



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

**“CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA Y  
MOLECULAR DEL RECEPTOR NICOTÍNICO  
PARA LA ACETILCOLINA EN LA CÉLULA  
CROMAFÍN BOVINA”**

**Memoria presentada para optar al grado de Doctor por**

**ELENA ESCALONA QUIRÓS**

**Director:**

**LUIS GANDÍA JUAN**

**Madrid, septiembre de 2009**

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1. MARCO EN EL QUE SE DESARROLLA ESTA TESIS .....	2
2. LA CÉLULA CROMAFÍN COMO MODELO NEUROSECRETOR .....	3
2.1. La glándula adrenal.....	3
2.2. La célula cromafín y otras células de la médula adrenal .....	6
2.3. La célula cromafín como modelo de neurona secretora: el término <i>paraneurona</i> .....	7
2.4. Funciones fisiológicas de la célula cromafín.....	8
3. CANALES IÓNICOS IMPLICADOS EN LA EXCITABILIDAD DE LA CÉLULA CROMAFÍN .....	9
3.1. Canales iónicos activados por voltaje.....	10
3.2. Canales iónicos activados por ligando .....	11
3.3. Otros canales.....	13
4. EL PROCESO SECRETOR DE CATECOLAMINAS .....	14
4.1. Acoplamiento excitación-secreción: papel mediador del calcio .....	14
4.2. Homeostasis celular del calcio .....	16
4.3. La vesícula cromafín .....	17
4.4. El proceso exocitótico .....	17
4.5. El proceso endocitótico .....	18
5. EL RECEPTOR NICOTÍNICO DE TIPO NEURONAL .....	19
5.1. Estructura y composición de los nAChRs neuronales .....	19
5.2. Clasificación de los nAChRs neuronales.....	22
5.3. Aspectos funcionales de los nAChRs neuronales .....	23
5.4. Modulación del nAChR neuronal.....	25

5.5. Farmacología de los nAChRs neuronales .....	27
5.6. Importancia fisiopatológica de los nAChRs neuronales .....	29
5.7. nAChRs en la célula cromafín bovina.....	31
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
1. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS .....	36
2. CULTIVO DE CÉLULAS PC12 .....	37
3. REGISTRO DE CORRIENTES IÓNICAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE <i>PATCH-CLAMP</i> .....	38
3.1. La técnica de <i>patch-clamp</i> .....	38
3.2. Registro de corrientes nicotínicas en células cromafines bovinas .....	40
4. REGISTRO DE CORRIENTES NICOTÍNICAS EN OVOCITOS DE <i>XENOPUS LAEVIS</i> .....	42
5. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE Ca <sup>2+</sup> CITOSÓLICO EN POBLACIONES CELULARES .....	44
6. MEDIDA DE LA SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS EN POBLACIONES CELULARES .....	45
7. PURIFICACIÓN E INMUNODETECCIÓN DE RECEPTORES QUE CONTIENEN LA SUBUNIDAD $\alpha 7$ .....	47
7.1. Purificación de nAChRs que contienen la subunidad $\alpha 7$ mediante inmunoprecipitación .....	47
7.2. Inmunodetección de las subunidades nicotínicas $\alpha 3$ y $\alpha 7$ mediante la técnica de <i>Western blot</i> .....	49
8. SOLUCIONES Y COMPUESTOS QUÍMICOS UTILIZADOS .....	51
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	51

<b>RESULTADOS</b> .....	<b>53</b>
1. EFECTO DE BLOQUEADORES SELECTIVOS $\alpha 7$ SOBRE LAS CORRIENTES INDUCIDAS POR ACh EN RECEPTORES NICOTÍNICOS BOVINOS .....	54
2. EFECTO DEL AGONISTA SELECTIVO $\alpha 7$ PNU-282987 SOBRE RECEPTORES NICOTÍNICOS BOVINOS .....	57
3. EFECTO DE LA PERFUSIÓN CONTINUA DEL AGONISTA SELECTIVO $\alpha 7$ PNU-282987 SOBRE LAS CORRIENTES INDUCIDAS POR ACh EN RECEPTORES NICOTÍNICOS BOVINOS .....	60
4. EFECTO DEL MODULADOR ALOSTÉRICO SELECTIVO $\alpha 7$ PNU-120596 SOBRE RECEPTORES NICOTÍNICOS BOVINOS.....	62
5. EFECTO DE DIVERSOS LIGANDOS SELECTIVOS $\alpha 7$ SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE $Ca^{2+}$ CITOSÓLICO EN POBLACIONES CELULARES.....	65
6. EFECTO DE DIVERSOS LIGANDOS SELECTIVOS $\alpha 7$ SOBRE LA SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS EN POBLACIONES DE CCB.....	72
7. PURIFICACIÓN E INMUNODETECCIÓN DE RECEPTORES QUE CONTIENEN LA SUBUNIDAD $\alpha 7$ .....	75
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>79</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>91</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>93</b>

## LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

**$\alpha$ Bgt:** Alfa-bungarotoxina

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>:** Concentración de calcio en el citosol

**5-HT:** 5-hidroxitriptamina o serotonina

**Ac:** Anticuerpo

**ACh:** Acetilcolina

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AM:** Acetoxi-metil éster

**ANOVA:** Análisis de la varianza (*ANalysis Of VAriance*)

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**ATP:** Adenosín trifosfato

**BAPTA:** Ácido 1,2-bis (2-aminofenoxi) etano-N,N,N',N'-tetraacético (*1,2-Bis(o-AminoPhenoxy) ethane-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid*)

**BK:** Canales de K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup> de alta conductancia (*Big Conductance*)

**BSA:** Albúmina de suero bovina (*Bovine Serum Albumin*)

**CCB:** Células cromafines bovinas

**CCDV:** Canales de calcio dependientes de voltaje

**CE<sub>50</sub>:** Concentración eficaz 50

**Cho:** Colina

**CICR:** Liberación de calcio inducida por calcio (*Calcium-Induced Calcium Release*)

**CRT:** Cafeína+Rianodina+Tapsigargina

**Cys:** Cisteína

**DMEM:** Medio de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

**EEM:** Error estándar de la media

**EDTA:** Ácido etileno diamino tetraacético (*Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*)

**EGTA:** Ácido etilenglicol-bis ( $\beta$ -aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraacético (*Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*)

**F<sub>max</sub>:** Fluorescencia máxima

**F<sub>min</sub>:** Fluorescencia mínima

**F<sub>TOTAL</sub>:** Fluorescencia total ( $F_{max}-F_{min}$ )

**GABA:** Ácido  $\gamma$ -aminobutírico

**Gly-R:** Receptor de glicina

**GTP:** Guanosín trifosfato

**H-100:** Ac policlonal de conejo frente a la subunidad  $\alpha 3$  del nAChR

**HEPES:** Ácido (N-[2-hidroxiethyl]-piperacino-N'-[2-etanosulfónico] (*N-2-HydroxyEthyl Piperazine-N'-2-EthaneSulfonic acid*)

**HVA:** CCDV de alto umbral de activación (*High-Voltage Activated*)

**I:** Corriente

**Ig:** Inmunoglobulina

**KH:** Tampón Krebs-HEPES

**LVA:** CCDV de bajo umbral de activación (*Low-Voltage Activated*)

**mAb319:** Ac monoclonal de rata frente a subunidad  $\alpha 7$  del nAChR

**Mec:** Mecamilamina

**MLA:** Metilicaconitina

**n:** Número de datos

**nAChR:** Receptor nicotínico para la acetilcolina

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**Olig:** Oligomicina

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

**PMSF:** Fenilmetilsulfonilfluoruro (*PhenylMethylSulphonyl Fluoride*)

**PNMT:** Feniletanolamina-N-metiltransferasa (*Phenylethanolamine N-Methyl Transferase*)

**PNU-120596:** 1-(5-cloro-2,4-dimetoxi-fenil)-3-(5-metil-isoxazol-3-il)-urea

**PNU-282987:** hidrocloreuro de [*N*-[(3*R*)-1-azabicyclo [2.2.2] oct-3-il]-4-clorobenzamida]

**PVDF:** Polifluoruro de vinilideno

**Rot:** Rotenona

**SDS:** Dodecil-sulfato de sodio (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

**SK:** Canales de K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup> de baja conductancia (*Small conductance*)

**TBS:** Tampón Tris salino

**TBS-T:** Tampón Tris salino con Tween-20

**TEA.Cl:** Cloruro de tetraetilamonio

**TMAQ:** 5-(Trifluorometil)-6-(1-metil-azepan-4-il) metil-1H-quinolin-2-uno

**TTX:** Tetrodotoxina

**V<sub>m</sub>:** Potencial de membrana



# **INTRODUCCIÓN**

## 1. MARCO EN EL QUE SE DESARROLLA ESTA TESIS

El trabajo realizado en esta tesis se enmarca en una línea de investigación básica-aplicada que se relaciona con la caracterización, desde un punto de vista biofísico y funcional, de los receptores nicotínicos para la acetilcolina (nAChRs) de tipo neuronal presentes en la membrana de la célula cromafín adrenomedular y que controlan fisiológicamente el proceso de liberación de catecolaminas.

Las células cromafines constituyen un modelo ampliamente utilizado para el estudio de la farmacología colinérgica y de la neurosecreción desde hace casi 50 años (Douglas y Rubin, 1961; Douglas, 1968). Alrededor de los años 70 comenzaron los primeros estudios sobre la naturaleza ganglionar de los receptores nicotínicos en estas células (Douglas *et al.*, 1967; Biales *et al.*, 1976; Brandt *et al.*, 1976). Asimismo, los primeros registros electrofisiológicos de corrientes unitarias a través de nAChRs neuronales se llevaron a cabo en las células cromafines (Fenwick *et al.*, 1982). En la actualidad, las células cromafines siguen constituyendo un buen modelo para el estudio de los nAChRs neuronales, dada la diversidad de receptores que expresan (Blumenthal *et al.*, 1997; Mousavi *et al.*, 2001; Di Angelantonio *et al.*, 2003), y para la investigación de su significado funcional, tanto por su papel en la respuesta neurosecretora (Aunis, 1998; Martin y Grishanin, 2003; de Diego *et al.*, 2008; Westerink y Ewing, 2008), como en los mecanismos de neuroprotección (Abad-Santos, 1997; Li *et al.*, 1999; Arias *et al.*, 2004; Egea *et al.*, 2007).

Esta caracterización de los nAChRs y de sus posibles mecanismos moduladores permitirá utilizar la célula cromafín como un modelo experimental para el estudio de nuevas moléculas con propiedades agonistas y/o moduladoras de la actividad de estos receptores, moléculas que además pueden resultar terapéuticamente eficaces como analgésicas, neuroprotectoras y/o en el tratamiento de diversas patologías del sistema nervioso (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o esquizofrenia, entre otras).

## 2. LA CÉLULA CROMAFÍN COMO MODELO NEUROSECRETOR

La supervivencia de un individuo depende en gran medida de la liberación al torrente sanguíneo de dos hormonas, adrenalina y noradrenalina, las cuales van a desencadenar de forma casi inmediata una respuesta de “lucha o huída” ante un estímulo estresante. Estas hormonas son sintetizadas y liberadas por neuronas postganglionares simpáticas y por un grupo de células neuroendocrinas, que suponen la principal parte de la glándula adrenal, conocidas como **células cromafines**.

La importancia de las células cromafines no sólo reside en su papel en la respuesta fisiológica ante situaciones de alarma o estrés, sino que también constituyen un buen modelo para el estudio de los mecanismos involucrados en la formación de vesículas secretoras, así como de los procesos de acoplamiento excitación-secreción.

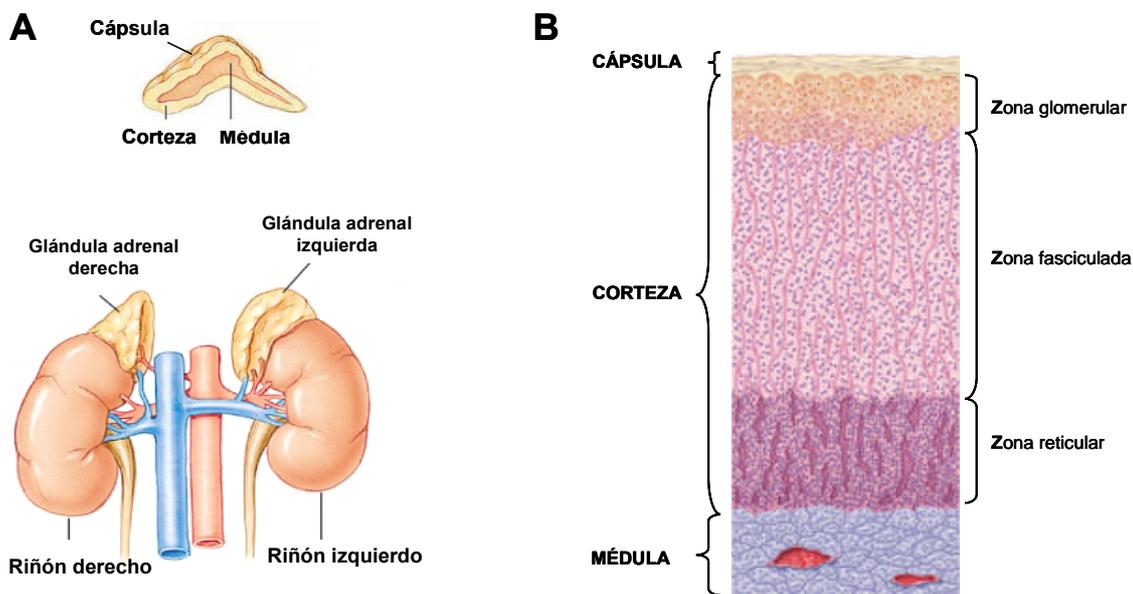
### 2.1.- La glándula adrenal

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

En mamíferos, esta glándula se localiza anatómicamente en la parte superior del riñón (**figura 1**). Consta de dos zonas bien definidas, tanto desde el punto de vista histológico como desde el funcional: corteza y médula (Carmichael y Stoddard, 1992). Ambas están recubiertas por una gruesa cápsula de tejido conectivo que se extiende hacia el interior formando conductos por los que transcurren los vasos y nervios que sustentan la glándula.

La **corteza** se origina a partir del mesodermo y representa el 70-90% del peso de la glándula. Contiene células distribuidas en tres capas o estratos, denominados, desde el exterior hacia el interior, zonas glomerular, fasciculada y reticular. Su función consiste en la síntesis y secreción de hormonas de naturaleza esteroidea: glucocorticoides (relacionados con el metabolismo energético y la inmunosupresión), mineralcorticoides (responsables del volumen circulante y la presión arterial) y

hormonas sexuales (relacionadas con la aparición de algunos caracteres sexuales secundarios).



**Figura 1. La glándula adrenal. A)** Localización y estructura de las glándulas adrenales en el organismo humano. **B)** Sección una glándula adrenal en la que pueden distinguirse las distintas capas o estratos.

En la parte central de la glándula se sitúa la **médula**, de origen neuroectodérmico. Está constituida principalmente por un tejido parenquimatoso de células poliédricas denominadas cromafines, que se distribuyen en acinos en torno a los vasos sanguíneos (Cocchia y Michetti, 1981) y son responsables de la síntesis, almacenamiento y secreción de catecolaminas (dopamina, adrenalina y noradrenalina), que ejercen una gran variedad de efectos en el organismo:

1) actúan sobre el metabolismo de los glúcidos (estimulan la glucogenolisis, aumentando los niveles de glucosa en sangre).

2) actúan sobre el metabolismo de los lípidos (favorecen la movilización de ácidos grasos libres desde el tejido adiposo).

3) redistribuyen el volumen sanguíneo circulante (dilatan los vasos que irrigan los músculos esquelético y cardíaco mientras que contraen los que irrigan piel o intestino).

4) aumentan la presión arterial, la frecuencia cardíaca y la frecuencia y profundidad de la respiración.

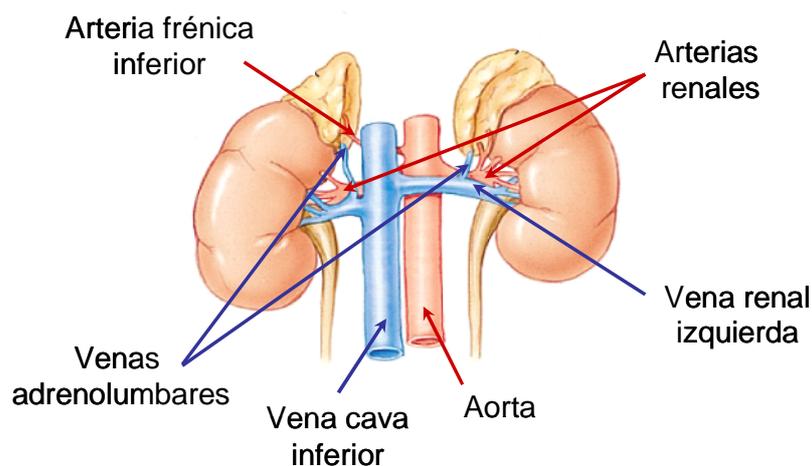
5) en el sistema nervioso central incrementan la atención y la vigilia.

6) a nivel de otros sistemas producen vasodilatación pupilar, broncodilatación y paralización de la actividad digestiva.

La médula adrenal está inervada por fibras preganglionares simpáticas procedentes de la médula espinal, cuyos cuerpos celulares se localizan en las columnas celulares intermediolaterales, entre las regiones T3 y L3 (Blaschko y Muscholl, 1972). La mayor parte de estas fibras proceden del nervio esplácnico mayor, pero también contribuyen a su inervación los nervios esplácnicos menores y otras fibras procedentes de los ganglios celíacos lumbares (Holets y Elde, 1982; Appel y Elde, 1988). La mayoría de estas fibras son amielínicas (Coupland, 1965), aunque también se pueden observar células de Schwann. Su naturaleza química es principalmente colinérgica, si bien en algunos casos se ha descrito la presencia de encefalina como transmisor (Pelto-Huikko *et al.*, 1985; Holgert *et al.*, 1995).

La corteza adrenal, a diferencia de la médula, carece de inervación y es controlada por la hormona adrenocorticotropa (ACTH) liberada por la hipófisis.

Cada glándula adrenal está irrigada por tres arterias y drena a una vena. La irrigación arterial procede de ramas de la aorta, la arteria renal y la arteria frénica inferior (**figura 2**). Por el contrario, son drenadas por una sola vena, la adrenolumbar o medular central, que también drena parte del retroperitoneo. La vena adrenolumbar derecha desemboca en la cava inferior mientras que la izquierda lo hace en la vena renal.



**Figura 2.** Esquema representativo de la vascularización de las glándulas adrenales en el organismo humano.

La circulación intraadrenal es bastante compleja: corteza y médula reciben una irrigación independiente. Sin embargo, el drenaje venoso de la corteza circula a través de la médula en un sistema porta que permite a los glucocorticoides sintetizados en la corteza llegar directamente a la médula y ejercer en ella ciertas acciones; el cortisol, por ejemplo, regula la síntesis de algunos péptidos y de la adrenalina, en concreto regula la actividad de la enzima PNMT (feniletanolamina N-metiltransferasa).

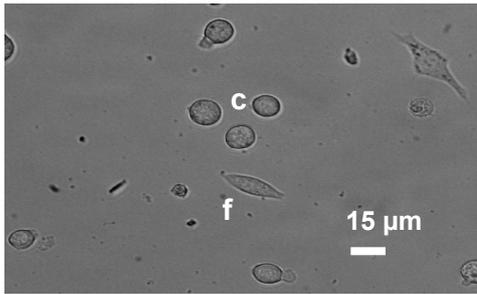
En la cápsula y en el tejido conectivo que rodea a los vasos sanguíneos grandes de la glándula hay vasos linfáticos, que sin embargo no se encuentran en las regiones secretoras de la misma (Fawcett *et al.*, 2002).

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

El término cromafín fue acuñado por primera vez en el siglo XIX por Alfred Kohn y se debe a la alta afinidad que tienen sus vesículas secretoras para teñirse con sales de cromo como el cromato potásico (Coupland, 1965). En esta clasificación se incluyen principalmente las células cromafines de la médula adrenal. Sin embargo, existen pequeños grupos de células epiteloideas que dan una reacción cromafín y que pueden encontrarse en el interior de la corteza y en corpúsculos extraadrenales. Se denominan paraganglios y se hayan ampliamente diseminados por el tejido retroperitoneal. Son pequeños grupos de células que dan una reacción cromafín y que contienen gránulos electroopacos con catecolaminas (Fawcett *et al.*, 2002).

En la médula adrenal, las células cromafines constituyen el tipo celular más importante desde el punto de vista estructural y funcional. En función de la catecolamina que secretan se han descrito principalmente dos tipos de células cromafines: adrenérgicas y noradrenérgicas. A diferencia con las células noradrenérgicas, las células adrenérgicas cuentan con la enzima PNMT en su citoplasma, lo que les permite transformar la noradrenalina en adrenalina.

La morfología de las células cromafines adrenérgicas y noradrenérgicas en el tejido es poligonal y bastante homogénea. En cultivo, sin embargo, las células cromafines se vuelven esféricas (**figura 3**), con un diámetro aproximado de 15-20  $\mu\text{m}$  (Kajiwara *et al.*, 1997). A nivel de microscopía electrónica la diferencia más llamativa es que las vesículas secretoras en las células adrenérgicas son mayores que en las noradrenérgicas, teniendo un contenido de material electrodenso más homogéneo y de menor densidad. Por el contrario, los gránulos de las células que almacenan noradrenalina poseen un núcleo electrodenso que a menudo ocupa una posición excéntrica (Fawcett *et al.*, 2002).



**Figura 3. Células de la médula adrenal en cultivo.** Se pueden observar células cromafines (c) y un pequeño porcentaje de otros tipos celulares (ej. fibroblasto, (f)).

(Fawcett *et al.*, 2002)

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

### **2.3. La célula cromafín como modelo de neurona secretora: el término *paraneurona*.**

A mediados de los años 70, Tsuneo Fujita (Fujita, 1977) y Shigeru Kobayashi (Kobayashi, 1977) introdujeron el término ***paraneurona*** para describir a las células neuroendocrinas con propiedades similares a las neuronas en cuanto a su origen, estructura, función y metabolismo. En base a estos criterios, las células cromafines de los mamíferos podrían considerarse paraneuronas, ya que presentan un gran parentesco con las neuronas simpáticas postganglionares:

- ambos tipos de células derivan de la cresta neural
- poseen vesículas sinápticas y/o de secreción
- tienen función neurosecretora (las células cromafines liberan catecolaminas en respuesta a la estimulación por acetilcolina (ACh) liberada por nervios originados en la médula espinal).

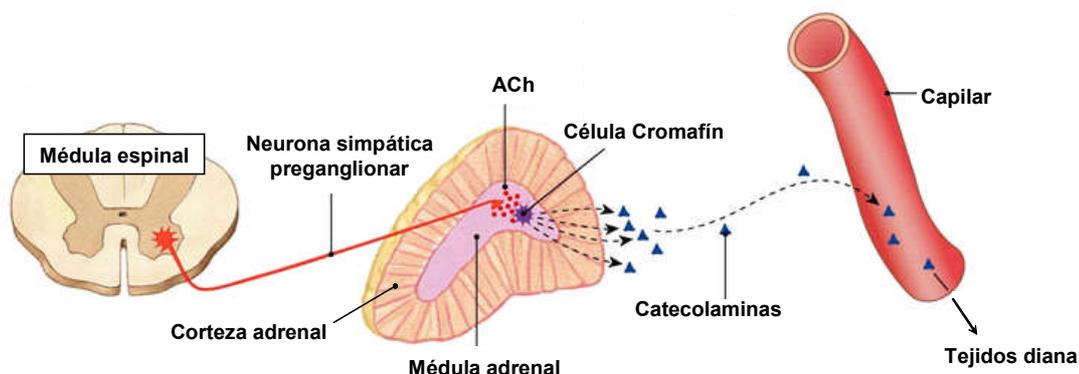
Ambos tipos de células comparten además otras características funcionales: así, las células cromafines poseen receptores nicotínicos (Douglas y Rubin, 1961; Wilson y Kirshner, 1977) y muscarínicos (Douglas y Poisner, 1965) sobre los que actúa la ACh; disparan potenciales de acción (Biales *et al.*, 1976; Brandt *et al.*, 1976; Kidokoro y Ritchie, 1980) poseen canales sensibles a voltaje de Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup>

(Fenwick *et al.*, 1982; Artalejo *et al.*, 1993; García *et al.*, 2006) o exhiben facilitación de corrientes de calcio por prepulsos despolarizantes repetidos (Ikeda, 1991; Artalejo *et al.*, 1992b; Gandía *et al.*, 1993b; Albillos *et al.*, 1996b). Las células cromafines también presentan similitudes morfológicas con las neuronas postganglionares simpáticas, ya que emiten prolongaciones al co-cultivarlas con astrogliia (Uceda *et al.*, 1995) o al exponerlas al factor de crecimiento nervioso (Unsicker *et al.*, 1980).

Por todo lo expuesto anteriormente y porque se pueden aislar y mantener en cultivo primario con facilidad (Livett, 1984), las células cromafines se han empleado ampliamente como modelo neurosecretor y mucho de lo que se conoce sobre la síntesis y liberación exocitótica de neurotransmisores se lo debemos a ellas. Por otra parte, el hecho de poseer receptores nicotínicos de diferentes subtipos las convierten en un valioso modelo para entender la estructura y función de los receptores nicotínicos neuronales (Gotti *et al.*, 1997; Lindstrom, 1997).

#### 2.4. Funciones fisiológicas de la célula cromafín

Buena parte de las respuestas adaptativas al estrés están condicionadas por los productos de secreción de la médula adrenal (catecolaminas, ATP, péptidos neuroactivos, cromograninas y derivados). Las células cromafines liberan sus vesículas secretoras al torrente sanguíneo en respuesta a dos tipos de estímulos: a un incremento de la actividad de los nervios esplácnicos, que liberarán el neurotransmisor fisiológico acetilcolina (**figura 4**), o a estímulos químicos que llegan a la médula adrenal por vía hemática. Entre los primeros figuran las situaciones de estrés físico (hipoxia, hipoglucemia o hipotermia) o emocional (miedo, ansiedad, alerta). Por vía hemática pueden llegar sustancias como la histamina, la bradisinina o la angiotensina II, liberadas en situaciones como la alergia o la hipotensión.



**Figura 4.** Esquema representativo de la inervación de las células cromafines en el interior de la médula adrenal y de cómo sus productos de secreción (catecolaminas) son vertidos al torrente sanguíneo.

Las catecolaminas liberadas por los distintos estímulos pueden actuar en diferentes puntos diana, principalmente el sistema cardiovascular, el sistema endocrino y el sistema nervioso central, produciendo un incremento en la frecuencia y fuerza de contracción cardíacas, elevando la presión sanguínea y favoreciendo la liberación hepática de glucosa. Todos estos procesos, junto a la estimulación simpática del corazón y de los músculos, preparan al organismo para afrontar rápidamente una situación de “lucha o huida” frente al estímulo estresante. La liberación basal de catecolaminas es muy baja, del orden de nanogramos por minuto; sin embargo, frente a situaciones de estrés, se produce un vertido masivo de adrenalina (70%) y noradrenalina (30%) al torrente sanguíneo, incrementándose su concentración plasmática hasta 60 veces (Wakade, 1981). Por tanto, en la cadena de reacciones mediante las cuales el cerebro coordina la respuesta al estrés, el sistema nervioso simpático y la médula adrenal tienen un papel predominante.

Junto con las catecolaminas se co-liberan otras sustancias igualmente almacenadas en las vesículas cromafines: ATP, péptidos opiáceos (dinorfinas y encefalinas), otros péptidos (factor natriurético atrial, péptido intestinal vasoactivo, neuropéptido Y, sustancia P, etc.), ascorbatos o cromograninas y sus derivados. Su presencia y funciones en la célula cromafín no están del todo esclarecidas. Hay quien piensa que son meros vestigios de la estirpe neural de estas células, pero se ha demostrado que muchas de ellas pueden modular la secreción adrenal de forma autocrina y paracrina (Gandía *et al.*, 1993b; Albillos *et al.*, 1996a; Albillos *et al.*, 1996b; Winkler y Fischer-Colbrie, 1998), incluso se postula que algunas ejerzan un papel hormonal.

### **3. CANALES IÓNICOS IMPLICADOS EN LA EXCITABILIDAD DE LA CÉLULA CROMAFÍN**

Los canales iónicos involucrados en la excitabilidad celular han podido estudiarse gracias al desarrollo de distintas técnicas experimentales. Por un lado, la biología molecular ha permitido indagar sobre la estructura molecular de los canales iónicos. Por otra parte, las propiedades biofísicas (selectividad iónica, conductancia, modulación, etc.) se han caracterizado, a su vez, gracias al desarrollo de las técnicas de *patch-clamp* y a la aparición de herramientas farmacológicas, fundamentalmente neurotoxinas (procedentes de caracoles marinos, arañas, abejas, escorpiones,

serpientes, ranas, plantas, etc.) y moléculas orgánicas de síntesis que son capaces de reconocer selectivamente los diversos tipos de canales iónicos presentes en la membrana celular.

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

- 1) canales activados por voltaje
- 2) canales activados por ligando
- 3) otros canales

### **3.1- Canales iónicos activados por voltaje**

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

Las propiedades eléctricas de los **canales de  $\text{Na}^+$**  presentes en la célula cromafín ( $\text{Na}_v1.7$ ) fueron descritos por primera vez mediante la técnica de *patch-clamp* por el grupo de Erwin Neher en 1982 (Fenwick *et al.*, 1982). En condiciones de bajas concentraciones de ACh o de baja densidad de receptores nicotínicos, estos canales se comportan como amplificadores de la señal nicotínica, promoviendo una mayor despolarización de la membrana y facilitando la apertura de los CCDV. En el resto de situaciones, la despolarización producida por la activación de los receptores nicotínicos *per se* es capaz de reclutar CCDV, sin que sea necesaria la intervención de los canales de  $\text{Na}^+$  (Kidokoro *et al.*, 1979; Kirpekar y Prat, 1979; Kidokoro y Ritchie, 1980; Sorimachi *et al.*, 1989).

Los **canales de  $\text{K}^+$**  presentes en la célula cromafín contribuyen a la repolarización de ésta durante los potenciales de acción, regulando su patrón de disparo y la exocitosis (González-García *et al.*, 1993; Lara *et al.*, 1995; Montiel *et al.*, 1995). Hasta ahora se han descrito principalmente dos tipos de canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje: el rectificador tardío y el rectificador anómalo (descrito en cobaya) (Inoue y Imanaga, 1993). Estos canales se abren y cierran en respuesta a variaciones en el potencial de membrana, de forma que señales de despolarización o hiperpolarización pueden aumentar su apertura generando una corriente de rectificación de salida o de entrada, respectivamente (Artalejo, 1995).

Los **CCDV** son la principal vía de entrada de calcio extracelular en la célula cromafín. Su apertura permite la entrada de grandes cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  debido al elevado gradiente electroquímico existente para este ión entre uno y otro lado de la membrana plasmática. Pueden clasificarse en dos grandes grupos en función del voltaje requerido para su apertura: canales de bajo umbral de activación (LVA: *low voltage-activated*), que se abren a potenciales superiores a -50 mV, y canales de alto umbral de activación (HVA: *high voltage-activated*), que requieren una fuerte despolarización de la membrana para abrirse (superior a -30 mV).

Los **canales LVA** o de tipo T (*tiny* o *transient*) se caracterizan por activarse tras ligeras despolarizaciones de la célula y por una rápida cinética de inactivación. Hasta el momento se ha descrito su presencia en células cromafines bovinas (Diverse-Pierluissi *et al.*, 1991; García-Palomero *et al.*, 2000), en las de rata adulta (Hollins y Ikeda, 1996; Novara *et al.*, 2004; Carabelli *et al.*, 2007) y en las de rata embrionaria (Bournaud *et al.*, 2001; Levitsky y López-Barneo, 2009).

En cuanto a los **canales HVA**, se han descrito hasta cinco subtipos (L, N, P/Q y R), que se diferencian entre sí por sus propiedades biofísicas y farmacológicas. En la célula cromafín se expresan todos ellos: los L (Hoshi y Smith, 1987; Bossu *et al.*, 1991a; Bossu *et al.*, 1991b; Albillos *et al.*, 1994), los N (Hans *et al.*, 1990; Bossu *et al.*, 1991a; Bossu *et al.*, 1991b; Artalejo *et al.*, 1992a; Albillos *et al.*, 1994), los P (Albillos *et al.*, 1993; Gandía *et al.*, 1993a; Artalejo *et al.*, 1994), los Q (López *et al.*, 1994; Albillos *et al.*, 1996c) y los R (Albillos *et al.*, 2000; García-Palomero *et al.*, 2000).

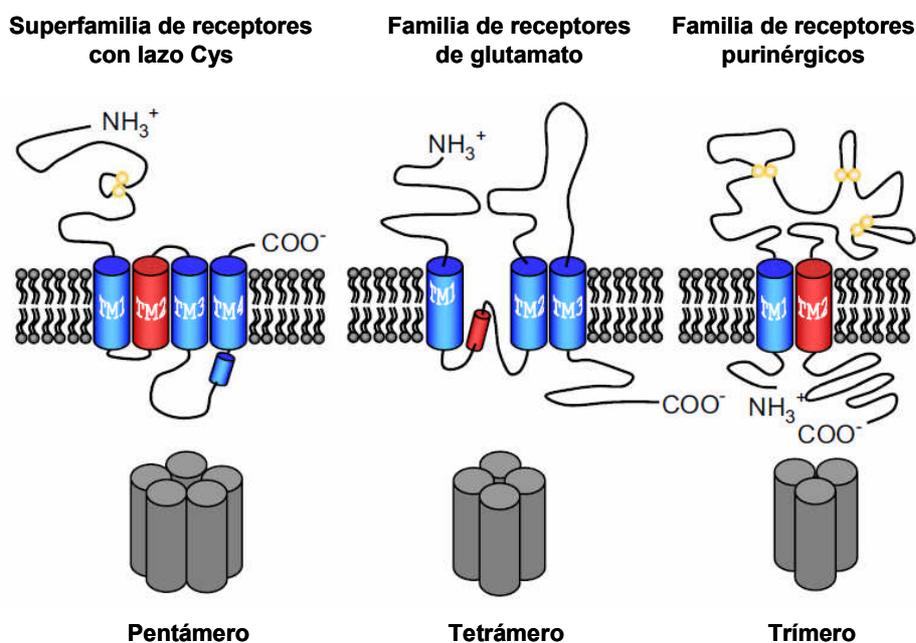
Los diferentes subtipos de canales HVA en la célula cromafín presentan una densidad relativa muy diferente entre especies (García *et al.*, 2000; García *et al.*, 2006). En el caso de las células cromafines bovinas (CCB) se ha descrito una similitud importante con las células cromafines humanas en cuanto a la proporción de los subtipos de CCDV, con una presencia predominante de los CCDV tipo-P/Q.

### **3.2.- Canales iónicos activados por ligando**

Son también conocidos como receptores ionotrópicos. En estos receptores, la unión específica de un ligando (neurotransmisor) produce un cambio conformacional que desencadena la apertura de un poro iónico que permite el intercambio de iones entre el interior y el exterior celular. A diferencia con los canales dependientes de voltaje, altamente selectivos a un determinado ión, los receptores ionotrópicos

presentan una baja selectividad iónica, por lo que suelen ser permeables a varios iones.

Dentro de los canales iónicos activados por ligando se han caracterizado tres familias (**figura 5**).



**Figura 5.** Familias de canales iónicos activados por ligando. Adaptado de Collingridge *et al.*, 2009.

Los **receptores purinérgicos (P2X)** son proteínas con una estequiometría trimérica (Brake *et al.*, 1994; Nicke *et al.*, 1998; Dunn *et al.*, 2001) capaces de reconocer al ATP como neurotransmisor (Dunn *et al.*, 2001). A diferencia con los receptores purinérgicos presentes en otros tejidos, en la célula cromafín estos receptores se encuentran exclusivamente acoplados al flujo de Ca<sup>2+</sup> (Castro *et al.*, 1994).

En la familia de **receptores de glutamato** se incluyen los receptores de NMDA, AMPA y kainato (Nakanishi, 1992; Hollmann y Heinemann, 1994). En células cromafines se ha postulado su implicación en la despolarización de la membrana y en el incremento de Ca<sup>2+</sup> intracelular que conllevan a la secreción de catecolaminas (González *et al.*, 1998).

Finalmente, la superfamilia de **receptores con lazo Cys** está formada por el receptor nicotínico para la acetilcolina (nAChR) (ver apartado 5 de esta *Introducción*), el receptor de glicina (GlyR) (Yadid *et al.*, 1993a; Yadid *et al.*, 1993b), el receptor de

serotonina (receptor 5-HT) (Fernández-Vivero *et al.*, 1993; Minakuchi *et al.*, 1997; Lefebvre *et al.*, 1998) y el receptor del ácido  $\gamma$ -aminobutírico de tipo A (GABA<sub>A</sub>) (Bormann y Clapham, 1985; Castro *et al.*, 1989). Todos estos receptores presentan un par de cisteínas separadas por 13 residuos y conectadas entre sí por un puente disulfuro en su extremo N-terminal (Kao y Karlin, 1986; Karlin y Akabas, 1995). En base a la especificidad iónica pueden subdividirse en dos grupos:

- Receptores de potenciales sinápticos excitatorios, que permiten el paso de cationes en las sinapsis excitatorias, como es el caso del nAChR y del receptor 5-HT.

- Receptores de potenciales sinápticos inhibitorios, que permeabilizan aniones en las sinapsis inhibitorias, como los receptores de GABA<sub>A</sub> y glicina.

### 3.3.- Otros canales

- **Canales de K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup>**: Actualmente se conocen dos tipos: los canales de alta conductancia o BK (*big conductance*) (Marty, 1981) y los canales de baja conductancia o SK (*small conductance*) (Artalejo *et al.*, 1993). Los canales BK son activados por Ca<sup>2+</sup> intracelular, pero a bajas concentraciones de éste son también dependientes de voltaje. Los canales SK, en cambio, se activan casi exclusivamente por Ca<sup>2+</sup> intracelular. Estos canales intervienen en la hiperpolarización de la célula en situaciones en las que se producen elevaciones sostenidas de Ca<sup>2+</sup> intracelular, cuando el potencial de membrana está en reposo.

- **Canales de Ca<sup>2+</sup> operados por depósitos intracelulares**: Son conocidos como SOCCs (*Store-Operated Calcium Channels*). Se activan por el vaciado de depósitos intracelulares de calcio generando una “entrada capacitativa de Ca<sup>2+</sup>” o “entrada de Ca<sup>2+</sup> operada por depósitos” destinada a rellenar tales depósitos (Fomina y Nowycky, 1999; Putney, 2003).

Aunque el rellenado de los depósitos de Ca<sup>2+</sup> pueda parecer la principal misión de estos canales, también son capaces de estimular la exocitosis a potenciales negativos, así como de potenciar las respuestas secretoras tras la activación de los CCDV (Fomina y Nowycky, 1999; Marley, 2003).

- **Canales de Cl<sup>-</sup>**: Estos canales intervienen principalmente en el mantenimiento del volumen celular. Se piensa que podrían estar implicados en las variaciones de volumen debidos al proceso excitotico (Artalejo, 1995).

- **Canales activados por segundos mensajeros:** También se conocen como receptores metabotrópicos. En este apartado se incluyen los receptores muscarínicos (Artalejo, 1995; Olivos y Artalejo, 2008), los de dopamina (Artalejo *et al.*, 1990; Bigornia *et al.*, 1990), los de histamina (Choi *et al.*, 1993; Cheek *et al.*, 1994) y los de ácido  $\gamma$ -aminobutírico de tipo B (GABA<sub>B</sub>) (Castro *et al.*, 1989). Los tres primeros actúan en las sinapsis excitatorias y los de GABA<sub>B</sub>, en las inhibitorias.

En el caso de la estimulación muscarínica, tras la llegada del agonista se activa una cascada de segundos mensajeros que provocan la apertura del canal iónico. Como consecuencia se produce un incremento en el nivel de Ca<sup>2+</sup> citosólico y la posterior secreción de catecolaminas. Existe una gran variabilidad entre especies respecto a la participación de los receptores muscarínicos en el proceso secretor; mientras que en células cromafines de gato, rata o perro se ha descrito una sólida implicación en este proceso, en células cromafines bovinas no se ha podido demostrar su contribución a la liberación de catecolaminas (Artalejo, 1995; Olivos y Artalejo, 2008).

#### **4. EL PROCESO SECRETOR DE CATECOLAMINAS**

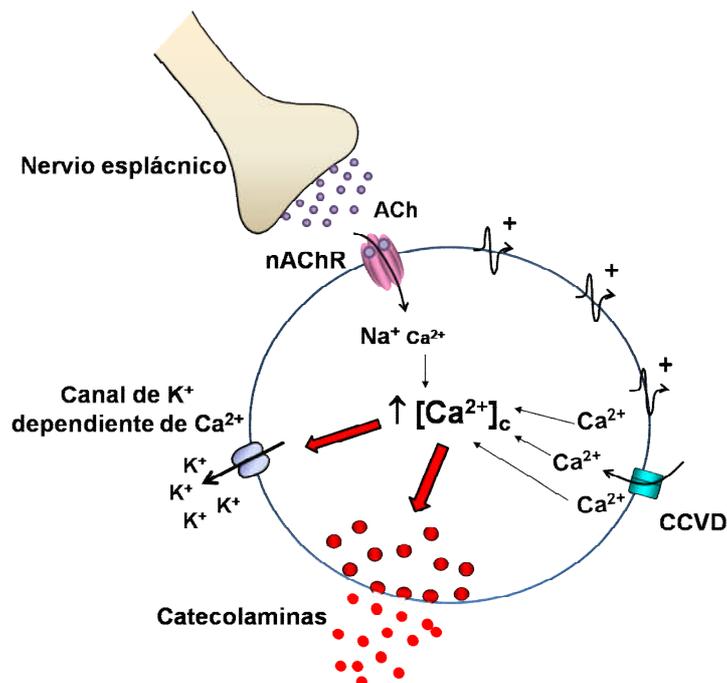
##### **4.1.- Acoplamiento excitación-secreción: papel mediador del calcio**

La secreción de catecolaminas por la célula cromafín se conoce desde las primeras décadas del siglo pasado. Ya en 1934, Feldberg y Minz (Feldberg *et al.*, 1934) demostraron que la estimulación del nervio esplácnico producía liberación de ACh y que ésta era responsable de la secreción de adrenalina por la médula adrenal. Años después, surgió el concepto de “**acoplamiento excitación-secreción**” de la mano de William Douglas y Donald Rubin. Gracias a sus estudios sobre la secreción de catecolaminas realizados en médula adrenal de gato demostraron que la entrada Ca<sup>2+</sup> extracelular era imprescindible para desencadenar el proceso secretor de catecolaminas (Douglas y Rubin, 1961).

En condiciones de reposo, se estima que las fibras esplácnicas disparan potenciales de acción de forma asincrónica a una frecuencia de 0,1 Hz (Brandt *et al.*, 1976). En situaciones de estrés, sin embargo, la frecuencia de descarga se incrementa hasta tres veces y puede llegar a sincronizarse, lo cual se traduce en la liberación de gran cantidad de ACh, el neurotransmisor fisiológico a nivel de la sinapsis esplácnico-

cromafín (Feldberg *et al.*, 1934). Una vez allí, la ACh actuará sobre receptores nicotínicos y/o muscarínicos presentes en la membrana de la célula cromafín; aunque el porcentaje de uno y otro colinoceptor varía entre especies animales y se altera en situaciones de estrés crónico, en los mamíferos predomina la acción de la ACh sobre los receptores nicotínicos (O'Sullivan y Burgoyne, 1989).

En la célula cromafín bovina, la activación del receptor nicotínico implica la apertura de su canal iónico, que en condiciones fisiológicas posibilita la entrada de  $\text{Na}^+$  y, en menor medida, de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular (Douglas *et al.*, 1967). Esta entrada de cationes al interior celular provoca una despolarización de la membrana plasmática capaz de inducir la activación de los CCDV y, con ello, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el espacio extracelular. Este incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico tendrá como consecuencia final la secreción de catecolaminas hacia el torrente sanguíneo (García *et al.*, 1984) (figura 6).



**Figura 6.** Esquema representativo del proceso de acoplamiento excitación-secreción en la célula cromafín.

La finalización del ciclo de actividad de la célula cromafín se produce por varios mecanismos:

- Hidrólisis de la ACh en el espacio sináptico por parte de la enzima acetilcolinesterasa.

- Desensibilización de los receptores nicotínicos por exposición continuada a ACh.
- Inactivación de los CCDV por el propio  $\text{Ca}^{2+}$  y por el voltaje.
- Inhibición de los CCDV por productos de secreción (ATP y opioides).
- Activación de los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , que favorecen la repolarización de la membrana plasmática, disminuyendo la excitabilidad celular.

#### 4.2.- Homeostasis celular del calcio

Tras el proceso de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol y el desencadenamiento de la respuesta secretora, se ponen en marcha los sistemas homeostáticos de mantenimiento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico.

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en la célula en reposo es del orden de 50-200 nM, unas 10.000 veces menor que la concentración extracelular, lo que da lugar a que incrementos relativamente pequeños de  $\text{Ca}^{2+}$  puedan servir de señal que dispara gran variedad de fenómenos fisiológicos. Estas señales intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  son el resultado de una regulación rápida y dinámica entre el  $\text{Ca}^{2+}$  que entra a través de los CCDV y, en menor medida, de los nAChRs, el  $\text{Ca}^{2+}$  tamponado, la salida o bombeo de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol hacia el exterior celular y el secuestro/liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por las organelas intracelulares.

La célula cromafín presenta una serie de mecanismos para evitar la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , que podría desencadenar multitud de procesos, entre los que se encuentra la muerte celular por apoptosis. Dentro de estos mecanismos, cabe destacar los siguientes:

- Proteínas que unen  $\text{Ca}^{2+}$ : parvalbúmina, calbindina y calmodulina, entre otras.
- Bombas e intercambiadores de la membrana celular: bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa e intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , que liberan  $\text{Ca}^{2+}$  al medio extracelular.
- Organelas intracelulares “dinámicas”: retículo endoplásmico y mitocondria, que secuestran o liberan  $\text{Ca}^{2+}$  en función de su estado de relleno y de la concentración de este catión en el citosol.
- Organelas “estáticas”: vesículas cromafines, que quelan  $\text{Ca}^{2+}$  en su interior.

#### 4.3.- La vesícula cromafín

Las células cromafines almacenan sus productos de secreción en las vesículas secretoras. Se han llegado a identificar hasta cinco tipos diferentes de estas vesículas, según su tamaño y forma al microscopio electrónico (Koval *et al.*, 2001), siendo las más abundantes las denominadas **vesículas grandes de núcleo denso** (LDCV: *Large Dense Core Vesicles*). En la célula cromafín bovina se ha estimado que hay entre 20.000-30.000 vesículas (Phillips, 1982; Burgoyne, 1991; Plattner *et al.*, 1997), con un diámetro entre 250 y 450 nm (Ornberg *et al.*, 1995; Parsons *et al.*, 1995; Plattner *et al.*, 1997), lo que representa aproximadamente el 10% del volumen celular.

Además de adrenalina y noradrenalina, que constituyen el 20% de su contenido, en las vesículas cromafines se almacenan también otras aminas como dopamina, histamina o serotonina, todas ellas asociadas a las **cromograninas**. Estas últimas son unas proteínas de naturaleza ácida que permiten, con ayuda de ATP,  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ , el empaquetamiento de las catecolaminas en una matriz o gel que reduce enormemente el gradiente osmótico de la vesícula (Winkler, 1976).

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

#### 4.4.- El proceso exocitótico

La exocitosis del contenido vesicular es la base de la comunicación intercelular en organismos multicelulares, a través de la liberación de una amplia gama de moléculas que van a actuar a nivel extracelular.

La fusión de la membrana vesicular con la plasmática es una reacción que requiere de proteínas específicas que empujen a las membranas a mantenerse juntas,

ya que la repulsión entre ambas membranas y el entorno acuoso no favorecería su fusión espontánea (Sudhof, 1995). Algunas de estas proteínas, muy conservadas en la evolución y en los diferentes tipos de neuronas y células neuroendocrinas, constituyen el denominado **complejo SNARE** (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*), y se localizan tanto en la membrana de las vesículas secretoras (v-SNAREs) como en la membrana plasmática (t-SNAREs). Se han identificado principalmente tres tipos (Sollner *et al.*, 1993; Roth y Burgoyne, 1994): sinaptobrevinas o VAMPs, syntaxinas y SNAP-25. Por sí mismas, estas proteínas son capaces de llevar a cabo el proceso de fusión *in vitro* (Weber *et al.*, 1998) pero *in vivo* la fusión de membranas requiere un gran número de otras proteínas reguladoras como la  $\alpha$ -SNAP, el factor sensible a n-etilmaleimida (NSF) (Sudhof, 1995) o la sinaptotagmina (Voets *et al.*, 2001), entre otras. Todo este complejo entramado de proteínas constituye la denominada “maquinaria de la exocitosis”.

Respecto a los requerimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  para que se produzca exocitosis, hay trabajos que indican que el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  para la fusión de membranas en células neuroendocrinas tiene una afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  un orden de magnitud mayor que en células neuronales; así, en células cromafines la concentración eficaz 50 ( $\text{CE}_{50}$ ) de  $\text{Ca}^{2+}$  para la exocitosis es de 10-20  $\mu\text{M}$  (Heinemann *et al.*, 1994) y la exocitosis se podría disparar a partir de concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico cercanas a 5  $\mu\text{M}$ , mientras que en células neuronales es de aproximadamente 190  $\mu\text{M}$  (Heidelberger *et al.*, 1994). No obstante, la relación entre  $\text{Ca}^{2+}$  y exocitosis en ambos tipos de células es muy controvertida en la literatura, con trabajos que postulan una relación lineal entre ellos y otros que postulan la cooperatividad entre iones calcio durante el proceso de exocitosis, lo que probablemente implicaría la unión del calcio a varios sitios de unión de una o más proteínas (Augustine *et al.*, 1991; Meir *et al.*, 1999; Carabelli *et al.*, 2003).

#### 4.5.- El proceso endocitótico

Después de un estímulo fisiológico que provoque la secreción en células con exocitosis regulada, va a ocurrir una recuperación de membrana similar a la fusionada para mantener una superficie celular constante, proceso conocido como **endocitosis**. Se han descrito dos mecanismos de endocitosis: una endocitosis rápida, que se completa en varias decenas de segundos, y una endocitosis lenta, mediada por receptor, que tiene lugar en minutos.

La endocitosis rápida es un proceso dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y requiere de la proteína de escisión dinamina para recuperar la membrana vesicular después de la secreción (Artalejo *et al.*, 1997). Además, es independiente de la proteína clatrina y es mucho más rápida que las formas de endocitosis mediadas por receptor (Artalejo *et al.*, 1995; Henkel y Almers, 1996). En determinadas ocasiones, como un estímulo muy intenso o cuando la concentración de calcio intracelular es muy elevada, se observa una endocitosis en la que se recupera más membrana de la que se ha fusionado durante el proceso exocitótico (Neher y Zucker, 1993). Por lo tanto se puede hablar de dos vías de endocitosis rápida en células cromafines en función de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico que requieran: endocitosis “compensadora” y endocitosis “excesiva” (Smith y Neher, 1997; Engisch y Nowycky, 1998). La endocitosis compensadora va a recuperar únicamente una cantidad semejante de membrana a la que se ha excitado y tiene lugar cuando los niveles de calcio son similares a los que han provocado la exocitosis. Recientemente se ha descrito en la célula cromafín bovina que es el calcio que entra a través de los CCDV de tipo L el principal responsable de este proceso (Rosa *et al.*, 2007). Por el contrario, la endocitosis en exceso no está relacionada con el nivel de exocitosis previo y requiere concentraciones de calcio citosólico muy altas.

Por otro lado la endocitosis “lenta” es dependiente de clatrina y de la concentración de  $\text{K}^+$  intracelular y es independiente, o está menos influenciada, de la concentración de calcio y otros iones divalentes (Artalejo *et al.*, 2002).

## **5. EL RECEPTOR NICOTÍNICO DE TIPO NEURONAL**

### **5.1.- Estructura y composición de los nAChRs neuronales**

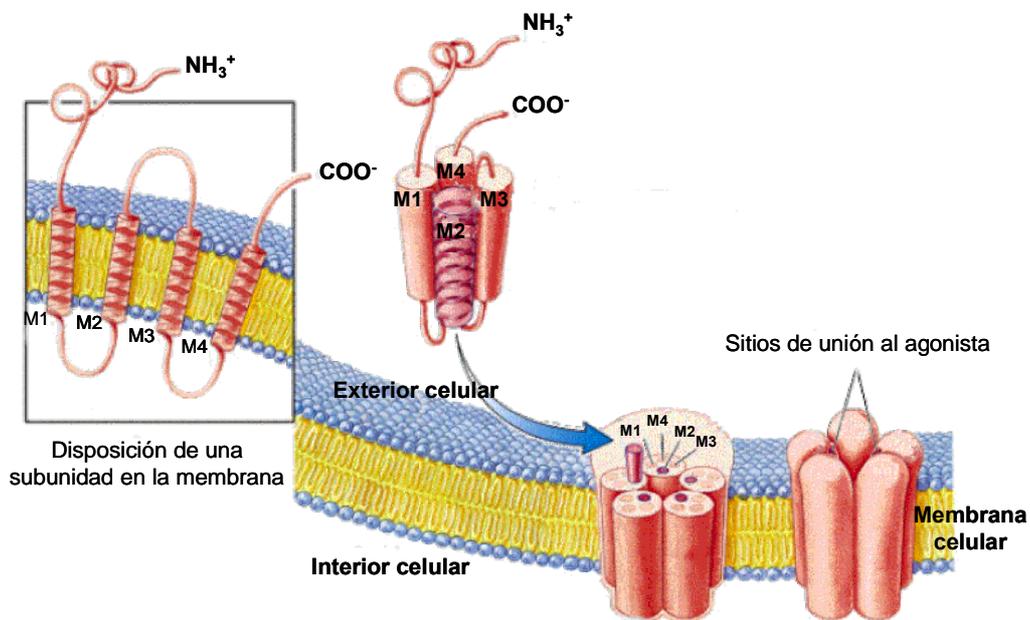
El receptor nicotínico neuronal, al igual que su homólogo de la placa motora, pertenece a la superfamilia de receptores ionotrópicos con lazo Cys, en la que se incluyen los receptores de glicina,  $\text{GABA}_A$  y  $5\text{-HT}_3$  (Bormann y Clapham, 1985; Castro *et al.*, 1989; Ortells y Lunt, 1995).

Los nAChRs neuronales están ampliamente distribuidos en localizaciones pre- y post-sinápticas tanto del Sistema Nervioso Central, como del Periférico (McGehee y Role, 1995). Se ha descrito también su presencia en diferentes tejidos no-nerviosos como el epitelio intestinal, el epitelio y el endotelio pulmonar, el tejido adiposo, el sistema inmune, el epitelio oral y el endotelio vascular, en queratinocitos, en órganos

reproductores, en vejiga urinaria o en células cancerígenas (Gahring y Rogers, 2005; Kawashima y Fujii, 2008), donde se han relacionado con la patología de ciertas enfermedades, convirtiéndolos así en potenciales dianas terapéuticas (Gwilt *et al.*, 2007; Egleton *et al.*, 2008; Fujii *et al.*, 2008; Kawashima y Fujii, 2008; Arias *et al.*, 2009).

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

Así, se acepta ampliamente el modelo que postula que el nAChR es una proteína constituida por 5 subunidades que se insertan en la membrana celular de forma simétrica, a modo de barril, en torno a un poro central (**figura 7**).



**Figura 7. Plegamiento del receptor nicotínico inserto en la membrana.** La glicoproteína está formada por 5 subunidades homólogas, cada una de las cuales presenta 4 segmentos hidrofóbicos (M1-M4) que se disponen atravesando la membrana. Los extremos N- y C- terminal de la proteína son extracelulares.

Cada una de estas subunidades consta de cuatro zonas bien definidas (Corringer *et al.*, 2000; Karlin, 2002):

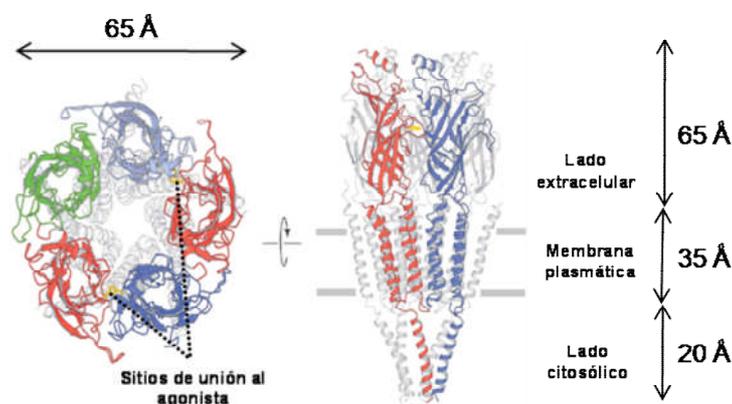
1- Un largo dominio extracelular que abarca la región comprendida entre el extremo N-terminal y el primer segmento transmembrana (M1), que contiene sitios para glicosilación y los elementos esenciales del sitio de unión de agonistas y antagonistas.

2- Cuatro segmentos transmembrana de carácter lipofílico denominados M1, M2, M3 y M4. El poro iónico está formado por los segmentos transmembrana M2 y por parte del extremo N-terminal del segmento transmembrana M1 de cada una de las subunidades que forman el receptor.

3- Un largo dominio citoplasmático, comprendido entre los segmentos M3 y M4, donde se sitúan sitios de fosforilación, que condicionan la modulación del receptor. A pesar de que todas las subunidades presentan secuencias homólogas, ésta es la región más variable (Sargent, 1993; Lindstrom *et al.*, 1995).

4- Un corto dominio C-terminal orientado extracelularmente.

La unión de estas subunidades para formar un receptor funcional confiere al receptor un aspecto cilíndrico de unos 65 Å de diámetro medio y 120 Å de longitud. Esta estructura sobresale de la membrana unos 65 Å por su lado extracelular y 20 Å hacia el interior celular. Además sufre un estrechamiento hacia la mitad del poro, debido a la rotación de las hélices  $\alpha$  de los segmentos transmembrana M2, que actúa como un mecanismo de compuerta (Unwin, 2005). Longitudinalmente existen en el receptor tres partes bien definidas: un dominio extracelular, un dominio transmembrana en torno a un poro estrecho y un dominio citoplasmático (**figura 8**).



**Figura 8.** Estructura tridimensional del receptor nicotínico. Adaptado de Unwin (2005).

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

**a. Subunidades de unión al agonista o subunidades  $\alpha$ :** Cuentan con dos residuos de cisteínas contiguos en las posiciones 192 y 193, situadas en el extremo N-terminal (Karlin y Akabas, 1995). El agonista se une a 2 subunidades  $\alpha$  o en lugares cercanos a la interfase entre éstas y otras subunidades.

**b. Subunidades estructurales o subunidades  $\beta$ :** No presentan las dos cisteínas adyacentes características de las subunidades  $\alpha$  y su función principal es estructural, si bien en los últimos años se les está otorgando un papel importante en el proceso de unión del agonista (Duvoisin *et al.*, 1989; Sine, 1993; Parker *et al.*, 1998; Boorman *et al.*, 2003) y en la funcionalidad y sensibilidad farmacológica del receptor (Duvoisin *et al.*, 1989; Cachelin y Jaggi, 1991; Luetje y Patrick, 1991; Papke y Heinemann, 1991; Harvey y Luetje, 1996; Bohler *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2006). En este apartado podría incluirse a la subunidad  $\alpha_5$ , que se designó como subunidad  $\alpha$  por la presencia de las dos cisteínas contiguas en el extremo N-terminal. Sin embargo, no presenta en su secuencia determinados aminoácidos característicos conservados en todas las subunidades  $\alpha$ , como la Tyr 190 (Karlin y Akabas, 1995), que parece estar implicada en la unión al agonista. Además, su secuencia guarda gran parecido con la subunidad  $\beta_3$  (Boulter *et al.*, 1990) y no es capaz de formar receptores con sitios de unión al agonista funcionales cuando se co-inyecta con otras subunidades  $\alpha$  o  $\beta$  en ovocitos de *Xenopus*. No obstante, se le han atribuido funciones tanto estructurales como modificadoras de las características biofísicas y farmacológicas del receptor (Ramírez-Latorre *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996; Kuryatov *et al.*, 2008).

## 5.2.- Clasificación de los nAChRs neuronales

Hasta la fecha se han identificado 12 genes que codifican otras tantas subunidades nicotínicas neuronales, nueve  $\alpha$  ( $\alpha_2$ - $\alpha_{10}$ ) y tres  $\beta$  ( $\beta_2$ - $\beta_4$ ), que se pueden agrupar para originar receptores **homoméricos** (5 subunidades  $\alpha$  del mismo tipo), o bien **heteroméricos** (por la combinación de como mínimo dos subunidades  $\alpha$  con subunidades  $\beta$ ).

A su vez, estos receptores se han clasificado en función de su capacidad de unión a  $\alpha$ -bungarotoxina ( $\alpha$ Bgt) en:

**a. nAChRs sensibles a  $\alpha$ Bgt:** Estos receptores están formados por subunidades  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$  (sólo identificada en pollo) o  $\alpha 9$ , capaces de formar receptores funcionales homoméricos, lo cual no excluye que puedan formar parte también de receptores heteroméricos (Schoepfer *et al.*, 1990). En este grupo cabría mencionar a la subunidad  $\alpha 10$ , que hasta la fecha sólo se ha detectado expresándose heterológamente junto con la  $\alpha 9$  (Elgoyhen *et al.*, 2001; Sgard *et al.*, 2002).

**b. nAChRs insensibles a  $\alpha$ Bgt:** Estos receptores están compuestos tanto por subunidades de tipo  $\alpha$  ( $\alpha 2$ - $\alpha 6$ ) como por subunidades de tipo  $\beta$  ( $\beta 2$ - $\beta 4$ ), que por sí mismas son incapaces de formar receptores funcionales. Estas subunidades se asocian entre sí con una estequiometría en la que como mínimo habrá dos subunidades de tipo  $\alpha$ . Por lo que se sabe hasta la fecha, estos receptores expresan un único tipo de subunidad  $\alpha$ , con la excepción de las subunidades  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$  que son capaces de expresarse junto a otras subunidades de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  para dar receptores heteroméricos del tipo  $\alpha 3\alpha 5\beta 4$ ,  $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ ,  $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ ,  $\alpha 5\alpha 6\beta 2$  o  $\alpha 3\alpha 6\beta 4$  (Sargent, 1993; Lindstrom *et al.*, 1995; Kuryatov *et al.*, 2000).

En general, se ha sugerido que la capacidad de combinación entre las subunidades examinadas sea más permisiva *in vivo* que en sistemas de expresión heterólogos, sin descartar la existencia de otras subunidades no identificadas, ya que en pocos casos existe una correlación entre las propiedades farmacológicas y electrofisiológicas de los receptores expresados heterológamente y de los registrados *in vivo*. Dependiendo de la combinación de subunidades, el receptor formado puede tanto cambiar su afinidad por ciertos fármacos y algunos de sus parámetros electrofisiológicos, como presentar propiedades nuevas.

Actualmente, la identificación de las subunidades que conforman un determinado receptor se basa en la combinación de técnicas de detección de ARNm (hibridación *in situ* o PCR) o proteínas (coimmunoprecipitación o inmunocitoquímica), junto con ensayos funcionales (electrofisiología o secreción de neurotransmisores).

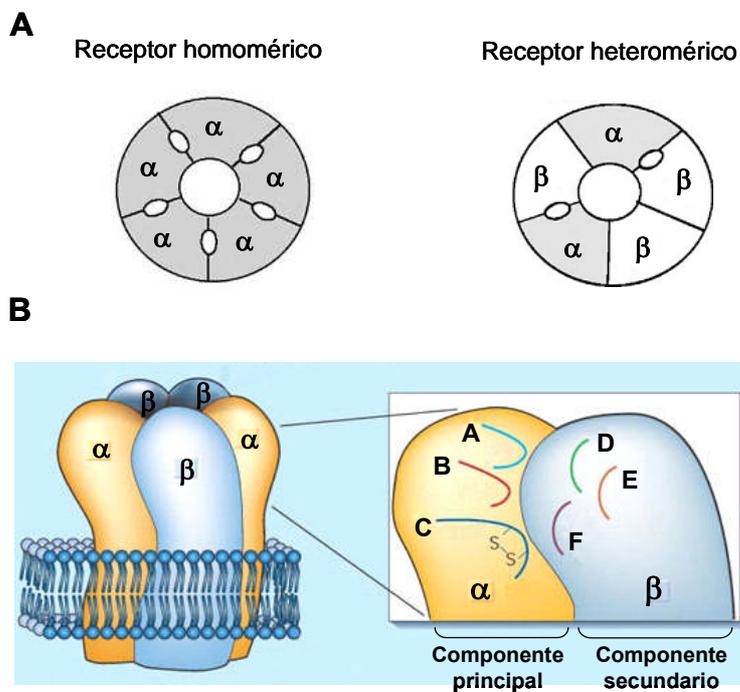
### **5.3.- Aspectos funcionales de los nAChRs neuronales**

#### **a) Sitios de unión del ligando:**

La unión de dos moléculas de agonista al nAChR provoca un cambio conformacional que afecta a todas las subunidades y que tiene como consecuencia

final la apertura de su canal iónico (Sine y Taylor, 1980; Kistler *et al.*, 1982; Unwin, 1996).

En los receptores homoméricos, este sitio de unión se sitúa en la interfase entre subunidades adyacentes, mientras que en receptores heteroméricos se encuentra en la interfase entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (**figura 9**). En ambos casos, está formado por una serie de residuos aminoacídicos pertenecientes al componente principal o lado positivo (A, B y C) y al componente secundario o lado negativo (D, E y F). Mientras que en los receptores heteroméricos el componente principal lo aportan las subunidades  $\alpha$  y el secundario las subunidades  $\beta$ , en los receptores homoméricos todas las subunidades contribuyen a ambos componentes (Changeux y Edelstein, 1998; Corringer *et al.*, 2000).



**Figura 9. A)** Localización de los lugares de unión del ligando en receptores homoméricos y heteroméricos (Adaptado de Gotti y Clementi, 2004). **B)** Localización de los componentes principal y secundario en un receptor heteromérico (Adaptado de Dougherty y Lester, 2001).

A pesar de haber sido clasificadas como subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , ni la subunidad  $\alpha_5$  ni la  $\beta_3$  forman parte del sitio de unión del ligando, ya que carecen de los aminoácidos necesarios para ello y, por tanto, están consideradas como subunidades auxiliares (Gotti y Clementi, 2004).

b) Comportamiento cinético:

Los distintos subtipos de nAChRs pueden encontrarse en tres estados funcionales distintos (Karlin y Akabas, 1995):

a) Reposo: predomina en ausencia de agonista. En este caso la probabilidad de apertura del canal es muy baja.

b) Abierto: la presencia de agonista favorece la apertura del canal durante unas decenas de milisegundos.

c) Desensibilizado: la presencia continua del agonista provoca un cambio conformacional en el receptor que hace que el canal pierda su funcionalidad.

Se ha propuesto la existencia de al menos 2 estados desensibilizados (I y D), que presentan una elevada afinidad por el ligando (pM-nM). La transición del estado abierto al estado "I" ocurre en el orden de milisegundos, mientras que la transición al estado "D" del receptor es más lenta, teniendo lugar en cuestión de minutos (Changeux *et al.*, 1984; Changeux y Edelstein, 1998).

Todos estos estados se encuentran en equilibrio en ausencia de ligando. Sin embargo, en presencia de un ligando, éste se unirá preferentemente a uno de los estados conformacionales del canal, estabilizándolo.

c) Selectividad iónica del canal:

Los receptores nicotínicos para la acetilcolina son canales iónicos selectivos al paso de cationes ( $\text{Na}^+$  en mayor medida,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ ). En esta selectividad iónica se ven implicados una serie de aminoácidos situados en el bucle entre los segmentos M1 y M2 de cada una de las subunidades que forman el canal, los cuales confieren un entorno óptimo al paso de cationes, impidiendo el paso de aniones por repulsión electrostática (Corringer *et al.*, 1999; Miyazawa *et al.*, 1999).

#### **5.4.- Modulación del nAChR neuronal**

Se han identificado diversos dominios estructurales que regulan las características cinéticas del nAChR, es decir, rapidez y tiempo medio de apertura del canal iónico, conductancia, permeabilidad al calcio, desensibilización, etc. El tipo de subunidades que conforman el receptor son las que determinan estas propiedades.

Los distintos subtipos de nAChRs presentan una regulación compleja por el ión calcio, ya que éste no sólo permea por el poro iónico, sino que también regula sus propiedades funcionales.

En el caso de los receptores homoméricos, se ha demostrado que presentan una elevada permeabilidad al ión  $\text{Ca}^{2+}$ , siendo equiparable a la de los receptores de glutamato activados por NMDA, en el caso de receptores  $\alpha 7$  (Rogers y Dani, 1995; Fucile, 2004), o incluso a la de los CCDV, como es el caso de los receptores  $\alpha 9$  (Jagger *et al.*, 2000; Katz *et al.*, 2000). Por otra parte, la presencia de la subunidad  $\alpha 5$  también ha sido relacionada con un aumento ostensible de la permeabilidad a este catión en receptores heteroméricos (Gerzanich *et al.*, 1998).

Además, tanto el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular como el extracelular son capaces de aumentar la frecuencia de apertura de los nAChRs presentes en células cromafines de la médula adrenal (Amador y Dani, 1995).

La entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  a través de estos receptores puede activar diversas cascadas de señalización intracelulares, en las que están implicadas enzimas encargadas de modificar el estado de fosforilación del receptor. La fosforilación de determinados aminoácidos presentes en las distintas subunidades nicotínicas provoca un aumento en la velocidad de desensibilización del receptor (Paterson y Nordberg, 2000). Esta desensibilización va a depender a su vez de una serie de factores:

a) la composición en subunidades del receptor: los receptores que contienen subunidades  $\alpha 7$  se desensibilizan de forma más rápida, en ms, que los receptores que no contienen  $\alpha 7$ , que lo hacen en s (Fenster *et al.*, 1997; Giniatullin *et al.*, 2005).

b) el tiempo de exposición al agonista y la dosis del mismo: a mayor dosis y tiempo de exposición, mayor grado de desensibilización, pudiendo llegar a ser irreversible en el caso de determinadas incubaciones crónicas al agonista (Reitstetter *et al.*, 1999).

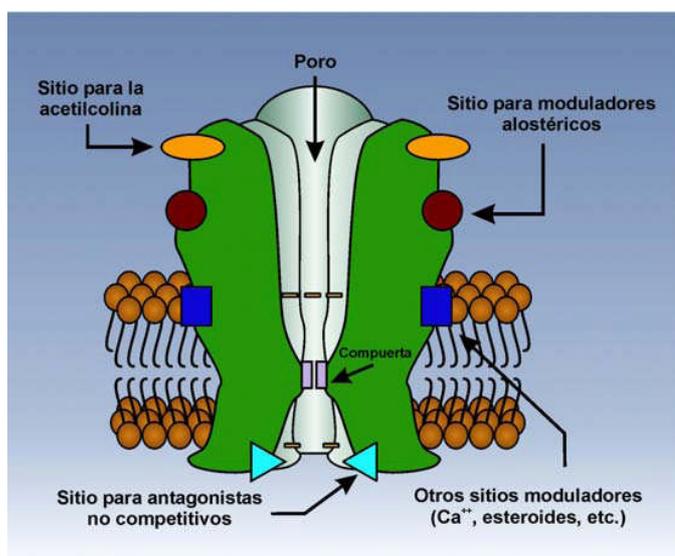
c) la rapidez con que un nAChR se recupera de la desensibilización varía en función del agonista (Paradiso y Steinbach, 2003).

Una característica muy relacionada con los procesos de desensibilización es la regulación del número de receptores en respuesta a la exposición continua a algunos agonistas nicotínicos (Gentry y Lukas, 2002; Gotti y Clementi, 2004). La inactivación del nAChR, ya sea por la desensibilización inducida por la presencia continua de agonista o por el bloqueo por antagonistas, provoca un incremento en el número de

receptores expresados en la membrana plasmática. Sin embargo, existe una cierta controversia sobre el significado y la funcionalidad de estos nuevos receptores (Wonnacott, 1990; Buisson y Bertrand, 2001). Se ha postulado que podría tratarse de un mecanismo compensatorio para mantener la función de los receptores nicotínicos durante largas exposiciones a nicotina, como ocurre en el caso de fumadores crónicos (Sala *et al.*, 2008).

### 5.5.- Farmacología de los nAChRs neuronales

Gracias a las técnicas de biología molecular y de mutagénesis dirigida, combinadas con técnicas electrofisiológicas, ha sido posible la identificación de determinados aminoácidos en el nAChR implicados en los procesos de reconocimiento de los diferentes fármacos. Además del lugar de unión del agonista, donde también pueden unirse antagonistas competitivos, también han sido descritos otros sitios de unión para fármacos no competitivos, tanto agonistas como antagonistas, y para otras sustancias moduladoras (Paterson y Nordberg, 2000) (**figura 10**).



**Figura 10.** Sitios de unión para diferentes ligandos (agonistas, antagonistas y moduladores) en el nAChR.

La combinación de subunidades presentes en un determinado receptor no sólo determina su especificidad funcional, sino también un perfil farmacológico característico. La farmacología de los compuestos que actúan sobre los distintos subtipos de receptores se evalúa mediante técnicas electrofisiológicas y bioquímicas, tanto en preparaciones celulares, como en sistemas de expresión heteróloga de los

ARNm que codifican para las distintas subunidades. A pesar de la diferencia que pueda existir entre el funcionamiento de los receptores recombinantes y los nativos (Sivilotti *et al.*, 1997), el objetivo de los estudios realizados en sistemas de expresión heteróloga es determinar qué subtipos están implicados en cada uno de los efectos de los distintos fármacos nicotínicos. Así, son especialmente interesantes los estudios que demuestran la influencia de la inclusión de un tercer tipo de subunidad ( $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  o  $\beta 3$ ) en la fisiología y farmacología de los nuevos nAChRs.

La mayor parte de los agonistas nicotínicos disponibles actualmente (**tabla 1**) se caracterizan por no poseer selectividad receptorial, es decir, son capaces de activar todos los subtipos de receptores nicotínicos. La aparición de nuevos compuestos selectivos permite conocer la implicación de un determinado subtipo de receptor en una determinada función fisiológica o fisiopatológica.

<b><u>Agonistas no selectivos</u></b>	<b><u>Antagonistas no selectivos</u></b>	<b><u>Moduladores alostéricos no selectivos</u></b>
5-I-A85380	$\alpha$ -conotoxina MII	Codeína
ABT-418/ABT-089	Clorisondamina	Fisostigmina
Acetilcolina	Dihidro- $\beta$ -eritroidina	Galantamina
Anabaseína	D-Tubocurarina	Ivermectina
Anatoxina	Erisodina	
Carbacol	Hexametonio	
Dimetilfenilpiperazinio	Mecamilamina	
Epibatidina	Trimetafán	
Lobelina		
Nicotina		
<b><u>Agonistas selectivos <math>\alpha 7</math></u></b>	<b><u>Antagonistas selectivos <math>\alpha 7</math></u></b>	<b><u>Moduladores alostéricos selectivos <math>\alpha 7</math></u></b>
4-OH-GTS-21	$\alpha$ -bungarotoxina	5-OH-Indol
AR-R17779	$\alpha$ -conotoxina Iml	PNU-120596
Colina	Metilicacotinina	
GTS-21		
PNU-282987		

**Tabla 1.** Ligandos de receptores nicotínicos neuronales

Actualmente están adquiriendo gran importancia los moduladores alostéricos, tanto en el campo de la terapéutica, como en el de la farmacología. El concepto de modulador alostérico surgió de la mano de la galantamina, un fármaco actualmente utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y que, aunque inhibe débilmente la acetilcolinesterasa, mejora de forma significativa la cognición y retrasa el deterioro del paciente. Se ha planteado la posibilidad de que su efecto alostérico, a

nivel de receptores nicotínicos cerebrales, sea el responsable de su eficacia en la prevención del deterioro cognitivo, por lo que en la actualidad se está trabajando en la síntesis de nuevos moduladores alostéricos que puedan actuar mejorando la transmisión colinérgica en otras enfermedades.

Los moduladores alostéricos se unen al receptor nicotínico en un lugar diferente al sitio de unión del agonista (**figura 10**), induciendo un cambio conformacional que provoca una hipersensibilidad del receptor al agonista (Changeux y Edelstein, 2005). La principal ventaja de estos compuestos como agentes terapéuticos es que no son activos en ausencia de agonista. Además, los moduladores alostéricos selectivos, por ejemplo, para el receptor  $\alpha 7$ , constituyen una herramienta farmacológica muy útil para la comprensión de la farmacología y del papel fisiológico de estos receptores.

### **5.6.- Importancia fisiopatológica de los nAChRs neuronales**

Neuronas y células cromafines son capaces de expresar en su membrana de forma muy selectiva gran diversidad de nAChRs. Sin duda la localización subcelular de estos receptores, así como su composición en subunidades, condicionan los patrones de incrementos del nivel de  $Ca^{2+}$  citosólico que generan y su posible función dentro de la célula (Dani, 2001; Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004). Todavía queda mucho por esclarecer sobre las funciones fisiológicas e implicaciones patológicas de tal variedad de nAChRs, debido fundamentalmente a la carencia de ligandos específicos para diseccionar cada subtipo de nAChR y a la dificultad añadida que implica el estudio de algunos subtipos de receptores, como los  $\alpha 7$ , por la rapidez con la que se desensibilizan. A este respecto, la utilización de ratones a los que se les ha practicado la ablación genética de uno o más genes ha supuesto un gran avance en el análisis de las funciones *in vivo* de los distintos subtipos de receptores (Cordero-Erausquin *et al.*, 2000; Champtiaux y Changeux, 2004; Jensen *et al.*, 2005; Fowler *et al.*, 2008). Se ha comprobado así la importancia de ciertas subunidades en la supervivencia de los individuos, por ejemplo, ratones con la ablación conjunta de las subunidades  $\beta 2$  y  $\beta 4$  o de la subunidad  $\alpha 3$  han resultado ser inviables. Sin embargo, la ablación de otros genes no es esencial para la vida, pero sí para el desarrollo normal de algunas funciones. De esta forma se ha podido implicar a la subunidad  $\beta 2$  en procesos de aprendizaje y en el desarrollo del sistema visual (Rossi *et al.*, 2001), a la subunidad  $\alpha 4$  en los procesos de analgesia mediada por nicotina o a la subunidad  $\beta 3$  en la formación

de receptores sensibles a  $\alpha$ -conotoxina MVII. Curiosamente, hasta el momento no se ha detectado ningún trastorno en el desarrollo en ratones carentes de la subunidad  $\alpha 7$ . Sin embargo, la inclusión del gen L250T, que produce receptores  $\alpha 7$  más sensibles a ACh y que no desensibilizan, genera animales con apoptosis extensa en la corteza somato-sensorial que no suelen sobrevivir más de un día (Cordero-Erausquin *et al.*, 2000).

Por otra parte, se ha demostrado la implicación de los nAChRs en diversas funciones del sistema nervioso, tanto a nivel presináptico, principalmente vía  $\alpha 7$ , modulando la secreción de neurotransmisores (Wonnacott, 1997) o la transmisión glutamatérgica en hipocampo y corteza cerebral (McGehee y Role, 1995; Gray *et al.*, 1996), como a nivel postsináptico, en el control de la transmisión en ganglios periféricos, hipocampo y corteza sensorial (Jones *et al.*, 1999). Esto ha permitido relacionar a los nAChRs con un gran número de patologías del sistema nervioso: enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Clementi *et al.*, 2000; Court *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2004) o la enfermedad de Parkinson (Quik y Kulak, 2002; Champiaux *et al.*, 2003), disfunciones cerebrales como el síndrome de Tourette (Gotti y Clementi, 2004), el autismo (Lee *et al.*, 2002; Granon *et al.*, 2003; Martín-Ruiz *et al.*, 2004), epilepsias como la hereditaria de tipo ADNFL (Epilepsia frontal nocturna autosómica dominante) (Combi *et al.*, 2004) o la esquizofrenia (Court *et al.*, 2000; Martín-Ruiz *et al.*, 2003), e incluso en procesos de ansiedad y depresión (Picciotto *et al.*, 2002; Shytle *et al.*, 2002a; Shytle *et al.*, 2002b) o analgesia (Vincler, 2005).

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

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

Las funciones fisiológicas de los nAChRs en tejidos no-neuronales aún están por esclarecer. Hasta el momento se les ha relacionado con la proliferación celular, probablemente por la activación de las quinasas MAP y Akt vía  $Ca^{2+}$  (Wada *et al.*, 1989; Schuller *et al.*, 2000; West *et al.*, 2003), con el control de la presión sanguínea (Wada *et al.*, 1989; Clarke, 1993) o con inflamación, ya que la activación de receptores

$\alpha 7$  en macrófagos provoca la inhibición de la secreción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y de citocinas proinflamatorias (Wang *et al.*, 2003). Así, los nAChRs se han visto implicados en la patología de ciertas enfermedades, como el crecimiento de tumores, patologías pulmonares, reacciones inflamatorias o inmunológicas, o hipertensión, entre otras, lo que los convierte en potenciales dianas terapéuticas.

### 5.7.- nAChRs en la célula cromafín bovina

Wilson y Kirshner fueron los primeros en describir la presencia de sitios de unión para  $\alpha$ Bgt en CCB (Wilson y Kirshner, 1977). Casi dos décadas después, fue clonada la subunidad  $\alpha 7$  del nAChR bovino y la inyección de su ARNm en ovocitos de *Xenopus laevis* produjo sitios de unión para  $\alpha$ Bgt y corrientes nicotínicas que eran bloqueadas por esta toxina (García-Guzmán *et al.*, 1995). Más tarde también se caracterizaron y clonaron, en CCB las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  y  $\beta 4$  del nAChR (Criado *et al.*, 1992; Campos-Caro *et al.*, 1997; Wenger *et al.*, 1997), que formaban receptores nicotínicos funcionales  $\alpha 3\beta 4$  al expresarse heterológicamente en ovocitos de *Xenopus* (Campos-Caro *et al.*, 1997).

Por todo ello se supuso la existencia de dos subtipos de nAChRs en CCB,  $\alpha 3\beta 4$  y  $\alpha 7$ , ambos presuntamente implicados en el control de la secreción de catecolaminas. Sin embargo, los intentos por bloquear con  $\alpha$ Bgt la secreción de catecolaminas inducida por diferentes agonistas del nAChR produjeron resultados negativos (Wilson y Kirshner, 1977; Kumakura *et al.*, 1980; Trifaró y Lee, 1980; Kilpatrick *et al.*, 1981) o datos conflictivos (Kageyama y Guidotti, 1984), lo que llevó a pensar que el proceso secretor era iniciado exclusivamente por los nAChRs no sensibles a  $\alpha$ Bgt, es decir, por los  $\alpha 3\beta 4$ .

Posteriormente, usando nuevos protocolos (pulsos cortos de ACh para prevenir la desensibilización del nAChR  $\alpha 7$ ) y nuevas herramientas farmacológicas (bloqueadores selectivos del subtipo de receptor nicotínico  $\alpha 7$ ) como  $\alpha$ -conotoxina Iml (McIntosh *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 1995) y metilicaconitina (MLA) (Ward *et al.*, 1990), López y colaboradores obtuvieron en 1998 (López *et al.*, 1998) datos que sugerían que ambos receptores nicotínicos,  $\alpha 3\beta 4$  y  $\alpha 7$ , contribuían tanto a la generación de corrientes nicotínicas, como al desencadenamiento de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y posterior liberación de catecolaminas en respuesta a la estimulación de las CCB con ACh (López *et al.*, 1998).

Recientemente se ha descrito un posible papel dual de los nAChRs en el proceso excitotónico. Por un lado, estos receptores podrían estimular directamente la secreción de catecolaminas mediante el proceso de acoplamiento excitación-secreción descrito en el apartado 4.1 de esta *Introducción*. Por otro lado, en condiciones basales, el  $\text{Ca}^{2+}$  que entra a través de estos receptores facilitaría la aproximación de las vesículas secretoras a la membrana plasmática. De esta forma, la célula estaría preparada para responder con una secreción masiva de catecolaminas ante una situación de estrés (Arnáiz-Cot *et al.*, 2008; Tapia *et al.*, 2009).

Además de todas estas funciones relacionadas con la activación de la maquinaria excitotónica, también se ha implicado al receptor nicotínico  $\alpha 7$  en la hiperpolarización de la célula cromafín bovina (Fuentealba *et al.*, 2004). En este trabajo, la estimulación de las CCB en condiciones de alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular conducía a un incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  que, por un lado, contribuía a la secreción de catecolaminas y, por otro, a la activación de canales SK (Montiel *et al.*, 1995) cercanos al receptor, provocando así la hiperpolarización de la célula cromafín.

A pesar de estos antecedentes, con los datos disponibles hasta el día de hoy (Maneu *et al.*, 2002; otros datos no publicados del grupo), aún no está claro qué subtipo/s de nAChRs presentan las CCB. Por una parte, hasta el momento no se han conseguido poner de manifiesto respuestas nicotínicas  $\alpha 7$  típicas, y por otra, los datos de bloqueo de la respuesta nicotínica obtenidos con distintos antagonistas selectivos del subtipo de nAChR  $\alpha 7$  resultan conflictivos, ya que se han empleado concentraciones tan elevadas que hacen que el bloqueador pierda su selectividad receptorial.

# **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

Como he comentado anteriormente, la célula cromafín bovina posee ARNm codificante para las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$  y  $\beta 4$  (Criado *et al.*, 1992; García-Guzmán *et al.*, 1995; Campos-Caro *et al.*, 1997; Wenger *et al.*, 1997). Sin embargo, existe bastante controversia sobre cómo se ensamblan estas subunidades para formar nAChRs funcionales. Datos previos de nuestro laboratorio muestran que las cinéticas de las corrientes nicotínicas inducidas en CCB por la aplicación de diferentes agonistas no selectivos (acetilcolina, nicotina, dimetilfenilpiperazinio, epibatidina, lobelina y citisina), así como de algunos agonistas (4-OH-GTS-21, colina y AR-R17779) y moduladores alostéricos selectivos para el subtipo  $\alpha 7$  (5-OH-Indol), difieren completamente de aquellas corrientes registradas en ovocitos de *Xenopus* que expresan diferentes combinaciones de subunidades de nAChRs bovinos. Estos resultados sugieren que, desde un punto de vista farmacológico, la célula cromafín bovina podría poseer un único subtipo de receptor integrado por las diferentes subunidades descritas ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$  y  $\beta 4$ ) y no dos subtipos de receptores independientes como se pensaba hasta ahora.

A pesar de que existen datos, tanto en la literatura (Criado *et al.*, 1997; El-Hajj *et al.*, 2007), como en nuestro propio grupo de investigación, de la presencia de receptores  $\alpha 7$  en la membrana celular de la célula cromafín bovina, todavía no ha sido posible demostrar de forma directa su posible papel funcional.

Por todo ello, el objetivo de esta tesis es caracterizar los posibles subtipos de receptores nicotínicos presentes en la membrana de las CCB. Partiendo de la hipótesis de la existencia de dos subtipos de receptores nicotínicos en la célula cromafín bovina,  $\alpha 3\beta 4^*$  y  $\alpha 7$ , y de que no disponemos de herramientas farmacológicas selectivas para el subtipo  $\alpha 3\beta 4$ , este trabajo se ha centrado principalmente en la búsqueda de un receptor nicotínico  $\alpha 7$  funcional. Para ello, se han utilizado diversas herramientas farmacológicas como bloqueadores ( $\alpha$ Bgt y MLA) o nuevos agonistas (PNU-282987) y moduladores alostéricos (PNU-120596) selectivos para este subtipo de receptor, junto con técnicas electrofisiológicas (registros de fijación de doble electrodo y de *patch-clamp*), de fluorescencia (incrementos de calcio citosólico en poblaciones de CCB) y amperométricas (secreción de catecolaminas en poblaciones de CCB). Finalmente, para esclarecer la hipótesis de la posible existencia de un receptor heteromérico complejo se han empleado técnicas de biología molecular como la inmunoprecipitación y la inmunoelectrotransferencia o *Western blot*.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS

Las células cromafines de la médula adrenal bovina se aislaron a partir de glándulas adrenales de vacas adultas, siguiendo un protocolo estandarizado (Livett, 1984) con algunas modificaciones introducidas en nuestro laboratorio (Moro *et al.*, 1990).

Las glándulas extraídas del animal en el matadero se transportaron en medio de Locke (sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ ), cuya composición es: 154 mM NaCl; 5,6 mM KCl; 3,5 mM  $\text{NaHCO}_3$ ; 5,6 mM glucosa; 10 mM HEPES; penicilina (50 UI/ml)/estreptomicina (0,05 mg/ml); pH 7,4. Una vez en la unidad de cultivos, se retiró el tejido graso periadrenal y se eliminaron los eritrocitos existentes en el sistema vascular mediante la inyección de Locke a través de la vena adrenolumbar. A continuación se inyectaron, también a través de la vena adrenolumbar, 3,5 ml de solución enzimática de colagenasa (colagenasa al 0,25% + albúmina de suero bovina (BSA) al 0,5%, disueltas en Locke) y se incubó la glándula a 37°C. La inyección de colagenasa se repitió hasta un total de 3 veces, a intervalos de 20 min.

Finalizada la digestión enzimática, se seccionó la glándula longitudinalmente y se extrajo la médula ya digerida, que se lavó mediante la adición de grandes volúmenes de Locke. La suspensión así obtenida se filtró a través de una malla de nylon con un tamaño de poro de 217  $\mu\text{m}$ , que permite eliminar fragmentos de médula no digeridos. La suspensión filtrada se centrifugó (120xg, 10 min) y el precipitado se resuspendió en Locke, tras lo cual se obtuvo una nueva suspensión celular que se filtró a través de una malla de nylon con un tamaño de poro menor, de 82  $\mu\text{m}$ , que permite la eliminación de grasa y de fibras.

A continuación se separaron y purificaron las células mediante un gradiente de Percoll, para lo cual se añadió Percoll estéril a la suspensión celular y se centrifugó a 20.000xg, durante 20 min, a 15°C. Tras esta centrifugación se observan varias bandas en el gradiente, entre las que destacan una superior con una mezcla de células cromafines adrenérgicas y noradrenérgicas y una inferior de cromafines principalmente adrenérgicas. Se recogieron las células contenidas en estas dos capas y se realizó un primer lavado del Percoll, añadiendo grandes cantidades de Locke y centrifugando (120xg, 10 min). Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Se centrifugó de nuevo (120xg, 10 min) y el precipitado resultante de esta última centrifugación se resuspendió en DMEM al que

se le había añadido: 5% de suero bovino fetal, inhibidores de fibroblastos (10  $\mu$ M de citosina-arabinósido y 10  $\mu$ M de fluorodeoxiuridina) y antibióticos (penicilina (50 UI/ml) /estreptomicina (0,05 mg/ml)).

Para los experimentos de *patch-clamp* las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio de 1 cm de diámetro (previamente tratados con poli-D-lisina para facilitar la adhesión de las células) a una densidad de  $5 \cdot 10^4$  células/cubre; para la medida de calcio citosólico en poblaciones se sembraron placas negras de 96 pocillos, de fondo transparente, a una concentración final de  $2 \cdot 10^5$  células/pocillo. Finalmente, para los experimentos de detección de catecolaminas por amperometría en poblaciones celulares la siembra se realizó en placas de Petri de 5 cm de diámetro a una densidad de  $1 \cdot 10^6$  células/ml (5 ml por placa).

Las células se mantuvieron a 37°C en un incubador con atmósfera saturada de agua y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se emplearon 24-96 h tras la siembra para los experimentos de *patch-clamp* y de secreción en poblaciones y 48 h tras la siembra para los de fluorescencia en poblaciones.

## 2. CULTIVO DE CÉLULAS PC12

Las células PC12 constituyen una línea celular procedente de un feocromocitoma de rata. Pueden expresar endógenamente subunidades nicotínicas  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  y  $\beta 4$  (Boulter *et al.*, 1987; Rogers *et al.*, 1992; Henderson *et al.*, 1994) y son capaces de expresar receptores nicotínicos  $\alpha 7$  funcionales (Blumenthal *et al.*, 1997), entre otros. A su vez, expresan CCVD de tipo L, N y P/Q (Plummer *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 1996; Solem *et al.*, 1997), así como receptores de IP<sub>3</sub> y de rianodina (Johanning *et al.*, 2002). Todas estas características las convierten en un buen control positivo para nuestros experimentos.

Tras su descongelación, las células se mantuvieron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en medio DMEM suplementado con 5% de suero bovino fetal, 10% de suero de caballo, ambos previamente inactivados, HEPES 10 mM y penicilina (50 UI/ml)/estreptomicina (0,05 mg/ml) y se sembraron en placas de Petri pretratadas con poli-D-lisina (0,1 mg/ml).

Para los experimentos de fluorescencia, se despegaron las células con tripsina y se sembraron placas negras de 96 pocillos, de fondo transparente y pretratadas con

poli-D-lisina a una densidad de  $5 \cdot 10^4$  células/pocillo. Las variaciones de calcio citosólico se midieron cuando los pocillos alcanzaron la confluencia (aproximadamente a las 48 h).

### **3. REGISTRO DE CORRIENTES IÓNICAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE *PATCH-CLAMP***

#### **3.1.- La técnica de *patch-clamp***

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

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

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

corriente que es necesario inyectar para mantener fijo el  $V_m$  será equivalente al flujo de iones que se ha producido a través del parche de membrana de la célula.

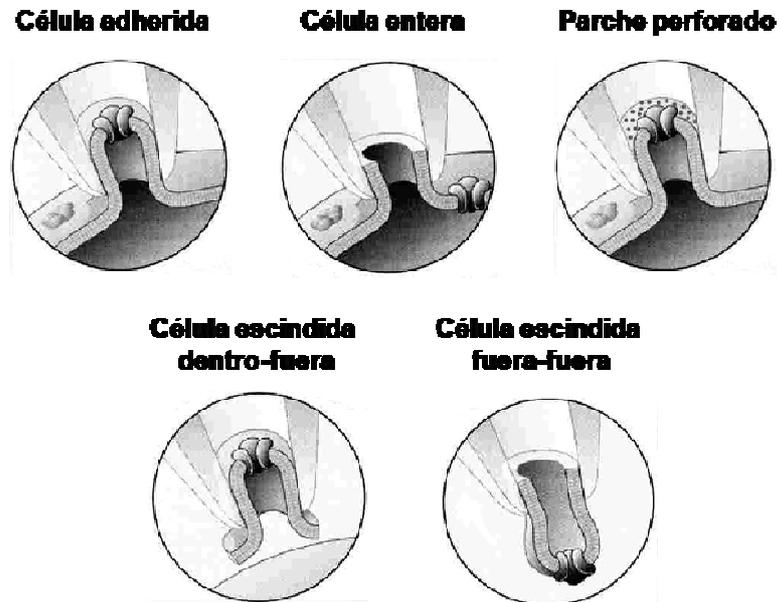
Esta técnica emplea un único electrodo que simultanea a elevada frecuencia el registro de voltaje (para mantenerlo fijo en el parche de membrana) y el registro de corriente (la inyectada para mantener fijo el  $V_m$ ). Sus ventajas con respecto a la clásica de fijación de voltaje de doble electrodo (Cole,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

El primer paso para ejecutar esta técnica es formar un sello de alta resistencia eléctrica entre la membrana celular y el electrodo de registro, para lo cual éste se introduce en el interior de una pipeta de vidrio cuya punta se pule al fuego hasta poseer un diámetro de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ . La pipeta se aproxima a la membrana de la célula y se presiona contra ella, con lo que se forma un sello eléctrico de alta resistencia (de unos 50 M $\Omega$ ) que asegura que la mayoría de corrientes originadas en el parche de membrana fluyan hacia el interior de la pipeta y de allí al circuito de medida de corriente.

Si la punta de la pipeta mantiene limpia su superficie, la aplicación de una ligera succión o presión negativa en su interior permite conseguir sellos de resistencia aún mayor, del orden de 10-100 G $\Omega$ , conocidos como *giga-sellos*, que reducen el ruido del registro y evitan el flujo de corriente entre la pipeta y el baño, lo que permite fijar el potencial de membrana. Se adquiere así la configuración de célula adherida o parche *in situ*. Estos sellos son además mecánicamente muy estables, por lo que permiten diversas manipulaciones mecánicas que originarán las distintas configuraciones de la técnica (célula adherida, célula entera, parche perforado, parche escindido dentro-fuera y parche escindido fuera-fuera) (**figura 11**).

En este trabajo, las corrientes generadas tras la estimulación de una célula cromafín por la aplicación de un agonista se registraron mediante la técnica de *patch-clamp* en su modalidad de fijación de voltaje y configuración de célula entera (Hamill *et al.*, 1981). Esta configuración se obtiene a partir de la de célula adherida, cuando la aplicación de una succión o presión negativa adicional al interior de la pipeta consigue romper el parche de membrana que hay bajo los bordes de la misma, con lo que todo

el interior de la pipeta entra en contacto eléctrico con todo el interior de la célula y se podrán registrar las corrientes que fluyen a través de los canales y/o receptores abiertos en la totalidad de la membrana celular.



**Figura 11.** Configuraciones de la técnica de *patch-clamp*

Es la configuración más sencilla de obtener y permite cierto control de la composición intracelular, pero tiene el inconveniente de ser invasiva para la célula (debido al proceso de ruptura del parche de membrana), además de que provoca la pérdida gradual de los componentes intracelulares, ya que inmediatamente tras la ruptura del parche la solución intracelular se equilibra con la solución del interior de la pipeta, cuyo volumen es muchísimo mayor. Esto puede causar una eventual desaparición de las respuestas moduladas por compuestos intracelulares, principalmente segundos mensajeros.

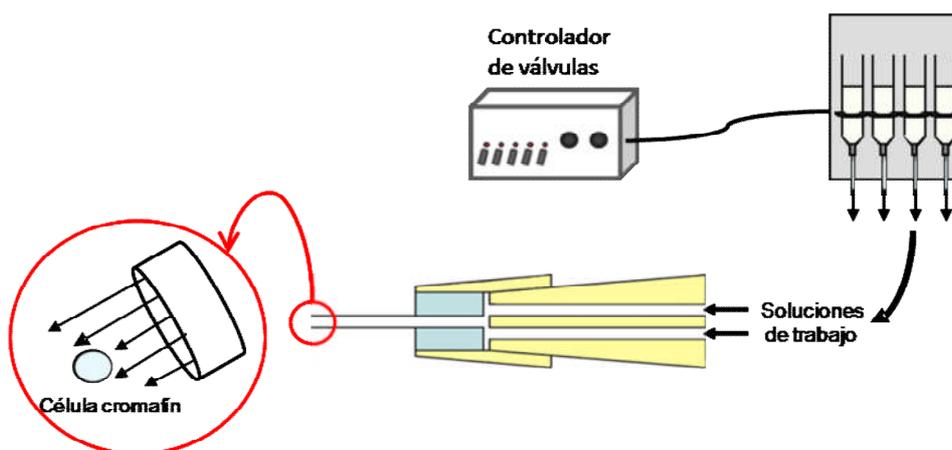
### **3.2.- Registro de corrientes nicotínicas en células cromafines bovinas**

Para el registro de las corrientes iónicas que fluyen a través de los nAChRs en las CCB, los cubreobjetos conteniendo las células se colocaron sobre una cámara experimental de metacrilato montada sobre la platina de un microscopio invertido Nikon Diaphot. La cámara se perfundió continuamente con una solución control de Krebs-HEPES (KH) conteniendo (en mM): 137 NaCl, 5,9 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10

HEPES, pH 7,4. Las células se dializaron, al utilizar la configuración de célula entera, con una solución intracelular conteniendo (en mM): 10 NaCl, 100 CsCl, 20 TEA.Cl, 14 EGTA, 5 Mg.ATP, 0,3 Na.GTP, 20 HEPES, pH 7,2.

El potencial de membrana de las células se fijó a -80 mV. Las pipetas se fabricaron a partir de capilares de vidrio de borosilicato (Kimax-51<sup>®</sup>, Kimble Glass Inc., diámetros 1,5-1,8 mm x 100 mm) con ayuda de un estirador vertical (modelo PP-830, Narishige, Tokio, Japón), aplicando calor en dos pasos sucesivos. La punta de las pipetas se pulió al calor de una resistencia en una microforja (MF-830, también de Narishige), hasta que su diámetro interior era de aproximadamente 1  $\mu$ m; la resistencia de las pipetas así obtenidas, una vez rellenas con la solución intracelular, fue de 3-4,5 M $\Omega$ .

Las corrientes nicotínicas se indujeron mediante la aplicación rápida de los diversos agonistas a través de una pipeta de perfusión formada por varios tubos de polietileno de pequeño diámetro (de 0,28 a 0,58 mm diámetro interno), insertados dentro de una punta de pipeta de manera que no queden espacios entre los tubos y la pared de la pipeta. Al final de la pipeta todos los tubos desembocan en una salida común, la cual se situó a unos 100  $\mu$ m de la célula. Cada uno de los tubos se conecta por su extremo posterior a un reservorio donde se acumulan las soluciones de trabajo y el flujo de cada una de las vías se controla electrónicamente mediante válvulas solenoides excluyentes (The Lee Company, Westbrook, CT, EEUU), de tal modo que sólo una de las válvulas puede permanecer abierta en el mismo periodo de tiempo. La velocidad del flujo fue de aproximadamente de 1 ml/min y regulada por gravedad, lo que permitía un cambio completo de soluciones en los alrededores de la célula en menos de 100 ms (**figura 12**).



**Figura 12.** Esquema del sistema de perfusión y detalle apical de la pipeta de perfusión utilizada.

Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) con las pipetas montadas sobre el preamplificador de un amplificador de *patch-clamp* EPC-9 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemania), con una interfase ITC-16 AD/DA integrada. Para la adquisición de datos y para el control automático de la apertura de las válvulas se empleó el *software* PULSE (también de HEKA). Las células se estimularon mediante la aplicación de pulsos de agonista de 250 ms a intervalos de 30 s y los registros se adquirieron a una frecuencia de muestreo de 50 kHz.

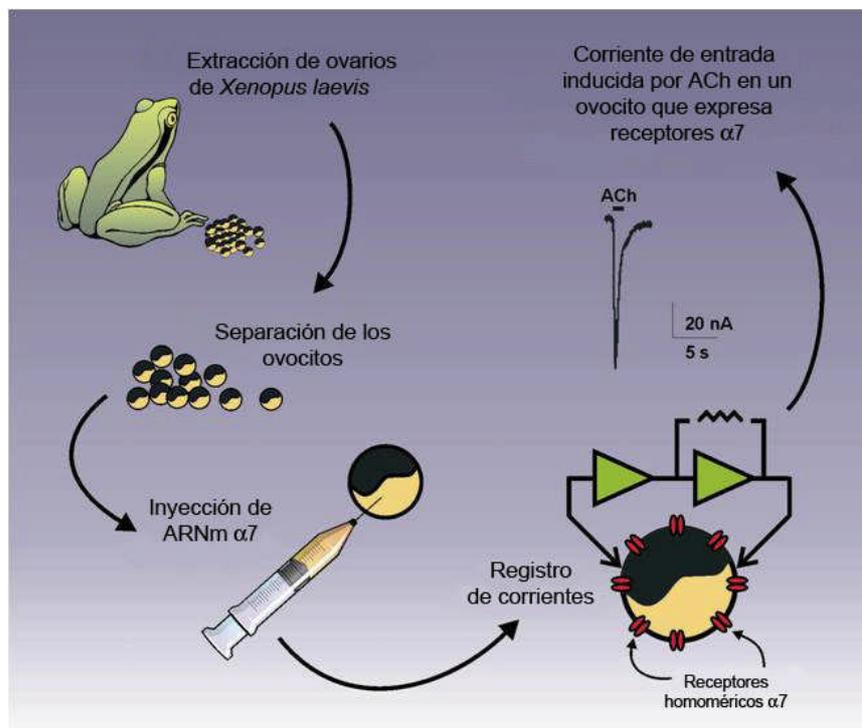
#### **4. REGISTRO DE CORRIENTES NICOTÍNICAS EN OVOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS***

Los ADN complementarios que codifican para las subunidades del nAChR bovino  $\alpha 3$ ,  $\alpha 7$  ó  $\beta 4$ , insertados en el vector pSP64T, junto con un vector que proporciona resistencia a ampicilina, fueron amablemente suministrados por el Dr. Criado. Se transformaron bacterias competentes DH5 $\alpha$  con estos vectores y se seleccionaron haciéndolas crecer en un medio con el antibiótico de selección (ampicilina). Posteriormente, se extrajo el ADN plasmídico mediante un kit de Maxiprep (Qiagen Iberia, S.L., Madrid) y se linearizó con la enzima de restricción XbaI (New England BioLabs, Inc., Ipswich, Reino Unido). Para la transcripción *in vitro* se utilizó el kit mMESSAGING mMACHINE® T7 de Ambion (Applied Biosystems, Madrid). El ARNm fue extraído con fenol/cloroformo (1:1), precipitado con isopropanol y resuspendido en agua libre de ribonucleasas. Se valoró la concentración de ARNm sintetizado mediante espectrofotometría y se diluyó en agua libre de ribonucleasas para obtener una concentración final de 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Se realizaron alícuotas de cada muestra de ARNm y se conservaron a  $-80^\circ\text{C}$ .

Como sistema de expresión heteróloga de estos ARNm se utilizaron ovocitos extraídos de sapos hembras de *Xenopus laevis* (Blades Biological, Kent, Reino Unido). Para ello, se anestesiaron los sapos con triclaína al 0,2% y se les realizó una pequeña incisión abdominal para extraer una pieza de ovario. Los ovocitos extraídos fueron depositados en una placa de Petri que contenía una solución de Barth sin  $\text{Ca}^{2+}$  (pH 7,4), cuya composición (en mM) es: 88 NaCl; 1 KCl; 2,4  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,82  $\text{MgSO}_4$ ; 7,5 Tris-HCl (pH 7,5), y fueron desfoliculados manualmente con la ayuda de unas pinzas. Posteriormente se inyectaron 46 nl de ARNm en cada ovocito con un microinyector automático Nanoject (Drummond Scientific Co., Broomall, PA, EEUU) y se incubaron a

16°C en una solución de Barth suplementada con penicilina (50 UI/ml)/estreptomina (0,05 mg/ml), 0,33 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0,41 mM  $\text{CaCl}_2$  y 5% suero de caballo. Las subunidades que componían los receptores heteroméricos fueron inyectadas equimolarmente (1:1). Todos los registros se realizaron al cabo de tres a seis días tras la inyección (**figura 13**).

La caracterización electrofisiológica de los nAChRs expresados en ovocitos se realizó mediante la técnica de fijación de voltaje de doble electrodo (Campos-Caro *et al.*, 1997). Para ello se colocaron los ovocitos en una cámara de registro que era continuamente perfundida mediante gravedad (8 ml/min) con una solución Ringer modificada que contenía (en mM): 82,5 NaCl; 2,5 KCl; 2,5  $\text{BaCl}_2$ ; 1  $\text{MgCl}_2$ ; 5 HEPES (pH 7,4). Se usó el bario como catión divalente permeable con objeto de inhibir las corrientes de cloruro activadas por calcio, y no se encontró ninguna diferencia significativa cuando se inyectó BAPTA (un quelante rápido de cationes) en los ovocitos. El potencial de membrana de los ovocitos se fijó en -70 mV. Las corrientes fueron filtradas a 50 Hz con la ayuda de un filtro Bessel de ocho polos, con una frecuencia de muestreo de 100 a 500 Hz y almacenadas sobre el disco duro de un ordenador para su posterior análisis.



**Figura 13.** Esquema de la expresión, y posterior registro de corrientes, de receptores nicotínicos en ovocitos de *Xenopus laevis*.

La aplicación de los agonistas y la adquisición de los datos fueron controlados por una interfase Digidata 1200 controlada por el programa informático pCLAMP 6.0 (Axon Instruments, Union City, California, EEUU).

Las soluciones conteniendo las diferentes concentraciones de agonistas nicotínicos, se aplicaron a través de una pipeta de perfusión similar a la usada en los experimentos de *patch-clamp*, pero usándose en este caso tubos de 1,5 mm de diámetro interno, situándose la salida común cercana al ovocito. Como estímulo se aplicaron pulsos de agonista de 5 s a intervalos de 2 min. El volumen de solución en la cámara de perfusión fue de 0,4 ml. Los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ )

## **5. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE $\text{Ca}^{2+}$ CITOSÓLICO EN POBLACIONES CELULARES**

Las variaciones en la concentración de calcio intracelular, tanto en CCB como en células PC12, se determinaron mediante la sonda Fluo-4 en el lector de placas de fluorescencia FLUOstar OPTIMA (BMG LabTechnologies).

La sonda Fluo-4 es un fluoróforo que se une de forma selectiva y reversible a  $\text{Ca}^{2+}$ , provocando un aumento en su intensidad de fluorescencia de emisión. Además de tener una estructura y propiedades espectrales muy similares a la sonda Fluo-3, la sonda Fluo-4 presenta algunas mejoras sobre la anterior (Thomas *et al.*, 2000), ya que permea en la célula con mayor facilidad y muestra una mayor excitación a 488 nM, lo que conlleva a una emisión de fluorescencia más intensa, permitiendo así su uso a concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico más bajas.

En este trabajo se ha empleado la forma esterificada de la molécula de Fluo-4 (Fluo-4 AM), que se caracteriza por ser hidrofóbica (lo que le permite atravesar la membrana plasmática con facilidad) e insensible a iones. Una vez en el citosol, los enlaces éster son hidrolizados por esterasas intracelulares, liberándose la forma polianiónica del fluoróforo, ya sensible a iones, que quedará atrapada en el interior celular.

Para la realización de los experimentos, las células, sembradas en placas negras de 96 pocillos e incubadas durante 48 h, se cargaron a  $37^\circ\text{C}$ , durante 45 min, con  $10 \mu\text{M}$  de sonda Fluo-4 AM disuelta en KH con ayuda del detergente aniónico

ácido plurónico. Previamente a su carga las células se lavaron con KH para eliminar el posible suero presente en el medio de cultivo, ya que éste podría unirse al indicador y disminuir su concentración efectiva. Finalizada la carga se realizaron dos lavados con KH para eliminar los restos de sonda no captados por las células y se procedieron a medir los cambios en la fluorescencia (excitación a 485 nm y emisión a 520 nm) tras la preincubación durante 10 min con distintos ligandos nicotínicos.

En cada pocillo se realizó una medida de la fluorescencia basal durante 10 s y, tras la inyección del agonista mediante un inyector automático, se midió la respuesta durante los siguientes 40 s. Para normalizar la señal del Fluo-4 se calibró la respuesta de cada pocillo midiendo los valores de fluorescencia máxima ( $F_{max}$ ) y mínima ( $F_{min}$ ) en cada uno de ellos. Al final de cada experimento se añadió Tritón X-100 al 5% para obtener los valores de  $F_{max}$  y posteriormente  $MnCl_2$  0,2 M para obtener los de  $F_{min}$ . Las respuestas se calcularon como % de fluorescencia total ( $F_{TOTAL} = F_{max} - F_{min}$ ).

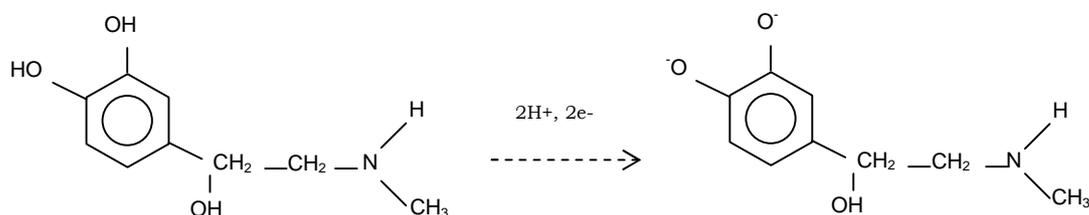
## 6. MEDIDA DE LA SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS EN POBLACIONES CELULARES

La liberación de catecolaminas por parte de una población de CCB tras su estimulación con el agonista se midió en tiempo real mediante la técnica amperométrica (Green y Perlman, 1981; Herrera *et al.*, 1985; Borges *et al.*, 1986).

La amperometría es un método electroquímico basado en la oxidación o reducción de sustancias. Es una técnica de fácil manejo y no invasiva para las células, sin embargo, no permite identificar qué tipo de sustancias han sido oxidadas.

Muchos productos de secreción, entre ellos las catecolaminas, contienen en su estructura grupos químicos con capacidad para ceder (oxidarse) o captar (reducirse) electrones. La detección por oxidación de los productos secretados se consigue mediante un electrodo de carbono; cuando las sustancias oxidables difunden hacia su superficie, los electrones generados en la reacción de oxidación, en el caso de las catecolaminas  $2 e^-$  por cada molécula oxidada (**figura 14**), son transferidos a él y se produce un flujo de corriente a su través que será directamente proporcional a la concentración de sustancias oxidadas. Para favorecer la oxidación de todas las moléculas secretadas debe aplicarse un voltaje que exceda al potencial redox en al menos +200 mV, ya que la aplicación de uno menor disminuiría drásticamente la

velocidad de oxidación y por tanto la detección de señales amperométricas (Bruns y Jahn, 1995). En el caso de las catecolaminas el potencial utilizado suele ser de +650-800 mV (**+650 mV** en este trabajo).

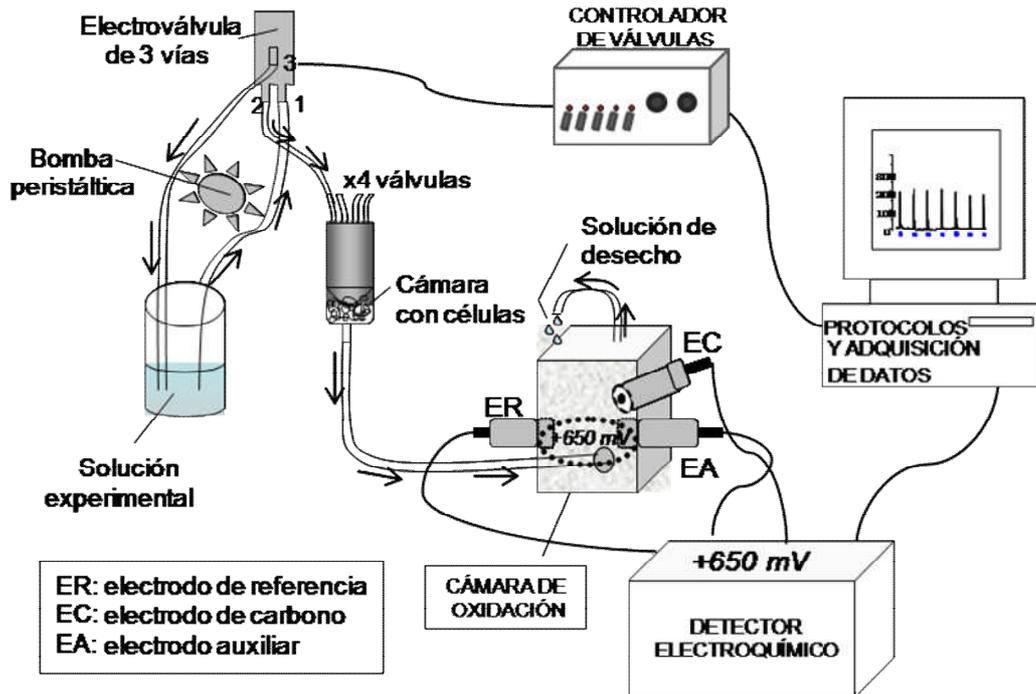


**Figura 14.** Esquema de la oxidación de una molécula de adrenalina (obsérvese cómo lo que se oxida es el anillo catecol de la molécula).

Para llevar a cabo los experimentos, las células se despegan de la placa de Petri mediante un suave raspado con una espátula de plástico y se centrifugan (120xg, 10 min). Una vez sedimentadas, se desecha el sobrenadante, se resuspenden en 200  $\mu$ l de KH y se colocan en una pequeña cámara, que previamente se ha rellenado con lana de vidrio para retener las células.

A continuación, se superfunden con una solución de KH a una velocidad de 2,5-3,0 ml/min. Mediante un sistema de electroválvulas de tres vías se puede controlar el medio que superfundirá a las células en todo momento, así como la duración y frecuencia de la superfusión (por ejemplo para aplicar los estímulos secretagogos). La solución que emana de las células (que acaba de bañar a las mismas) se conduce rápidamente a una cámara de oxidación, en la que se verá sometida a un voltaje de +650 mV gracias a un sistema de dos electrodos (uno de referencia y otro auxiliar) conectados a un detector electroquímico (Metrohm AG Herisau, 641-VA, Suiza). En la cámara de oxidación confluye un tercer electrodo, el de carbono, que detectará los electrones liberados tras la oxidación de las catecolaminas y conducirá esta señal al detector, conectado a su vez a un ordenador, que permite adquirir la señal (con una frecuencia de muestreo de 2 Hz), así como aplicar los diferentes protocolos experimentales (apertura electrónica de las válvulas) y el análisis de los resultados (**figura 15**).

Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Los estímulos secretagogos aplicados fueron de 5 s de duración a intervalos de 3 min.



**Figura 15.** Esquema del dispositivo empleado para la detección amperométrica de la secreción de catecolaminas en poblaciones celulares. Las flechas indican el sentido en el que circulan las soluciones a lo largo de un experimento.

## 7. PURIFICACIÓN E INMUNODETECCIÓN DE RECEPTORES QUE CONTIENEN LA SUBUNIDAD $\alpha 7$

### 7.1.- Purificación de nAChRs que contienen la subunidad $\alpha 7$ mediante inmunoprecipitación

Los experimentos de inmunoprecipitación se llevaron a cabo tanto a partir de tejido medular fresco de la glándula adrenal bovina, como a partir de células cromafines bovinas en cultivo ( $40 \cdot 10^6$  células).

La glándula adrenal bovina, una vez limpia de la grasa que la recubría, fue cortada longitudinalmente para extraer pequeños fragmentos de médula con ayuda de unas pinzas y unas tijeras. Las CCB fueron sembradas en placas de Petri de 5 cm de diámetro a una concentración de  $5 \cdot 10^6$  células/placa y se mantuvieron en un incubador ( $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$ ) durante 48 h. Transcurrido ese tiempo, se despegaron las células con ayuda de un raspador y se reunieron los 40 millones para ser procesadas

conjuntamente. A continuación, se realizaron dos lavados con Locke, tanto de los fragmentos de médula, como de las CCB aisladas por cultivo, mediante dos centrifugaciones consecutivas a 120xg durante 10 minutos, descartando el sobrenadante y resuspendiendo los precipitados en solución de Locke nueva. Finalmente, tras una nueva centrifugación, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los precipitados en 5 volúmenes de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 mM PMSF; una pastilla de inhibidores de proteasas (complete Mini, Roche Diagnostics S.L., Barcelona, España); Tritón X-100 al 1%).

Para extraer las proteínas, tanto el tejido medular como el precipitado celular fueron homogeneizados durante un periodo de aproximadamente 1 h, con ayuda de un homogeneizador en el caso del tejido medular, o agitando intermitentemente (30 s a intervalos de 10-15 min) en un vortex en el caso del precipitado celular, manteniendo las muestras en hielo durante todo el proceso. Las proteínas solubilizadas por la acción del detergente fueron recuperadas en el sobrenadante tras centrifugar de nuevo las muestras a 16.000xg durante 15 min, descartando en este caso el precipitado.

Con el fin de eliminar las proteínas que pudieran unirse de forma inespecífica a la resina utilizada en la inmunoprecipitación se incubaron los sobrenadantes con sefarosa 4 activada por bromuro de cianógeno (CNBr) (GE Healthcare, Barcelona, España) durante 3-4 h, a 4°C, en agitación (“preaclaramiento” de la muestra).

Tras descartar la resina por centrifugación (120xg, 5 min, 4°C) se estimó la concentración proteica en los extractos, utilizando un kit comercial basado en el método del ácido bicinónico (BCA) (Pierce, Nueva Jersey, EEUU).

Se separaron 2 mg de proteína total de cada muestra y se incubaron con sefarosa conjugada con  $\alpha$ Bgt ( $\alpha$ Bgt\*sefarosa), siguiendo las instrucciones del fabricante, durante toda la noche, a 4°C y en agitación para purificar los receptores que contuvieran la subunidad  $\alpha 7$  del nAChR. Paralelamente, se incubaron en condiciones similares los siguientes controles de la inmunoprecipitación:

- Control de proteínas sin inmunoprecipitar: para comprobar que la muestra de partida se encontraba en condiciones óptimas y que contenía las subunidades del nAChR de interés.

- Control de la resina (sefarosa + lisado celular): para comprobar si, a pesar del proceso de "preaclaramiento", se había producido la unión inespecífica de alguna proteína del lisado a la resina.

- Control de la  $\alpha$ Bgt (sefarosa conjugada con  $\alpha$ Bgt, sin lisado celular): para ver si la  $\alpha$ Bgt por sí misma producía una señal inespecífica que fuera detectable mediante la técnica de *Western blot*.

Una vez finalizadas las incubaciones mencionadas anteriormente, excepto en el caso de los controles de proteínas, se realizaron dos lavados con tampón de lisis, dos con tampón A (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl) y una con tampón B (50 mM Tris-HCl pH 7,5), mediante centrifugaciones sucesivas (120xg, 5 min, 4°C), con el fin de eliminar las proteínas que hubieran quedado unidas de forma inespecífica al complejo " $\alpha$ 7- $\alpha$ Bgt\*sefarosa".

Para romper los enlaces del complejo " $\alpha$ 7- $\alpha$ Bgt\*sefarosa" se resuspendió cada muestra en tampón de carga (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glicerol, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol y 2%  $\beta$ -mercaptoetanol) y se calentó a 96°C durante 1 min. Finalmente, se realizó una centrifugación a 16.000xg durante 1 min, quedando en el sobrenadante las subunidades de los receptores purificados y en el precipitado los restos de resina unida a  $\alpha$ Bgt.

## **7.2.- Inmunodetección de las subunidades nicotínicas $\alpha$ 3 y $\alpha$ 7 mediante la técnica de *Western blot***

Las subunidades de los receptores purificados, tanto en lisados celulares, como en tisulares, fueron analizadas mediante la técnica de *Western blot* para comprobar si había coimmunoprecipitado la subunidad  $\alpha$ 3 junto con la  $\alpha$ 7.

Las proteínas presentes en las distintas muestras se separaron en función de su tamaño mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE). Para ello, se prepararon geles de poliacrilamida al 10% y se cargaron los pocillos con 50  $\mu$ l de cada muestra. Posteriormente se sometió al gel a una intensidad de corriente de 70 mA durante 1 h, en una cubeta de electroforesis "Mini Protean 3 cell" (Bio-Rad, Richmond, California, EEUU) conteniendo un tampón de composición: 25 mM Tris base, 192 mM glicina, 1% SDS (pH = 8,3).

Pasado ese tiempo se colocó el gel en una unidad de transferencia “Mini trans-blot” (Bio-Rad) y se electrotransfirió a una membrana de poli fluoruro de vinilideno (PVDF) (Amersham, Uppsala, Suecia) con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ , en un tampón de transferencia de composición: 25 mM Tris base, 192 mM glicina, 20% metanol (pH = 8,3), mediante la aplicación de intensidad de corriente de 50 mA durante toda la noche, a 4°C. El PVDF, debido a su naturaleza hidrofóbica, fue previamente activado sumergiendo la membrana en metanol puro durante 10 s, lavándose a continuación con agua destilada y permitiendo su equilibrado en el tampón de transferencia.

Una vez finalizada la transferencia a la membrana, se tiñeron las proteínas introduciendo la membrana en una solución de rojo Ponceau (de composición: 0,2% (p/v) rojo Ponceau, 3% (p/v) ácido tricloroacético, 3% (p/v) ácido sulfosalicílico) durante un minuto para comprobar que la transferencia había tenido lugar. Inmediatamente se procedió a lavar la membrana con agua destilada y, tras visualizar las bandas proteicas, se señalaron con ayuda de un lapicero la posición de las bandas de los marcadores de peso molecular, siguiendo a continuación con el lavado de la membrana hasta la completa desaparición del tinte.

Después se procedieron a bloquear en la membrana todos los sitios de unión inespecíficos a proteínas incubando la misma en una solución de bloqueo que contenía 10% BSA, 5% leche desnatada en polvo y 0,05% Tween-20 en TBS (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) durante 1-3 h, en agitación. Posteriormente, para detectar la presencia de subunidades  $\alpha 3$  del nAChR en las muestras inmunoprecipitadas, se incubó la membrana con el anticuerpo (Ac) policlonal H-100 (Santa Cruz Biotechnology, California, EEUU) diluido en tampón de bloqueo (1:200), a 4°C, en agitación, durante toda la noche. Al día siguiente, las membranas se lavaron 4 veces durante 30 min con TBS-T (TBS con Tween-20 al 0,1%) y posteriormente se incubaron con el Ac secundario (anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, California, EEUU)) diluido en tampón de bloqueo (1:2000), durante 1 h, a temperatura ambiente. Seguidamente las membranas fueron lavadas 4 veces durante 15 min con TBS-T y se realizó un último lavado con TBS. Más tarde, las membranas se incubaron con la solución de revelado “ECL Plus” (Amersham, Uppsala, Suecia) durante 5 min y, a continuación, fueron situadas bajo una película sensible a rayos x en el interior de un “casette” de autorradiografía (Amersham). La película fue expuesta un tiempo de 10 min aproximadamente y pasado ese tiempo fue

sometida a un proceso de revelado, fijación, lavado y secado (en un procesador automático de películas) para visualizar la señal en la misma.

Como control negativo una de las membranas fue sometida al mismo protocolo experimental, exceptuando la incubación con el Ac primario.

Para confirmar la inmunoprecipitación de la subunidad  $\alpha 7$ , se eliminó el Ac que reconocía la subunidad  $\alpha 3$  mediante la incubación de las membranas con una solución que contenía 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7, 100 mM  $\beta$ -mercaptoetanol y 2% SDS a 50°C, durante 30 min, en agitación. Se realizaron 2 lavados con TBS-T para eliminar los restos de tampón y se bloqueó de nuevo durante 1-3 h con tampón de bloqueo. Se realizó un primer marcaje con el Ac monoclonal 319 (1:2000) (Sigma, Madrid, España), que reconoce específicamente la subunidad  $\alpha 7$ , durante toda la noche, a 4°C. Posteriormente se procedió al marcaje con el anticuerpo secundario (anti-IgG de rata conjugado a peroxidasa, 1:15.000) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EEUU) y finalmente, tras una serie de lavados con TBS-T y TBS, al revelado de las membranas.

## **8. SOLUCIONES Y COMPUESTOS QUÍMICOS UTILIZADOS**

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación se han utilizado los siguientes compuestos: colagenasa de *Clostridium histolyticum* (Roche Diagnostics S.L., Barcelona, España); suero bovino fetal y suero de caballo (Gibco, Madrid, España); lana de vidrio (Panreac, Barcelona, España); Fluo-4 AM y ácido plurónico (Invitrogen, Madrid, España); PNU-120596 y PNU-282987 (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido). El resto de los reactivos, a menos que se indique lo contrario, fueron obtenidos de Sigma (Madrid, España).

## **9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados están expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Las diferencias estadísticas entre las medias de los resultados de dos variables se han estimado mediante ANOVA, seguido por el test post-hoc Newman-Keuls. Se ha considerado como límite de significancia un valor de  $p \leq 0,05$ . La  $CE_{50}$  de los diferentes agonistas fue estimada a través de un análisis de regresión no lineal mediante el programa Origin.8 (OriginLab).



# **RESULTADOS**

## 1. EFECTO DE BLOQUEADORES SELECTIVOS $\alpha 7$ SOBRE LAS CORRIENTES INDUCIDAS POR ACh EN RECEPTORES NICOTÍNICOS BOVINOS

En un trabajo previo de nuestro grupo (López *et al.*, 1998), mediante el uso de cortas aplicaciones de agonista (1 s) y de antagonistas selectivos para el subtipo  $\alpha 7$  ( $\alpha$ -conotoxina Iml, MLA y  $\alpha$ Bgt), se llegó a la conclusión de que las corrientes nicotínicas nativas en CCB eran probablemente el resultado de la activación simultánea de una población entremezclada de receptores nicotínicos  $\alpha 7$  y  $\alpha 3\beta 4$ , pues se observaba una inhibición parcial de la corriente nicotínica inducida por la aplicación de ACh con los diferentes bloqueadores utilizados. Sin embargo, estos datos resultan un tanto conflictivos, ya que en estos experimentos se emplearon concentraciones de antagonista tan elevadas que éstos podrían haber perdido su selectividad.

Como se ha comentado anteriormente, debido al hecho de que no disponemos de herramientas farmacológicas selectivas para el nAChR del subtipo  $\alpha 3\beta 4$ , se ha investigado principalmente si las subunidades  $\alpha 7$  del nAChR pudieran estar formando receptores homoméricos funcionales en CCB.

Con el fin de corroborar los datos anteriores se evaluó el efecto de diferentes bloqueadores selectivos del nAChR  $\alpha 7$  sobre la corriente inducida por ACh en CCB, pero utilizando en este caso concentraciones de antagonista menores.

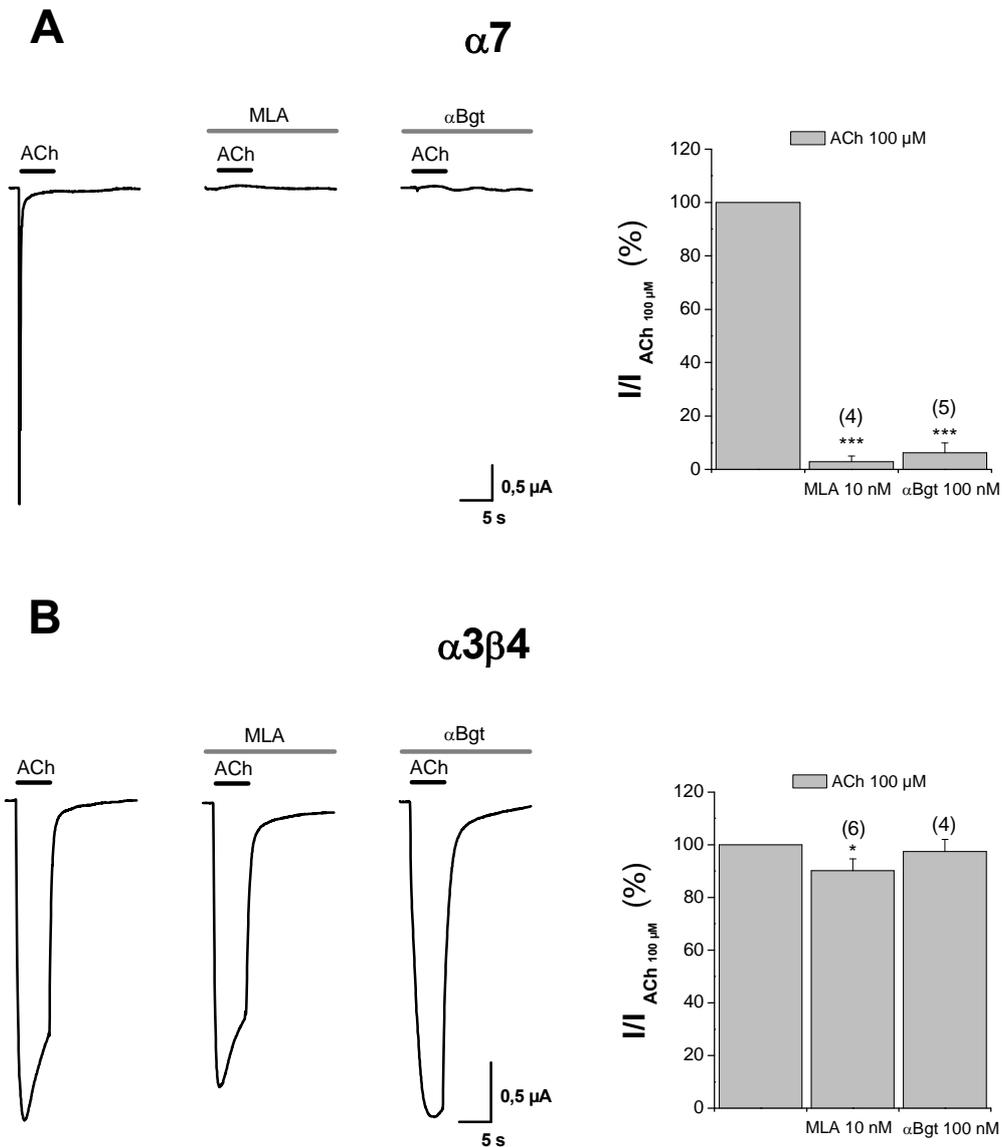
Como paso previo se estudió la selectividad de las nuevas concentraciones de los bloqueadores MLA y  $\alpha$ Bgt en ovocitos de *Xenopus* que expresaban receptores nicotínicos bovinos  $\alpha 7$  y  $\alpha 3\beta 4$ .

Para ello, mediante la técnica de fijación de voltaje de doble electrodo, se aplicaron pulsos de 5 s de ACh (100  $\mu$ M) a intervalos de 2 min en ausencia (pulsos control) o presencia de antagonista.

La **figura 16** muestra el efecto de los antagonistas MLA (10 nM) y  $\alpha$ Bgt (100 nM) sobre las corrientes inducidas por ACh (100  $\mu$ M) en ovocitos de *Xenopus* que expresan receptores nicotínicos bovinos  $\alpha 7$  (**16A**) y  $\alpha 3\beta 4$  (**16B**).

Como puede observarse, concentraciones de 10 nM MLA y 100 nM  $\alpha$ Bgt son capaces de bloquear de forma selectiva las corrientes inducidas por ACh en ovocitos que expresan receptores  $\alpha 7$  (%bloqueo<sub>MLA</sub> = 97,15  $\pm$  2,11; %bloqueo <sub>$\alpha$ Bgt</sub> = 93,83  $\pm$

3,74), sin apenas afectar a las corrientes inducidas de igual forma en ovocitos que expresan receptores  $\alpha 3\beta 4$  (%bloqueo<sub>MLA</sub> = 9,80 ± 4,44; %bloqueo <sub>$\alpha$ Bgt</sub> = 2,62 ± 4,62).



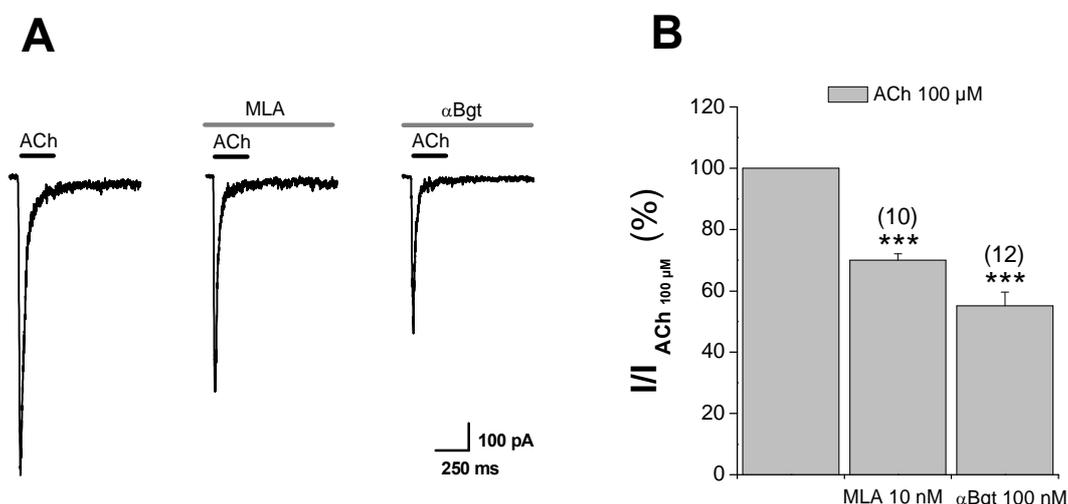
**Figura 16.** Efecto de la perfusión continua de bloqueadores selectivos para el nAChR del subtipo  $\alpha 7$  sobre la corriente inducida por ACh en ovocitos que expresan receptores nicotínicos bovinos  $\alpha 7$  (A) o  $\alpha 3\beta 4$  (B). Las figuras A y B (izquierda) muestran registros originales de corrientes inducidas por ACh (100  $\mu$ M) en ausencia o presencia de MLA (10 nM) o  $\alpha$ Bgt (100 nM). Las barras horizontales indican el tiempo de aplicación del agonista (—) o del bloqueador (---). En los diagramas de barras de la derecha están representadas las medias de las respuestas observadas en el número de ovocitos indicado entre paréntesis, normalizadas respecto 100  $\mu$ M ACh  $\pm$  EEM (\* $p$ <0,05, \*\*\* $p$ <0,001).

Una vez comprobada la selectividad de los antagonistas a las concentraciones elegidas sobre receptores nicotínicos bovinos expresados en ovocitos se quiso poner

de manifiesto si el receptor  $\alpha 7$  estaba implicado en la generación de corrientes nicotínicas inducidas por ACh en CCB mediante la técnica de *patch-clamp*.

Las células se estimularon con pulsos de ACh (100  $\mu$ M) de 250 ms de duración aplicados a intervalos de 30 s. Una vez estabilizada la corriente, se perfundió el antagonista (10 nM MLA ó 100 nM  $\alpha$ Bgt) durante 3-5 minutos y se evaluó el grado máximo de bloqueo de la corriente (**figura 17**).

Como se puede observar, la perfusión tanto de MLA como de  $\alpha$ Bgt produjo un bloqueo significativo de la corriente nicotínica inducida por ACh, siendo ligeramente superior en el caso de la  $\alpha$ Bgt (%bloqueo<sub>MLA</sub> = 30,01  $\pm$  2,09; %bloqueo <sub>$\alpha$ Bgt</sub> = 44,86  $\pm$  4,45), lo que sugiere una posible implicación del receptor  $\alpha 7$  en la generación de corrientes nicotínicas en CCB.



**Figura 17.** Efecto de la perfusión continua de bloqueadores selectivos para el subtipo  $\alpha 7$  sobre la corriente inducida por ACh en CCB. El panel **A** muestra registros originales de corrientes inducidas por ACh (100  $\mu$ M) en ausencia o presencia de MLA (10 nM) o  $\alpha$ Bgt (100 nM). Las barras horizontales indican el tiempo de aplicación del agonista ( — ) o del bloqueador ( — ). En el panel **B** están representadas los valores medios de todas las células empleadas en cada experimento, normalizadas respecto 100  $\mu$ M ACh  $\pm$  EEM (\*\*\*) $p$ <0,001). Entre paréntesis se indica el número de datos obtenidos para cada grupo.

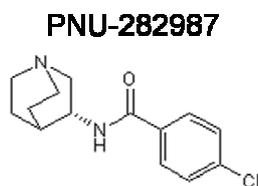
Tanto en los experimentos realizados en ovocitos, como en los realizados en CCB, el bloqueo producido por los distintos antagonistas fue calculado como la diferencia entre la media del pico máximo de los tres últimos pulsos en ausencia de bloqueador y la media de los tres últimos pulsos durante la aplicación del antagonista.

## 2. EFECTO DEL AGONISTA SELECTIVO $\alpha 7$ PNU-282987 SOBRE RECEPTORES NICOTÍNICOS BOVINOS

Si un receptor  $\alpha 7$  homomérico típico estuviera presente en las CCB, sería de esperar que la aplicación de pulsos breves de un agonista selectivo para este subtipo de receptor indujese la activación de una corriente iónica proporcional al número de receptores presentes.

En base a esta premisa y para explorar tal posibilidad, se compararon los efectos de la aplicación de PNU-282987 (100  $\mu\text{M}$ ) sobre receptores nicotínicos bovinos expresados en ovocitos de *Xenopus*, con los obtenidos en receptores nativos en CCB (**figuras 19 y 20**).

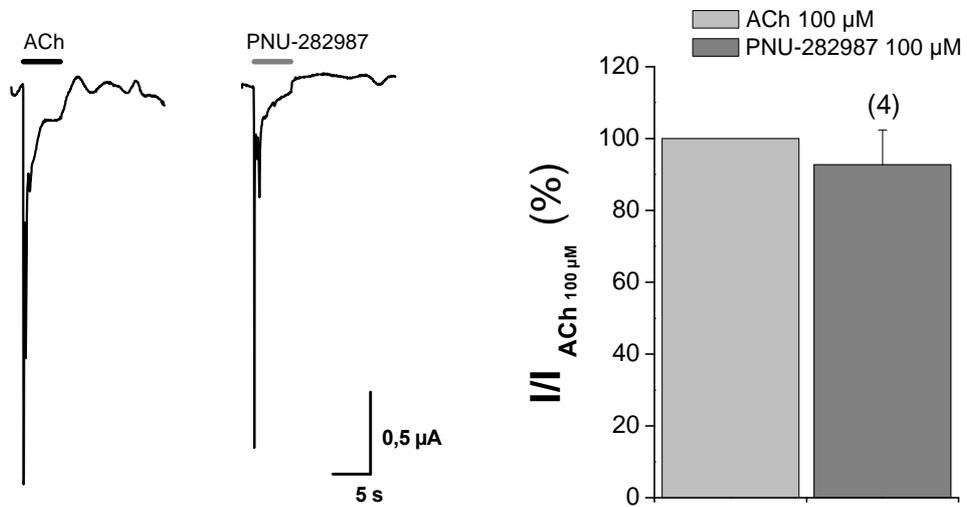
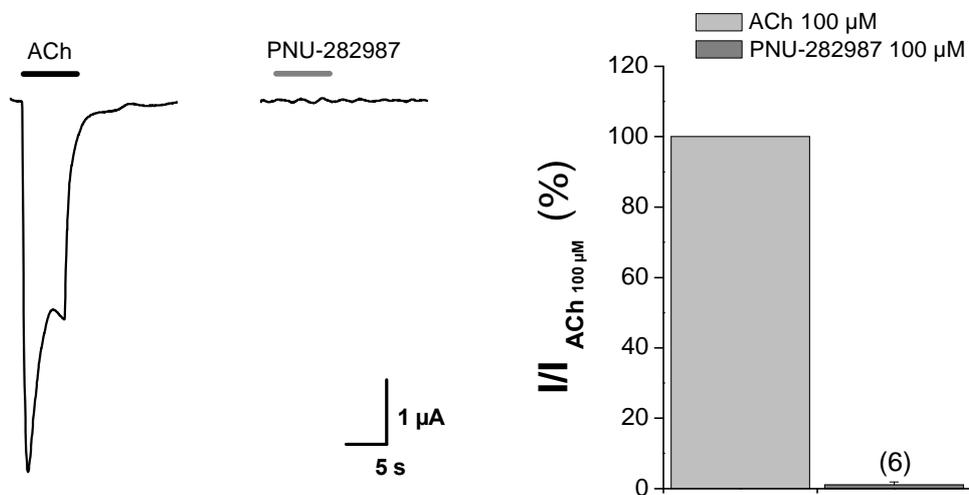
El PNU-282987 (hidrocloruro de N-[(3R)-1-azabicyclo [2.2.2] oct-3-il]-4-clorobenzamida) (**figura 18**) ha sido descrito como agonista selectivo de receptores nicotínicos del subtipo  $\alpha 7$  en rata (Bodnar *et al.*, 2005; Hajós *et al.*, 2005), en ratón (Su *et al.*, 2007; Hiramoto *et al.*, 2008) y en humano (Gronlien *et al.*, 2007).



**Figura 18.** Estructura química de PNU-282987

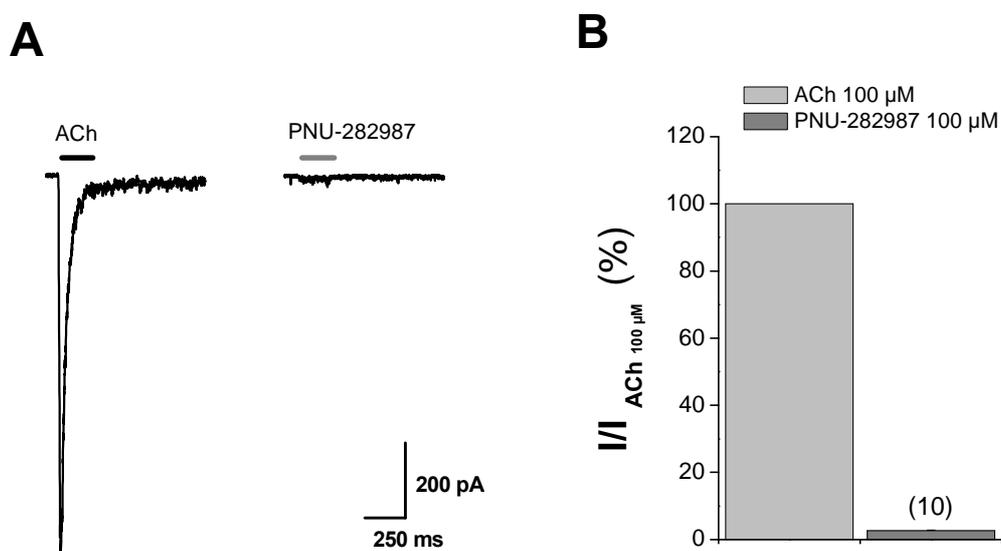
Para comprobar su selectividad sobre receptores bovinos se realizaron primeramente experimentos en ovocitos de *Xenopus* que expresaban receptores nicotínicos bovinos de los subtipos  $\alpha 7$  y  $\alpha 3\beta 4$  (**figura 19**).

Como se puede observar en la **figura 19**, la estimulación de ovocitos que expresaban receptores  $\alpha 7$  con 100  $\mu\text{M}$  PNU-282987 (5 s/2 min) indujo una corriente nicotínica de un  $92,69 \pm 9,67\%$ , respecto a la inducida por 100  $\mu\text{M}$  ACh, por lo que se puede considerar que ambos agonistas producen una respuesta equiparable a esta concentración. Como era de esperar, en el caso de ovocitos que expresaban receptores  $\alpha 3\beta 4$ , el PNU-282987 (100  $\mu\text{M}$ ) no fue capaz de generar ninguna corriente significativa ( $1,10 \pm 0,79\%$ ), confirmándose así la selectividad de este agonista sobre nAChRs del subtipo  $\alpha 7$ .

**A** $\alpha 7$ **B** $\alpha 3\beta 4$ 

**Figura 19. (Izquierda)** Registros de corriente representativos obtenidos tras estimular ovocitos de *Xenopus* que expresan receptores nicotínicos bovinos  $\alpha 7$  (A) o  $\alpha 3\beta 4$  (B) con los agonistas ACh (100  $\mu$ M) o PNU-282987 (100  $\mu$ M). Las barras horizontales indican el tiempo de aplicación del agonista. Los diagramas de barras de la **derecha** representan los datos normalizados con respecto a 100  $\mu$ M ACh  $\pm$  EEM. El número de ovocitos empleados en cada experimento se encuentra indicado entre paréntesis.

Dado que los experimentos realizados con bloqueadores selectivos del subtipo  $\alpha 7$  descritos en el apartado anterior sugieren la participación del nAChR  $\alpha 7$  en la generación de corrientes nicotínicas en CCB, lo esperable sería que la aplicación de pulsos breves de PNU-282987 indujese la activación de una corriente proporcional al número de receptores presentes en las células. Para corroborarlo, se realizaron experimentos de *patch-clamp* en CCB en los que se aplicaron pulsos de ACh (100  $\mu$ M) o PNU-282987 (100  $\mu$ M) de 250 ms de duración a intervalos de 30 s y se compararon las respuestas máximas obtenidas con uno u otro agonista (**figura 20**).



**Figura 20. A)** Registros originales de corrientes inducidas por 100  $\mu$ M ACh ó 100  $\mu$ M PNU-282987. Las barras horizontales indican el tiempo de aplicación del agonista. **B)** Representación de los valores medios de las respuestas normalizadas respecto 100  $\mu$ M ACh  $\pm$  EEM. Entre paréntesis se indica el número de células empleadas en el experimento.

Como puede apreciarse en la figura, a diferencia de lo esperado, tras la aplicación de pulsos breves de PNU-282987, las CCB presentaban respuestas prácticamente inapreciables respecto a aquellas obtenidas con ACh (**figura 20A**). El PNU-282987, a una concentración de 100  $\mu$ M, tan sólo indujo una corriente de  $16,26 \pm 1,44$  pA, lo que equivale a un  $2,65 \pm 0,25\%$  de la corriente obtenida tras la estimulación con 100  $\mu$ M ACh en las mismas células. Estos datos, por tanto, no apoyarían la existencia de un receptor homomérico  $\alpha 7$  en la membrana de las CCB.

### 3. EFECTO DE LA PERFUSIÓN CONTINUA DEL AGONISTA SELECTIVO $\alpha 7$ PNU-282987 SOBRE LAS CORRIENTES INDUCIDAS POR ACh EN RECEPTORES NICOTÍNICOS BOVINOS

Como ya se comentó en la *Introducción* (sección 5.4), una de las propiedades de los nAChRs es su desensibilización debida a la presencia continua del agonista. Esta inactivación depende, entre otras cosas, del tipo de agonista, de su concentración, del tiempo y frecuencia con que se aplique y del subtipo de nAChR que se vea afectado.

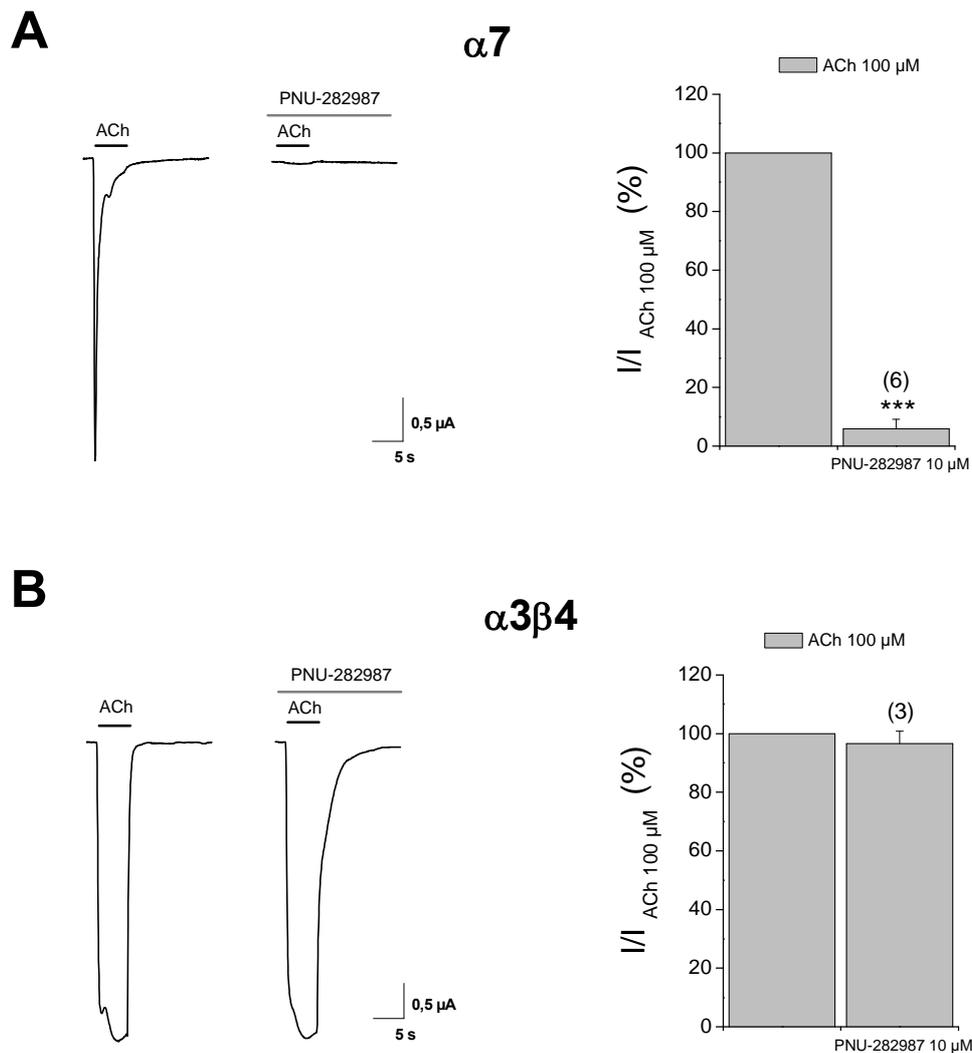
En base a esta característica, se procedió a inactivar la corriente nicotínica a través de los receptores  $\alpha 7$  mediante la perfusión continua de PNU-282987, que como se ha mencionado anteriormente, es un agonista selectivo para este subtipo de receptor (Bodnar *et al.*, 2005; Hajós *et al.*, 2005). De esta forma, se podría evaluar la proporción de corriente inducida por ACh debida a la activación de receptores  $\alpha 7$  en CCB.

De nuevo se realizaron controles en ovocitos de *Xenopus* que expresaban nAChRs de los subtipos  $\alpha 7$  y  $\alpha 3\beta 4$  para confirmar la selectividad del PNU-282987 sobre receptores  $\alpha 7$  bovinos y para valorar el grado de desensibilización de los mismos a la concentración elegida.

De forma similar a los experimentos realizados con antagonistas, se aplicaron pulsos de 5 s de 100  $\mu\text{M}$  de ACh a intervalos de 2 min en ausencia (pulsos control) o presencia de 10  $\mu\text{M}$  de PNU-282987.

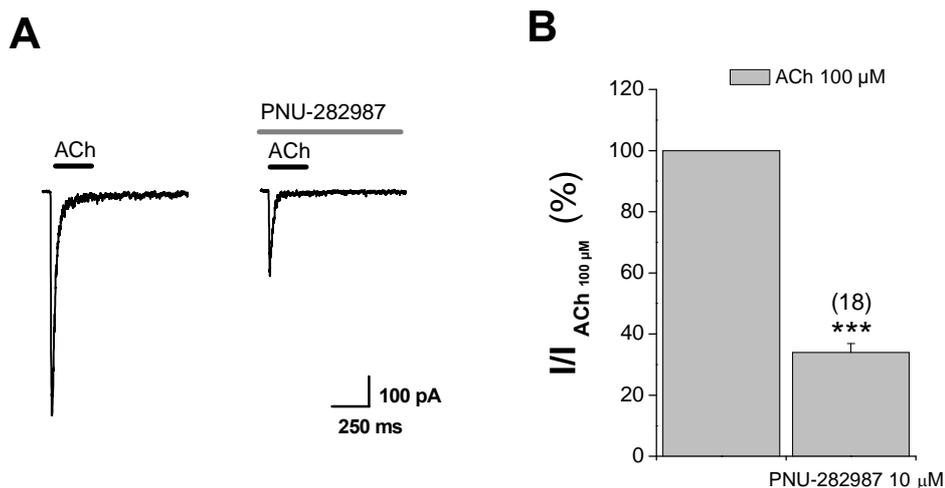
La **figura 21** muestra el efecto de la perfusión continua de PNU-282987 (10  $\mu\text{M}$ ) sobre las corrientes inducidas por ACh (100  $\mu\text{M}$ ) en ovocitos de *Xenopus* que expresan nAChRs bovinos  $\alpha 7$  y  $\alpha 3\beta 4$ .

Como puede observarse, la perfusión de 10  $\mu\text{M}$  de PNU-282987 provoca la inactivación prácticamente total de la corriente inducida por ACh (100  $\mu\text{M}$ ) en ovocitos de *Xenopus* que expresan nAChRs bovinos  $\alpha 7$  (**21A**) (%bloqueo<sub>PNU-282987</sub> = 94,06  $\pm$  3,29), sin afectar a las corrientes inducidas de igual forma en ovocitos que expresan receptores  $\alpha 3\beta 4$  (%bloqueo<sub>PNU-282987</sub> = 3,45  $\pm$  4,24) (**21B**).



**Figura 21.** Efecto de la perfusión continua del agonista selectivo del subtipo  $\alpha 7$  PNU-282987 sobre la corriente inducida por ACh en ovocitos que expresan receptores nicotínicos bovinos  $\alpha 7$  (A) o  $\alpha 3\beta 4$  (B). Las figuras A y B (izquierda) muestran registros originales de corrientes inducidas por ACh (100  $\mu\text{M}$ ) en ausencia o presencia de PNU-282987 (10  $\mu\text{M}$ ). Las barras horizontales indican el tiempo de aplicación de la ACh (—) o del PNU-282987 (—). Los diagramas de barras de la derecha representan los datos normalizados respecto a 100  $\mu\text{M}$  ACh  $\pm$  EEM (\*\*p < 0,001). El número de datos para cada experimento se indica entre paréntesis.

La proporción de receptores del subtipo  $\alpha 7$  presentes en CCB se estimó nuevamente mediante la técnica de *patch-clamp*, en su configuración de célula entera (figura 22). La corriente inducida por pulsos de 100  $\mu\text{M}$  ACh (250 ms/30 s) fue bloqueada un  $66,05 \pm 2,92\%$  en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de PNU-282987.



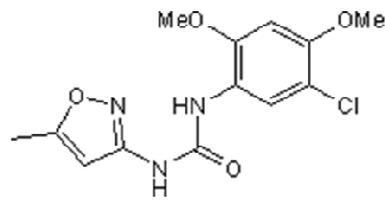
**Figura 22.** Desensibilización de la corriente inducida por ACh en presencia continua de PNU-282987 en CCB. **A)** Registros originales de corrientes inducidas por ACh (100  $\mu\text{M}$ ) antes y durante la perfusión de PNU-282987 (10  $\mu\text{M}$ ). Las barras horizontales indican el tiempo de aplicación de la ACh (—) o del PNU-282987 (—). **B)** Representación de los valores medios de las respuestas normalizadas respecto 100  $\mu\text{M}$  ACh  $\pm$  EEM (\*\* $p < 0,001$ ). Entre paréntesis se indica el número de células empleadas en el experimento.

Al igual que en el apartado anterior, tanto en los experimentos realizados en ovocitos, como en los realizados en CCB, el % de desensibilización fue calculado como la media del pico máximo obtenido en los tres últimos pulsos durante la perfusión de PNU-282987, normalizada respecto a la media del pico máximo de los tres últimos pulsos control.

#### 4. EFECTO DEL MODULADOR ALOSTÉRICO SELECTIVO $\alpha 7$ PNU-120596 SOBRE RECEPTORES NICOTÍNICOS BOVINOS

Con el objeto de poder analizar la presencia de una pequeña población de receptores  $\alpha 7$  en CCB se estudió el efecto del modulador alostérico positivo PNU-120596 (**figura 23**) sobre las corrientes nicotínicas inducidas por PNU-282987. El PNU-120596 (1-(5-cloro-2,4-dimetoxi-fenil)-3-(5-metil-isoxazol-3-il)-urea) ha sido descrito como un potente modulador alostérico positivo de nAChRs del subtipo  $\alpha 7$  y, además, presenta la capacidad de retardar la desensibilización del receptor en presencia del agonista, aumentando así el tiempo de apertura del canal iónico (Hurst *et al.*, 2005).

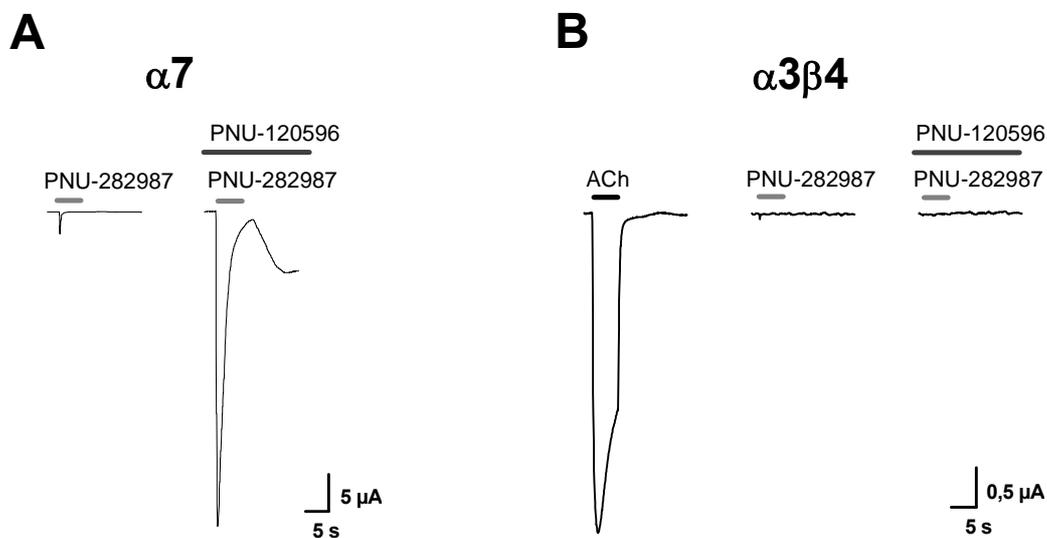
## PNU-120596



**Figura 23.** Estructura química de PNU-120596

La eficacia y selectividad de este compuesto sobre receptores nicotínicos bovinos fueron corroboradas mediante experimentos realizados en ovocitos de *Xenopus* que expresaban receptores bovinos de los subtipos  $\alpha 7$  y  $\alpha 3\beta 4$  (**figura 24**).

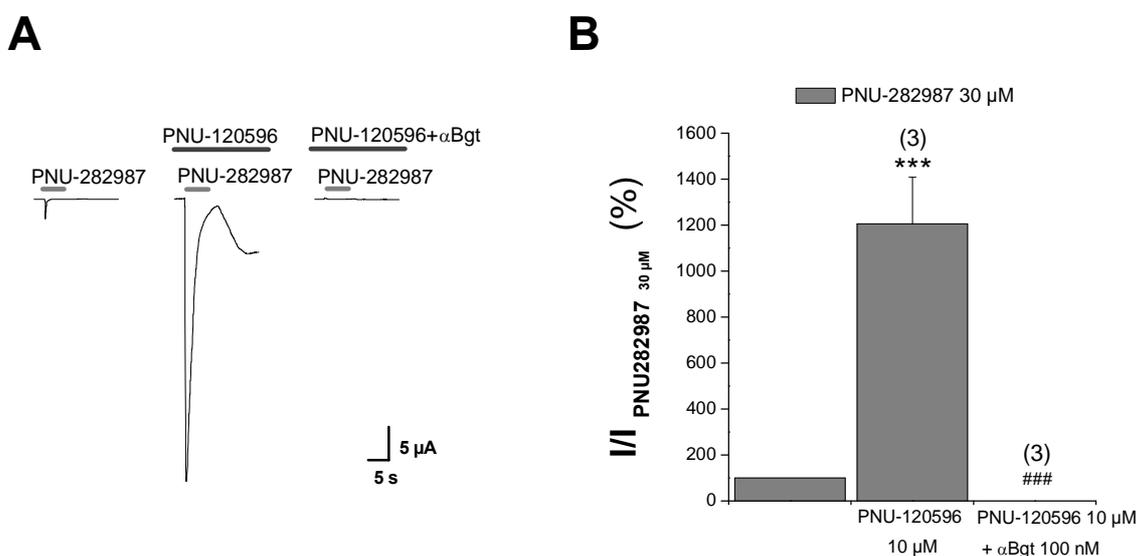
Con el fin de minimizar el efecto “rebote”, debido a la presencia de restos de agonista en la cámara de registro entre pulso y pulso, se utilizó una concentración de PNU-282987 menor que en los experimentos anteriores (se disminuyó la concentración de agonista de 100 a 30  $\mu\text{M}$ ).



**Figura 24.** Efecto del modulador alostérico PNU-120596 (10  $\mu\text{M}$ ) sobre la corriente inducida por 30  $\mu\text{M}$  PNU-282987 (5 s/2 min) en ovocitos de *Xenopus* que expresan receptores nicotínicos bovinos  $\alpha 7$  (**A**) o  $\alpha 3\beta 4$  (**B**). Las barras horizontales indican el tiempo de aplicación de cada ligando. En el caso de ovocitos en los que se había inyectado ARNm que codifica para las subunidades  $\alpha 3$  y  $\beta 4$  se aplicó un pulso de 100  $\mu\text{M}$  ACh, previo al estímulo con PNU-282987, para comprobar que los receptores se habían expresado correctamente (**B**).

Como se puede observar, la perfusión de PNU-120596 potenció aproximadamente 12 veces la respuesta inducida por PNU-282987 en ovocitos que expresaban receptores  $\alpha 7$  ( $1205,71 \pm 202,10\%$ ,  $n = 3$ ), mientras que en ovocitos que expresaban receptores  $\alpha 3\beta 4$  no produjo ninguna respuesta significativa ( $1,10 \pm 0,79\%$ ,  $n = 6$ ).

La selectividad de este fármaco sobre receptores  $\alpha 7$  quedó patente no sólo por su capacidad de potenciar la corriente inducida por PNU-282987 en estos receptores y no en los  $\alpha 3\beta 4$ , sino también porque esta respuesta fue totalmente bloqueada en presencia de  $\alpha$ Bgt (**figura 25**) o MLA (datos no mostrados).



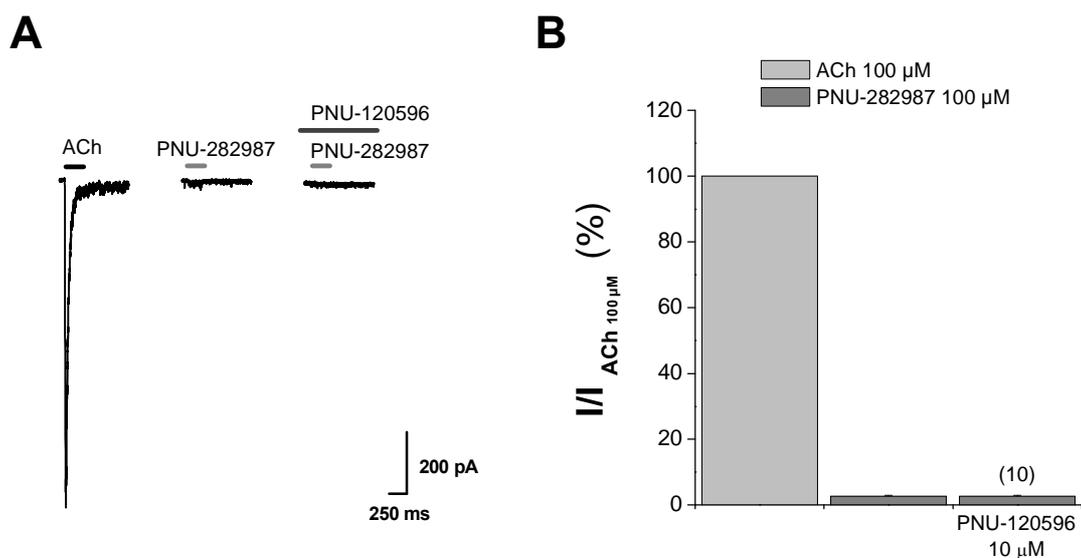
**Figura 25.** Bloqueo de la potenciación de la corriente inducida por PNU-282987, en presencia de PNU-120596, por la coaplicación de este modulador junto con  $\alpha$ Bgt. La figura **A** muestra registros originales de corrientes inducidas por 30  $\mu$ M PNU-282987 en ausencia (izquierda) o presencia de 10  $\mu$ M PNU-120596 (centro) o de 10  $\mu$ M PNU-120596 + 100 nM  $\alpha$ Bgt (derecha). Las barras horizontales indican el tiempo de aplicación de los distintos compuestos. El panel **B** resume los resultados obtenidos en el número de ovocitos indicado entre paréntesis, normalizados respecto 30  $\mu$ M PNU-282987  $\pm$  EEM (\*\*\*) $p < 0,001$ , respecto a PNU-282987 solo, ### $p < 0,001$ , respecto a PNU-282987 en presencia de PNU-120596).

Una vez caracterizado el efecto de la perfusión de PNU-120596 sobre receptores bovinos, se llevaron a cabo experimentos de *patch-clamp* en CCB, utilizando como estímulo pulsos de agonista de 250 ms de duración, aplicados a intervalos de 30 s.

Debido a la falta de respuesta a PNU-282987 en estas células (**figura 19**), se aplicaron inicialmente pulsos de 100  $\mu$ M ACh para corroborar que las células se

encontraban en condiciones óptimas. A continuación, se estimularon las células con pulsos de 100  $\mu\text{M}$  PNU-282987 en ausencia o en presencia de 10  $\mu\text{M}$  PNU-120596 y se compararon las respuestas máximas obtenidas en cada caso (**figura 26**).

Como puede apreciarse en la figura, al igual que ocurría en ovocitos que expresaban nAChRs  $\alpha 3\beta 4$ , el PNU-120596 no fue capaz de potenciar de forma significativa la corriente inducida por PNU-282987 en CCB ( $\%I_{\text{PNU-282987}}/I_{\text{ACh}} = 2,65 \pm 0,26$ ;  $\%I_{\text{PNU-282987+PNU-120596}}/I_{\text{ACh}} = 2,68 \pm 0,35$ ).



**Figura 26.** Efecto del modulador alostérico PNU-120596 sobre la corriente inducida por PNU-282987 en CCB. En la figura (A) aparecen representados registros originales de la corriente inducida por 100  $\mu\text{M}$  ACh (izquierda) o por 100  $\mu\text{M}$  PNU-282987 en ausencia (centro) o en presencia de PNU-120596 (10  $\mu\text{M}$ ) (derecha). Las barras horizontales indican el tiempo de aplicación de cada ligando. En el panel (B) se han representado las medias de los valores del pico máximo obtenidos en cada caso, normalizadas respecto ACh 100  $\mu\text{M} \pm \text{EEM}$ .

Estos datos no apoyan la posible existencia de una pequeña población de receptores homoméricos  $\alpha 7$  en CCB.

## 5. EFECTO DE DIVERSOS LIGANDOS SELECTIVOS $\alpha 7$ SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE $\text{Ca}^{2+}$ CITOSÓLICO EN POBLACIONES CELULARES

En un nuevo intento de poner de manifiesto la existencia de una pequeña población de receptores  $\alpha 7$  que no pudiera detectarse mediante técnicas realizadas en célula única, se evaluaron los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en

poblaciones de CCB en respuesta a la aplicación de distintos agonistas, en presencia o ausencia de diversos ligandos selectivos para el nAChR  $\alpha 7$ .

Para ello, se cargaron las células con la sonda Fluo-4 y se registraron las variaciones en la  $[Ca^{2+}]_c$  en el lector de placas de fluorescencia FLUOstar OPTIMA.

Dentro de cada experimento individual, cada una de las distintas condiciones experimentales (control, presencia de modulador alostérico, presencia de antagonista, etc.) se ensayó por triplicado. En cada pocillo se midió el valor máximo de fluorescencia y se calculó el promedio de las 3 réplicas. Los datos obtenidos así fueron normalizados respecto al control con 100  $\mu$ M ACh. Los valores de cada experimento individual se utilizaron para el cálculo final de los valores medios correspondientes y en el posterior análisis estadístico.

Inicialmente se ajustaron las condiciones experimentales utilizando células PC12, ya que, como se ha descrito en el apartado *Material y Métodos* (sección 2), constituyen un buen control positivo para nuestros experimentos al ser capaces de expresar receptores  $\alpha 7$  nativos (Blumenthal *et al.*, 1997).

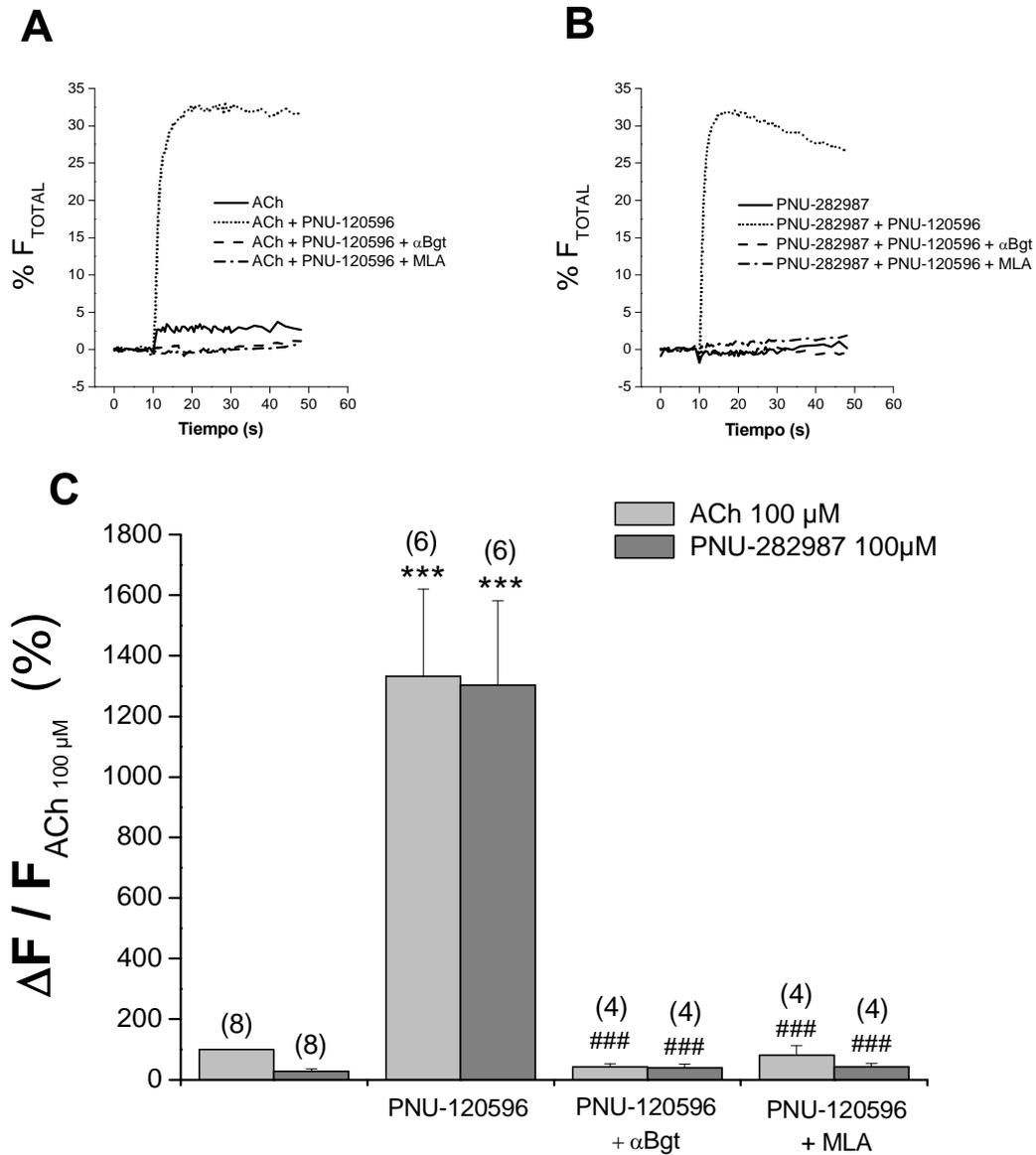
En estos experimentos con células PC12, una vez cargadas éstas con la sonda Fluo-4, se preincubaron durante 10 min con las distintas soluciones para que éstas pudieran ejercer su efecto. El protocolo aplicado en cada pocillo consistió en una medida de la fluorescencia basal durante los 10 primeros segundos, seguida de la inyección del agonista y el posterior registro de la respuesta durante los siguientes 40 s.

Antes de comenzar los experimentos, se realizaron controles en los que se inyectó KH en lugar de agonista para descartar la posibilidad de que alguno de los ligandos, a las concentraciones utilizadas, produjera por sí mismo un efecto sobre la fluorescencia basal (datos no mostrados). Una vez confirmada la ausencia de respuesta, se llevaron a cabo los experimentos estimulando las células con ACh o PNU-282987.

La inyección de 100  $\mu$ M ACh indujo un ligero incremento en la fluorescencia, que en el caso del PNU-282987 (100  $\mu$ M) fue prácticamente indetectable (tan sólo el  $27,79 \pm 7,57\%$  de la respuesta obtenida con ACh) (**figura 27**).

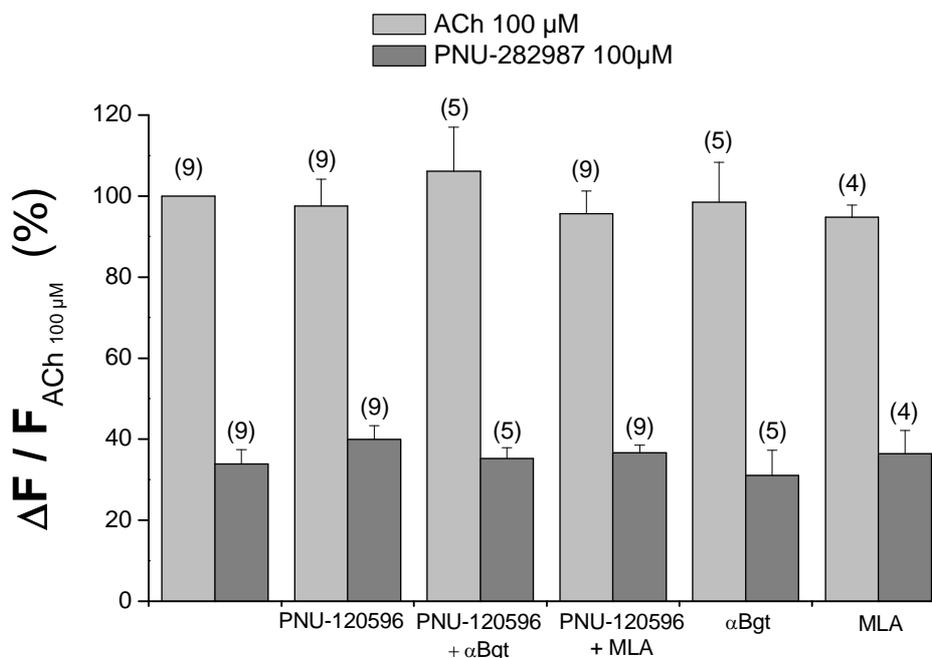
Para facilitar la identificación de respuestas debidas a la activación de nAChRs del subtipo  $\alpha 7$  se preincubaron las células con el modulador alostérico PNU-120596 (10  $\mu$ M), incrementándose así hasta 12 veces la  $[Ca^{2+}]_c$  obtenida en el control (1332,13

$\pm 288,02\%$  al usar como estímulo ACh, y  $1302,39 \pm 279,04\%$ , al estimular las células con PNU-282987). Esta potenciación de la fluorescencia fue prácticamente revertida al preincubar las células con 100 nM  $\alpha$ Bgt o 10 nM MLA junto con PNU-120596 (10  $\mu$ M), confirmándose así la selectividad de las respuestas obtenidas.



**Figura 27.** Efecto de la estimulación con ACh o con PNU-282987 sobre la  $[Ca^{2+}]_c$  en poblaciones de células PC12 preincubadas con distintos ligandos selectivos para el subtipo  $\alpha 7$ . Los paneles **A** y **B** representan registros originales obtenidos al estimular estas células con 100  $\mu$ M ACh (**A**) o 100  $\mu$ M PNU-282987 (**B**) que previamente habían sido preincubadas con KH (—) o con 10  $\mu$ M PNU-120596 en ausencia (...) o presencia de 100 nM  $\alpha$ Bgt (- -) o 10 nM MLA (- -). **C**) Las barras representan las medias  $\pm$  EEM de las respuestas observadas en el número de experimentos indicado entre paréntesis, normalizados respecto a ACh 100  $\mu$ M (\*\*\*) $p < 0,001$ , respecto a ACh sola, ### $p < 0,001$ , respecto a ACh en presencia de PNU-120596).

Una vez establecidos tanto el protocolo de estimulación, como las concentraciones de trabajo, se quiso poner de manifiesto si, al igual que en el caso anterior, el PNU-120596 (10  $\mu$ M) era capaz de potenciar la señal de calcio en poblaciones de CCB estimuladas con ACh o con PNU-282987 (100  $\mu$ M) y si además esta potenciación se revertía por  $\alpha$ Bgt (100 nM) o MLA (10 nM) (**figura 28**).

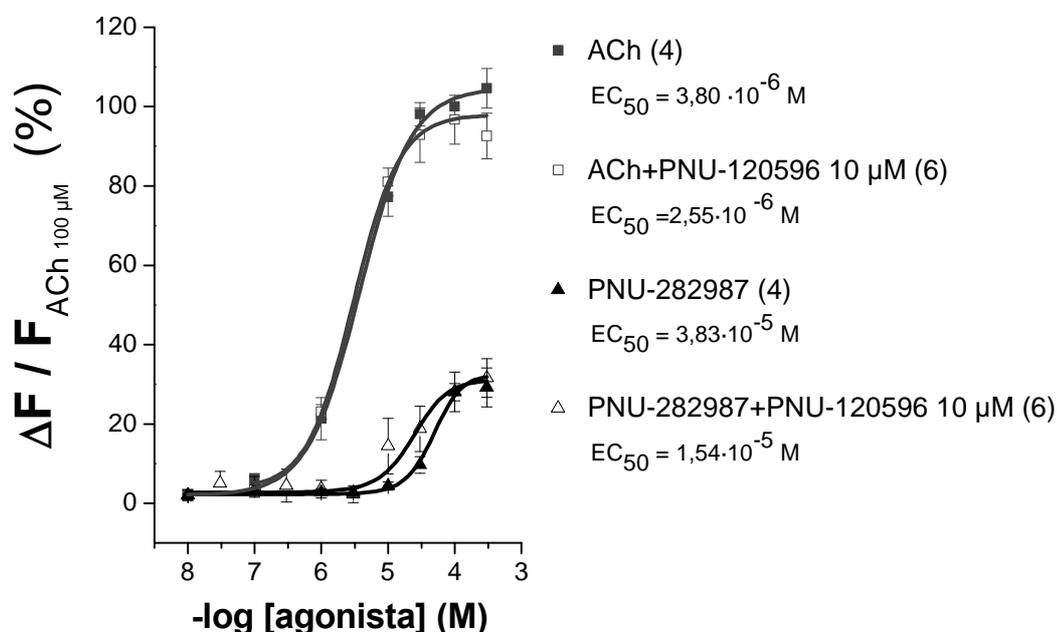


**Figura 28.** Efecto de los agonistas ACh o PNU-282987 sobre la  $[Ca^{2+}]_c$  en poblaciones CCB preincubadas con distintos ligandos selectivos para el subtipo  $\alpha 7$ . En ambos casos se evaluó el efecto de PNU-120596 (10  $\mu$ M) en ausencia o presencia de 100 nM  $\alpha$ Bgt o 10 nM MLA y el efecto de cada uno de los antagonistas por sí mismos. Las barras representan las medias  $\pm$  EEM de las respuestas observadas en el número de experimentos indicado entre paréntesis. Todos los datos fueron normalizados respecto a 100  $\mu$ M ACh.

Como se puede observar, en CCB el PNU-120596 no fue capaz de potenciar de forma significativa la señal de calcio inducida por ninguno de los dos agonistas utilizados y, al no producir efecto, no se pudo evaluar posible la reversión de esta potenciación por  $\alpha$ Bgt o MLA. Por otra parte, la preincubación con  $\alpha$ Bgt o con MLA solas no produjo ningún bloqueo significativo del incremento de  $[Ca^{2+}]_c$  inducido por ACh o PNU-282987.

Para descartar la posibilidad de que en CCB el efecto del PNU-120596 (10  $\mu$ M) pudiera depender de la concentración de agonista, se realizaron curvas concentración-respuesta preincubando las células con el modulador y utilizando como estímulo distintas concentraciones de ACh o de PNU-282987 (**figura 29**).

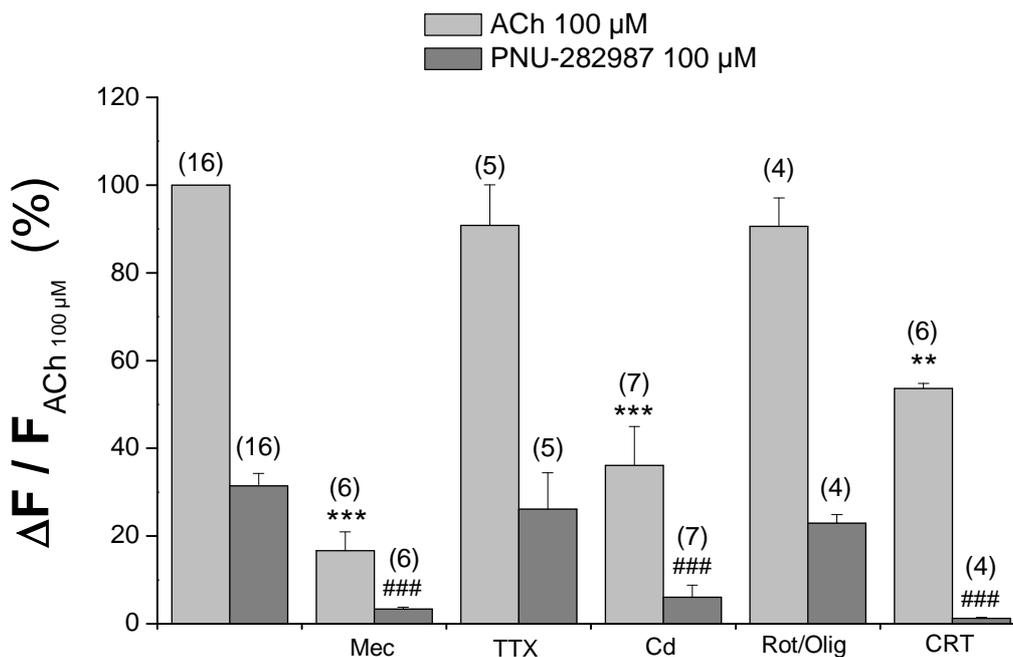
Como puede apreciarse en la figura, la preincubación con PNU-120596, tanto en el caso de ACh, como en el de PNU-282987 no produjo ninguna diferencia significativa a ninguna de las concentraciones ensayadas, lo que sugiere que la falta de respuesta a PNU-120596 no es dependiente de la concentración de agonista utilizado.



**Figura 29.** Curvas concentración-respuesta obtenidas como resultado de la inyección de distintas concentraciones de ACh o PNU-282987. (■) Curva concentración-respuesta a ACh. En este caso las células fueron preincubadas con KH antes de la inyección del agonista. (□) Curva concentración-respuesta a ACh de células preincubadas durante 10 min con PNU-120596 (10  $\mu\text{M}$ ). (▲) Curva concentración-respuesta a PNU-282987. Al igual que en el caso de la ACh, las células fueron preincubadas con KH antes de su inyección. (△) Curva concentración-respuesta a PNU-282987 de células preincubadas durante 10 minutos con PNU-120596 (10  $\mu\text{M}$ ). Todos los datos están normalizados respecto a 100  $\mu\text{M}$  ACh. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de las respuestas observadas a las distintas concentraciones. El número de experimentos realizados en cada caso se encuentra indicado entre paréntesis. Los valores para las  $CE_{50}$  se calcularon mediante la aplicación de la ecuación de Hill.

En las figuras anteriores (28 y 29) se puede observar cómo el PNU-282987 es capaz de provocar un pequeño incremento en la  $[Ca^{2+}]_c$  ( $33,87 \pm 3,55\%$ , respecto a la respuesta inducida por 100  $\mu\text{M}$  ACh). Sin embargo, no hemos podido demostrar que esta respuesta sea debida a la activación selectiva de receptores nicotínicos del subtipo  $\alpha 7$ , ya que no es potenciada por PNU-120596, ni bloqueada por antagonistas selectivos ( $\alpha\text{Bgt}$  o MLA). Para indagar en el posible origen de esta respuesta se realizaron experimentos en los que se trataron de bloquear las distintas vías que conducen al incremento del nivel de  $Ca^{2+}_c$  (figura 30). Para ello, utilizando un

protocolo de estimulación similar al de los casos anteriores, se preincubaron las CCB con 30  $\mu\text{M}$  de mecamilamina (Mec, un bloqueador no selectivo de nAChRs), para comprobar si el efecto se debía a la activación de receptores nicotínicos, con 5  $\mu\text{M}$  de tetrodotoxina (TTX, bloqueador no selectivo de canales de  $\text{Na}^+$ ) o con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$  (bloqueador no selectivo de CCDV), por si el PNU-282987 pudiera estar actuando de alguna forma sobre canales de  $\text{Na}^+$  o  $\text{Ca}^{2+}$  o sobre el potencial de membrana y, finalmente, con 3  $\mu\text{M}$  de rotenona (Rot, bloqueador del complejo I de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria) junto con 3  $\mu\text{M}$  de oligomicina (Olig, bloqueador del complejo V de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria), o con la mezcla de Cafeína+Rianodina+Tapsigargina (CRT), a las concentraciones de 20 mM Cafeína (provoca la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE a través de los receptores de rianodina), 10  $\mu\text{M}$  Rianodina (bloqueador de los receptores de rianodina) y 1  $\mu\text{M}$  Tapsigargina (bloqueador de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del RE), para determinar la posible participación de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en esta señal.



**Figura 30.** Efecto de la preincubación con distintos ligandos sobre la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por ACh o PNU-282987 (100  $\mu\text{M}$ ) en CCB. Las células fueron preincubadas con KH (control), 10  $\mu\text{M}$  Mec, 5  $\mu\text{M}$  TTX, 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ , 3  $\mu\text{M}$  Rot/Olig o CRT (20 mM Cafeína, 10  $\mu\text{M}$  Rianodina, 1  $\mu\text{M}$  Tapsigargina) durante 10 minutos antes de la inyección del agonista. Las barras representan las medias  $\pm$  EEM de las respuestas observadas en el número de experimentos indicado entre paréntesis. Todos los datos fueron normalizados respecto a 100  $\mu\text{M}$  ACh (\*\*\*) $p < 0,001$ , respecto a ACh control, ### $p < 0,001$ , respecto a PNU-282987 control).

Como se observa en la figura, la preincubación con Mec provocó el bloqueo en gran medida de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por ambos agonistas ( $\% \text{bloqueo}_{\text{Mec}} = 83,39 \pm 4,39$ , respecto ACh control;  $\% \text{bloqueo}_{\text{Mec}} = 89,38 \pm 0,45$ , respecto a PNU-282987 control), lo que demuestra la naturaleza nicotínica de la respuesta tanto a ACh, como a PNU-282987. En el caso del PNU-282987, estos datos podrían sugerir que este agonista está ejerciendo un efecto sobre receptores nicotínicos de otro subtipo diferente al receptor homomérico  $\alpha 7$ .

Por otra parte, los canales de  $\text{Na}^+$  no parecen estar participando en este proceso, puesto que la preincubación con TTX no afectó de forma significativa al incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a ACh ( $\% \text{respuesta}_{\text{TTX}} = 90,85 \pm 9,24$ , respecto a ACh control) o PNU-282987 ( $\% \text{respuesta}_{\text{TTX}} = 83,02 \pm 8,28$ , respecto a PNU-282987 control).

Como era de esperar, el  $\text{Cd}^{2+}$  produjo un gran bloqueo de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , ya que, como se había mencionado en la *Introducción* (apartados 3.1, 4.1 y 4.2), los CCDV son la principal vía de entrada de calcio extracelular en la célula cromafín ( $\% \text{bloqueo}_{\text{Cd}} = 63,89 \pm 8,91$ , respecto a ACh control;  $\% \text{bloqueo}_{\text{Cd}} = 80,76 \pm 2,70$ , respecto a PNU-282987 control).

En relación con la posible contribución de los depósitos intracelulares a la variación en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , parece ser que ésta podría ser debida principalmente a la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE, ya que, mientras que no se obtuvieron datos significativos de bloqueo con Rot/Olig ( $\% \text{bloqueo}_{\text{Rot/Olig}} = 9,35 \pm 6,48$ , respecto a ACh control;  $\% \text{bloqueo}_{\text{Rot/Olig}} = 27,06 \pm 2,00$ , respecto a PNU-282987 control), descartando así la participación de la mitocondria, las células que habían sido preincubadas con la mezcla de depleción e inactivación del RE (CRT) mostraron una inhibición en su  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  de:  $\% \text{bloqueo}_{\text{CRT}} = 46,33 \pm 1,19$  y  $\% \text{bloqueo}_{\text{CRT}} = 96,03 \pm 0,25$ , en relación a sus controles con ACh o PNU-282987, respectivamente.

A modo de resumen, podemos decir que la estimulación de poblaciones de CCB con ACh o con PNU-282987 provoca la activación de receptores nicotínicos distintos a los receptores  $\alpha 7$  homoméricos típicos, que conduce a un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  debido al propio  $\text{Ca}^{2+}$  que entra a través de los nAChRs, al que entra por los CCDV y al que sale del RE.

## 6. EFECTO DE DIVERSOS LIGANDOS SELECTIVOS $\alpha 7$ SOBRE LA SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS EN POBLACIONES DE CCB

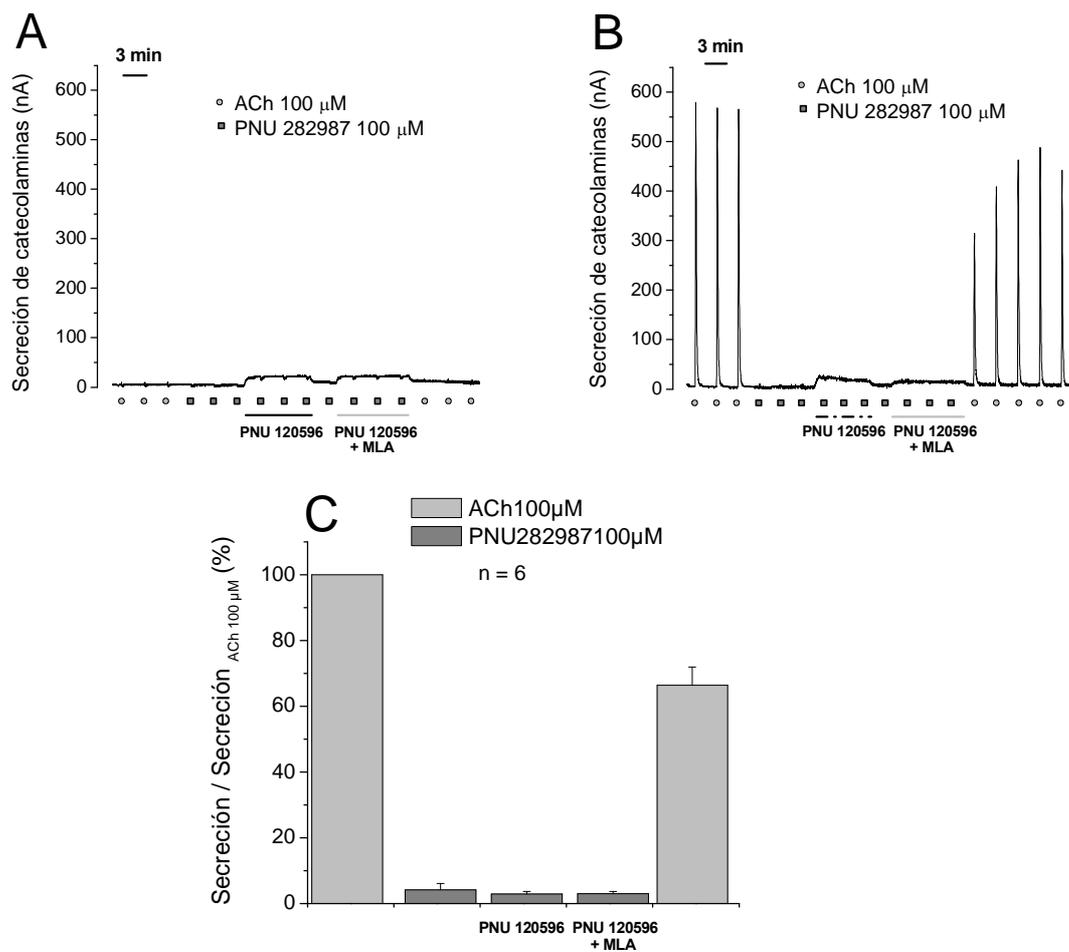
Continuando con los experimentos en poblaciones y avanzando un paso más en el proceso de acoplamiento excitación-secreción, se realizaron experimentos para estudiar el efecto de los compuestos anteriores sobre la secreción de catecolaminas en CCB.

La amperometría es una técnica experimental que aprovecha los fenómenos de óxido-reducción para detectar los productos de secreción por la oxidación de los mismos. Sin embargo, no sólo las catecolaminas son susceptibles a la oxidación, algunos compuestos químicos también pueden resultar oxidados y originar señales inespecíficas. Para solventar este problema, se realizaron controles sin células a los que se aplicó el mismo protocolo que el utilizado en el resto de experimentos (**figuras 31 y 32, A**). Como se puede observar, la perfusión de PNU-120596 (10  $\mu$ M) produjo una ligera elevación de la línea basal, lo que fue tenido en cuenta al realizar el análisis de datos.

Para evaluar el posible efecto de diversos ligandos selectivos para el nAChR  $\alpha 7$  sobre la secreción de catecolaminas en poblaciones de CCB se utilizó un protocolo consistente en la aplicación de pulsos de agonista de 5 s de duración a intervalos de 3 min. Este protocolo de estimulación aseguraba buenas respuestas secretoras y el intervalo entre pulsos permitía el retorno de la señal hasta los niveles basales entre pulso y pulso. En primer lugar se aplicaron pulsos control de ACh (100  $\mu$ M). Una vez estabilizada la señal, y para evaluar de forma directa la implicación del nAChR  $\alpha 7$  en el proceso secretor, se aplicaron pulsos similares de PNU-282987 (100  $\mu$ M), pero en este caso no se obtuvo ningún pico de secreción significativo.

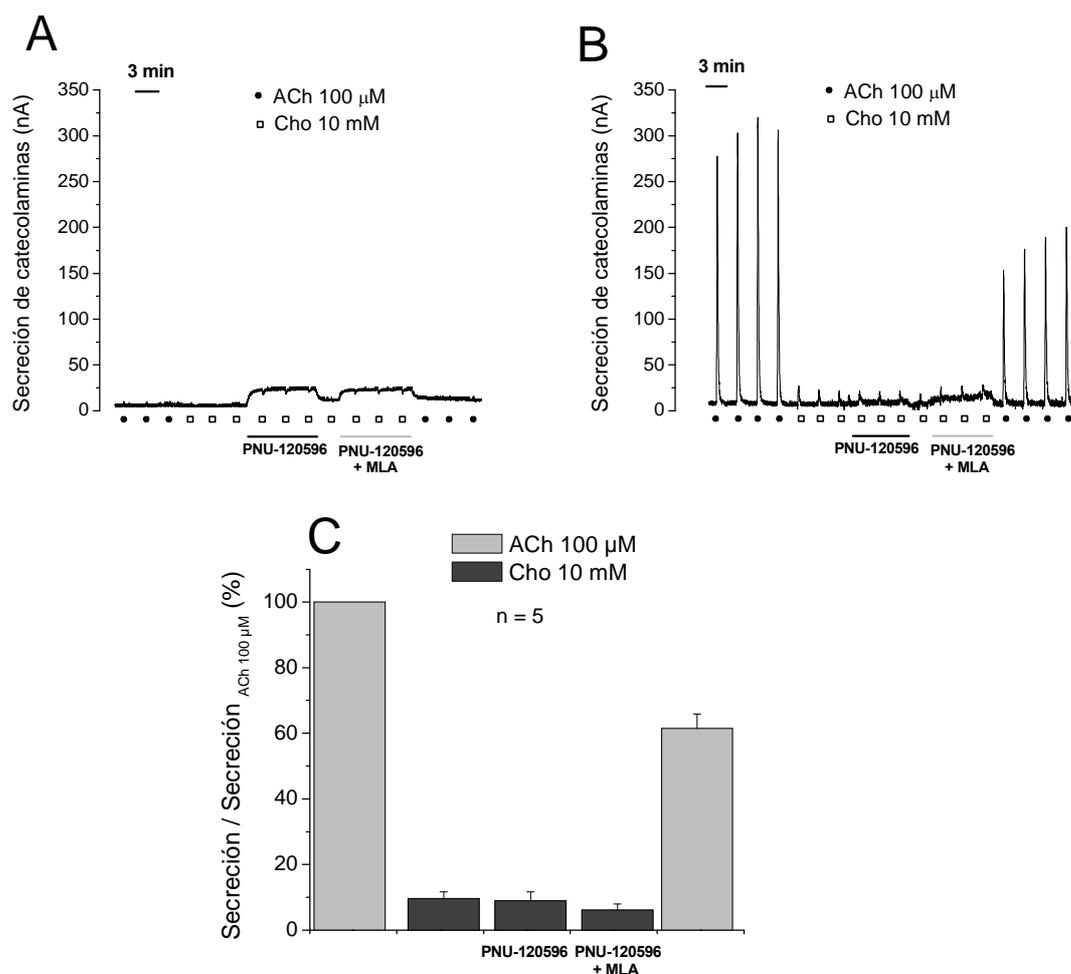
Para tratar de potenciar esta pequeña secreción inducida por la aplicación de pulsos de PNU-282987, se perfundió PNU-120596 (10  $\mu$ M). Seguidamente, se perfundió PNU-120596 junto con MLA (10 nM) para comprobar si esta potenciación era revertida por el antagonista. Finalmente, para corroborar que las células continuaban en condiciones óptimas, se aplicaron de nuevo pulsos control de ACh (**figura 31**). El panel **C** resume el análisis de los datos obtenidos en los 6 experimentos realizados. En cada experimento se analizó el pico máximo de cada espiga amperométrica. Una vez estabilizada la señal, se calculó el promedio de las 3 últimas espigas obtenidas tras la estimulación con ACh (previas a la estimulación con PNU-

282987) y se tomó este dato como la respuesta secretora control, con respecto a la cual se normalizaron las respuestas de todas las espigas subsiguientes del experimento. De igual forma, se calculó la media de las 3 últimas espigas obtenidas con PNU-282987 en ausencia o presencia de PNU-120596 sólo o coaplicado junto con MLA. Estos valores de cada experimento individual fueron utilizados para el cálculo final de las medias de todos los experimentos realizados y su posterior análisis estadístico.



**Figura 31.** Efecto de la perfusión del modulador alostérico PNU-120596 en ausencia o presencia de MLA sobre la secreción de catecolaminas inducida por PNU-282987 (100 μM) en poblaciones de CCB. El panel **A** representa los datos originales de un experimento control realizado sin células, en el que se aplicaron pulsos control de 100 μM ACh, seguidos de pulsos de 100 μM PNU-282987 en ausencia o presencia de 10 μM PNU-120596 sólo o coaplicado junto con 10 nM MLA. El panel **B** muestra un registro original de un experimento similar al anterior, pero realizado con células. En el panel **C** aparecen representadas las medias ± EEM del pico máximo de las espigas amperométricas de los distintos experimentos llevados a cabo con células. Todos los datos fueron normalizados respecto a 100 μM ACh. En la parte superior de las gráficas, junto a la leyenda, aparecen indicados el número de experimentos realizados en cada caso (*n*).

Como puede observarse en la figura anterior, en ninguno de los experimentos realizados se pudo detectar la participación de un nAChR  $\alpha 7$  en el proceso excitotico, ya que, por un lado, el PNU-282987 apenas fue capaz de inducir secreción de catecolaminas (tan sólo el  $4,17 \pm 1,93\%$  de la secreción obtenida con  $100 \mu\text{M}$  ACh) y, por otro, el PNU-120596 tampoco consiguió potenciar esta secreción ( $2,94 \pm 0,71\%$ , respecto a la secreción control).



**Figura 32.** Efecto de la perfusión del modulador alostérico PNU-120596 en ausencia o presencia de MLA sobre la secreción de catecolaminas inducida por Cho (10 mM) en poblaciones de CCB. El panel **(A)** representa los datos originales de un experimento control realizado sin células, en el que se aplicaron pulsos control de  $100 \mu\text{M}$  ACh, seguidos de pulsos de 10 mM Cho en ausencia o presencia de  $10 \mu\text{M}$  PNU-120596 sólo o coaplicado junto con 10 nM MLA. El panel **(B)** muestra un registro original de un experimento similar al anterior, pero realizado con células. **(C)** Las barras representan las medias  $\pm$  EEM del pico máximo de las espigas amperométricas de los distintos experimentos llevados a cabo con células, calculados de igual forma que en la **figura 31**. Todos los datos fueron normalizados respecto a  $100 \mu\text{M}$  ACh. En la parte superior de las gráficas, junto a la leyenda, aparecen indicados el número de experimentos realizados en cada caso (*n*).

Para comprobar si el efecto del PNU-282987 era extensible a otros agonistas  $\alpha 7$ , se realizaron experimentos similares a los anteriores, pero utilizando colina (Cho, 10 mM) como agonista selectivo para este subtipo de receptor (**figura 32**).

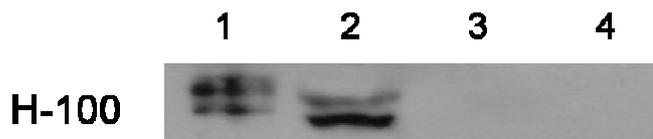
Al igual que lo ocurrido con PNU-282987, no se pudo observar una implicación directa de los receptores  $\alpha 7$  en el proceso secretor de catecolaminas en CCB. A pesar de que la Cho fue capaz de generar pequeños picos de secreción ( $9,62 \pm 2,02\%$  de la secreción inducida por el control con ACh), éstos no fueron potenciados por 10  $\mu\text{M}$  PNU-120596 ( $8,91 \pm 2,77\%$  respecto al control), ni bloqueados por 10 nM MLA ( $6,14 \pm 1,75\%$ , respecto al control).

## **7. PURIFICACIÓN E INMUNODETECCIÓN DE RECEPTORES QUE CONTIENEN LA SUBUNIDAD $\alpha 7$**

El análisis de los datos farmacológicos anteriores no parece apoyar la presencia de receptores nicotínicos  $\alpha 7$  homoméricos funcionales en la membrana plasmática de las células cromafines bovinas. Sin embargo, en la literatura está bien descrita la presencia de ARNm que codifica para la subunidad  $\alpha 7$  del nAChR (García-Guzmán *et al.*, 1995) y de sitios de unión a  $\alpha\text{Bgt}$  (Wilson y Kirshner, 1977; Criado *et al.*, 1997; El-Hajj *et al.*, 2007), además de haber confirmado su presencia en la membrana celular mediante técnicas de inmunofluorescencia y *Western blot* (datos del grupo no publicados).

Una posible explicación a estas discrepancias podría ser que la subunidad  $\alpha 7$  se encuentre formando parte de un receptor heteromérico  $\alpha 3\alpha 7\beta 4^*$ . Para poder comprobar esta hipótesis se realizó un experimento de coimmunoprecipitación de las subunidades  $\alpha 7$  y  $\alpha 3$ . Tras la purificación de los receptores que contenían la subunidad  $\alpha 7$  con  $\alpha\text{Bgt}^*$ sefarosa, se determinó la presencia de la subunidad  $\alpha 3$  mediante la técnica de *Western blot* a partir de las muestras purificadas.

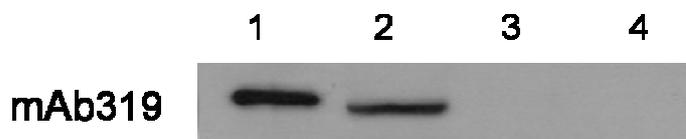
Se ha descrito que el tratamiento con colagenasa puede afectar a la expresión en membrana de ciertos receptores. Para descartar este efecto en el caso de receptores nicotínicos que contienen la subunidad  $\alpha 7$ , los experimentos se llevaron a cabo tanto a partir de tejido de médula adrenal, como a partir de CCB en cultivo.



**Figura 33.** Detección de la subunidad  $\alpha 3$  mediante el marcaje con el Ac H-100 en muestras inmunoprecipitadas con  $\alpha$ Bgt\*sefarosa a partir de lisados de CCB en cultivo. El carril 1 corresponde con la muestra inmunoprecipitada. El carril 2 pertenece al control de proteína sin inmunoprecipitar. Los carriles 3 y 4, en los que no se observa ninguna banda, corresponden con los controles de la resina y de la  $\alpha$ Bgt, respectivamente. La identificación de una proteína de aproximadamente 55 kDa en los carriles 1 y 2 podría corresponder con la subunidad  $\alpha 3$  del nAChR.

Como se observa en la figura, el marcaje con el anticuerpo H-100 (selectivo para la subunidad  $\alpha 3$  del nAChR) produjo una banda correspondiente a un peso molecular de aproximadamente 55 kDa, similar al descrito para la subunidad  $\alpha 3$  del nAChR bovino (56 kDa) (Criado *et al.*, 1992), en los carriles correspondientes a la muestra inmunoprecipitada (1) y a su control de proteínas (2), tanto en la muestra obtenida a partir de CCB en cultivo, como en la obtenida a partir de tejido adrenomedular (datos no mostrados). Este resultado sugiere que esta subunidad podría encontrarse formando parte de un receptor nicotínico junto con la subunidad  $\alpha 7$  en CCB.

Para confirmar que, efectivamente, los receptores purificados contenían la subunidad  $\alpha 7$ , se eliminó el anticuerpo el Ac que reconocía a la subunidad  $\alpha 3$  y se realizó un nuevo marcaje de la membrana con el Ac mAb319, que reconoce selectivamente la subunidad  $\alpha 7$  del nAChR (**figura 34**).



**Figura 34.** Detección de la subunidad  $\alpha 7$  mediante el marcaje con el Ac mAb319 en muestras inmunoprecipitadas con  $\alpha$ Bgt\*sefarosa a partir de lisados de CCB en cultivo. El carril 1 corresponde con la muestra inmunoprecipitada. El carril 2 pertenece al control de proteína sin inmunoprecipitar. Los carriles 3 y 4, en los que no se observa ninguna banda, corresponden con los controles de la resina y de la  $\alpha$ Bgt, respectivamente. La identificación de una proteína de aproximadamente 60 kDa en los carriles 1 y 2 podría corresponder con la subunidad  $\alpha 7$  del nAChR.

Como se puede ver en la figura, la obtención de una banda correspondiente a un peso molecular aproximado de 60 kDa tras el marcaje con el Ac mAb319 (selectivo para la subunidad  $\alpha 7$  del nAChR), similar al peso molecular descrito para esta subunidad en CCB (57 kDa) (García-Guzmán *et al.*, 1995), parece confirmar que el uso de  $\alpha$ Bgt\*sefarosa permite purificar de forma selectiva los nAChRs que contienen la subunidad  $\alpha 7$ .

De estos resultados se puede deducir, por un lado, que el tratamiento con colagenasa no afecta a la expresión en membrana plasmática de los nAChRs bovinos que contienen la subunidad  $\alpha 7$  y, por otro, que estos receptores coexpresan las subunidades  $\alpha 7$  y  $\alpha 3$ , por lo que sería plausible la existencia de un receptor heteromérico complejo  $\alpha 3\alpha 7\beta 4^*$  en la célula cromafín bovina.



# **DISCUSIÓN**

La identidad de los receptores nicotínicos presentes en las CCB es una cuestión controvertida. Aunque desde el punto de vista molecular se haya constatado la presencia de subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$  y  $\beta 4$  en estas células (Criado *et al.*, 1992; García-Guzmán *et al.*, 1995; Campos-Caro *et al.*, 1997; Wenger *et al.*, 1997), la composición exacta en subunidades del receptor nativo es todavía desconocida.

Entre finales de los años 70 y principios de los 80, diversos autores trataron de mostrar la posible implicación del receptor  $\alpha 7$  en el proceso secretor de catecolaminas mediante el uso de  $\alpha$ Bgt como bloqueador selectivo (Wilson y Kirshner, 1977; Kumakura *et al.*, 1980; Trifaró y Lee, 1980; Kilpatrick *et al.*, 1981; Kageyama y Guidotti, 1984). Sin embargo, los resultados no fueron concluyentes, lo que llevó a sugerir que el control de la respuesta secretora en CCB se realizaba exclusivamente por los receptores nicotínicos del subtipo  $\alpha 3\beta 4$  y no por el  $\alpha 7$ .

Posteriormente, gracias al uso de nuevos protocolos experimentales (basados en la aplicación de pulsos muy breves de agonistas nicotínicos con el fin de evitar la desensibilización del receptor  $\alpha 7$ ) y nuevas herramientas farmacológicas (toxinas selectivas para bloquear los diferentes subtipos de nAChR), nuestro grupo sugirió que ambos receptores nicotínicos,  $\alpha 3\beta 4$  y  $\alpha 7$ , estaban implicados en la generación de corrientes nicotínicas, así como en el desencadenamiento de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y posterior secreción de catecolaminas en respuesta a la estimulación de las CCB con ACh (López *et al.*, 1998). Más recientemente, Fuentealba y colaboradores (Fuentealba *et al.*, 2004) propusieron que el receptor nicotínico  $\alpha 7$  también podría estar implicado en la hiperpolarización de la célula cromafín, además de participar en el proceso secretor de catecolaminas. En este trabajo, estimularon las CCB con Cho en condiciones de alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y observaron un incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  que, por un lado, contribuía a la secreción de catecolaminas y, por otro, a la activación de canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  cercanos al receptor, provocando así la hiperpolarización de la célula cromafín.

En base a estos antecedentes, el trabajo de nuestro grupo se centró inicialmente en el estudio del papel funcional de los receptores nicotínicos  $\alpha 7$  en la generación de señales dirigidas a la exocitosis de catecolaminas en las CCB. Sin embargo, pronto se advirtió la incoherencia entre los resultados experimentales que se iban obteniendo y el dogma, asentado en la literatura, de la presencia de un receptor nicotínico  $\alpha 7$  homomérico típico en este modelo celular. A partir de entonces, nuestro

trabajo se redirigió hacia la re-caracterización de los subtipos de receptores nicotínicos presentes en las CCB y más concretamente del subtipo  $\alpha 7$ .

El hecho de que hasta ahora no esté claro qué subtipos de nAChRs presentan las CCB se debe principalmente a dos motivos; por un lado, aún no ha sido posible poner de manifiesto respuestas nicotínicas  $\alpha 7$  típicas y, por otro, en los estudios publicados hasta el momento se han empleado concentraciones de antagonista tan elevadas que hacen que éste pierda su selectividad receptorial, dando lugar a datos de bloqueo de la respuesta nicotínica conflictivos.

Hay que tener en cuenta también que la selectividad de un determinado compuesto depende en gran medida de la especie en la que esté siendo analizado. A pesar de que las subunidades nicotínicas presentan secuencias muy conservadas y una alta homología entre especies, pequeñas diferencias en la composición en cuanto a aminoácidos en los lugares de unión a los diversos ligandos nicotínicos determinan dicha selectividad.

Así, se ha visto como la citisina o el TMAQ (5-(Trifluorometil)-6-(1-metil-azepan-4-il)metil-1H-quinolin-2-uno), potentes agonistas de receptores que contienen la subunidad  $\beta 4$ , son capaces de ejercer su efecto o no en función de la especie. Por ejemplo, mientras que la citisina actúa como agonista de estos receptores en rata (Luetje y Patrick, 1991; Papke y Heinemann, 1991; Papke y Heinemann, 1994), en receptores bovinos es incapaz de producir ninguna respuesta significativa (Campos-Caro *et al.*, 1997; Maneu *et al.*, 2002). De forma similar, el TMAQ actúa sobre receptores humanos, sin causar ningún efecto sobre receptores de rata (Young *et al.*, 2007).

Respecto a los antagonistas, también se han descrito grandes diferencias en cuanto a su capacidad de unión al receptor en función de la especie. Por ejemplo, la  $\alpha Bgt$  presenta una afinidad superior por el receptor  $\alpha 7$  de rata, que por el humano o el bovino (Ohana y Gershoni, 1990).

Por ello, todos los compuestos empleados en este trabajo se estudiaron inicialmente sobre receptores nicotínicos bovinos expresados en ovocitos de *Xenopus*, previamente a su uso sobre CCB. De esta forma, nos asegurábamos de que los distintos fármacos, a las concentraciones seleccionadas, ejercían su efecto de forma selectiva.

Basándonos en los experimentos de bloqueo por antagonistas selectivos  $\alpha 7$ , realizados por López y colaboradores en 1998, quisimos comprobar si concentraciones de bloqueador más bajas a las utilizadas en este estudio también eran capaces de producir un bloqueo en la corriente nicotínica inducida por ACh en CCB.

Los controles realizados en ovocitos de *Xenopus* dejaron patente la selectividad de los antagonistas MLA (10 nM) y  $\alpha$ Bgt (100 nM) sobre los nAChRs bovinos del subtipo  $\alpha 7$  (**figura 16**). Cuando se estudiaron estos compuestos sobre CCB, en ambos casos se obtuvo un bloqueo significativo de las corrientes nicotínicas (**figura 17**), lo que apoyaría inicialmente la hipótesis de la existencia de dos subtipos de receptores,  $\alpha 3\beta 4$  y  $\alpha 7$ , en este modelo celular.

Para corroborar la presencia de receptores  $\alpha 7$  funcionales en CCB se evaluó el efecto como agonista del PNU-282987 sobre CCB, una vez demostrada su selectividad sobre receptores nicotínicos bovinos  $\alpha 7$  expresados en ovocitos de *Xenopus* (**figura 19**). Lo esperable sería que la aplicación de pulsos breves de PNU-282987 indujese la activación de una corriente iónica proporcional al número de receptores  $\alpha 7$  presentes en la célula. Sin embargo, este agonista no fue capaz de inducir ninguna corriente significativa (**figura 20**), lo que hablaría en contra de la existencia de receptores  $\alpha 7$  homoméricos funcionales en CCB.

Como abordaje alternativo, y basándonos en la propiedad de los receptores nicotínicos de desensibilizarse en presencia continua del agonista, se perfundieron las CCB con el agonista  $\alpha 7$  PNU-282987, con la intención de anular de forma selectiva la función de los supuestos nAChRs  $\alpha 7$  presentes en las CCB. En esta serie de experimentos, la corriente inducida por ACh en estas células se vio disminuida en gran medida en presencia de PNU-282987 (**figura 22**), lo que de nuevo concordaría con la participación de un receptor  $\alpha 7$  en la generación de corrientes nicotínicas en CCB.

En base a estos datos, resulta paradójico comprobar cómo el grado de inhibición de la respuesta nicotínica, ya sea por el efecto de bloqueadores selectivos frente a la subunidad  $\alpha 7$ , como MLA o  $\alpha$ Bgt, o debido a la desensibilización por PNU-282987, es muchísimo mayor que el porcentaje de corriente que puede ser activada por la acción de un agonista selectivo sobre los supuestos receptores nicotínicos  $\alpha 7$  homoméricos presentes en las CCB (comparar las **figuras 17 y 22** con la **19**). Esta discrepancia podría estar de acuerdo con la posible existencia de un único receptor

nicotínico complejo, formado por la combinación de subunidades  $\alpha 7$  junto a subunidades  $\alpha 3$  y  $\beta 4$  y/o  $\alpha 5$ . Este receptor heteromérico “complejo” respondería adecuadamente a agonistas nicotínicos no selectivos, que se unirían a las subunidades  $\alpha 3$  y  $\alpha 7$  del receptor, produciendo la activación del mismo, como ocurre en el caso de la ACh. Sin embargo, sería incapaz de responder frente a agonistas selectivos  $\alpha 7$ , ya que éstos sólo serían capaces de unirse a una subunidad de tipo  $\alpha$ , por lo que no se activaría el receptor.

Respecto al bloqueo por antagonistas selectivos para este subtipo de receptor podrían darse dos alternativas: al bloquear la subunidad  $\alpha 7$  el receptor ya no puede ser activado y el porcentaje de bloqueo observado corresponde con el porcentaje de receptores heteroméricos presentes en las CCB; o bien, la unión del antagonista a una única subunidad  $\alpha 7$  puede dar lugar a un bloqueo parcial y no total, permitiendo así una pequeña activación del receptor que originaría la corriente nicotínica observada en presencia de antagonistas. Las diferencias en cuanto al grado de bloqueo entre  $\alpha$ Bgt y MLA podrían explicarse por las distintas afinidades que presentan uno u otro antagonista por el receptor. Hay que tener en cuenta que, a pesar de haber visto un bloqueo total de los receptores  $\alpha 7$  expresados en ovocitos a las concentraciones testadas, es posible que éstas no sean suficientes para bloquear todos los receptores que contienen la subunidad  $\alpha 7$  en CCB. Así, se ha visto que la afinidad de la  $\alpha$ Bgt por receptores expresados en ovocitos de *Xenopus* es notablemente superior que por receptores bovinos (Ohana y Gershoni, 1990). Si esto es así, es probable que 100 nM  $\alpha$ Bgt esté produciendo un mayor bloqueo en CCB que 10 nM MLA.

Por otra parte, la desensibilización en presencia continua de PNU-282987 provoca la inactivación de un mayor porcentaje de receptores que el uso de antagonistas. Es muy probable que este fenómeno sea debido a que la unión del PNU-282987 esté bloqueando el lugar de unión al agonista en el que participa la subunidad  $\alpha 7$ . El pequeño porcentaje de corriente que se observa puede ser debido a receptores parcialmente desensibilizados o a que la concentración de PNU-282987 fuera insuficiente para bloquear totalmente la mayor parte de los receptores presentes en las CCB.

Con objeto de poner de manifiesto la posible presencia de una pequeña población de receptores  $\alpha 7$  homoméricos en CCB, cuya corriente podría haber quedado enmascarada por la gran corriente nicotínica generada por una población mayoritaria de receptores  $\alpha 3\beta 4^*$ , se utilizó el modulador alostérico positivo PNU-

120596, que actúa selectivamente sobre nAChRs  $\alpha 7$  homoméricos. Su eficacia y selectividad sobre receptores  $\alpha 7$  bovinos fue estudiada previamente en ovocitos de *Xenopus* que expresaban heterológicamente receptores bovinos de los subtipos  $\alpha 7$  o  $\alpha 3\beta 4$ . Mientras que este compuesto no ejercía ningún efecto sobre receptores  $\alpha 3\beta 4$ , en el caso de receptores  $\alpha 7$  era capaz de potenciar enormemente la señal inducida por PNU-282987 y, además, esta potenciación era totalmente revertida en presencia de MLA o  $\alpha$ Bgt (**figuras 24 y 25**).

En las CCB no se observó ninguna potenciación de la respuesta nicotínica inducida por ACh o por PNU-282987 (**figura 26**), lo que sugiere nuevamente que los nAChRs  $\alpha 7$  homoméricos no estarían presentes en la membrana de las CCB.

Una posible explicación para esta discrepancia observada entre las corrientes nicotínicas registradas en ovocitos de *Xenopus* y las corrientes nicotínicas nativas que presentan las CCB podría deberse al hecho de que la composición en subunidades del nAChR afecta a la eficacia y la potencia de los diferentes agonistas (Zwart y Vijverberg, 1998; Vizi y Lendvai, 1999; Paterson y Nordberg, 2000) y a las características cinéticas de las corrientes inducidas por los diferentes agonistas nicotínicos (Wang *et al.*, 1996; Chávez-Noriega *et al.*, 1997).

Adicionalmente, la inclusión/exclusión de algún tipo de subunidad puede variar enormemente la afinidad del receptor por los diferentes agonistas (Ramírez-Latorre *et al.*, 1996; Gerzanich *et al.*, 1998). Así, por ejemplo, cabría la posibilidad de que la subunidad  $\alpha 5$  estuviera formando parte de los receptores nativos y por este motivo las corrientes nicotínicas observadas en CCB no se corresponderían con las observadas en ovocitos de *Xenopus*. Se ha descrito que la inclusión de la subunidad  $\alpha 5$  en receptores  $\alpha 3\beta 4$  expresados en ovocitos puede aumentar la desensibilización y la permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  del canal, llegando incluso a ser equiparables a las observadas en receptores  $\alpha 7$  homoméricos (Wang *et al.*, 1996; Sivilotti *et al.*, 1997; Gerzanich *et al.*, 1998), sin afectar drásticamente a su sensibilidad a agonistas como la ACh o la nicotina (Wang *et al.*, 1996; Campos-Caro *et al.*, 1997; Gerzanich *et al.*, 1998).

Es posible que los receptores nativos estén formados por subunidades  $\alpha 7$ ,  $\alpha 3$ , y  $\beta 4$  a diferentes estequiometrías de las probadas, pero también sería razonable pensar en la existencia de un receptor complejo formado por las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$  y  $\beta 4$  con características electrofisiológicas diferentes de las de los receptores nicotínicos  $\alpha 3\beta 4$  y  $\alpha 7$ .

Por otra parte, esta ausencia de respuesta en CCB a los ligandos selectivos para el nAChR del subtipo  $\alpha 7$  PNU-282987 y PNU-120596 también podría deberse a que la población de receptores  $\alpha 7$  fuera tan pequeña que no pudiera ser detectada mediante técnicas realizadas en célula única. De hecho, como se ha comentado en la *Introducción* (apartado 2.2), la médula adrenal está constituida principalmente por una población mixta de células cromafines; adrenérgicas y noradrenérgicas. La principal diferencia bioquímica entre ellas es la presencia en las células adrenérgicas de la enzima PNMT, así como la presencia de varios factores de transcripción que regulan la expresión de esta enzima, como Egr-1 o MAZ (Ebert *et al.*, 1994; Ebert y Wong, 1995; Criado *et al.*, 1997; Her *et al.*, 1999; Wong, 2003). Por otra parte, se ha descrito la existencia de lugares de unión a Egr-1 en el promotor del gen que codifica para la subunidad  $\alpha 7$  del nAChR (Criado *et al.*, 1997; Gault *et al.*, 1998; Nagavarapu *et al.*, 2001) y se piensa que este factor de transcripción actuaría potenciando la actividad del promotor (Criado *et al.*, 1997; Carrasco-Serrano *et al.*, 1998). Por todo ello, se ha propuesto que Egr-1 podría estar formando parte de un mecanismo común implicado en la inducción del fenotipo adrenérgico y en la expresión diferencial de receptores sensibles a  $\alpha$ Bgt en la glándula adrenal bovina (Criado *et al.*, 1997; Carrasco-Serrano *et al.*, 2000). Adicionalmente, experimentos de autorradiografía con  $\alpha$ Bgt en rodajas de glándulas adrenales bovinas demuestran que los receptores que contienen la subunidad  $\alpha 7$  colocan con la enzima PNMT y, además, el ARNm que codifica para esta subunidad también ha sido detectado en el mismo lugar (Criado *et al.*, 1997), por lo que se ha sugerido que las subunidades  $\alpha 7$  del nAChR en CCB se localizarían exclusivamente en células adrenérgicas.

Si partimos de la base de la existencia de una pequeña población de receptores  $\alpha 7$ , que además sólo se encuentra en células adrenérgicas, es posible que las técnicas en célula única no sean suficientes para poner de manifiesto una respuesta significativa. Para descartar tal posibilidad, se llevaron a cabo experimentos en poblaciones de CCB en los que se evaluaron los efectos de diversos compuestos selectivos del subtipo  $\alpha 7$  sobre la  $[Ca^{2+}]_c$  mediante fluorimetría.

Previamente a la utilización de CCB, se realizaron experimentos con células PC12, ya que está descrito que expresan receptores  $\alpha 7$  nativos (Blumenthal *et al.*, 1997), con el fin de comprobar que las condiciones experimentales eran las adecuadas (protocolo de estimulación, concentraciones de los distintos ligandos, etc.) (**figura 27**).

Como era de esperar, en células PC12 la ACh indujo un incremento de la  $[Ca^{2+}]_c$  que se vio potenciado en gran medida en presencia de PNU-120596 y revertido totalmente por  $\alpha$ Bgt o MLA. La estimulación con PNU-282987 produjo una elevación de la  $[Ca^{2+}]_c$  menor que la obtenida con ACh, que correspondería a la proporción de receptores del subtipo  $\alpha 7$  presentes en estas células. La preincubación con PNU-120596 antes de la estimulación con PNU-282987 dio lugar a un incremento en el nivel de  $Ca^{2+}_c$  similar al obtenido tras la estimulación con ACh, lo que demostraría que este modulador sólo ejerce su efecto sobre receptores  $\alpha 7$ . De igual forma, este incremento en la fluorescencia se revirtió en presencia de antagonistas selectivos como  $\alpha$ Bgt o MLA. Todos estos resultados demuestran que el protocolo experimental es adecuado para poner de manifiesto la presencia de receptores  $\alpha 7$  homoméricos funcionales, ya que la señal de calcio registrada con los compuestos selectivos  $\alpha 7$  parece corresponderse únicamente con la participación de este subtipo de receptor.

Sin embargo, en CCB, la ACh indujo un aumento de la  $[Ca^{2+}]_c$  que no se vio potenciado por PNU-120596, ni bloqueado por  $\alpha$ Bgt o MLA. El PNU-282987 también fue capaz de aumentar la señal de  $Ca^{2+}_c$ , aunque en menor medida que la ACh. Sin embargo, este incremento de calcio no se vio potenciado en presencia del modulador alostérico, ni bloqueado por los antagonistas selectivos, lo que parece indicar que el PNU-282987 en este caso no estaría ejerciendo su efecto sobre receptores  $\alpha 7$  típicos (**figura 28**). La posibilidad de que el efecto del modulador alostérico dependiera de la concentración de agonista quedó descartada tras la realización de curvas concentración-respuesta a ACh o PNU-282987 en presencia o ausencia de PNU-120596 (**figura 29**).

Como pudimos ver en los experimentos de *patch-clamp*, tanto  $\alpha$ Bgt, como MLA producían un bloqueo de las corrientes nicotínicas inducidas por ACh en CCB (**figura 17**). Probablemente, el % de receptores nicotínicos que permanecen activos son suficientes para producir una despolarización celular que permita la apertura de CCDV en el mismo grado que en ausencia de bloqueador. Por esta razón, no se observaron diferencias significativas en el nivel de  $Ca^{2+}_c$  en presencia de estos antagonistas.

Respecto al incremento de  $Ca^{2+}$  inducido por PNU-282987, no se ha podido demostrar que se deba a la activación de forma selectiva de nAChRs del subtipo  $\alpha 7$ . Sin embargo, el bloqueo de esta señal en presencia de mecamilamina dejó patente su naturaleza nicotínica (**figura 30**). Una posible explicación podría ser que el PNU-282987 estuviera activando parcialmente un receptor atípico, lo que apoyaría de nuevo

la hipótesis de la existencia de un receptor heteromérico complejo ( $\alpha 3\alpha 7\beta 4^*$ ) en CCB. El hecho de que no se haya observado ninguna respuesta significativa con PNU-282987 mediante la técnica de *patch-clamp* (**figura 22**), podría explicarse porque, al tratarse de un agonista parcial, produzca una señal tan pequeña que no pueda ser detectada mediante una técnica en célula única.

Por otra parte, la ausencia de respuesta con PNU-120596 podría deberse a que este compuesto requiera más de una subunidad  $\alpha 7$  para poder ejercer su efecto. Recientemente ha sido publicado un trabajo en el que proponen un posible mecanismo de unión del modulador al receptor  $\alpha 7$  (Barron *et al.*, 2009). Estos autores sugieren que el PNU-120596 se uniría en la interfase de dos subunidades  $\alpha$ , provocando así un cambio conformacional similar, aunque no igual, al producido por la ACh. Además, para que esta unión fuera posible, sería imprescindible que el agonista se encontrara ocupando sus lugares de unión en el receptor. La expresión de un receptor heteromérico complejo, en el que se incluiría la subunidad  $\alpha 7$ , podría explicar por qué en CCB el modulador alostérico no ha sido capaz de inducir ningún efecto significativo, ya que éste requiere al menos dos subunidades  $\alpha 7$  para poder unirse al receptor, tras la unión del agonista.

Respecto al papel de los canales de  $\text{Na}^+$  en el incremento de  $\text{Ca}^{2+}_c$ , no se ha podido demostrar una posible implicación en este proceso, puesto que no se observó ningún bloqueo de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  en presencia de TTX. Este resultado no debería sorprendernos, ya que, como se menciona en el apartado 3.1. de la *Introducción*, estos canales sólo participan como amplificadores de la señal nicotínica en condiciones de bajas concentraciones de ACh (inferiores a  $50 \mu\text{M}$ ) (Kidokoro y Ritchie, 1980) o de baja densidad de nAChRs. Por otra parte, en la célula cromafín bovina se ha descrito la presencia de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo T (Diverse-Pierluissi *et al.*, 1991; García-Palomero *et al.*, 2000), que, al igual que los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje, se abren a potenciales de membrana próximos a  $-60 \text{ mV}$ . La despolarización producida por la activación de los receptores nicotínicos *per se* sería suficiente para reclutar CCDV de tipo T, sin que fuera necesaria la intervención de los canales de  $\text{Na}^+$ .

La contribución de los CCDV al incremento de  $\text{Ca}^{2+}_c$  quedó patente con el elevado grado de bloqueo de la fluorescencia máxima observado en presencia de  $\text{Cd}^{2+}$ . Este resultado sugiere que, en la célula cromafín bovina, las variaciones en el nivel de  $\text{Ca}^{2+}_c$  en respuesta a la estimulación nicotínica son debidas, principalmente, a la activación de CCDV.

En los últimos años se ha descrito la participación de la mitocondria en la modulación de la secreción de neurotransmisores en CCB (Montero *et al.*, 2000; Montero *et al.*, 2001; Villalobos *et al.*, 2002). Sin embargo, esta organela no parece contribuir al incremento en los niveles citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a agonistas nicotínicos, puesto que no se observó ningún efecto sobre la fluorescencia máxima al preincubar las células con Rotenona/Oligomicina.

Respecto a la participación del retículo endoplásmico en las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  generadas por la activación de receptores nicotínicos, en la literatura aparecen varios trabajos que relacionan el nAChR  $\alpha 7$  con el fenómeno de CICR en distintos modelos celulares (Sharma y Vijayaraghavan, 2001; Dajas-Bailador *et al.*, 2002; Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004; Dickinson *et al.*, 2007). El denominado CICR (*Calcium-Induced Calcium Release*), descrito por primera vez por Fabiato (Fabiato, 1983), se caracteriza por la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE a través de los receptores de rianodina, como consecuencia de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los CCDV, amplificando y propagando así la señal de calcio por el citosol.

Con el objetivo de determinar la posible intervención del RE en la señal de  $\text{Ca}^{2+}_c$  inducida por la estimulación con ACh o PNU-282987, se preincubaron poblaciones de CCB con una mezcla de Cafeína+Rianodina+Tapsigargina, para depletar  $\text{Ca}^{2+}$  del RE e inactivarlo. En ambos casos se obtuvo un bloqueo de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , siendo mayor en el caso de la estimulación con PNU-282987, lo que podría sugerir la participación del RE en las variaciones de la concentración de este ión, vía estimulación de receptores que contienen la subunidad  $\alpha 7$ . Sin embargo, el grado de bloqueo observado es superior al que podría ser atribuible a la participación del RE (que corresponde al % de señal remanente tras el bloqueo con mecamilamina), por lo que sería razonable pensar que alguno de los componentes de la mezcla de depleción del RE podría estar bloqueando inespecíficamente los nAChRs.

A modo de resumen, podríamos decir que el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  en respuesta a agonistas nicotínicos, en poblaciones de CCB, es consecuencia, principalmente, del  $\text{Ca}^{2+}$  que entra a través de los CCDV (aproximadamente un 65% en el caso de la estimulación con ACh y un 80% al estimular con PNU-282987) y, en menor medida, del  $\text{Ca}^{2+}$  que entra a través de los nAChRs (alrededor de un 20% con ACh y de un 10% con PNU-282987) y del que sale del RE (15% tras la estimulación con ACh y un 10% al estimular con PNU-282987). Las diferencias entre uno y otro agonista se deberían a que, mientras el PNU-282987 estaría activando parcialmente

receptores que contienen la subunidad  $\alpha 7$ , la ACh actuaría de forma inespecífica activando todos los subtipos de nAChRs presentes en las CCB.

Por último, se realizaron experimentos de medida de la secreción de catecolaminas en poblaciones celulares en un nuevo intento de poner de manifiesto una pequeña población de receptores  $\alpha 7$  funcionales.

En los experimentos realizados con CCB, el PNU-282987 no fue capaz de inducir secreción de catecolaminas, ni el PNU-120596 produjo una potenciación de la secreción (**figura 31**), por lo que, una vez más, no se pudo demostrar la presencia de receptores  $\alpha 7$  homoméricos funcionales.

Paralelamente se llevaron a cabo experimentos similares a los anteriores, pero utilizando Cho (10 mM) como agonista selectivo del subtipo  $\alpha 7$  (Papke *et al.*, 1996), para descartar la posibilidad de que la falta de secreción tras la estimulación con PNU-282987 se debiera a un efecto específico de ese agonista (**figura 32**). A pesar de que la Cho indujo pequeños picos de secreción, éstos no fueron potenciados por PNU-120596, ni bloqueados por MLA. En la literatura está descrito que la Cho, además de activar selectivamente nAChRs del subtipo  $\alpha 7$ , puede comportarse como un agonista parcial de otros subtipos de receptores nicotínicos neuronales (Mandelzys *et al.*, 1995; Papke *et al.*, 1996; Alkondon *et al.*, 1997), por lo que podría estar actuando sobre un hipotético receptor heteromérico  $\alpha 3\alpha 7\beta 4^*$ . Otra posible explicación es que, la pequeña secreción que se observa con este agonista podría corresponderse con un efecto no selectivo sobre otros subtipos de receptores, ya que hemos observado en nuestro laboratorio que la Cho es capaz de inducir una pequeña corriente residual en ovocitos de *Xenopus* que expresan nAChRs  $\alpha 3\beta 4$  bovinos (González-Rubio *et al.*, 2006).

A modo de resumen, hasta ahora todos los estudios funcionales realizados en nuestro laboratorio hablan mayoritariamente en contra de la presencia de nAChRs  $\alpha 7$  homoméricos típicos en células cromafines bovinas. Estos resultados contrastan marcadamente con los datos previos de la literatura, tanto los referentes a la presencia de sitios de unión a  $\alpha$ Bgt (Wilson y Kirshner, 1977; Geertsen *et al.*, 1988; Geertsen *et al.*, 1990), como los datos de biología molecular que indican que estas células presentan ARNm que codifica para dicha subunidad (García-Guzmán *et al.*, 1995), o incluso con los datos de nuestro propio grupo que sugerían la participación de este subtipo de receptor nicotínico en el control de la secreción de catecolaminas (López *et al.*, 1998; Fuentealba *et al.*, 2004).

Estas discrepancias podrían justificarse si asumimos la existencia de un receptor nicotínico complejo  $\alpha 3\alpha 7\beta 4^*$  funcional. En este caso se explicaría la presencia de subunidades  $\alpha 7$  y de sitios de unión a  $\alpha$ Bgt, así como los datos de bloqueo con antagonistas selectivos o la desensibilización en presencia continua de PNU-282987. Además, el hecho de que el receptor sólo cuente con una subunidad  $\alpha 7$  también explicaría la ausencia de respuesta a agonistas selectivos como PNU-282987 o Cho y al modulador alostérico PNU-120596.

En los últimos años, han sido publicados varios trabajos que muestran evidencias de la expresión de receptores heteroméricos que contienen la subunidad  $\alpha 7$ . De esta forma, se ha descrito el co-ensamblaje de subunidades  $\alpha 7$  del nAChR junto con otras como  $\alpha 5$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  o  $\beta 4$ , para dar lugar a receptores funcionales en sistemas de expresión heteróloga (Yu y Role, 1998a; Yu y Role, 1998b; Girod *et al.*, 1999; Palma *et al.*, 1999; Khiroug *et al.*, 2002; Millar, 2003). Más recientemente, se ha sugerido la expresión de receptores heteroméricos nativos de este tipo en células PC12 (Virginio *et al.*, 2002), en neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal de ratón (Liu *et al.*, 2009) e incluso, en CCB (El-Hajj *et al.*, 2007).

En base a estos estudios y a los resultados farmacológicos obtenidos en CCB se trató de confirmar la posible existencia de un receptor heteromérico  $\alpha 3\alpha 7\beta 4^*$  en estas células, mediante la purificación de los receptores que contenían la subunidad  $\alpha 7$  del nAChR con  $\alpha$ Bgt conjugada a sefarosa. La identificación de una proteína de aproximadamente 56 kDa, similar al peso molecular descrito para la subunidad  $\alpha 3$  del nAChR bovino (Criado *et al.*, 1992), con el anticuerpo H-100 (que reconoce de forma selectiva la subunidad  $\alpha 3$  del nAChR), tanto en las muestras inmunoprecipitadas con  $\alpha$ Bgt\*sefarosa, como en los lisados originales sin inmunoprecipitar, sugiere la co-expresión de las subunidades  $\alpha 3$  y  $\alpha 7$  en un mismo receptor.

Por tanto, estos resultados muestran indicios de que la subunidad  $\alpha 7$  del nAChR pudiera estar formando parte de un receptor heteromérico funcional que, en relación con las subunidades descritas en CCB, estaría constituido por las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 7$ ,  $\beta 4$  y, probablemente,  $\alpha 5$ .

# **CONCLUSIONES**

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

1. El bloqueo por antagonistas selectivos del nAChR  $\alpha 7$ , o por desensibilización en presencia continua de PNU-282987, sugiere una posible implicación de receptores que contienen la subunidad  $\alpha 7$  en la generación de corrientes nicotínicas en CCB en cultivo.

2. La ausencia de respuesta a agonistas selectivos  $\alpha 7$  y al modulador alostérico PNU-120596 sugiere que las CCB no son capaces de expresar en su membrana receptores  $\alpha 7$  homoméricos funcionales.

3. El agonista selectivo del nAChR  $\alpha 7$  PNU-282987 es capaz de inducir un incremento en la concentración de calcio citosólico, medido en poblaciones de CCB, a través de la estimulación de receptores nicotínicos distintos a los nAChRs  $\alpha 7$  homoméricos típicos.

4. Este incremento de calcio citosólico no es eficaz a la hora de inducir secreción de catecolaminas en poblaciones de CCB.

5. La inmunoprecipitación con  $\alpha$ Bgt conjugada a sefarosa, a partir de muestras de tejido adrenomedular y de CCB en cultivo, permitió la purificación de receptores que contenían tanto la subunidad  $\alpha 7$ , como la subunidad  $\alpha 3$  del nAChR.

Como conclusión final de esta tesis: a pesar de haber constatado la presencia de subunidades  $\alpha 7$  en la célula cromafín bovina, no se ha podido demostrar que este tipo celular exprese receptores nicotínicos  $\alpha 7$  homoméricos funcionales en su membrana. Es probable que en células cromafines bovinas, esta subunidad se encuentre formando parte de un receptor heteromérico  $\alpha 3\alpha 7\beta 4^*$  funcional.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- ABAD-SANTOS, F. (1997). [In vitro models for the study of nerve lesions and potential neuroprotective drugs]. *Rev Neurol*, **25**, 2015-21.
- ALBILLOS, A., GARCÍA, A.G. Y GANDÍA, L. (1993). omega-Agatoxin-IVA-sensitive calcium channels in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett*, **336**, 259-62.
- ALBILLOS, A., ARTALEJO, A.R., LÓPEZ, M.G., GANDÍA, L., GARCÍA, A.G. Y CARBONE, E. (1994). Calcium channel subtypes in cat chromaffin cells. *J Physiol*, **477 ( Pt 2)**, 197-213.
- ALBILLOS, A., CARBONE, E., GANDÍA, L., GARCÍA, A.G. Y POLLO, A. (1996a). Opioid inhibition of Ca<sup>2+</sup> channel subtypes in bovine chromaffin cells: selectivity of action and voltage-dependence. *Eur J Neurosci*, **8**, 1561-70.
- ALBILLOS, A., GANDÍA, L., MICHELENA, P., GILABERT, J.A., DEL VALLE, M., CARBONE, E. Y GARCÍA, A.G. (1996b). The mechanism of calcium channel facilitation in bovine chromaffin cells. *J Physiol*, **494 ( Pt 3)**, 687-95.
- ALBILLOS, A., GARCÍA, A.G., OLIVERA, B. Y GANDÍA, L. (1996c). Re-evaluation of the P/Q Ca<sup>2+</sup> channel components of Ba<sup>2+</sup> currents in bovine chromaffin cells superfused with solutions containing low and high Ba<sup>2+</sup> concentrations. *Pflugers Arch*, **432**, 1030-8.
- ALBILLOS, A., NEHER, E. Y MOSER, T. (2000). R-Type Ca<sup>2+</sup> channels are coupled to the rapid component of secretion in mouse adrenal slice chromaffin cells. *J Neurosci*, **20**, 8323-30.
- ALKONDON, M., PEREIRA, E.F., CORTES, W.S., MAELICKE, A. Y ALBUQUERQUE, E.X. (1997). Choline is a selective agonist of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Eur J Neurosci*, **9**, 2734-42.
- AMADOR, M. Y DANI, J.A. (1995). Mechanism for modulation of nicotinic acetylcholine receptors that can influence synaptic transmission. *J Neurosci*, **15**, 4525-32.
- APPEL, N.M. Y ELDE, R.P. (1988). The intermediolateral cell column of the thoracic spinal cord is comprised of target-specific subnuclei: evidence from retrograde transport studies and immunohistochemistry. *J Neurosci*, **8**, 1767-75.
- ARIAS, E., ALÉS, E., GABILÁN, N.H., CANO-ABAD, M.F., VILLARROYA, M., GARCÍA, A.G. Y LÓPEZ, M.G. (2004). Galantamine prevents apoptosis induced by beta-amyloid and thapsigargin: involvement of nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, **46**, 103-14.
- ARIAS, H.R., RICHARDS, V.E., NG, D., GHAFoori, M.E., LE, V. Y MOUSA, S.A. (2009). Role of non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors in angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, **41**, 1441-51.
- ARNÁIZ-COT, J.J., DE DIEGO, A.M., HERNÁNDEZ-GUIJO, J.M., GANDÍA, L. Y GARCÍA, A.G. (2008). A two-step model for acetylcholine control of exocytosis via nicotinic receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, **365**, 413-9.
- ARTALEJO, A.R., GARCÍA, A.G. Y NEHER, E. (1993). Small-conductance Ca(2+)-activated K+ channels in bovine chromaffin cells. *Pflugers Arch*, **423**, 97-103.
- ARTALEJO, A.R. (1995). Electrical properties of adrenal chromaffin cells. In *The electrophysiology of neuroendocrine cells*. ed Inc., C.P. pp. 259-299: Eds. H. Scherubel and J. Hescheler.
- ARTALEJO, C.R., ARIANO, M.A., PERLMAN, R.L. Y FOX, A.P. (1990). Activation of facilitation calcium channels in chromaffin cells by D1 dopamine receptors through a cAMP/protein kinase A-dependent mechanism. *Nature*, **348**, 239-42.
- ARTALEJO, C.R., PERLMAN, R.L. Y FOX, A.P. (1992a). Omega-conotoxin GVIA blocks a Ca<sup>2+</sup> current in bovine chromaffin cells that is not of the "classic" N type. *Neuron*, **8**, 85-95.
- ARTALEJO, C.R., ROSSIE, S., PERLMAN, R.L. Y FOX, A.P. (1992b). Voltage-dependent phosphorylation may recruit Ca<sup>2+</sup> current facilitation in chromaffin cells. *Nature*, **358**, 63-6.

- ARTALEJO, C.R., ADAMS, M.E. Y FOX, A.P. (1994). Three types of Ca<sup>2+</sup> channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. *Nature*, **367**, 72-6.
- ARTALEJO, C.R., HENLEY, J.R., MCNIVEN, M.A. Y PALFREY, H.C. (1995). Rapid endocytosis coupled to exocytosis in adrenal chromaffin cells involves Ca<sup>2+</sup>, GTP, and dynamin but not clathrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8328-32.
- ARTALEJO, C.R., LEMMON, M.A., SCHLESSINGER, J. Y PALFREY, H.C. (1997). Specific role for the PH domain of dynamin-1 in the regulation of rapid endocytosis in adrenal chromaffin cells. *Embo J*, **16**, 1565-74.
- ARTALEJO, C.R., ELHAMDANI, A. Y PALFREY, H.C. (2002). Sustained stimulation shifts the mechanism of endocytosis from dynamin-1-dependent rapid endocytosis to clathrin- and dynamin-2-mediated slow endocytosis in chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 6358-63.
- AUGUSTINE, G.J., ADLER, E.M. Y CHARLTON, M.P. (1991). The calcium signal for transmitter secretion from presynaptic nerve terminals. *Ann N Y Acad Sci*, **635**, 365-81.
- AUNIS, D. (1998). Exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Int Rev Cytol*, **181**, 213-320.
- BARRON, S.C., MCLAUGHLIN, J.T., SEE, J.A., RICHARDS, V.L. Y ROSENBERG, R.L. (2009). The allosteric modulator of  $\alpha 7$  nicotinic receptors, PNU-120596, causes conformational changes in the extracellular ligand binding domain similar to acetylcholine. *Mol Pharmacol*.
- BIALES, B., DICHTER, M. Y TISCHLER, A. (1976). Electrical excitability of cultured adrenal chromaffin cells. *J Physiol*, **262**, 743-53.
- BIGORNIA, L., ALLEN, C.N., JAN, C.R., LYON, R.A., TITELER, M. Y SCHNEIDER, A.S. (1990). D<sub>2</sub> dopamine receptors modulate calcium channel currents and catecholamine secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *J Pharmacol Exp Ther*, **252**, 586-92.
- BLASCHKO, H. Y MUSCHOLL, E. (1972). Catecholamines. ed Springer-Verlag. New York.
- BLUMENTHAL, E.M., CONROY, W.G., ROMANO, S.J., KASSNER, P.D. Y BERG, D.K. (1997). Detection of functional nicotinic receptors blocked by alpha-bungarotoxin on PC12 cells and dependence of their expression on post-translational events. *J Neurosci*, **17**, 6094-104.
- BODNAR, A.L., CORTES-BURGOS, L.A., COOK, K.K., DINH, D.M., GROPPI, V.E., HAJÓS, M., HIGDON, N.R., HOFFMANN, W.E., HURST, R.S., MYERS, J.K., ROGERS, B.N., WALL, T.M., WOLFE, M.L. Y WONG, E. (2005). Discovery and structure-activity relationship of quinuclidine benzamides as agonists of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors. *J Med Chem*, **48**, 905-8.
- BOHLER, S., GAY, S., BERTRAND, S., CORRINGER, P.J., EDELSTEIN, S.J., CHANGEUX, J.P. Y BERTRAND, D. (2001). Desensitization of neuronal nicotinic acetylcholine receptors conferred by N-terminal segments of the beta 2 subunit. *Biochemistry*, **40**, 2066-74.
- BOORMAN, J.P., BEATO, M., GROOT-KORMELINK, P.J., BROADBENT, S.D. Y SIVILOTTI, L.G. (2003). The effects of beta3 subunit incorporation on the pharmacology and single channel properties of oocyte-expressed human  $\alpha 3\beta 4$  neuronal nicotinic receptors. *J Biol Chem*, **278**, 44033-40.
- BORGES, R., SALA, F. Y GARCÍA, A.G. (1986). Continuous monitoring of catecholamine release from perfused cat adrenals. *J Neurosci Methods*, **16**, 289-300.
- BORMANN, J. Y CLAPHAM, D.E. (1985).  $\gamma$ -Aminobutyric acid receptor channels in adrenal chromaffin cells: a patch-clamp study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 2168-72.
- BOSSU, J.L., DE WAARD, M. Y FELTZ, A. (1991a). Inactivation characteristics reveal two calcium currents in adult bovine chromaffin cells. *J Physiol*, **437**, 603-20.

- BOSSU, J.L., DE WAARD, M. Y FELTZ, A. (1991b). Two types of calcium channels are expressed in adult bovine chromaffin cells. *J Physiol*, **437**, 621-34.
- BOULTER, J., CONNOLLY, J., DENERIS, E., GOLDMAN, D., HEINEMANN, S. Y PATRICK, J. (1987). Functional expression of two neuronal nicotinic acetylcholine receptors from cDNA clones identifies a gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 7763-7.
- BOULTER, J., O'SHEA-GREENFIELD, A., DUVOISIN, R.M., CONNOLLY, J.G., WADA, E., JENSEN, A., GARDNER, P.D., BALLIVET, M., DENERIS, E.S., MCKINNON, D. Y ET AL. (1990). Alpha 3, alpha 5, and beta 4: three members of the rat neuronal nicotinic acetylcholine receptor-related gene family form a gene cluster. *J Biol Chem*, **265**, 4472-82.
- BOURNAUD, R., HIDALGO, J., YU, H., JAIMOVICH, E. Y SHIMAHARA, T. (2001). Low threshold T-type calcium current in rat embryonic chromaffin cells. *J Physiol*, **537**, 35-44.
- BRAKE, A.J., WAGENBACH, M.J. Y JULIUS, D. (1994). New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature*, **371**, 519-23.
- BRANDT, B.L., HAGIWARA, S., KIDOKORO, Y. Y MIYAZAKI, S. (1976). Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *J Physiol*, **263**, 417-39.
- BREJC, K., VAN DIJK, W.J., KLAASSEN, R.V., SCHUURMANS, M., VAN DER OOST, J., SMIT, A.B. Y SIXMA, T.K. (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature*, **411**, 269-76.
- BRUNS, D. Y JAHN, R. (1995). Real-time measurement of transmitter release from single synaptic vesicles. *Nature*, **377**, 62-5.
- BUISSON, B. Y BERTRAND, D. (2001). Chronic exposure to nicotine upregulates the human (alpha)4((beta)2 nicotinic acetylcholine receptor function. *J Neurosci*, **21**, 1819-29.
- BURGOYNE, R.D. (1991). Control of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta*, **1071**, 174-202.
- CACHELIN, A.B. Y JAGGI, R. (1991). Beta subunits determine the time course of desensitization in rat alpha 3 neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Pflugers Arch*, **419**, 579-82.
- CAMPOS-CARO, A., SMILLIE, F.I., DOMÍNGUEZ DEL TORO, E., ROVIRA, J.C., VICENTE-AGULLO, F., CHAPULI, J., JUÍZ, J.M., SALA, S., SALA, F., BALLESTA, J.J. Y CRIADO, M. (1997). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors on bovine chromaffin cells: cloning, expression, and genomic organization of receptor subunits. *J Neurochem*, **68**, 488-97.
- CARABELLI, V., GIANCIPPOLI, A., BALDELLI, P., CARBONE, E. Y ARTALEJO, A.R. (2003). Distinct potentiation of L-type currents and secretion by cAMP in rat chromaffin cells. *Biophys J*, **85**, 1326-37.
- CARABELLI, V., MARCANTONI, A., COMUNANZA, V. Y CARBONE, E. (2007). Fast exocytosis mediated by T- and L-type channels in chromaffin cells: distinct voltage-dependence but similar Ca<sup>2+</sup> -dependence. *Eur Biophys J*, **36**, 753-62.
- CARMICHAEL, S.W. Y STODDARD, S.L. (1992). The adrenal medulla, 1989-1991. ed Inc., C.P. Boca Ratón. Florida, USA. .
- CARRASCO-SERRANO, C., CAMPOS-CARO, A., VINIEGRA, S., BALLESTA, J.J. Y CRIADO, M. (1998). GC- and E-box motifs as regulatory elements in the proximal promoter region of the neuronal nicotinic receptor alpha7 subunit gene. *J Biol Chem*, **273**, 20021-8.
- CARRASCO-SERRANO, C., VINIEGRA, S., BALLESTA, J.J. Y CRIADO, M. (2000). Phorbol ester activation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit gene: involvement of transcription factor Egr-1. *J Neurochem*, **74**, 932-9.

- CASTRO, E., OSET-GASQUE, M.J. Y GONZÁLEZ, M.P. (1989). GABAA and GABAB receptors are functionally active in the regulation of catecholamine secretion by bovine chromaffin cells. *J Neurosci Res*, **23**, 290-6.
- CASTRO, E., TOME, A.R., MIRAS-PORTUGAL, M.T. Y ROSARIO, L.M. (1994). Single-cell fura-2 microfluorometry reveals different purinoceptor subtypes coupled to Ca<sup>2+</sup> influx and intracellular Ca<sup>2+</sup> release in bovine adrenal chromaffin and endothelial cells. *Pflugers Arch*, **426**, 524-33.
- CLARKE, P.B. (1993). Nicotinic receptors in mammalian brain: localization and relation to cholinergic innervation. *Prog Brain Res*, **98**, 77-83.
- CLEMENTI, F., FORNASARI, D. Y GOTTI, C. (2000). Neuronal nicotinic receptors, important new players in brain function. *Eur J Pharmacol*, **393**, 3-10.
- COCCHIA, D. Y MICHETTI, F. (1981). S-100 antigen in satellite cells of the adrenal medulla and the superior cervical ganglion of the rat. An immunohistochemical and immunocytochemical study. *Cell Tissue Res*, **215**, 103-12.
- COLE, K.S. (1949). Some physical aspects of bioelectric phenomena. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **35**, 558-66.
- COLLINGRIDGE, G.L., OLSEN, R.W., PETERS, J. Y SPEDDING, M. (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*, **56**, 2-5.
- COMBI, R., DALPRA, L., TENCHINI, M.L. Y FERINI-STRAMBI, L. (2004). Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy--a critical overview. *J Neurol*, **251**, 923-34.
- CORDERO-ERAUSQUIN, M., MARUBIO, L.M., KLINK, R. Y CHANGEUX, J.P. (2000). Nicotinic receptor function: new perspectives from knockout mice. *Trends Pharmacol Sci*, **21**, 211-7.
- CORRINGER, P.J., BERTRAND, S., GALZI, J.L., DEVILLERS-THIERY, A., CHANGEUX, J.P. Y BERTRAND, D. (1999). Molecular basis of the charge selectivity of nicotinic acetylcholine receptor and related ligand-gated ion channels. *Novartis Found Symp*, **225**, 215-24; discussion 224-30.
- CORRINGER, P.J., LE NOVERE, N. Y CHANGEUX, J.P. (2000). Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **40**, 431-58.
- COUPLAND, R. (1965). The natural history of the chromaffin cell. ed Longmans. London.
- COURT, J.A., PIGGOTT, M.A., LLOYD, S., COOKSON, N., BALLARD, C.G., MCKEITH, I.G., PERRY, R.H. Y PERRY, E.K. (2000). Nicotine binding in human striatum: elevation in schizophrenia and reductions in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Alzheimer's disease and in relation to neuroleptic medication. *Neuroscience*, **98**, 79-87.
- CRiado, M., ALAMO, L. Y NAVARRO, A. (1992). Primary structure of an agonist binding subunit of the nicotinic acetylcholine receptor from bovine adrenal chromaffin cells. *Neurochem Res*, **17**, 281-7.
- CRiado, M., DOMÍNGUEZ DEL TORO, E., CARRASCO-SERRANO, C., SMILLIE, F.I., JUIZ, J.M., VINIEGRA, S. Y BALLESTA, J.J. (1997). Differential expression of alpha-bungarotoxin-sensitive neuronal nicotinic receptors in adrenergic chromaffin cells: a role for transcription factor Egr-1. *J Neurosci*, **17**, 6554-64.
- CHAMPTIAUX, N., GOTTI, C., CORDERO-ERAUSQUIN, M., DAVID, D.J., PRZYBYLSKI, C., LENA, C., CLEMENTI, F., MORETTI, M., ROSSI, F.M., LE NOVERE, N., MCINTOSH, J.M., GARDIER, A.M. Y CHANGEUX, J.P. (2003). Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knockout mice. *J Neurosci*, **23**, 7820-9.
- CHAMPTIAUX, N. Y CHANGEUX, J.P. (2004). Knockout and knockin mice to investigate the role of nicotinic receptors in the central nervous system. *Prog Brain Res*, **145**, 235-51.
- CHANGEUX, J.P., DEVILLERS-THIERY, A. Y CHEMOULLI, P. (1984). Acetylcholine receptor: an allosteric protein. *Science*, **225**, 1335-45.

- CHANGEUX, J.P. Y EDELSTEIN, S.J. (1998). Allosteric receptors after 30 years. *Neuron*, **21**, 959-80.
- CHANGEUX, J.P. Y EDELSTEIN, S.J. (2005). Allosteric mechanisms of signal transduction. *Science*, **308**, 1424-8.
- CHÁVEZ-NORIEGA, L.E., CRONA, J.H., WASHBURN, M.S., URRUTIA, A., ELLIOTT, K.J. Y JOHNSON, E.C. (1997). Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors h alpha 2 beta 2, h alpha 2 beta 4, h alpha 3 beta 2, h alpha 3 beta 4, h alpha 4 beta 2, h alpha 4 beta 4 and h alpha 7 expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, **280**, 346-56.
- CHEEK, T.R., MURAWSKY, M.M. Y STAUDERMAN, K.A. (1994). Histamine-induced Ca<sup>2+</sup> entry precedes Ca<sup>2+</sup> mobilization in bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem J*, **304 ( Pt 2)**, 469-76.
- CHOI, A.Y., CAHILL, A.L., PERRY, B.D. Y PERLMAN, R.L. (1993). Histamine evokes greater increases in phosphatidylinositol metabolism and catecholamine secretion in epinephrine-containing than in norepinephrine-containing chromaffin cells. *J Neurochem*, **61**, 541-9.
- DAJAS-BAILADOR, F. Y WONNACOTT, S. (2004). Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci*, **25**, 317-24.
- DAJAS-BAILADOR, F.A., MOGG, A.J. Y WONNACOTT, S. (2002). Intracellular Ca<sup>2+</sup> signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells: contribution of voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels and Ca<sup>2+</sup> stores. *J Neurochem*, **81**, 606-14.
- DANI, J.A. (2001). Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol Psychiatry*, **49**, 166-74.
- DE DIEGO, A.M., GANDÍA, L. Y GARCÍA, A.G. (2008). A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta Physiol (Oxf)*, **192**, 287-301.
- DI ANGELANTONIO, S., MATTEONI, C., FABBRETTI, E. Y NISTRI, A. (2003). Molecular biology and electrophysiology of neuronal nicotinic receptors of rat chromaffin cells. *Eur J Neurosci*, **17**, 2313-22.
- DICKINSON, J.A., HANROTT, K.E., MOK, M.H., KEW, J.N. Y WONNACOTT, S. (2007). Differential coupling of alpha7 and non-alpha7 nicotinic acetylcholine receptors to calcium-induced calcium release and voltage-operated calcium channels in PC12 cells. *J Neurochem*, **100**, 1089-96.
- DIVERSE-PIERLUISSI, M., DUNLAP, K. Y WESTHEAD, E.W. (1991). Multiple actions of extracellular ATP on calcium currents in cultured bovine chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 1261-5.
- DOUGHERTY, D.A. Y LESTER, H.A. (2001). Neurobiology. Snails, synapses and smokers. *Nature*, **411**, 252-3, 255.
- DOUGLAS, W.W. Y RUBIN, R.P. (1961). The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J Physiol*, **159**, 40-57.
- DOUGLAS, W.W. Y POISNER, A.M. (1965). Preferential release of adrenaline from the adrenal medulla by muscarine and pilocarpine. *Nature*, **208**, 1102-3.
- DOUGLAS, W.W., KANNO, T. Y SAMPSON, S.R. (1967). Effects of acetylcholine and other medullary secretagogues and antagonists on the membrane potential of adrenal chromaffin cells: an analysis employing techniques of tissue culture. In *J Physiol*. pp. 107-20.
- DOUGLAS, W.W. (1968). Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol*, **34**, 451-74.
- DUNN, P.M., ZHONG, Y. Y BURNSTOCK, G. (2001). P2X receptors in peripheral neurons. *Prog Neurobiol*, **65**, 107-34.

- DUVOISIN, R.M., DENERIS, E.S., PATRICK, J. Y HEINEMANN, S. (1989). The functional diversity of the neuronal nicotinic acetylcholine receptors is increased by a novel subunit: beta 4. *Neuron*, **3**, 487-96.
- EBERT, S.N., BALZ, S.L., HUNTER, J.P., GASHLER, A., SUKHATME, V. Y WONG, D.L. (1994). Egr-1 activation of rat adrenal phenylethanolamine N-methyltransferase gene. *J Biol Chem*, **269**, 20885-98.
- EBERT, S.N. Y WONG, D.L. (1995). Differential activation of the rat phenylethanolamine N-methyltransferase gene by Sp1 and Egr-1. *J Biol Chem*, **270**, 17299-305.
- EGEA, J., ROSA, A.O., CUADRADO, A., GARCÍA, A.G. Y LÓPEZ, M.G. (2007). Nicotinic receptor activation by epibatidine induces heme oxygenase-1 and protects chromaffin cells against oxidative stress. *J Neurochem*, **102**, 1842-52.
- EGLTON, R.D., BROWN, K.C. Y DASGUPTA, P. (2008). Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: multiple roles in proliferation and inhibition of apoptosis. *Trends Pharmacol Sci*, **29**, 151-8.
- EL-HAJJ, R.A., MCKAY, S.B. Y MCKAY, D.B. (2007). Pharmacological and immunological identification of native alpha7 nicotinic receptors: evidence for homomeric and heteromeric alpha7 receptors. *Life Sci*, **81**, 1317-22.
- ELGOYHEN, A.B., VETTER, D.E., KATZ, E., ROTHLIN, C.V., HEINEMANN, S.F. Y BOULTER, J. (2001). alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3501-6.
- ENGISCH, K.L. Y NOWYCKY, M.C. (1998). Compensatory and excess retrieval: two types of endocytosis following single step depolarizations in bovine adrenal chromaffin cells. *J Physiol*, **506 ( Pt 3)**, 591-608.
- FABIATO, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol*, **245**, C1-14.
- FAWCETT, D., JENSH, R. Y W, B. (2002). Bloom & Fawcett's concise histology. ed Arnold. London.
- FELDBERG, W., MINZ, B. Y TSUDZIMURA, H. (1934). The mechanism of the nervous discharge of adrenaline. *J Physiol*, **81**, 286-304.
- FENSTER, C.P., RAINS, M.F., NOERAGER, B., QUICK, M.W. Y LESTER, R.A. (1997). Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine. *J Neurosci*, **17**, 5747-59.
- FENWICK, E.M., MARTY, A. Y NEHER, E. (1982). Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol*, **331**, 599-635.
- FERNÁNDEZ-VIVERO, J., RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, F., VERASTEGUI, C., CÓRDOBA MORIANO, F., ROMERO, A. Y DE CASTRO, J.M. (1993). Immunocytochemical distribution of serotonin and neuropeptide Y (NPY) in mouse adrenal gland. *Histol Histopathol*, **8**, 509-20.
- FOMINA, A.F. Y NOWYCKY, M.C. (1999). A current activated on depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores can regulate exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J Neurosci*, **19**, 3711-22.
- FOWLER, C.D., ARENDS, M.A. Y KENNY, P.J. (2008). Subtypes of nicotinic acetylcholine receptors in nicotine reward, dependence, and withdrawal: evidence from genetically modified mice. *Behav Pharmacol*, **19**, 461-84.
- FUCILE, S. (2004). Ca<sup>2+</sup> permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium*, **35**, 1-8.
- FUENTEALBA, J., OLIVARES, R., ALÉS, E., TAPIA, L., ROJO, J., ARROYO, G., ALDEA, M., CRIADO, M., GANDÍA, L. Y GARCÍA, A.G. (2004). A choline-evoked [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signal causes catecholamine release and hyperpolarization of chromaffin cells. *Faseb J*, **18**, 1468-70.
- FUJII, T., TAKADA-TAKATORI, Y. Y KAWASHIMA, K. (2008). Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of an independent, non-neuronal

- cholinergic system in lymphocytes and its clinical significance in immunotherapy. *J Pharmacol Sci*, **106**, 186-92.
- FUJITA, T. (1977). Concept of paraneurons. *Arch Histol Jpn*, **40 Suppl**, 1-12.
- GAHRING, L.C. Y ROGERS, S.W. (2005). Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells. *Aaps J*, **7**, E885-94.
- GANDÍA, L., ALBILLOS, A. Y GARCÍA, A.G. (1993a). Bovine chromaffin cells possess FTX-sensitive calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun*, **194**, 671-6.
- GANDÍA, L., GARCÍA, A.G. Y MORAD, M. (1993b). ATP modulation of calcium channels in chromaffin cells. *J Physiol*, **470**, 55-72.
- GARCÍA-GUZMÁN, M., SALA, F., SALA, S., CAMPOS-CARO, A., STUHMER, W., GUTIÉRREZ, L.M. Y CRIADO, M. (1995). alpha-Bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors on bovine chromaffin cells: molecular cloning, functional expression and alternative splicing of the alpha 7 subunit. *Eur J Neurosci*, **7**, 647-55.
- GARCÍA-PALOMERO, E., CUCHILLO-IBÁÑEZ, I., GARCÍA, A.G., RENART, J., ALBILLOS, A. Y MONTIEL, C. (2000). Greater diversity than previously thought of chromaffin cell Ca<sup>2+</sup> channels, derived from mRNA identification studies. *FEBS Lett*, **481**, 235-9.
- GARCÍA, A.G., SALA, F., REIG, J.A., VINIEGRA, S., FRÍAS, J., FONTERIZ, R. Y GANDÍA, L. (1984). Dihydropyridine BAY-K-8644 activates chromaffin cell calcium channels. *Nature*, **309**, 69-71.
- GARCÍA, A.G., GARCÍA-DE-DIEGO, A.M., GANDÍA, L., BORGES, R. Y GARCÍA-SANCHO, J. (2006). Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev*, **86**, 1093-131.
- GARCÍA, A.G., GANDÍA, L., LÓPEZ, M.G. Y MONTIEL, C. (2000). Calcium channels for exocytosis: functional modulation with toxins. . In *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection*. ed Marcel-Decker, B.L. pp. 91-124. New York.
- GAULT, J., ROBINSON, M., BERGER, R., DREBING, C., LOGEL, J., HOPKINS, J., MOORE, T., JACOBS, S., MERIWETHER, J., CHOI, M.J., KIM, E.J., WALTON, K., BUTING, K., DAVIS, A., BREESE, C., FREEDMAN, R. Y LEONARD, S. (1998). Genomic organization and partial duplication of the human alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene (CHRNA7). *Genomics*, **52**, 173-85.
- GEERTSEN, S., AFAR, R., TRIFARÓ, J.M. Y QUIK, M. (1988). Regulation of alpha-bungarotoxin sites in chromaffin cells in culture by nicotinic receptor ligands, K<sup>+</sup>, and cAMP. *Mol Pharmacol*, **34**, 549-56.
- GEERTSEN, S., AFAR, R., TRIFARÓ, J.M. Y QUIK, M. (1990). Phorbol esters and d-tubocurarine up-regulate alpha-bungarotoxin sites in chromaffin cells in culture via distinct mechanisms. *Neuroscience*, **34**, 441-50.
- GENTRY, C.L. Y LUKAS, R.J. (2002). Regulation of nicotinic acetylcholine receptor numbers and function by chronic nicotine exposure. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, **1**, 359-85.
- GERZANICH, V., WANG, F., KURYATOV, A. Y LINDSTROM, J. (1998). alpha 5 Subunit alters desensitization, pharmacology, Ca<sup>++</sup> permeability and Ca<sup>++</sup> modulation of human neuronal alpha 3 nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, **286**, 311-20.
- GINIATULLIN, R., NISTRÍ, A. Y YAKEL, J.L. (2005). Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. *Trends Neurosci*, **28**, 371-8.
- GIROD, R., CRABTREE, G., ERNSTROM, G., RAMÍREZ-LATORRE, J., MCGEHEE, D., TURNER, J. Y ROLE, L. (1999). Heteromeric complexes of alpha 5 and/or alpha 7 subunits. Effects of calcium and potential role in nicotine-induced presynaptic facilitation. *Ann N Y Acad Sci*, **868**, 578-90.

- GONZÁLEZ-GARCÍA, C., CENA, V., KEISER, H.R. Y ROJAS, E. (1993). Catecholamine secretion induced by tetraethylammonium from cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta*, **1177**, 99-105.
- GONZÁLEZ-RUBIO, J.M., ROJO, J., TAPIA, L., MANEU, V., MULET, J., VALOR, L.M., CRIADO, M., SALA, F., GARCÍA, A.G. Y GANDÍA, L. (2006). Activation and blockade by choline of bovine alpha7 and alpha3beta4 nicotinic receptors expressed in oocytes. *Eur J Pharmacol*, **535**, 53-60.
- GONZÁLEZ, M.P., HERRERO, M.T., VICENTE, S. Y OSET-GASQUE, M.J. (1998). Effect of glutamate receptor agonists on catecholamine secretion in bovine chromaffin cells. *Neuroendocrinology*, **67**, 181-9.
- GOTTI, C., FORNASARI, D. Y CLEMENTI, F. (1997). Human neuronal nicotinic receptors. *Prog Neurobiol*, **53**, 199-237.
- GOTTI, C. Y CLEMENTI, F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol*, **74**, 363-96.
- GRANON, S., FAURE, P. Y CHANGEUX, J.P. (2003). Executive and social behaviors under nicotinic receptor regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 9596-601.
- GRAY, R., RAJAN, A.S., RADCLIFFE, K.A., YAKEHIRO, M. Y DANI, J.A. (1996). Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature*, **383**, 713-6.
- GREEN, D.J. Y PERLMAN, R.L. (1981). On-line measurement of catecholamine secretion. *Anal Biochem*, **110**, 270-6.
- GRONLIEN, J.H., HAKERUD, M., WEEN, H., THORIN-HAGENE, K., BRIGGS, C.A., GOPALAKRISHNAN, M. Y MALYSZ, J. (2007). Distinct profiles of alpha7 nAChR positive allosteric modulation revealed by structurally diverse chemotypes. *Mol Pharmacol*, **72**, 715-24.
- GWILT, C.R., DONNELLY, L.E. Y ROGERS, D.F. (2007). The non-neuronal cholinergic system in the airways: an unappreciated regulatory role in pulmonary inflammation? *Pharmacol Ther*, **115**, 208-22.
- HAJÓS, M., HURST, R.S., HOFFMANN, W.E., KRAUSE, M., WALL, T.M., HIGDON, N.R. Y GROPPA, V.E. (2005). The selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PNU-282987 [N-[(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-4-chlorobenzamide hydrochloride] enhances GABAergic synaptic activity in brain slices and restores auditory gating deficits in anesthetized rats. *J Pharmacol Exp Ther*, **312**, 1213-22.
- HAMILL, O.P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B. Y SIGWORTH, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, **391**, 85-100.
- HANS, M., ILLES, P. Y TAKEDA, K. (1990). The blocking effects of omega-conotoxin on Ca current in bovine chromaffin cells. *Neurosci Lett*, **114**, 63-8.
- HARVEY, S.C. Y LUETJE, C.W. (1996). Determinants of competitive antagonist sensitivity on neuronal nicotinic receptor beta subunits. *J Neurosci*, **16**, 3798-806.
- HEIDELBERGER, R., HEINEMANN, C., NEHER, E. Y MATTHEWS, G. (1994). Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature*, **371**, 513-5.
- HEINEMANN, C., CHOW, R.H., NEHER, E. Y ZUCKER, R.S. (1994). Kinetics of the secretory response in bovine chromaffin cells following flash photolysis of caged Ca<sup>2+</sup>. *Biophys J*, **67**, 2546-57.
- HENDERSON, L.P., GDOVIN, M.J., LIU, C., GARDNER, P.D. Y MAUE, R.A. (1994). Nerve growth factor increases nicotinic ACh receptor gene expression and current density in wild-type and protein kinase A-deficient PC12 cells. *J Neurosci*, **14**, 1153-63.

- HENKEL, A.W. Y ALMERS, W. (1996). Fast steps in exocytosis and endocytosis studied by capacitance measurements in endocrine cells. *Curr Opin Neurobiol*, **6**, 350-7.
- HER, S., BELL, R.A., BLOOM, A.K., SIDDALL, B.J. Y WONG, D.L. (1999). Phenylethanolamine N-methyltransferase gene expression. Sp1 and MAZ potential for tissue-specific expression. *J Biol Chem*, **274**, 8698-707.
- HERRERA, M., KAO, L.S., CURRAN, D.J. Y WESTHEAD, E.W. (1985). Flow-injection analysis of catecholamine secretion from bovine adrenal medulla cells on microbeads. *Anal Biochem*, **144**, 218-27.
- HIRAMOTO, T., CHIDA, Y., SONODA, J., YOSHIHARA, K., SUDO, N. Y KUBO, C. (2008). The hepatic vagus nerve attenuates Fas-induced apoptosis in the mouse liver via alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Gastroenterology*, **134**, 2122-31.
- HODGKIN, A.L., HUXLEY, A.F. Y KATZ, B. (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. *J Physiol*, **116**, 424-48.
- HOLETS, V. Y ELDE, R. (1982). The differential distribution and relationship of serotonergic and peptidergic fibers to sympathoadrenal neurons in the intermediolateral cell column of the rat: a combined retrograde axonal transport and immunofluorescence study. *Neuroscience*, **7**, 1155-74.
- HOLGERT, H., AMAN, K., COZZARI, C., HARTMAN, B.K., BRIMIJOIN, S., EMSON, P., GOLDSTEIN, M. Y HOKFELT, T. (1995). The cholinergic innervation of the adrenal gland and its relation to enkephalin and nitric oxide synthase. *Neuroreport*, **6**, 2576-80.
- HOLLINS, B. Y IKEDA, S.R. (1996). Inward currents underlying action potentials in rat adrenal chromaffin cells. *J Neurophysiol*, **76**, 1195-211.
- HOLLMANN, M. Y HEINEMANN, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*, **17**, 31-108.
- HOSHI, T. Y SMITH, S.J. (1987). Large depolarization induces long openings of voltage-dependent calcium channels in adrenal chromaffin cells. *J Neurosci*, **7**, 571-80.
- HURST, R.S., HAJÓS, M., RAGGENBASS, M., WALL, T.M., HIGDON, N.R., LAWSON, J.A., RUTHERFORD-ROOT, K.L., BERKENPAS, M.B., HOFFMANN, W.E., PIOTROWSKI, D.W., GROPPI, V.E., ALLAMAN, G., OGIER, R., BERTRAND, S., BERTRAND, D. Y ARNERIC, S.P. (2005). A novel positive allosteric modulator of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor: in vitro and in vivo characterization. *J Neurosci*, **25**, 4396-405.
- IKEDA, S.R. (1991). Double-pulse calcium channel current facilitation in adult rat sympathetic neurones. *J Physiol*, **439**, 181-214.
- INOUE, M. Y IMANAGA, I. (1993). G protein-mediated inhibition of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in guinea pig chromaffin cells. *Am J Physiol*, **265**, C946-56.
- JAGGER, D.J., GRIESINGER, C.B., RIVOLTA, M.N., HOLLEY, M.C. Y ASHMORE, J.F. (2000). Calcium signalling mediated by the 9 acetylcholine receptor in a cochlear cell line from the immortal mouse. *J Physiol*, **527 Pt 1**, 49-54.
- JENSEN, A.A., FROLUND, B., LILJEFORS, T. Y KROGSGAARD-LARSEN, P. (2005). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *J Med Chem*, **48**, 4705-45.
- JOHENNING, F.W., ZOCHOWSKI, M., CONWAY, S.J., HOLMES, A.B., KOULEN, P. Y EHRLICH, B.E. (2002). Distinct intracellular calcium transients in neurites and somata integrate neuronal signals. *J Neurosci*, **22**, 5344-53.
- JOHNSON, D.S., MARTÍNEZ, J., ELGOYHEN, A.B., HEINEMANN, S.F. Y MCINTOSH, J.M. (1995). alpha-Conotoxin Iml exhibits subtype-specific nicotinic acetylcholine receptor blockade: preferential inhibition of homomeric alpha 7 and alpha 9 receptors. *Mol Pharmacol*, **48**, 194-9.
- JONES, S., SUDWEEKS, S. Y YAKEL, J.L. (1999). Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function. *Trends Neurosci*, **22**, 555-61.

- KAGEYAMA, H. Y GUIDOTTI, A. (1984). Effect of alpha-bungarotoxin and etorphine on acetylcholine-evoked release of endogenous and radiolabeled catecholamines from primary culture of adrenal chromaffin cells. *J Neurosci Methods*, **10**, 9-16.
- KAJIWARA, R., SAND, O., KIDOKORO, Y., BARISH, M.E. Y IJIMA, T. (1997). Functional organization of chromaffin cells and cholinergic synaptic transmission in rat adrenal medulla. *Jpn J Physiol*, **47**, 449-64.
- KANEKO, S., MAEDA, T., KUME, T., KOCHIYAMA, H., AKAIKE, A., SHIMOHAMA, S. Y KIMURA, J. (1997). Nicotine protects cultured cortical neurons against glutamate-induced cytotoxicity via alpha7-neuronal receptors and neuronal CNS receptors. *Brain Res*, **765**, 135-40.
- KAO, P.N. Y KARLIN, A. (1986). Acetylcholine receptor binding site contains a disulfide cross-link between adjacent half-cystinyl residues. *J Biol Chem*, **261**, 8085-8.
- KARLIN, A. Y AKABAS, M.H. (1995). Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron*, **15**, 1231-44.
- KARLIN, A. (2002). Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci*, **3**, 102-14.
- KATZ, E., VERBITSKY, M., ROTHLIN, C.V., VETTER, D.E., HEINEMANN, S.F. Y ELGOYHEN, A.B. (2000). High calcium permeability and calcium block of the alpha9 nicotinic acetylcholine receptor. *Hear Res*, **141**, 117-28.
- KAWASHIMA, K. Y FUJII, T. (2008). Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance. *J Pharmacol Sci*, **106**, 167-73.
- KHIROUG, S.S., HARKNESS, P.C., LAMB, P.W., SUDWEEKS, S.N., KHIROUG, L., MILLAR, N.S. Y YAKEL, J.L. (2002). Rat nicotinic ACh receptor alpha7 and beta2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels. *J Physiol*, **540**, 425-34.
- KIDOKORO, Y., RITCHIE, A.K. Y HAGIWARA, S. (1979). Effect of tetrodotoxin on adrenaline secretion in the perfused rat adrenal medulla. *Nature*, **278**, 63-5.
- KIDOKORO, Y. Y RITCHIE, A.K. (1980). Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. *J Physiol*, **307**, 199-216.
- KILPATRICK, D.L., SLEPETIS, R. Y KIRSHNER, N. (1981). Ion channels and membrane potential in stimulus-secretion coupling in adrenal medulla cells. *J Neurochem*, **36**, 1245-55.
- KIRPEKAR, S.M. Y PRAT, J.C. (1979). Release of catecholamines from perfused cat adrenal gland by veratridine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 2081-3.
- KISTLER, J., STROUD, R.M., KLYMKOWSKY, M.W., LALANCETTE, R.A. Y FAIRCLOUGH, R.H. (1982). Structure and function of an acetylcholine receptor. *Biophys J*, **37**, 371-83.
- KOBAYASHI, S. (1977). Adrenal medulla: chromaffin cells as paraneurons. *Arch Histol Jpn*, **40 Suppl**, 61-79.
- KOVAL, L.M., YAVORSKAYA, E.N. Y LUKYANETZ, E.A. (2001). Electron microscopic evidence for multiple types of secretory vesicles in bovine chromaffin cells. *Gen Comp Endocrinol*, **121**, 261-77.
- KUMAKURA, K., KAROUM, F., GUIDOTTI, A. Y COSTA, E. (1980). Modulation of nicotinic receptors by opiate receptor agonists in cultured adrenal chromaffin cells. *Nature*, **283**, 489-92.
- KURYATOV, A., OLALE, F., COOPER, J., CHOI, C. Y LINDSTROM, J. (2000). Human alpha6 AChR subtypes: subunit composition, assembly, and pharmacological responses. *Neuropharmacology*, **39**, 2570-90.
- KURYATOV, A., ONKSEN, J. Y LINDSTROM, J. (2008). Roles of accessory subunits in alpha4beta2(\*) nicotinic receptors. *Mol Pharmacol*, **74**, 132-43.

- LARA, B., ZAPATER, P., MONTIEL, C., DE LA FUENTE, M.T., MARTÍNEZ-SIERRA, R., BALLESTA, J.J., GANDÍA, L. Y GARCÍA, A.G. (1995). Density of apamin-sensitive Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> channels in bovine chromaffin cells: relevance to secretion. *Biochem Pharmacol*, **49**, 1459-68.
- LEE, M., MARTÍN-RUIZ, C., GRAHAM, A., COURT, J., JAROS, E., PERRY, R., IVERSEN, P., BAUMAN, M. Y PERRY, E. (2002). Nicotinic receptor abnormalities in the cerebellar cortex in autism. *Brain*, **125**, 1483-95.
- LEFEBVRE, H., CONTESSE, V., DELARUE, C., VAUDRY, H. Y KUHN, J.M. (1998). Serotonergic regulation of adrenocortical function. *Horm Metab Res*, **30**, 398-403.
- LEVITSKY, K.L. Y LÓPEZ-BARNEO, J. (2009). Developmental change of T-type Ca<sup>2+</sup> channel expression and its role in rat chromaffin cell responsiveness to acute hypoxia. *J Physiol*, **587**, 1917-29.
- LI, Y., PAPKE, R.L., HE, Y.J., MILLARD, W.J. Y MEYER, E.M. (1999). Characterization of the neuroprotective and toxic effects of alpha7 nicotinic receptor activation in PC12 cells. *Brain Res*, **830**, 218-25.
- LINDSTROM, J., ANAND, R., PENG, X., GERZANICH, V., WANG, F. Y LI, Y. (1995). Neuronal nicotinic receptor subtypes. *Ann N Y Acad Sci*, **757**, 100-16.
- LINDSTROM, J. (1997). Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease. *Mol Neurobiol*, **15**, 193-222.
- LIU, H., FELIX, R., GURNETT, C.A., DE WAARD, M., WITCHER, D.R. Y CAMPBELL, K.P. (1996). Expression and subunit interaction of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in PC12 cells. *J Neurosci*, **16**, 7557-65.
- LIU, Q., HUANG, Y., XUE, F., SIMARD, A., DECHON, J., LI, G., ZHANG, J., LUCERO, L., WANG, M., SIERKS, M., HU, G., CHANG, Y., LUKAS, R.J. Y WU, J. (2009). A novel nicotinic acetylcholine receptor subtype in basal forebrain cholinergic neurons with high sensitivity to amyloid peptides. *J Neurosci*, **29**, 918-29.
- LIVETT, B.G. (1984). Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol Rev*, **64**, 1103-61.
- LÓPEZ, M.G., VILLARROYA, M., LARA, B., MARTÍNEZ SIERRA, R., ALBILLOS, A., GARCÍA, A.G. Y GANDÍA, L. (1994). Q- and L-type Ca<sup>2+</sup> channels dominate the control of secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett*, **349**, 331-7.
- LÓPEZ, M.G., MONTIEL, C., HERRERO, C.J., GARCÍA-PALOMERO, E., MAYORGAS, I., HERNÁNDEZ-GUIJO, J.M., VILLARROYA, M., OLIVARES, R., GANDÍA, L., MCINTOSH, J.M., OLIVERA, B.M. Y GARCÍA, A.G. (1998). Unmasking the functions of the chromaffin cell alpha7 nicotinic receptor by using short pulses of acetylcholine and selective blockers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14184-9.
- LUETJE, C.W. Y PATRICK, J. (1991). Both alpha- and beta-subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci*, **11**, 837-45.
- MANDELZYS, A., DE KONINCK, P. Y COOPER, E. (1995). Agonist and toxin sensitivities of ACh-evoked currents on neurons expressing multiple nicotinic ACh receptor subunits. *J Neurophysiol*, **74**, 1212-21.
- MANEU, V., ROJO, J., MULET, J., VALOR, L.M., SALA, F., CRIADO, M., GARCÍA, A.G. Y GANDÍA, L. (2002). A single neuronal nicotinic receptor alpha3alpha7beta4\* is present in the bovine chromaffin cell. *Ann N Y Acad Sci*, **971**, 165-7.
- MARLEY, P.D. (2003). Mechanisms in histamine-mediated secretion from adrenal chromaffin cells. *Pharmacol Ther*, **98**, 1-34.
- MARMONT, G. (1949). Studies on the axon membrane; a new method. *J Cell Physiol*, **34**, 351-82.
- MARTÍN-RUIZ, C.M., HAROUTUNIAN, V.H., LONG, P., YOUNG, A.H., DAVIS, K.L., PERRY, E.K. Y COURT, J.A. (2003). Dementia rating and nicotinic receptor expression in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, **54**, 1222-33.

- MARTÍN-RUIZ, C.M., LEE, M., PERRY, R.H., BAUMANN, M., COURT, J.A. Y PERRY, E.K. (2004). Molecular analysis of nicotinic receptor expression in autism. *Brain Res Mol Brain Res*, **123**, 81-90.
- MARTIN, T.F. Y GRISHANIN, R.N. (2003). PC12 cells as a model for studies of regulated secretion in neuronal and endocrine cells. *Methods Cell Biol*, **71**, 267-86.
- MARTY, A. (1981). Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature*, **291**, 497-500.
- MARUBIO, L.M., GARDIER, A.M., DURIER, S., DAVID, D., KLINK, R., ARROYO-JIMÉNEZ, M.M., MCINTOSH, J.M., ROSSI, F., CHAMPTIAUX, N., ZOLI, M. Y CHANGEUX, J.P. (2003). Effects of nicotine in the dopaminergic system of mice lacking the alpha4 subunit of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Neurosci*, **17**, 1329-37.
- MCGEHEE, D.S. Y ROLE, L.W. (1995). Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu Rev Physiol*, **57**, 521-46.
- MCINTOSH, J.M., YOSHIKAMI, D., MAHE, E., NIELSEN, D.B., RIVIER, J.E., GRAY, W.R. Y OLIVERA, B.M. (1994). A nicotinic acetylcholine receptor ligand of unique specificity, alpha-conotoxin Iml. *J Biol Chem*, **269**, 16733-9.
- MEIR, A., GINSBURG, S., BUTKEVICH, A., KACHALSKY, S.G., KAISERMAN, I., AHDUT, R., DEMIRGOREN, S. Y RAHAMIMOFF, R. (1999). Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiol Rev*, **79**, 1019-88.
- MILLAR, N.S. (2003). Assembly and subunit diversity of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Soc Trans*, **31**, 869-74.
- MINAKUCHI, K., HOUCHI, H., YOSHIKAMI, M., ISHIMURA, Y., MORITA, K., TAKASUGI, M., OKA, M. Y TAMAKI, T. (1997). Serotonin increases Na(+)-dependent Ca<sup>2+</sup> efflux from bovine adrenal chromaffin cells in culture. *Neurosci Lett*, **223**, 17-20.
- MIYAZAWA, A., FUJIYOSHI, Y., STOWELL, M. Y UNWIN, N. (1999). Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J Mol Biol*, **288**, 765-86.
- MIYAZAWA, A., FUJIYOSHI, Y. Y UNWIN, N. (2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*, **423**, 949-55.
- MONTERO, M., ALONSO, M.T., CARNICERO, E., CUCHILLO-IBÁÑEZ, I., ALBILLOS, A., GARCÍA, A.G., GARCÍA-SANCHO, J. Y ÁLVAREZ, J. (2000). Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol*, **2**, 57-61.
- MONTERO, M., ALONSO, M.T., ALBILLOS, A., CUCHILLO-IBÁÑEZ, I., OLIVARES, R., A, G.G., GARCÍA-SANCHO, J. Y ÁLVAREZ, J. (2001). Control of secretion by mitochondria depends on the size of the local [Ca<sup>2+</sup>] after chromaffin cell stimulation. *Eur J Neurosci*, **13**, 2247-54.
- MONTIEL, C., LÓPEZ, M.G., SÁNCHEZ-GARCÍA, P., MAROTO, R., ZAPATER, P. Y GARCÍA, A.G. (1995). Contribution of SK and BK channels in the control of catecholamine release by electrical stimulation of the cat adrenal gland. *J Physiol*, **486 ( Pt 2)**, 427-37.
- MORO, M.A., LÓPEZ, M.G., GANDÍA, L., MICHELENA, P. Y GARCÍA, A.G. (1990). Separation and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medullae. *Anal Biochem*, **185**, 243-8.
- MOUSAVI, M., HELLSTROM-LINDAHL, E., GUAN, Z.Z., BEDNAR, I. Y NORDBERG, A. (2001). Expression of nicotinic acetylcholine receptors in human and rat adrenal medulla. *Life Sci*, **70**, 577-90.
- NAGAVARAPU, U., DANTHI, S. Y BOYD, R.T. (2001). Characterization of a rat neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha7 promoter. *J Biol Chem*, **276**, 16749-57.
- NAKANISHI, S. (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*, **258**, 597-603.

- NEHER, E. Y ZUCKER, R.S. (1993). Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron*, **10**, 21-30.
- NICKE, A., BAUMERT, H.G., RETTINGER, J., EICHELE, A., LAMBRECHT, G., MUTSCHLER, E. Y SCHMALZING, G. (1998). P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *Embo J*, **17**, 3016-28.
- NOVARA, M., BALDELLI, P., CAVALLARI, D., CARABELLI, V., GIANCIPPOLI, A. Y CARBONE, E. (2004). Exposure to cAMP and beta-adrenergic stimulation recruits Ca(V)3 T-type channels in rat chromaffin cells through Epac cAMP-receptor proteins. *J Physiol*, **558**, 433-49.
- O'SULLIVAN, A.J. Y BURGOYNE, R.D. (1989). A comparison of bradykinin, angiotensin II and muscarinic stimulation of cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Biosci Rep*, **9**, 243-52.
- OHANA, B. Y GERSHONI, J.M. (1990). Comparison of the toxin binding sites of the nicotinic acetylcholine receptor from *Drosophila* to human. *Biochemistry*, **29**, 6409-15.
- OLIVOS, L. Y ARTALEJO, A.R. (2008). Muscarinic excitation-secretion coupling in chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)*, **192**, 213-20.
- ORNBERG, R.L., FURUYA, S., GOPING, G. Y KUIJPERS, G.A. (1995). Granule swelling in stimulated bovine adrenal chromaffin cells: regulation by internal granule pH. *Cell Tissue Res*, **279**, 85-92.
- ORTELLS, M.O. Y LUNT, G.G. (1995). Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci*, **18**, 121-7.
- PALMA, E., MAGGI, L., BARABINO, B., EUSEBI, F. Y BALLIVET, M. (1999). Nicotinic acetylcholine receptors assembled from the alpha7 and beta3 subunits. *J Biol Chem*, **274**, 18335-40.
- PAPKE, R.L. Y HEINEMANN, S.F. (1991). The role of the beta 4-subunit in determining the kinetic properties of rat neuronal nicotinic acetylcholine alpha 3-receptors. *J Physiol*, **440**, 95-112.
- PAPKE, R.L. Y HEINEMANN, S.F. (1994). Partial agonist properties of cytisine on neuronal nicotinic receptors containing the beta 2 subunit. *Mol Pharmacol*, **45**, 142-9.
- PAPKE, R.L., BENCHERIF, M. Y LIPPIELLO, P. (1996). An evaluation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation by quaternary nitrogen compounds indicates that choline is selective for the alpha 7 subtype. *Neurosci Lett*, **213**, 201-4.
- PARADISO, K.G. Y STEINBACH, J.H. (2003). Nicotine is highly effective at producing desensitization of rat alpha4beta2 neuronal nicotinic receptors. *J Physiol*, **553**, 857-71.
- PARKER, M.J., BECK, A. Y LUETJE, C.W. (1998). Neuronal nicotinic receptor beta2 and beta4 subunits confer large differences in agonist binding affinity. *Mol Pharmacol*, **54**, 1132-9.
- PARSONS, T.D., COORSEN, J.R., HORSTMANN, H. Y ALMERS, W. (1995). Docked granules, the exocytic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells. *Neuron*, **15**, 1085-96.
- PATERSON, D. Y NORDBERG, A. (2000). Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog Neurobiol*, **61**, 75-111.
- PELTO-HUIKKO, M., SALMINEN, T. Y HERVONEN, A. (1985). Localization of enkephalins in adrenaline cells and the nerves innervating adrenaline cells in rat adrenal medulla. *Histochemistry*, **82**, 377-83.
- PHILLIPS, J.H. (1982). Dynamic aspects of chromaffin granule structure. *Neuroscience*, **7**, 1595-609.
- PICCIOTTO, M.R., ZOLI, M., RIMONDINI, R., LENA, C., MARUBIO, L.M., PICH, E.M., FUXE, K. Y CHANGEUX, J.P. (1998). Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature*, **391**, 173-7.

- PICCIOTTO, M.R., BRUNZELL, D.H. Y CALDARONE, B.J. (2002). Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. *Neuroreport*, **13**, 1097-106.
- PLATTNER, H., ARTALEJO, A.R. Y NEHER, E. (1997). Ultrastructural organization of bovine chromaffin cell cortex-analysis by cryofixation and morphometry of aspects pertinent to exocytosis. *J Cell Biol*, **139**, 1709-17.
- PLUMMER, M.R., LOGOTHETIS, D.E. Y HESS, P. (1989). Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron*, **2**, 1453-63.
- PUTNEY, J.W., JR. (2003). Capacitative calcium entry in the nervous system. *Cell Calcium*, **34**, 339-44.
- QUIK, M. Y KULAK, J.M. (2002). Nicotine and nicotinic receptors; relevance to Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, **23**, 581-94.
- RAMÍREZ-LATORRE, J., YU, C.R., QU, X., PERIN, F., KARLIN, A. Y ROLE, L. (1996). Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature*, **380**, 347-51.
- REITSTETTER, R., LUKAS, R.J. Y GRUENER, R. (1999). Dependence of nicotinic acetylcholine receptor recovery from desensitization on the duration of agonist exposure. *J Pharmacol Exp Ther*, **289**, 656-60.
- ROGERS, M. Y DANI, J.A. (1995). Comparison of quantitative calcium flux through NMDA, ATP, and ACh receptor channels. *Biophys J*, **68**, 501-6.
- ROGERS, S.W., MANDELZYS, A., DENERIS, E.S., COOPER, E. Y HEINEMANN, S. (1992). The expression of nicotinic acetylcholine receptors by PC12 cells treated with NGF. *J Neurosci*, **12**, 4611-23.
- ROSA, J.M., DE DIEGO, A.M., GANDÍA, L. Y GARCÍA, A.G. (2007). L-type calcium channels are preferentially coupled to endocytosis in bovine chromaffin cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **357**, 834-9.
- ROSSI, F.M., PIZZORUSSO, T., PORCIATTI, V., MARUBIO, L.M., MAFFEI, L. Y CHANGEUX, J.P. (2001). Requirement of the nicotinic acetylcholine receptor beta 2 subunit for the anatomical and functional development of the visual system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 6453-8.
- ROTH, D. Y BURGOYNE, R.D. (1994). SNAP-25 is present in a SNARE complex in adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett*, **351**, 207-10.
- SALA, F., NISTRI, A. Y CRIADO, M. (2008). Nicotinic acetylcholine receptors of adrenal chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)*, **192**, 203-12.
- SARGENT, P.B. (1993). The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Neurosci*, **16**, 403-43.
- SCHOEPFER, R., CONROY, W.G., WHITING, P., GORE, M. Y LINDSTROM, J. (1990). Brain alpha-bungarotoxin binding protein cDNAs and MAbs reveal subtypes of this branch of the ligand-gated ion channel gene superfamily. *Neuron*, **5**, 35-48.
- SCHULLER, H.M., JULL, B.A., SHEPPARD, B.J. Y PLUMMER, H.K. (2000). Interaction of tobacco-specific toxicants with the neuronal alpha(7) nicotinic acetylcholine receptor and its associated mitogenic signal transduction pathway: potential role in lung carcinogenesis and pediatric lung disorders. *Eur J Pharmacol*, **393**, 265-77.
- SGARD, F., CHARPANTIER, E., BERTRAND, S., WALKER, N., CAPUT, D., GRAHAM, D., BERTRAND, D. Y BESNARD, F. (2002). A novel human nicotinic receptor subunit, alpha10, that confers functionality to the alpha9-subunit. *Mol Pharmacol*, **61**, 150-9.
- SHARMA, G. Y VIJAYARAGHAVAN, S. (2001). Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4148-53.

- SHIMOHAMA, S., AKAIKE, A. Y KIMURA, J. (1996). Nicotine-induced protection against glutamate cytotoxicity. Nicotinic cholinergic receptor-mediated inhibition of nitric oxide formation. *Ann N Y Acad Sci*, **777**, 356-61.
- SHYTLER, R.D., SILVER, A.A., LUKAS, R.J., NEWMAN, M.B., SHEEHAN, D.V. Y SANBERG, P.R. (2002a). Nicotinic acetylcholine receptors as targets for antidepressants. *Mol Psychiatry*, **7**, 525-35.
- SHYTLER, R.D., SILVER, A.A., SHEEHAN, K.H., SHEEHAN, D.V. Y SANBERG, P.R. (2002b). Neuronal nicotinic receptor inhibition for treating mood disorders: preliminary controlled evidence with mecamylamine. *Depress Anxiety*, **16**, 89-92.
- SINE, S.M. Y TAYLOR, P. (1980). The relationship between agonist occupation and the permeability response of the cholinergic receptor revealed by bound cobra alpha-toxin. *J Biol Chem*, **255**, 10144-56.
- SINE, S.M. (1993). Molecular dissection of subunit interfaces in the acetylcholine receptor: identification of residues that determine curare selectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9436-40.
- SIVILOTTI, L.G., MCNEIL, D.K., LEWIS, T.M., NASSAR, M.A., SCHOEPFER, R. Y COLQUHOUN, D. (1997). Recombinant nicotinic receptors, expressed in *Xenopus* oocytes, do not resemble native rat sympathetic ganglion receptors in single-channel behaviour. *J Physiol*, **500 ( Pt 1)**, 123-38.
- SMITH, C. Y NEHER, E. (1997). Multiple forms of endocytosis in bovine adrenal chromaffin cells. *J Cell Biol*, **139**, 885-94.
- SOLEM, M., MCMAHON, T. Y MESSING, R.O. (1997). Protein kinase A regulates inhibition of N- and P/Q-type calcium channels by ethanol in PC12 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, **282**, 1487-95.
- SOLLNER, T., BENNETT, M.K., WHITEHEART, S.W., SCHELLER, R.H. Y ROTHMAN, J.E. (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*, **75**, 409-18.
- SORIMACHI, M., YAMAGAMI, K., YADA, T. Y NISHIMURA, S. (1989). Spontaneous and secretagogue-induced changes in cytosolic free Ca concentration measured by microfluorimetry with fura-2 on single bovine adrenal chromaffin cells. *Jpn J Physiol*, **39**, 687-701.
- SU, X., LEE, J.W., MATTHAY, Z.A., MEDNICK, G., UCHIDA, T., FANG, X., GUPTA, N. Y MATTHAY, M.A. (2007). Activation of the alpha7 nAChR reduces acid-induced acute lung injury in mice and rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **37**, 186-92.
- SUDHOF, T.C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*, **375**, 645-53.
- TAPIA, L., GARCÍA-EGUIAGARAY, J., GARCÍA, A.G. Y GANDÍA, L. (2009). Preconditioning stimuli that augment chromaffin cell secretion. *Am J Physiol Cell Physiol*, **296**, C792-800.
- TAPPER, A.R., MCKINNEY, S.L., NASHMI, R., SCHWARZ, J., DESHPANDE, P., LABARCA, C., WHITEAKER, P., MARKS, M.J., COLLINS, A.C. Y LESTER, H.A. (2004). Nicotine activation of alpha4\* receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. *Science*, **306**, 1029-32.
- THOMAS, D., TOVEY, S.C., COLLINS, T.J., BOOTMAN, M.D., BERRIDGE, M.J. Y LIPP, P. (2000). A comparison of fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca<sup>2+</sup> signals. *Cell Calcium*, **28**, 213-23.
- TRIFARÓ, J.M. Y LEE, R.W. (1980). Morphological characteristics and stimulus-secretion coupling in bovine adrenal chromaffin cell cultures. *Neuroscience*, **5**, 1533-46.
- UCEDA, G., MICHELENA, P., LÓPEZ, M., GARCÍA, A.G. Y COLOMBO, J. (1995). Rat striatal astroglia induces morphological and neurochemical changes in adult bovine, adrenergic-enriched adrenal chromaffin cells in vitro. *Restor Neur and Neurosc*, **8**, 129-136.

- UNSICKER, K., RIEFFERT, B. Y ZIEGLER, W. (1980). Effects of cell culture conditions, nerve growth factor, dexamethasone, and cyclic AMP on adrenal chromaffin cells in vitro. *Adv Biochem Psychopharmacol*, **25**, 51-9.
- UNWIN, N. (1993). Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J Mol Biol*, **229**, 1101-24.
- UNWIN, N. (1995). Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature*, **373**, 37-43.
- UNWIN, N. (1996). Projection structure of the nicotinic acetylcholine receptor: distinct conformations of the alpha subunits. *J Mol Biol*, **257**, 586-96.
- UNWIN, N. (2005). Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol*, **346**, 967-89.
- VILLALOBOS, C., NÚÑEZ, L., MONTERO, M., GARCÍA, A.G., ALONSO, M.T., CHAMERO, P., ÁLVAREZ, J. Y GARCÍA-SANCHO, J. (2002). Redistribution of Ca<sup>2+</sup> among cytosol and organelle during stimulation of bovine chromaffin cells. *Faseb J*, **16**, 343-53.
- VINCLER, M. (2005). Neuronal nicotinic receptors as targets for novel analgesics. *Expert Opin Investig Drugs*, **14**, 1191-8.
- VIRGINIO, C., GIACOMETTI, A., ALDEGHERI, L., RIMLAND, J.M. Y TERSTAPPEN, G.C. (2002). Pharmacological properties of rat alpha 7 nicotinic receptors expressed in native and recombinant cell systems. *Eur J Pharmacol*, **445**, 153-61.
- VIZI, E.S. Y LENDVAI, B. (1999). Modulatory role of presynaptic nicotinic receptors in synaptic and non-synaptic chemical communication in the central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev*, **30**, 219-35.
- VOETS, T., MOSER, T., LUND, P.E., CHOW, R.H., GEPPERT, M., SUDHOF, T.C. Y NEHER, E. (2001). Intracellular calcium dependence of large dense-core vesicle exocytosis in the absence of synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 11680-5.
- WADA, E., WADA, K., BOULTER, J., DENERIS, E., HEINEMANN, S., PATRICK, J. Y SWANSON, L.W. (1989). Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4, and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol*, **284**, 314-35.
- WAKADE, A.R. (1981). Facilitation of secretion of catecholamines from rat and guinea-pig adrenal glands in potassium-free medium or after ouabain. *J Physiol*, **313**, 481-98.
- WANG, F., GERZANICH, V., WELLS, G.B., ANAND, R., PENG, X., KEYSER, K. Y LINDSTROM, J. (1996). Assembly of human neuronal nicotinic receptor alpha5 subunits with alpha3, beta2, and beta4 subunits. *J Biol Chem*, **271**, 17656-65.
- WANG, H., YU, M., OCHANI, M., AMELLA, C.A., TANOVIC, M., SUSARLA, S., LI, J.H., WANG, H., YANG, H., ULLOA, L., AL-ABED, Y., CZURA, C.J. Y TRACEY, K.J. (2003). Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, **421**, 384-8.
- WARD, J.M., COCKCROFT, V.B., LUNT, G.G., SMILLIE, F.S. Y WONNACOTT, S. (1990). Methyllycaconitine: a selective probe for neuronal alpha-bungarotoxin binding sites. *FEBS Lett*, **270**, 45-8.
- WEBER, T., ZEMELMAN, B.V., MCNEW, J.A., WESTERMANN, B., GMACHL, M., PARLATI, F., SOLLNER, T.H. Y ROTHMAN, J.E. (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell*, **92**, 759-72.
- WENGER, B.W., BRYANT, D.L., BOYD, R.T. Y MCKAY, D.B. (1997). Evidence for spare nicotinic acetylcholine receptors and a beta 4 subunit in bovine adrenal chromaffin cells: studies using bromoacetylcholine, epibatidine, cytisine and mAb35. *J Pharmacol Exp Ther*, **281**, 905-13.
- WEST, K.A., BROGNARD, J., CLARK, A.S., LINNOILA, I.R., YANG, X., SWAIN, S.M., HARRIS, C., BELINSKY, S. Y DENNIS, P.A. (2003). Rapid Akt activation by nicotine and a

- tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. *J Clin Invest*, **111**, 81-90.
- WESTERINK, R.H. Y EWING, A.G. (2008). The PC12 cell as model for neurosecretion. *Acta Physiol (Oxf)*, **192**, 273-85.
- WILSON, S.P. Y KIRSHNER, N. (1977). The acetylcholine receptor of the adrenal medulla. *J Neurochem*, **28**, 687-95.
- WINKLER, H. (1976). The composition of adrenal chromaffin granules: an assessment of controversial results. *Neuroscience*, **1**, 65-80.
- WINKLER, H. Y FISCHER-COLBRIE, R. (1998). Regulation of the biosynthesis of large dense-core vesicles in chromaffin cells and neurons. *Cell Mol Neurobiol*, **18**, 193-209.
- WONG, D.L. (2003). Why is the adrenal adrenergic? *Endocr Pathol*, **14**, 25-36.
- WONNACOTT, S. (1990). The paradox of nicotinic acetylcholine receptor upregulation by nicotine. *Trends Pharmacol Sci*, **11**, 216-9.
- WONNACOTT, S. (1997). Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci*, **20**, 92-8.
- WU, J., KUO, Y.P., GEORGE, A.A., XU, L., HU, J. Y LUKAS, R.J. (2004). beta-Amyloid directly inhibits human alpha4beta2-nicotinic acetylcholine receptors heterologously expressed in human SH-EP1 cells. *J Biol Chem*, **279**, 37842-51.
- WU, J., LIU, Q., YU, K., HU, J., KUO, Y.P., SEGERBERG, M., ST JOHN, P.A. Y LUKAS, R.J. (2006). Roles of nicotinic acetylcholine receptor beta subunits in function of human alpha4-containing nicotinic receptors. *J Physiol*, **576**, 103-18.
- YADID, G., MAOR, G., YODIM, M.B., SILBERMAN, M. Y ZINDER, O. (1993a). Autoradiographic localization of strychnine-sensitive glycine receptor in bovine adrenal medulla. *Neurochem Res*, **18**, 1051-5.
- YADID, G., YODIM, M.B. Y ZINDER, O. (1993b). Uptake and receptor sites for glycine in isolated bovine adrenal medulla chromaffin cells. *Neuroscience*, **55**, 1147-52.
- YOUNG, G.T., BROAD, L.M., ZWART, R., ASTLES, P.C., BODKIN, M., SHER, E. Y MILLAR, N.S. (2007). Species selectivity of a nicotinic acetylcholine receptor agonist is conferred by two adjacent extracellular beta4 amino acids that are implicated in the coupling of binding to channel gating. *Mol Pharmacol*, **71**, 389-97.
- YU, C.R. Y ROLE, L.W. (1998a). Functional contribution of the alpha7 subunit to multiple subtypes of nicotinic receptors in embryonic chick sympathetic neurones. *J Physiol*, **509 ( Pt 3)**, 651-65.
- YU, C.R. Y ROLE, L.W. (1998b). Functional contribution of the alpha5 subunit to neuronal nicotinic channels expressed by chick sympathetic ganglion neurones. *J Physiol*, **509 ( Pt 3)**, 667-81.
- ZWART, R. Y VIJVERBERG, H.P. (1998). Four pharmacologically distinct subtypes of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Pharmacol*, **54**, 1124-31.