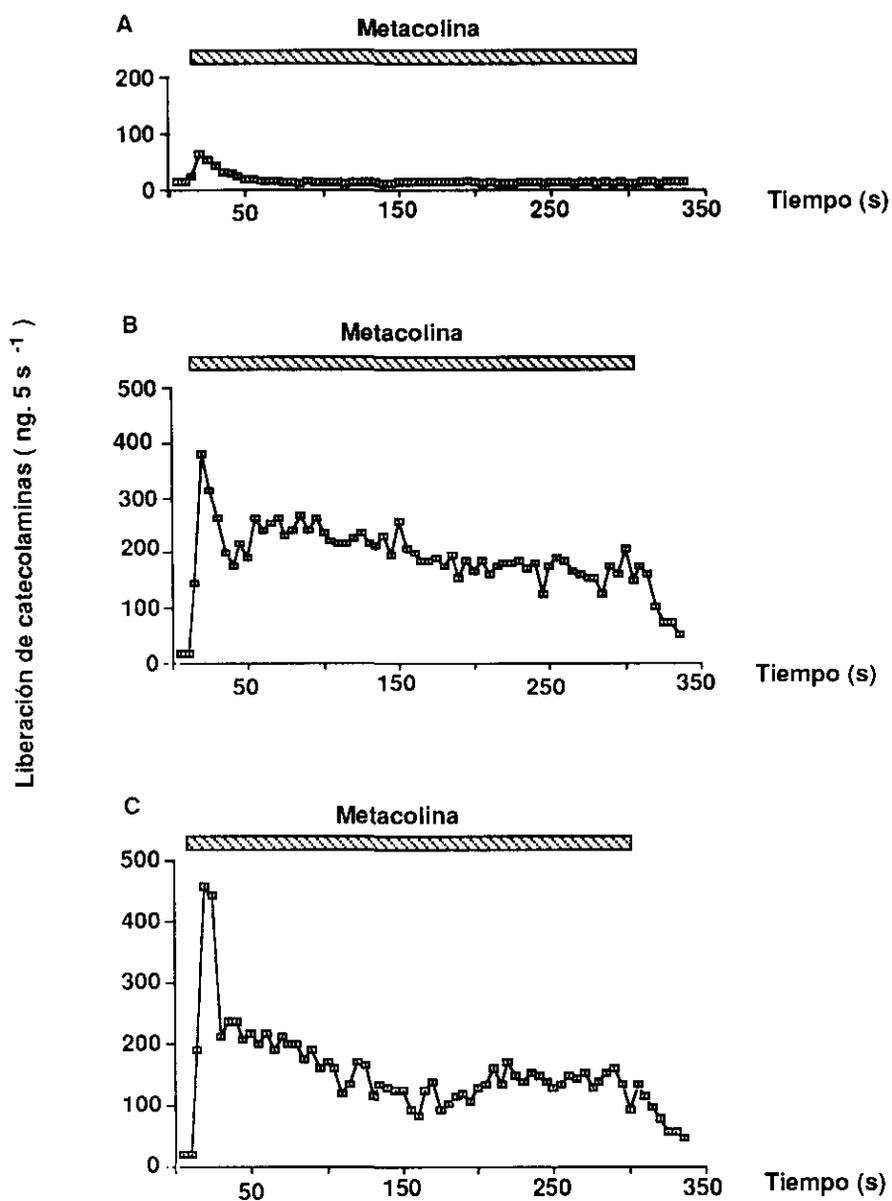


Fig. 23. Perfiles secretores producidos por la estimulación con metacolina más apamina en glándulas adrenales sometidas a distintas condiciones de oferta de Ca^{2+} . Tras una hora inicial de estabilización con Krebs normal, las glándulas se perfundieron y estimularon como sigue, introduciendo la apamina dos min antes del estímulo y durante todo éste. En (A), se perfundió con Krebs normal y se estimuló con metacolina ($100 \mu\text{M}$, 5 min) en una solución que contenía $0\text{Ca}^{2+}/1\text{EGTA}$. En B, la glándula se perfundió primero durante 15 min con Krebs normal y luego con solución $0\text{Ca}^{2+}/1\text{EGTA}$ durante los 15 min previos a la estimulación con metacolina en Krebs normal (2.5 mM de Ca^{2+}). En C, la misma glándula se perfundió 30 min con Krebs normal y se estimuló con metacolina en la misma solución..

elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por la estimulación muscarínica de la médula adrenal de gato.

En la Fig. 23 se muestra los resultados de un experimento en todo similar al de la Fig. 21 salvo en que se ha introducido apamina $0.1 \mu M$ 3 min antes, y durante la estimulación con metacolina. La respuesta secretora obtenida de esta manera, en ausencia de Ca_e^{2+} (Fig. 23A), tras la reintroducción de éste con los depósitos intracelulares vacíos (Fig. 23B), y con los depósitos recuperados (Fig. 23C), era mayor que la producida por metacolina en presencia de apamina (Fig. 21). Sin embargo, era cualitativamente similar con respecto a la aparición del gran pico inicial en condiciones en que los depósitos intracelulares habían sido llenados de nuevo.

En cuanto a los estudios de la $[Ca^{2+}]_i$, se observó la aparición de un pico inicial de $[Ca^{2+}]_i$ transitorio en ausencia de Ca_e^{2+} (Fig. 24A), un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ hasta una meseta con oscilaciones cuando el Ca_e^{2+} fue reintroducido en células cuyos depósitos intracelulares habían sido mermados (Fig. 24B) y un gran pico transitorio en solución que contenía una concentración normal de Ca^{+2} con los depósitos recuperados (Fig. 24C) cuando se realizábamos la estimulación con muscarina en presencia de apamina en las tres situaciones anteriormente descritas.

Es, por último, particularmente interesante señalar que en algunas células tratadas con apamina como la presentada en la Fig. 24 la estimulación con metacolina originó la aparición de grandes oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ que llegan a alcanzar una amplitud de hasta $1 \mu M$ (ver Fig. 24B).

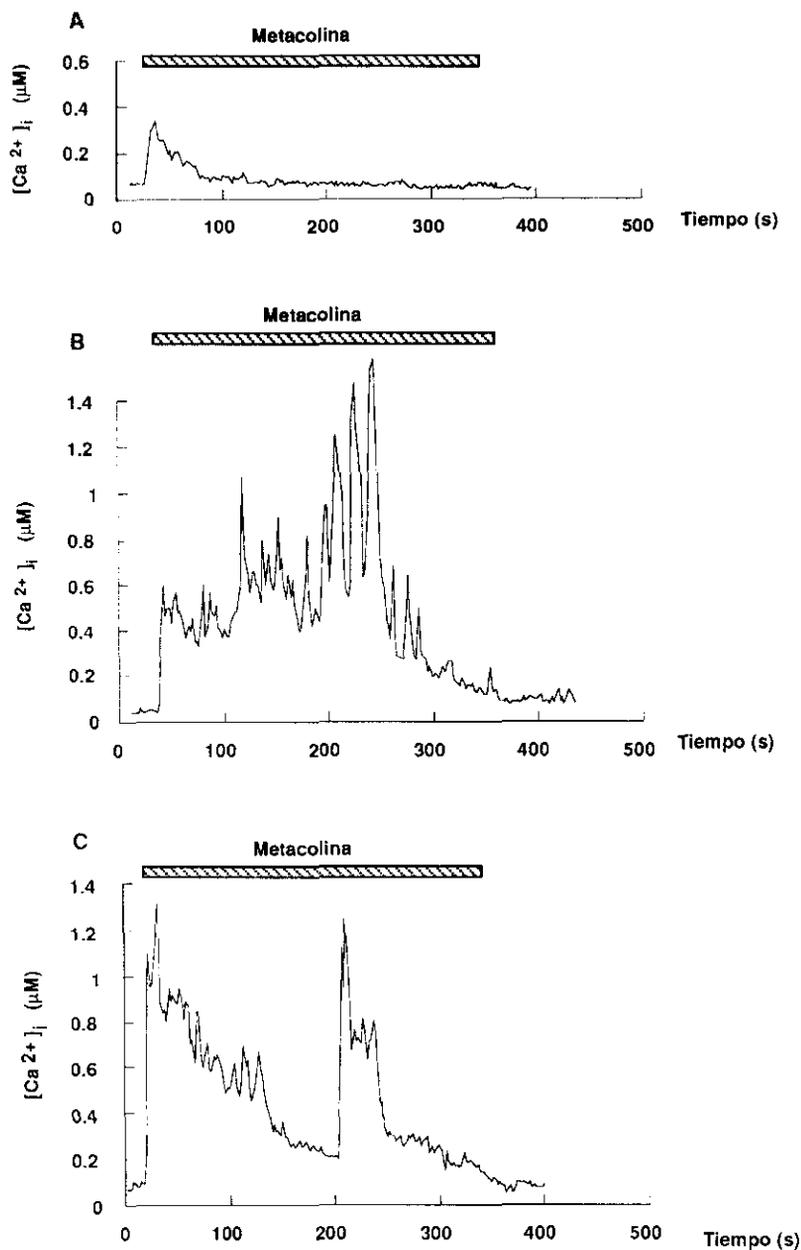


Fig. 24. Separación de los componentes fásico y tónico de los cambios de calcio intracelular producidos por la estimulación con metacolina más apamina en una célula cromafín. La apamina ($0.1 \mu M$) estuvo presente desde 2 min antes del estímulo y durante éste. En (A), las células se superfundieron 15 min con Krebs normal y luego se aplicó metacolina ($100 \mu M$, 5 min) disuelta en una solución $0Ca^{2+}/1EGTA$. En (B), la célula se superfundió durante 15 min con Krebs normal y posteriormente con solución $0Ca^{2+}/1EGTA$ durante los 15 min previos a la aparición de metacolina disuelta en Krebs normal. En (C), tras 30 min de superfusión con Krebs normal, se estimuló la célula con metacolina disuelta en la misma solución

DISCUSSION

I.- LOS CANALES DE POTASIO DEPENDIENTES DE CALCIO MODULAN LA SECRECIÓN MUSCARÍNICA EN CELULAS CROMAFINES DE GATO.

En este trabajo describimos como la d-tubocurarina (DTC), un bloqueante de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , potencia la secreción de catecolaminas mediada por la estimulación del receptor muscarínico de la glándula adrenal de gato. Tras descartar un posible efecto nicotínico de este fármaco (comprobando que otros antagonistas de este receptor, el hexametonio y la mecamilamina, no potenciaban la secreción muscarínica) confirmamos la implicación en el mencionado fenómeno de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} por el hecho de que la apamina, bloqueante específico los canales de pequeña conductancia iónica (SK), también produce una potenciación de la respuesta secretora, que es incluso más intensa que en el caso de la DTC. Es importante señalar que estos agentes bloquean selectivamente los canales de potasio dependientes de Ca^{2+} en varios tipos celulares como neuronas simpáticas (Nohomi y Kuba, 1984; Smart, 1987), hepatocitos (Cook y Haylett, 1985) o células híbridas de neuroblastoma y glioma NG 108-15 (Brown e Higashida, 1988).

Tanto la DTC como la apamina potencian a su vez el incremento de Ca_i^{2+} que se produce cuando estimulamos el receptor muscarínico con metacolina. La respuesta de Ca_i^{2+} , de por sí más alta, es también más duradera, lo cual se traduce en una mayor oferta de Ca^{2+} a la maquinaria secretora durante un tiempo más largo, coherente con un bloqueo de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , y que se traduce, como hemos visto, en una potenciación de la secreción.

II.- EVIDENCIAS FARMACOLOGICAS SOBRE EL TIPO DE CANALES DE POTASIO DEPENDIENTES DE CALCIO QUE MODULAN LA RESPUESTA SECRETORA MUSCARINICA.

La DTC, y la apamina potencian la respuesta secretora producida por metacolina en la glándula adrenal de gato. Además, la DTC y la apamina aumentan de forma notable la señal de Ca_i^{2+} originada por la estimulación muscarínica. Dado que esos agentes están caracterizados como bloqueantes de varios tipos de canales de potasio, es obvio que se puede concluir que esos canales están implicados en la regulación de la respuesta secretora muscarínica en las células cromafines de gato. La pregunta que se plantea ahora es qué tipo de canal es el responsable de este papel modulador.

En principio, la potenciación más marcada de la señal de $[Ca^{2+}]_i$ se obtuvo con la apamina. Este componente del veneno de abeja se considera bloqueante específico de los canales de potasio dependientes de Ca^{2+} de pequeña conductancia iónica en neuronas simpáticas (Nohmi y Kuba, 1984; Kawai y Watanabe, 1986) y en células cromafines (Artalejo y Neher, 1993). Estos canales están involucrados en la fase de post-hiperpolarización lenta que sigue a los potenciales de acción en muchas células excitables y son responsables de la adaptación a la frecuencia que se produce cuando un estímulo prolongado origina un tren de disparos de potenciales de acción. En estos casos esta fase es cada vez más larga enlenteciendo la respuesta y pudiendo incluso llegar a anular el disparo de un nuevo potencial de acción. Su bloqueo prolonga el tiempo durante el cual que se producen estos trenes (Hille, 1992). Por su parte, la DTC al igual que la apamina bloquea estos canales (Nohmi y Kuba, 1984; Blatz y Magleby, 1987) aunque además, bloquea los canales del tipo BK, implicados en la fase de repolarización del potencial de acción.

En nuestros experimentos observamos como el tetraetilamonio (TEA) potenciaba también la secreción de catecolaminas mediada por estimulación del receptor muscarínico. Este agente producía ese

efecto a una concentración de 20-30 mM, mientras que en la literatura estaba descrito su efecto como bloqueante de los canales BK en células híbridas de neuroblastoma y glioma NG 108-15 (Brown e Higasida, 1988) y en neuronas simpáticas (Smart, 1987) a concentraciones de 1-10 mM, rango en el que no obtuvimos efecto alguno en nuestros experimentos. La potenciación con concentraciones mayores se debería asociar a otros efectos de ese tipo no relacionados con los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} . El hecho de que el TEA no actúe sobre la secreción a concentraciones a las que bloquea los canales BK, nos hace descartar la implicación de éstos en la potenciación por la DTC y asociarla solamente al bloqueo de los canales SK. Estos canales estarían potenciando la respuesta en los dos tipos de células cromafines como muestran los experimentos en los que se analizó la secreción diferencial de adrenalina y noradrenalina.

Ni la DTC ni la apamina aumentan los niveles basales de $[Ca^{2+}]_i$ o la secreción basal de catecolaminas, lo cual indica que los canales SK no se encuentran activados al potencial de reposo de la célula con los niveles basales de Ca^{2+}_i , por lo que el "bloqueo" no produce una despolarización capaz de provocar una respuesta secretora y que su efecto se manifiesta sólo cuando se pone en marcha un mecanismo que incrementa la $[Ca^{2+}]_i$. También descartamos, así, un posible efecto presináptico consistente en un aumento de la liberación de ACh. Sin embargo, el TEA aumenta la secreción basal notablemente. Este incremento se ha atribuido a efectos despolarizantes directos del TEA en las células de gato (Sorimachi y col., 1990) probablemente asociados a la estimulación directa del receptor nicotínico. De hecho la DTC bloqueaba la respuesta secretora evocada por TEA.

III.- IMPLICACION DE LOS CANALES DE CALCIO DE TIPO L EN LA RESPUESTA SECRETORA MUSCARINICA Y EN SU POTENCIACION POR LA D-TUBOCURARINA.

Pudimos observar en nuestros experimentos la existencia de una dependencia marcada del Ca_e^{2+} tanto de la respuesta secretora muscarínica como de su potenciación por la DTC, . Este hecho nos hizo preguntarnos por la posibilidad de una participación de los canales de calcio dependientes de voltaje en estos fenómenos, dada la enorme importancia que tienen en el control del proceso secretor producido por otras vías como la estimulación del receptor nicotínico, o la despolarización con concentraciones elevadas de potasio extracelular. La utilización de dihidropiridinas como el Bay K 8644, que aumenta la entrada de calcio por los canales de tipo L en las células cromafines (García y col., 1984a, Montiel y col., 1984) y de la isradipina, que la inhibe (Gandía y col., 1987), permitió verificar nuestra hipótesis. En nuestros experimentos, el Bay K 8644 duplica la secreción debida a la metacolina y la isradipina la bloquea. Estos resultados son coherentes con los de un trabajo de Ladona y col. (1987) donde se demuestra que el Bay K 8644 casi triplica el pico de la respuesta secretora a muscarina en adrenales perfundidas de gato.

La estimulación del receptor muscarínico en células cromafines de la médula adrenal de la rata genera una señal despolarizante que pone en marcha el disparo de potenciales de acción (Akaike y col., 1990). La estimulación muscarínica de las células cromafines de gato podría producir un efecto similar. Estos potenciales de acción producirían una despolarización capaz de activar los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, cuya participación en la respuesta secretora se pone de manifiesto en nuestros resultados experimentales arriba mencionados. Esto se corrobora por la potenciación producida por apamina de la liberación originada por la despolarización con altas concentraciones de K^+ (35 mM).

Por otro lado, hemos visto también un efecto del Bay K 8644 y de la isradipina en la potenciación por la DTC de la respuesta secretora muscarínica. En neuronas simpáticas, la aplicación de fuertes corrientes despolarizantes genera la aparición de trenes de potenciales de acción. Como ya se ha comentado, en presencia de apamina, se obtiene un número y frecuencia mayores de descargas (Kawai y Watanabe, 1986). Si extrapolamos este hecho a las células cromafines de gato, la mayor susceptibilidad a dihidropiridinas de la respuesta secretora inducida por metacolina en presencia de DTC, se podría explicar por un mayor reclutamiento de canales de Ca^{2+} tipo L durante las descargas repetitivas causadas por bloqueo de los canales de tipo SK.

IV.- EXISTENCIA DE UN PATRON COMUN A LA RESPUESTA SECRETORA Y DE CALCIO INTRACELULAR INDUCIDAS POR LA ESTIMULACION MUSCARINICA.

En nuestra investigación realizamos experimentos de *estimulación prolongada (varios minutos)* del receptor muscarínico con su agonista metacolina. Dado el alto flujo de perfusión al que trabajamos (6 ml/min) pudimos recoger muestras de 5 s de forma continuada, lo que nos permitió dibujar el perfil secretor que se construye cuando se mantiene la estimulación a lo largo del tiempo. De esta manera hallamos dos componentes en la respuesta secretora muscarínica: uno "fásico" transitorio y otro "tónico" en forma de meseta, mantenido en el tiempo y sin desensibilización hasta que retiramos el estímulo.

Por otro lado, la realización del mismo estudio midiendo la $[Ca^{2+}]_i$ en una sola célula aislada cargada con fura-2 nos ofreció un patrón similar de conducta de la señal de Ca^{2+}_i . Este hecho sugiere que las dos fases halladas en la señal de $[Ca^{2+}]_i$ eran responsables de las que aparecían paralelamente en la secreción, y nos hizo plantearnos cual era el origen del Ca^{2+} que originaba cada componente de la señal de Ca^{2+} y de la respuesta secretora.

V.- LAS FUENTES DE CALCIO EN LA RESPUESTA SECRETORA MUSCARINICA.

En la médula adrenal de gato, la acetilcolina liberada por el nervio esplácnico produce la secreción de catecolaminas mediante la activación tanto del receptor nicotínico como del muscarínico de la célula cromafín (Alamo y col., 1991). Está claro que el componente nicotínico de la secreción depende enteramente del Ca_e^{2+} (Douglas y Rubin, 1961) y se desensibiliza rápidamente (Schiavone y Kirpekar, 1982). Sin embargo, el componente muscarínico parece ser más complejo en sus requerimientos de Ca^{2+} y en su cinética.

Para indagar sobre las fuentes de Ca^{2+} que participan en la repuesta muscarínica utilizamos protocolos experimentales en los que la estimulación muscarínica prolongada se aplicaba a células en tres condiciones de oferta de calcio distintas (una primera estimulación se hacía aplicando la metacolina en ausencia de Ca_e^{2+} ; una segunda, con 2'5 mM de Ca_e^{2+} pero con los depósitos intracelulares mermados por la perfusión con una solución extracelular carente de calcio y con 1 mM de EGTA; una tercera que utilizamos como control, con disponibilidad tanto de Ca_e^{2+} como de unos depósitos intracelulares intactos y veíamos como se afectaba el patrón antes descrito.

Como se ve en los resultados, la metacolina es capaz de producir un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ aún en ausencia de Ca_e^{2+} , que es transitorio, declinando rápidamente hasta los niveles basales, lo cual sugiere que la fuente responsable de este pico de Ca_i^{2+} se ha agotado (esta fuente sería probablemente el retículo endoplasmático liso, pues se ha descrito que la estimulación del receptor muscarínico en células cromafines bovinas aumenta la formación de inosoles trifosfato (Azila y col., 1982; Forsberg y col., 1986) y que estos movilizan Ca^{2+} en células permeabilizadas (Föhr y col., 1991). A pesar de que se produjo un incremento bastante grande de la

$[Ca^{2+}]_i$, parece ser que el Ca^{2+} movilizado por metacolina de los depósitos intracelulares es insuficiente para producir una buena respuesta secretora, como muestran los resultados de secreción. Este pico de secreción fue tan pequeño que el Ca^{2+} probablemente no alcanzó la maquinaria secretora.

En estímulos en los que los depósitos intracelulares de Ca^{2+} estaban mermados por la superfusión durante 15 min con solución $0Ca^{2+}/1EGTA$, la reintroducción de Ca_e^{2+} simultáneamente a la aplicación de metacolina produjo una señal de Ca_i^{2+} desprovista del pico inicial pero con la meseta intacta. En esas condiciones creemos, naturalmente, que el aumento de Ca_i^{2+} se debe a la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular. Cuando los depósitos están intactos la estimulación con metacolina en presencia de Ca_e^{2+} , determina la entrada de este catión que se suma al Ca^{2+} movilizado de los depósitos produciendo así un pico inicial secretor (componente fásico) que cae a la mencionada meseta que se mantiene gracias a la continuada entrada de Ca_e^{2+} . En esas condiciones experimentales la aplicación de apamina potenciaba marcadamente tanto el componente fásico como el tónico de la secreción y de la señal de Ca_i^{2+} . El bloqueo por apamina de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , que son activados por el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por metacolina, produciría una mayor entrada de Ca^{2+} como se observa en presencia de esta neurotoxina. Esta interpretación se ve, así mismo, confirmada por el hecho de que la apamina no incrementa la señal de Ca_i^{2+} o la respuesta secretora obtenidas tras la administración de metacolina en un medio extracelular carente de Ca^{2+} .

Todos estos resultados son coherentes con la hipótesis de que el pico inicial transitorio está asociado a la movilización de calcio de los depósitos intracelulares así como a la entrada del exterior, mientras que el componente mantenido del incremento de calcio intracelular depende totalmente de la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular por los canales de calcio voltaje dependientes.

Finalmente, se ha de resaltar la aparición de notables oscilaciones en la fase de meseta de la secreción y de la señal de Ca_i^{2+} que son mucho más pronunciadas en presencia de apamina. Esto se podría relacionar con una actividad eléctrica oscilatoria de la célula en la que se estarían activando canales de calcio de una forma cíclica. Estas oscilaciones se pueden deber al disparo repetido de potenciales de acción debidos a la despolarización de la célula por estimulación del receptor muscarínico. El pico inicial de Ca_i^{2+} activaría los canales de potasio SK que cortocircuitarían tal despolarización desactivándose periódicamente cuando el Ca_i^{2+} viera reducidos sus niveles.

VI.- MODELO PROPUESTO PARA LA RESPUESTA MUSCARINICA EN LA MEDULA ADRENAL DE GATO.

Los resultados obtenidos en los experimentos incluidos en este trabajo permiten elaborar un esquema sobre la forma en que se produce la respuesta secretora inducida por el estímulo muscarínico en la médula adrenal de gato (Fig. 25). La respuesta muscarínica se iniciaría con la movilización de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares con el concurso del sistema de los inositoles fosfato simultáneamente a la entrada de este ión desde el exterior que sería responsable del mantenimiento de la secreción de catecolaminas. Nuestro modelo sugiere que la entrada de Ca^{2+} a la célula durante el estímulo muscarínico dependería de una despolarización de la membrana cuyo mecanismo actualmente desconocemos. Esta despolarización induciría el disparo de potenciales de acción con el consiguiente reclutamiento de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. La entrada de Ca^{2+} a través de los canales de tipo L sensibles a dihidropiridinas estaría íntimamente ligada a la puesta en marcha del proceso secretor en la médula adrenal del gato. La elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por el estímulo muscarínico activaría también los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} de pequeña conductancia (SK) contrarrestando la despolarización muscarínica y, por ello, enlenteciendo la frecuencia

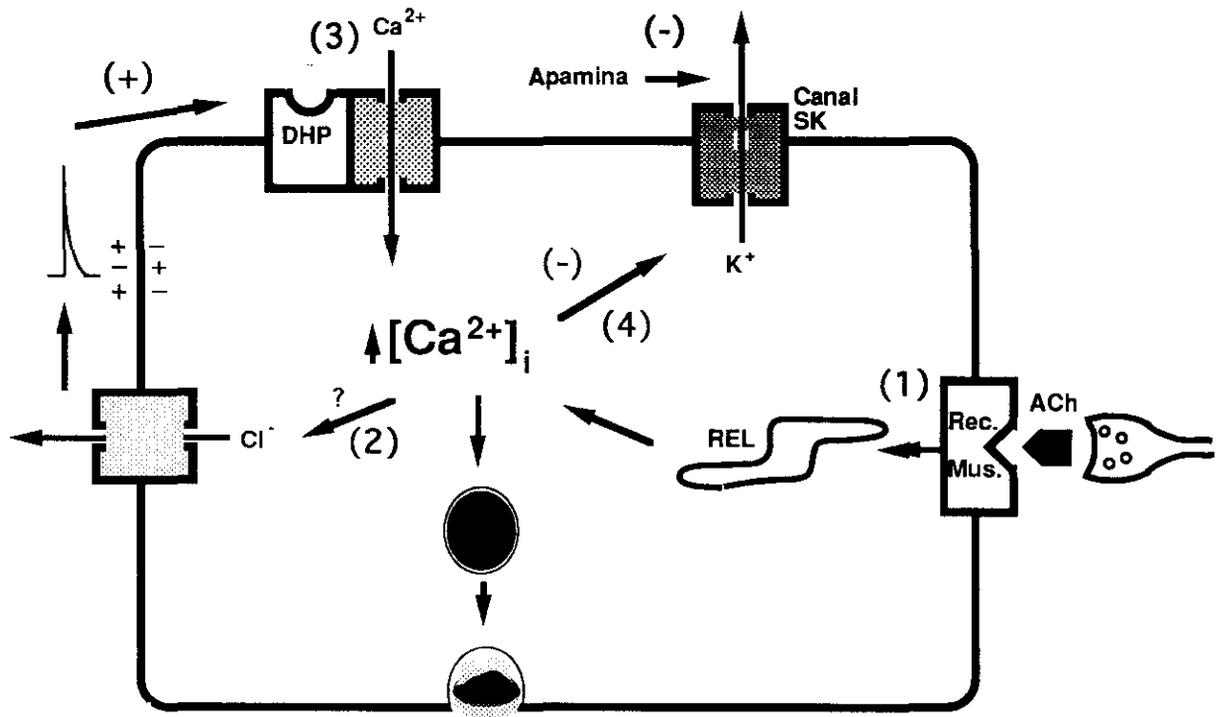


Fig. 25. Mecanismos implicados en la respuesta secretora muscarínica.

de disparo de los potenciales de acción. Así, los canales SK actuarían como mecanismo "represor" limitando la magnitud de la respuesta secretora mediada por el receptor muscarínico, que como hemos visto, se potencia por el bloqueo de tales canales por la apamina o la DTC. Los canales SK desempeñarían también un papel en el mantenimiento de la respuesta secretora a la estimulación muscarínica previniendo la inactivación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y con ellos la secreción de catecolaminas. Si el Ca^{2+} que entra en la célula cromafín es capaz de inactivar los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, activaría también los canales de K^{+} dependientes de Ca^{2+} , lo que hiperpolarizaría la membrana celular interrumpiendo la ulterior entrada de Ca^{2+} . Se generaría de esta manera un patrón intermitente y alternante de activación-desactivación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y canales de K^{+} dependientes de Ca^{2+} que perpetuarían la respuesta de Ca_i^{2+} y de secreción de catecolaminas mientras el estímulo muscarínico estuviera presente.

CONCLUSIONES

Del planteamiento, resultados y discusión de este trabajo pueden establecerse las siguientes conclusiones:

1) En la membrana de las células cromafines de la médula adrenal de gato existen canales de K^+ activados por Ca^{2+} de pequeña conductancia iónica (canales SK).

2) Estos canales modulan la respuesta secretora de catecolaminas inducida por el estímulo muscarínico en las células adrenérgicas y noradrenérgicas de la glándula adrenal del gato.

3) Dicho efecto modulador se ejercería controlando la entrada de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo L (sensibles a dihidropiridinas) que serían reclutados durante el estímulo muscarínico, probablemente a través de potenciales de acción generados por la despolarización producida por una corriente de Cl^- activada por Ca_i^{2+} .

4) La respuesta secretora de catecolaminas inducida por la estimulación muscarínica de la glándula adrenal de gato consta de un componente fásico inicial seguido de una meseta que se corresponden con idénticos componentes en la señal de Ca_i^{2+} .

5) La entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular tiene lugar tanto durante el pico como durante la meseta secretora siendo regulada en ambos casos por canales SK.

6) La movilización de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares participaría exclusivamente en el componente fásico de la respuesta secretora y de la señal de Ca_i^{2+} .

BIBLIOGRAFIA

- ABAD, F., GARRIDO, B., LOPEZ, M.G. y GARCIA, A.G.: The source of calcium for muscarinic-mediated catecholamine release from cat adrenals. *J. Physiol.* **445**, 725-740. 1992.
- ADAMS, P.R., CONSTANTINI, D.A., BROWN, D.A. y CLARK, R.B.: Intracellular calcium activates a fast voltage-sensitive potassium current in vertebrate sympathetic neurones. *Nature.* **296**, 746-749. 1982.
- AKAIKE, A., MINE, Y., SASA, M. y TAKAORI, S.: Voltage and current clamp studies of muscarinic and nicotinic excitation of the rat adrenal chromaffin cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **255**, 333-339. 1990.
- ALAMO, L., GARCIA, A.G. y BORGES, R.: Electrically evoked catecholamine release from cat adrenals. Role of cholinergic receptors. *Biochem. Pharmacol.* **42**, 973-978. 1991.
- ALMERS, W. y NEHER, E. : The calcium signal from fura-2 loaded mast cells depends strongly on the method of dye-loading. *FEBS Lett.* **192**, 13-18. 1985.
- ARTALEJO, A.R., GARCIA, A.G., MONTIEL, C. y SANCHEZ-GARCIA, P.: A dopaminergic receptor modulates catecholamine release from cat adrenal glands. *J. Physiol. (London)*. **362**, 359-368. 1985.
- ARTALEJO, A.R., GARCIA, A.G. y AUNIS, D.: Chromaffin cell calcium channel kinetics measured isotopically through fast calcium, strontium, and barium fluxes. *J. Biol. Chem.* **262**, 915-926. 1987.
- ARTALEJO, C.R., DAHMER, M.K., PERLMAN, R.L. y FOX, A.P.: Two types of Ca^{2+} currents are found in bovine chromaffin cells: Facilitation is due to the recruitment of one type. *J. Physiol.* **432**, 681-707. 1991a.
- ARTALEJO, C.R., MOGUL, D.J., PERLMAN, R.L. y FOX, A.P.: Three types of bovine chromaffin cell Ca^{2+} channels: Facilitation increases the opening probability of a 27 pS channel. *J. Physiol.* **444**, 213-240. 1991b.
- ARTALEJO, A.R., NEHER, E. y GARCIA, A.G.: Small conductance calcium-activated K^+ channel in bovine chromaffin cells. *Pflügers. Archiv.* (en prensa). 1993.

- AZILA, N. y HAWTHORNE, J.N.: Subcellular localization of phospholipid changes in response to muscarinic stimulation of perfused bovine adrenal medulla. *Biochem. J.* **204**, 291-297. 1982.
- BALLESTA, J.J., BORGES, R., GARCIA, A.G. e HIDALGO, M.J.: Secretory and radioligand binding studies on muscarinic receptors in bovine and feline chromaffin cells. *J. Physiol.* **418**, 411-426. 1989.
- BARRET, J.N., MAGLEBY, K.L. y PALLOTA, P.B.: Properties of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *J. Physiol.* **331**, 211-130. 1982.
- BLATZ, A.L. y MAGLEBY, K.L.: Calcium activated potassium channels. *Nature.* **323**, 718-720. 1986.
- BLATZ, A.L. y MAGLEBY, K.L.: Calcium-activated potassium channels. *Trends. Neurosci.* **10**, 463-467. 1987.
- BORGES, R., BALLESTA, J.J. y GARCIA, A.G.: M₂ muscarinoceptor-associated ionophore at the cat adrenal medulla. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**, 965-972. 1987.
- BOROWITZ, J.L.: Calcium binding by subcellular fractions of bovine adrenal medulla. *J. Cell. Comp. Physiol.* **69**, 305-310, 1967.
- BOSSU, J.L., DE WAARD, M. y FELTZ, A.: Inactivation characteristics reveal two calcium currents in adult bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* **437**, 603-620. 1991a.
- BOSSU, J.L., DE WAARD, M. y FELTZ, A.: Two types of calcium channels are expressed in adult bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* **437**, 621-634. 1991b.
- BROWN, D.A. y HIGASHIDA, H.: Voltage and calcium-activated potassium currents in mouse neuroblastoma x rat glioma hybrid cells. *J. Physiol.* **397**, 149-165. 1988.
- CARDENAS, A.M., MONTIEL, C., ARTALEJO, A.R., SANCHEZ-GARCIA, P. y GARCIA, A.G.: Sodium-dependent inhibition by PN 200-110 enantiomers of nicotinic adrenal catecholamine release. *Br. J. Pharmacol.* **95**, 9-14. 1988.

- CARAFOLI, E. y LEHNINGER, A.L.: A survey of the interactions of calcium ions with mitochondria from different tissues and species. *Biochem. J.* **122**, 681-690. 1971.
- CARBONE, E., WANKE, E., PRESTIPINO, G., POSSANI, L.D. y MAELICKE, A.: Selective blockade of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin. *Nature.* **296**, 90-91. 1982.
- CASTLE, N.A., HAYLETT, D.G. y JENKINSON, D.H.: Toxins in the characterization of potassium channels. *TINS.* **12**, 5965. 1989.
- CEÑA, V., STUTZIN, A. y ROJAS, E.: Effects of calcium and Bay K 8644 on calcium currents in adrenal medullary chromaffin cells. *J. Membrane Biol.* **112**, 255-265. 1989.
- CHEEK, T.R. y BURGOYNE, R.D.: Effect of activation of muscarinic receptors in intracellular free calcium and secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **846**, 167-173. 1985.
- CHEEK, T., O'SULLIVAN, A.J., MORETON, R.B., BERRIDGE, M.J. y BURGOYNE, R.: Spartial localization of the stimulus-induced rise in cytosolic Ca²⁺ in bovine adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett.* **247**, 429-434, 1989.
- COOK, N.S. y HAYLETT, D.G.: Effects of apamin, quinine and neuromuscular blockers on calcium-activated potassium channels in guinea-pig hepatocytes. *J. Physiol.* **358**, 373-394. 1985.
- DALE, H.H.: The action of certain esters and ethers of choline and their relations to muscarine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **6**, 147-190. 1914.
- DIXON, W.R., GARCIA, A.G. y KIRPEKAR, S.M.: Release of catecholamines and dopamine-B-hydroxylase from the perfused adrenal gland of the cat. *J. Physiol.* **244**, 805-824. 1975.
- DOUGLAS, W.W. y RUBIN, R.P.: The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J. Physiol.* **151**, 40-57. 1961.
- DOUGLAS, W.W. y RUBIN, R.P.: The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling. *J. Physiol.* **167**, 288-310. 1963.

- DOUGLAS, W.W. y POISNER, A.M.: Preferential release of adrenaline from the adrenal medulla by muscarine and pilocarpine. *Nature*. **208**, 1102-1103. 1965.
- DOUGLAS, W.W, KANNO, T. y SAMPSON, S.R.: Effects of acetylcholine and other secretagogues and antagonists on the membrane potential of adrenal chromaffin cells: an analysis employing techniques of tissue culture. *J. Physiol.* **188**, 107-120. 1967.
- DOUGLAS, W.W: Secretomotor control of adrenal medullary secretion: synaptic, membrane, and ionic requirements in stimulus secretion coupling. En *Handbook of Physiology*, sección 7, vol. 6, ed. Blaschko, H., pp. 367-385. American Physiological Society, Bethesda, MD, USA. 1975.
- FELDBERG, W., MINZ, B. y TSUDIMURA, H.: The mechanism of the nervous discharge of adrenaline. *J. Physiol.* **81**, 286-304. 1934.
- FENWICK, E.M., MARTY, A. y NEHER, E.: A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J. Physiol.* **331**, 577-597. 1982a.
- FENWICK, E.M., MARTY, A. y NEHER, E.: Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* **331**, 599-635. 1982b.
- FÖHR, K.J., AHNERT-HILGER, G., STECHER, B., SCOTT, J. y GRATZL, M.: GTP and Ca^{2+} modulate the inositol 1,4,5-triphosphate-dependent Ca^{2+} release in streptolysin O-permeabilized bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.* **56**, 665-670. 1991.
- FONTERIZ, R., GANDIA, J.L., LOPEZ, M., ARTALEJO, C. y GARCIA, A.G.: Dihydropyridine chirality at the chromaffin cell calcium channel. *Brain. Res.* **408**, 359-362. 1987.
- FORSBERG, E.J., ROJAS, E., y POLLARD, H.P.: 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. 1986.
- FUJITA, T. y KOBAYASHI, S.: Paraneurons, the new brothers of neuron. Igakuno Ayumi. Tokio. **94**, 638-640. 1975.

- GANDIA, L., LOPEZ, M., FONTERIZ, R., ARTALEJO, C.R. y GARCIA, A.G.: Relative sensitivity of chromaffin cell calcium channels to organic and inorganic calcium antagonists. *Neurosci. Lett.* **77**, 333-338. 1987.
- GARCIA, A.G., SALA, F., REIG, J.A., VINIEGRA, S., FRIAS, J., FONTERIZ, R. y GANDIA, J.L.: Dihydropyridine Bay K 8644 activates chromaffin cell calcium channels. *Nature*. **308**, 69-71. 1984a.
- GARCIA, A.G., CEÑA, V. Y FRIAS, J.: Pharmacological dissection of ionic channels involved in catecholamine release from the chromaffin cell. *Actual. Chim. Ther.* serie 11, 165-185. 1984b.
- GARCIA, A.G., ARTALEJO, A.R., BORGES, R., REIG, J.A., y SALA, F.: Pharmacological properties of the chromaffin cell calcium channel. En: Biophysics of the pancreatic β -cell. Ed. Atwater I, Rojas, S. y Soria, B. Plenum Publishing Corporation, 1986, pp 139-157.
- GOH, J.W. y PENNEFATHER, P.S.: Pharmacological and physiological properties of the after-hyperpolarization current of bullfrog ganglion neurones. *J. Physiol.* **394**, 315-330. 1987.
- GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M. y TSIEN, R.Y.: A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450. 1985.
- HAGIWARA, S., BYERLY, L.: Calcium channel. *Ann. Rev. Neurosci.* **4**, 69-125. 1981.
- HAMILL, O.P. MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B. y SIGWORTH, F.: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Plügers. Arch.* **391**, 85-100. 1981.
- HARISH, O.E., KAO, L., RAFFANIELLO, R., WAKADE, A.R. y SCHNEIDER, A.: Calcium dependence of muscarinic receptor-mediated catecholamine secretion from the perfused rat adrenal medulla. *J. Neurochem.* **48**, 1730-1735. 1987.
- HARVEY, A.L. y ANDERSON, A.J.: Dendrotoxins: snake toxins that block potassium channels and facilitate neurotransmitter release. *Pharmacol. Ther.* **31**, 33-55. 1985.

- HESS, P., LANSMAN, J.B. y TSIEN, R.: Different modes of calcium channels gating behaviour by dihydropyridines calcium agonists and antagonists. *Nature*. **311**, 538-544. 1984.
- HILLE, B.: Ionic channels of excitable membranes. Cap. 5. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. 1992.
- HIRANO, T.; KIDOKORO, Y. y OHMORI, H.: Acetylcholine dose-response relation and effect of cesium in the rat adrenal chromaffin cell under voltage clamp. *Plügers. Archiv.* **408**, 401-407. 1987.
- HOF, R.F., SHOLTYSIK, G., LOUTZENHISER, R., VUORELA, H.J. y NEUMANN, P.: PN200-110, a new calcium antagonist: electrophysiological, inotropic, and chronotropic effects on guinea-pig myocardial tissue and effects on contraction and calcium uptake of rabbit aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **6**, 399-406. 1984.
- HOLZ, R.W., SENTER, R.A. y FRYE, R.A.: Relationship between Ca²⁺ uptake and catecholamine secretion in primary dissociated cultures of adrenal medulla. *J. Neurochem.* **39**, 635-640. 1982.
- INOUE, M. y KURIYAMA, H.: Muscarinic receptor is coupled with a cation channel through a GTP-binding protein in guinea-pig chromaffin cells. *J. Physiol.* **436**, 511-529. 1991.
- JAANUS, S.D., MIELE, E. y RUBIN, R.P.: The analysis of the inhibitory effect of local anaesthetics and propranolol on adreno-medullary secretion evoked by calcium or acetylcholine. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **31**, 319-330. 1967.
- KAO, L. y SCHNEIDER, A.: Muscarinic receptors on bovine chromaffin cells mediate a rise in cytosolic calcium that is independent of extracellular calcium. *J. Biol. Chem.* **260**: 2019-2021. 1985.
- KAWAI, T. y WATANABE, M.: Blockade of calcium-activated K⁺ conductance in rat sympathetic neurones. *British. J. Pharmacol.* **87**, 225-232. 1986.
- KAYAALP, S.O. y NEFF, N.H.: Muscarinic receptor binding in adrenal medulla. *Europ. J. Pharmacol.* **57**, 255-261. 1979a.

- KAYAALP, S.O. y NEFF, N.H.: Cholinergic muscarinic receptors of bovine adrenal medulla. *Neuropharmacology*. **18**, 909-914. 1979b.
- KENDRICK, N.C., BLAUSTEIN, M.P., FIED, R.C. y RATZLAFF, R.W.: ATP-dependent calcium storage in presynaptic nerve terminals. *Nature*. **265**: 246-248.1977.
- KIDOKORO, Y. MIYAZAKI, S. y OZAWA, S.: Acetylcholine-induced membrane depolarization and potential fluctuations in the rat adrenal chromaffin cell. *J. Physiol.* **324**, 203-220. 1982.
- KIRPEKAR, S.M., PRAT, J.C. y SCHIAVONE, M.T.: Effect of muscarine on the release of catecholamines from the perfused adrenal gland of the cat. *Br. J. Pharmacol.* **77**: 455-460.1982a.
- KIRPEKAR, S.M., GARCIA, A.G. y SCHIAVONE, M.T.: Secretion of catecholamines from the adrenal gland by various agents. En: Synthesis storage and secretion of adrenal catecholamines. Vol. 36. Ed. by F. Izumi, M. Kumakura, pp. 55-62. Pergamon Press, Oxford, 1982b.
- KNIGHT, D.E. y BAKER, P.F.: Observations on the muscarinic activation of catecholamine secretion in the chicken adrenal. *Neuroscience*. **19**, 357-366.1986.
- KNIGHT, D.E. y MACONOCHE, D.J.: Muscarine induces an inward current in chicken chromaffin cells. *J. Physiol.* **394**, 147P.1987.
- KOKUBUN, S. y REUTER, H.: Dihydropyridine derivatives prolong the open state of calcium channels in cultured cardiac cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 4824-4827.1983.
- KOSTRON, M.; WINCKER, H.; GEISLER, D y KONIG, P.: Uptake of calcium by chromaffin granules in vitro. *J. Neurochem.* **28**, 487-483, 1977.
- KUBO, Y. y KIDOKORO, Y.: Potassium currents induced by muscarinic receptor activation in the rat adrenal chromaffin cells. *Bomed. Res.* **10**, 71-81, 1989.
- LADONA, M.G., SANCHEZ-GARCIA, P. y GARCIA, A.G.: Effects of hypertonic solutions on catecholamine release from cat adrenal glands. *Neuroscience*. **12**, 301-307, 1984.

- LADONA, M.G., AUNIS, D., GANDIA, J.L., y GARCIA, A.G.: Dihydropyridine modulation of the chromaffin cell secretory response. *J. Neurochem.* **48**(2), 483-490, 1987.
- LANCASTER, B. y PENNEFATHER, P.: Potassium currents evoked by brief depolarizations in bull-frog sympathetic ganglion cells. *J. Physiol.* **387**, 519-548, 1987.
- LANG, D.G. y RITCHIE, A.K.: Large and small conductance calcium-activated potassium channels in the GH₃ anterior pituitary cell line. *Pflügers. Archiv.* **410**, 614-622, 1987.
- LANG, D.G. y RITCHIE, A.K.: Tetraethylammonium blockade of apamin-sensitive and -insensitive calcium-activated potassium channels in the GH₃ pituitary cell line. *J. Physiol.* **425**, 117-132, 1990a.
- LANG, D.G. y RITCHIE, A.K.: TEA sensitivity of a 35 pS Ca²⁺ calcium-activated potassium channel in GH₃ cells that is activated by thyrotropin releasing hormone. *J. Physiol.* **425**, 150-163, 1990b.
- LEE, F.L. y TRENDELENBURG, U.: Muscarinic transmission of preganglionic impulses to the adrenal medulla of the cat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **158**, 73-79. 1967.
- LATORRE, R. y MILLER, C.: Conduction and selectivity of potassium channels. *J. Membr. Biol.* **71**, 11-30. 1983.
- LEE, F.L.: The effect of non-nicotinic drugs on the cat's adrenal medulla during block by nicotine. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* **275**, 193-201. 1972.
- LOPEZ, M.G., MORO, M.A., CASTILLO, C.F., ARTALEJO, C. y GARCIA, A.G.: Variable, voltage-dependent, blocking effects of nitrendipine, verapamil, diltiazem, cinnarizine and cadmium on adrenomedullary secretion. *J. Neurochem.* **96**, 725-731, 1989.
- LOPEZ, M.G., MICHELENA, P., GANDIA, L. y GARCIA, A.G.: (+)-Isradipine but not (-)-Bay K 8644 exhibits voltage-dependent effects on cat adrenal catecholamine release. *B. J. Pharmacol.* **102**, 289-296, 1991.

- MAGLEBY, K.L. y PALLOTA, B.S.: Calcium dependence of open and shut interval distributions from calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *J. Physiol.* **344**, 585-604, 1983.
- MARTY, A.: Ca²⁺-dependent K⁺ channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature.* **291**, 497-500, 1981.
- MARTY, A. y NEHER, E.: Potassium channels in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *J. Physiol.* **367**, 117-141, 1985.
- MILLER, C., MOCZYDLOWSKY, E., LATORRE, R. y PHILIPS, M.: Charibdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature.* **313**, 316-318, 1985.
- MONTIEL, C., ARTALEJO, A.R. y GARCIA, A.G.: Effects of the novel dihydropyridine Bay k 8644 on adrenomadullary catecollamine releae evoked by calcium reintroduction. *Biophys. Biochem. Res. Comm.* **120**, 851-857, 1984.
- NEELY, A. y LINGLE, C.J.: Two components of calcium-activated potassium current in rat adrenal chromaffin cells. *J. Physiol.* **453**, 97-131, 1992a.
- NEELY, A. y LINGLE, C.J.: Effects of muscarine on single rat adrenal chromaffin cells. *J. Physiol.* **453**, 133-166, 1992b.
- NOBLE, E.P., BOMMER, M., SINCINI, E. y COSTA, T.: H₁-Histaminergic activation stimulates inositol-1-phosphate accumulations in chromaffin cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **135**, 566-573, 1987.
- NOHMI, M. y KUBA, J.: (+)-Tubocurarine blocks the Ca²⁺-dependent K⁺-channel of the bullfrog sympathetic ganglion cell. *Brain. Res.* **301**, 146-148, 1984.
- O'SULLIVAN, A.J. y BURGOYNE, R.D.: A comparison of bradykinin, angiotensin II and muscarinic stimulation of cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Biosci. Reports.* **9**, 243-252. 1984.
- O'SULLIVAN, A.J., CHEEK, T.R., MORETON, R.B., BERRIDGE, M.J. y BURGOIYNE, R.: Localization and heterogeneity of agonist-induced changes in cytosolic calcium concentration in single bovine adrenal

- chromaffin cells from video imaging of fura-2. *EMBO. J.* **8**, 401-411, 1989.
- PALLOTA, B.: Calcium-activated potassium channels in rat muscle inactivate from a short-duration open state. *J. Physiol.* **365**, 501-516. 1985.
- PENNEFATHER, P.; LANCASTER, B.; ADAMS, P.R. y NICOLL, R.A.: Two distinct Ca-dependent potassium currents in bullfrog sympathetic ganglion cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **82**, 3040-3044, 1985.
- REUTER, H., STEVENS, C.F., TSIEN, R.W. y YELLEU, G.: Properties of single calcium channels in cardiac cell culture. *Nature.* **297**, 501-504, 1982.
- RITCHIE, A.K.: Two distinct Ca-activated potassium currents in a rat anterior pituitary cell line. *J. Physiol.* **385**, 591-609. 1987a.
- RITCHIE, A.K.: Thyrotrophin-releasing hormone stimulates a calcium activated potassium currents in a rat anterior pituitary cell line. *J. Physiol.* **385**, 611-625. 1987b.
- ROLE, L.W. y PERLMAN, R.L.: Both nicotinic and muscarinic receptors mediate catecholamine secretion by isolated guinea-pig chromaffin cells. *Neurosc.* **10**, 979-985, 1983.
- ROMEY, G. y LAZDUNSKI, M.: The coexistence in rat muscle cells of two distinct classes of calcium-dependent potassium channels with different pharmacological properties and different physiological functions. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **118**, 669-674, 1984.
- SCHIAVONE, M.T. y KIRPEKAR, S.M.: Inactivation of secretory responses to potassium and nicotine in the cat adrenal medulla. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* **223**, 734-749. 1982.
- SCHRAMM, M., THOMAS, G., TOWART, R. y FRANCKOWIAK, G.: Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca²⁺ channels. *Nature.* **314**, 747-751. 1983.
- SHELLENBERGER, M.K. y GORDON, H.H.: A rapid simplified procedure for simultaneous assay of norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine from discrete brain areas. *Analyt. Biochem.* **39**, 356-372, 1971.

- SMART, T.G.: Single calcium activated potassium channels recorded from cultured rat sympathetic neurones. *J. Physiol.* **389**, 337-360, 1987.
- SMITH, A.D. y WINKLER, H.: Fundamental mechanisms in the release of catecholamines. En Catecholamines (ed. Blaschko, H. y Muscholl. E.). pp 538-617. Springer, Berlín.1972.
- SORIMACHI, M., YAMAGAMI, K. y NISHIMURA, S.: Tetraethylammonium stimulates adrenomedullary secretion by causing fluctuations in a cytosolic free Ca^{2+} concentration. *Br. Res.* **507**, 347-350. 1990.
- STANSFELD, C.E.: Mast cell degranulating peptide and dendrotoxin selectively inhibit fast-activating potassium current and bind common neuronal proteins: *Neuroscience.* **23**, 893-902. 1987.
- STORM, J.F.: Action potential repolaritation and fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol. (London).* **385**, 733-759. 1987.
- TRIGGLE, D.J.: Potassium channels and potassium channels modulators. *Neurotransmissions VI.* nº3. RBI. 1990.
- TSIEN, R.W.: Calcium channels in excitable cell membranes. *Ann. Rev. Physiol.* **45**, 341-358. 1983.
- WAKADE, A.R.: Studies on secretion of catecholamines evoked by acetylcholine or transmural stimulation of the rat adrenal gland. *J. Physiol.* **313**. 463-380. 1981.
- WAKADE, A.R. y WAKADE. T.D.: Contribution of nicotinic and muscarinic receptors in the secretion of catecholamines evoked by endogenous and exogenous acetylcholine. *Neurosciences.* **10**, 973-978. 1983.
- WARASHINA, A.; FUJIWARA, N. y SHIMOJI, K.: Characteristics of nicotinic and muscarinic secretory responses in the cat adrenal medulla studied by real-time monitoring of catecholamine release. *Biomed. Res.* **10**, 157-164. 1989.
- WINKLER, H. y WESTHEAD, E.W.: The molecular organization of adrenal chromaffin granules. *Neurosciences.* **5**, 1803-1823, 1980.

YAMAGAMI, K., NISHIMURA, S. y SORIMACHI, M.: Internal Ca^{2+} mobilization by muscarinic stimulation increases secretion from adrenal chromaffin cells only in presence of Ca^{2+} influx. *J. Neurochem.* **57**, 1681-1689. 1991.

YELLEN, G.: Ionic permeation and blockade in Ca^{2+} -activated K^{+} channels of bovine chromaffin cells. *J. Gen. Physiol.* **84**, 157-186. 1984.

Dr. ^{Preside} Rafael Codorniza

Dr. ^{Vice} Angel Villar

Dr. ~~San-Fris.~~

Dr. ~~Carmen Montiel~~

~~Secretaria~~
~~Teresa Tepezina~~

... en el día de hoy, el Tribunal que ...
... para juzgar este tesis doctoral ...
... calificar

Apto "Cum laude" por Unanimidad.

Fecha: 14 de Septiembre de 1973

El Secretario del Tribunal: