



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

**ESTUDIO DE LOS ELEMENTOS IMPLICADOS EN
EL ACOPLAMIENTO ESTÍMULO-SECRECIÓN EN
LA CÉLULA CROMAFÍN HUMANA**

ALBERTO PÉREZ ÁLVAREZ

**Trabajo presentado para optar al Título de Doctor por la Universidad
Autónoma de Madrid**

Directora: Dra. María Almudena Albillos Martínez



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

Dra. MARÍA ALMUDENA ALBILLOS MARTÍNEZ, Profesora Titular del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA, que Don Alberto Pérez Álvarez, ha realizado bajo su dirección el presente trabajo: **ESTUDIO DE LOS ELEMENTOS IMPLICADOS EN EL ACOPLAMIENTO ESTÍMULO-SECRECIÓN EN LA CÉLULA CROMAFÍN HUMANA**, como Tesis para alcanzar el grado de doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que conste a efectos oportunos, expide y firma la presente en Madrid a 11 de mayo de 2010.

Dra. María Almudena Albillos Martínez
Profesora Titular de Farmacología

INDICE

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	3
INTRODUCCIÓN	7
1. LA GLÁNDULA ADRENAL	8
1.1. ANATOMÍA Y LOCALIZACIÓN.....	8
1.2. EMBRIOGÉNESIS	12
1.3. INERVACIÓN.....	13
1.4. IRRIGACIÓN.....	15
1.5. FUNCIÓN	17
2. EL MODELO NEURONAL DE LA CÉLULA CROMAFÍN	19
2.1. RELEVANCIA FISIOPATOLÓGICA DE LA CÉLULA CROMAFÍN.....	21
2.2. APLICACIONES CLÍNICAS.....	23
3. EL ACOPLAMIENTO ESTÍMULO-SECRECIÓN	27
4. LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE... 33	
4.1 ESTRUCTURA.....	33
4.2 SUBTIPOS	35
4.2.1 CANALES <i>Ca_v1</i>	36
4.2.2 CANALES <i>Ca_v2</i>	37
4.2.3 CANALES <i>Ca_v3</i>	40
4.3 FISIOPATOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA.....	41
4.4.1 ATP Y OPIOIDES	46
4.4.2. MODULACIÓN AUTOCRINA/PARACRINA	46
4.4.5 MODULACIÓN DIFERENCIAL DE LOS CANALES	48
4.4.6 PAPEL DE LA MODULACIÓN EN LA FISIOLOGÍA	50
5.1 LA ACETILCOLINA	52
5.2 EL RECEPTOR NICOTÍNICO	54
5.2.1 ESTRUCTURA.....	54
5.2.2 SUBUNIDADES Y NOMENCLATURA.....	56
5.2.3 POSIBILIDADES ESTEQUIOMÉTRICAS.....	59

<i>5.2.4 SUBTIPOS Y DISTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES NATIVOS</i>	62
<i>5.2.5 ASPECTOS FUNCIONALES</i>	68
<i>5.2.6 FARMACOLOGÍA Y MODULACIÓN</i>	73
<i>5.2.7 FISIOPATOLOGÍA</i>	86
5.3 EL RECEPTOR MUSCARÍNICO	95
<i>5.3.1 SUBTIPOS DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS</i>	96
<i>5.3.2 FARMACOLOGÍA Y DIANAS TERAPÉUTICAS</i>	101
<i>5.3.3 RECEPTORES MUSCARÍNICOS EN LA CÉLULA CROMAFÍN</i>	104
RESULTADOS	112
DISCUSIÓN	169
CONCLUSIONES	182
BIBLIOGRAFÍA	185

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El objetivo de esta tesis doctoral ha sido caracterizar los componentes que participan en la neurotransmisión en la sinapsis esplácnico-cromafín humana y llevan a la secreción de catecolaminas.

ESTADO ACTUAL DEL TEMA

La cascada de eventos a nivel postsináptico que se inicia con la liberación del agonista endógeno ACh en la sinapsis, sólo puede reproducirse de manera parcial en el laboratorio. Con este propósito se han empleado diferentes técnicas, de complejidad y resolución crecientes (medición de catecolaminas en plasma, en glándula adrenal perfundida *in vivo* y *ex vivo*, en poblaciones de células cromafines aisladas de la médula, estudios amperométricos, de “patch clamp” y capacidad de membrana en célula única aislada e *in situ*). La mayor parte del conocimiento actual que ha llevado a hipotetizar sobre cuál es la secuencia real de eventos que tienen lugar en el acoplamiento estímulo-secreción (Douglas y Rubin, 1961), se basa en datos obtenidos a partir de numerosos estudios en otras especies de mamíferos (García y col., 2006).

Sin embargo, técnicamente es posible estudiar con un elevado nivel de resolución cuáles son los elementos participantes en la excitabilidad celular y la entrada de calcio al citosol, los cuales desencadenan la liberación de neurotransmisores por parte de la célula cromafín. Se han estudiado ampliamente los mecanismos que regulan tanto la excitabilidad, la entrada de calcio al citosol y la liberación exocitótica de catecolaminas. Aún así, la medida de la secreción total evocada por ACh no ha sido abordada con técnicas de alta resolución como la medida de capacidad de la membrana plasmática con la técnica de “patch clamp”.

Por otro lado, los estudios realizados en la célula cromafín humana son muy limitados en comparación a otras especies. Además, se han constatado importantes diferencias interespecíficas en los diversos elementos participantes en el acoplamiento estímulo-secreción, como los receptores para la ACh y los canales de calcio dependientes de voltaje (García y col., 2006; Olivos y Artalejo, 2008; Sala y col., 2008).

RELEVANCIA DEL ESTUDIO

En este estudio hemos profundizado en el conocimiento *per se* de la fisiología de la célula cromafín de la médula de la glándula adrenal humana. También la hemos caracterizado como modelo neuronal para el estudio preclínico de diversas enfermedades. La célula cromafín, derivada embriológicamente de la cresta neural, expresa de manera nativa diversas proteínas (receptores nicotínicos, canales de calcio dependientes de voltaje, cromogranina A y catestatina) implicadas en diversas enfermedades humanas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la migraña, la ataxia y la hipertensión arterial (Gotti y Clementi, 2004; Fernandez-Espejo y col., 2005a; Pietrobon, 2005; Mahata y col., 2010b). Todas ellas tienen un alto coste social y sanitario y, en conjunto, todas estas características en el contexto actual, convierten a la célula cromafín humana en un modelo excelente para estudiar abordajes terapéuticos desde una vertiente preclínica. Por todo ello, el estudio presentado en este trabajo se ha centrado en el gran interés científico y sanitario que tiene caracterizar los elementos que rigen la excitabilidad y la biología de la célula cromafín humana, sus funciones y su regulación en diversas condiciones experimentales.

En vista de lo anteriormente expuesto, en esta tesis doctoral se han perseguido los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL:

Establecer las bases de la fisiología de la célula cromafín de la glándula adrenal humana en relación a los principales elementos que subyacen en el acoplamiento estímulo-secreción de una respuesta rápida ante una situación de estrés.

OBJETIVOS CONCRETOS:

Objetivo 1. Establecer un protocolo de actuación para la obtención regular de glándulas adrenales humanas.

Objetivo 2. Estudio del potencial de membrana, las corrientes iónicas y la secreción generadas por pulsos cortos y largos de acetilcolina (ACh).

Objetivo 3. Caracterización de los canales de calcio dependientes de voltaje empleando la técnica de “patch clamp” en su configuración de parche perforado.

Objetivo 4. Caracterización electrofisiológica y farmacológica de la expresión funcional del subtipo $\alpha 7$ de receptor nicotínico neuronal para la ACh (nAChR)

INTRODUCCIÓN

1. LA GLÁNDULA ADRENAL

1.1. ANATOMÍA Y LOCALIZACIÓN

Las glándulas suprarrenales o adrenales, son unos órganos pares, aplanados, aproximadamente triangulares, incluidos en el tejido adiposo retroperitoneal, sobre el polo craneal de cada riñón. Funcionalmente las glándulas están compuestas de dos zonas, una estructural y otra secretora. La primera, que se conoce como cápsula suprarrenal, está constituida por una gruesa capa de tejido conectivo que recubre el tejido secretor y, que se extiende hacia el interior de éste, formando verdaderos conductos por los que transcurren los vasos sanguíneos y los nervios. La segunda de estas zonas, la secretora, está compuestas a su vez de dos partes: la corteza y la médula. (ver fig. 1.1).

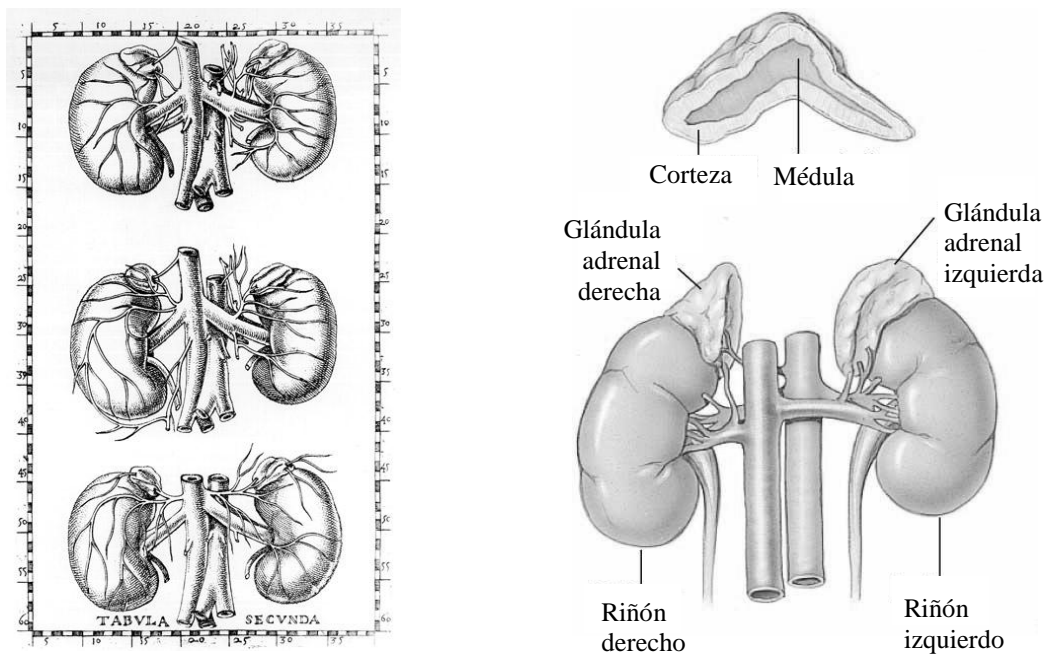


Fig. 1.1. Localización de las glándulas adrenales en el cuerpo humano. A) Las primeras imágenes registrando la localización de las glándulas adrenales y su irrigación, realizado por Bartolomeo Eustaquio en 1552. B)

Corte sagital de una glándula adrenal y morfología que adopta en su localización sobre los respectivos riñones.

La corteza es la porción secretora de esteroides. Es amarilla brillante en su parte externa, y rojo pardusca en su parte profunda. A su vez, la corteza está subdividida en tres capas concéntricas: una capa delgada, la zona glomerular externa; otra capa gruesa, la zona fasciculada media; y la zona reticular, vecina a la parte más interna de la glándula, la médula (ver fig 1.2). Son las responsables de la producción de las hormonas esteroideas aldosterona, cortisol y dehidroepiandrosterona, respectivamente.

La médula es la porción central de la glándula que se encuentra principalmente en la cabeza y cuerpo de la glándula. Está irregularmente delimitada por la zona reticular de la corteza (ver fig. 1.2).

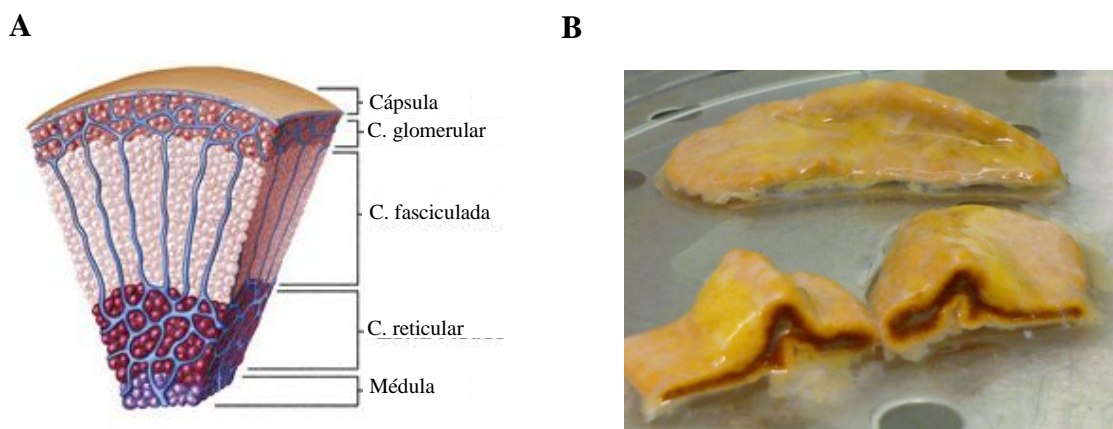


Fig. 1.2. Disposición de los distintos tejidos secretores de la glándula adrenal. A) Dibujo mostrando la disposición de las capas de la glándula adrenal en el eje sagital. B) Foto de glándulas adrenales humanas y corte sagital de una de ellas.

Está compuesta fundamentalmente por células secretoras de adrenalina y noradrenalina, que forman un parénquima de células epiteloides cromafines, denominadas así porque la reacción de oxidación que sufren las catecolaminas en presencia de sales de cromo les da una coloración granular parda (Coupland y Hopwood, 1966). Se extiende en un área diez veces menor que la

corteza y no más gruesa de 2 mm. En un corte transversal de la glándula adrenal, las células cromafines están organizadas en grupos o acinos, rodeados de tejido conectivo, que se distribuyen en torno a los vasos sanguíneos. Cada acino constituye una unidad funcional independiente para la liberación de catecolaminas, secretando todas las células del acino de manera sincrónica tras estimulación por las fibras esplánicas (Iijima y col., 1992; Kajiwara y col., 1997). Cada acino tiene aproximadamente un diámetro de 80 μm y contiene en torno a unas 100 células (Kajiwara y col., 1997; Hillarp, 1946). Su morfología es bastante homogénea. Tienen apariencia poligonal en la glándula intacta, pero adoptan morfología esférica (aproximadamente 15 μm de diámetro) cuando se aíslan (Kajiwara y col., 1997; Barbara y col., 1998b). Estudios morfológicos han sugerido un fenotipo polarizado en el tejido intacto con el núcleo desplazado hacia un polo de la célula (Carmichael, 1983).

Desde un punto de vista ultraestructural, las células cromafines se caracterizan por presentar grandes y abundantes vesículas de secreción en su citoplasma, denominadas vesículas de núcleo denso, por su alto contenido peptídico y opaco a los electrones. La liberación del contenido de estas vesículas de secreción se desencadena por la acción de la ACh, el neurotransmisor liberado por el axón de la neurona presináptica en la sinapsis esplánico-cromafín (Feldberg y col., 1934). Sin embargo, algunos autores han demostrado que, al igual que otras estirpes celulares, las células cromafines se comunican entre ellas, fundamentalmente dentro del mismo acino, mediante uniones estrechas (Moser, 1998; Martin y col., 2001). Estas estructuras, similares a un canal iónico, son permeables a numerosos compuestos de bajo peso molecular y, por tanto, permiten el acoplamiento eléctrico y metabólico entre células, transmitiéndose mensajes biológicos que codifican para diferentes funciones sin necesidad de pasar por el espacio

extracelular. La existencia de uniones estrechas en la célula cromafín se ha caracterizado mediante microscopía confocal; sin embargo parece que estas uniones se encuentran en pequeño número en la rata (Grynszpan-Wynograd y Nicolas, 1980; Meda y col., 1993). En el ratón, la conductancia entre las células cromafines es muy baja. Por lo que también se les ha llamado uniones de baja conductancia (Moser, 1998). Además, también se ha observado una baja conexión eléctrica entre las células cromafines que se encuentran contiguas en cultivo (Brandt y col., 1976a). Algunos autores opinan que las uniones estrechas tienen un papel importante en la transmisión de impulsos (Nassar-Gentina y col., 1988; Holman y col., 1994) y, por tanto, en la secreción de catecolaminas (Martin y col., 2001; Martin y col., 2003).

Además de las células adrenérgicas y noradrenérgicas también existe un tercer tipo de célula cromafín: las células cromafines llamadas SIF (*small intensely fluorescent*) que contienen vesículas pequeñas (Michel-Béchet y col., 1963; Gorgas y Bock, 1976; Kanno, 1998; Aunis y Langley, 1999). En el ratón constituyen menos del 4% (*small granule cells* o SGCs). Poseen un fenotipo de desarrollo intermedio entre células cromafines noradrenérgicas y neuronas (Aunis y Langley, 1999) pudiéndose diferenciar a cualquiera de ellos en distintas condiciones (Doupe y col., 1985a). Se cree que podrían ejercer el papel de interneuronas (Coupland, 1989). Recientemente, se han identificado células progenitoras cromafines derivadas de la cresta neural en la médula adrenal bovina (Chung y col., 2009).

Las células cromafines están intercaladas por células sustentaculares, consideradas como componentes neurogliales de la médula adrenal; son pequeñas e irregulares y contienen el marcador glial S-100 (Cocchia y Michetti, 1981). Por último, también se encuentran en la médula adrenal células endoteliales y fibroblastos.

1.2. EMBRIOGÉNESIS

El origen embriológico de las dos partes de la zona secretora es diferente, siendo la corteza originada a partir del mesodermo y la médula del neuroectodermo (Crowder, 1957), al igual que el resto de tejidos del sistema nervioso. En particular, las células precursoras de la médula adrenal se originan en la cresta neural y migran desde ganglios primitivos espinales (del sexto ganglio torácico al primer ganglio lumbar) para formar el sistema nervioso simpático primitivo situado dorsal a la aorta. Algunas células que forman parte de este esbozo simpático, la simpatogonia, migran más lejos a través de los nervios que se desarrollan de la cadena simpática y a lo largo de los vasos sanguíneos que penetran en el cortex adrenal del feto por la parte caudal de la glándula, aún sin cápsula. Esto explica la distribución no uniforme de la médula en el adulto. Las células neurales penetran en el primordio adrenal pasando a través del córtex fetal. De esta manera, tanto la simpatogonia como un plexo nervioso se distribuyen irregularmente entre las células corticales fetales. Dos divisiones de la progenie de la simpatogonia evolucionan, siendo la mayoría pequeñas células denominadas neuroblastos y una mayoría células grandes con citoplasma basófilo (feocromoblastos). Tras el parto, la médula comprende una región central de estas células que protruyen en el córtex provisional que irá degenerando. Se encuentran en agrupamientos irregulares conteniendo ambos tipos celulares aunque predominando los feocromoblastos. El colapso posnatal del cortex provisional y su estroma elimina el soporte de las intrusiones de estas células en el córtex y sus plexos nerviosos y por lo tanto, estas estructuras acaban fusionándose en torno a las venas centrales de la médula.

Como hemos visto, tradicionalmente se han considerado células cromafines a aquellas derivadas del ectodermo, de la cresta neural, innervadas por fibras simpáticas preganglionares y capaces de sintetizar y secretar catecolaminas. Sin embargo, es importante resaltar que no solo se encuentran células cromafines en la médula suprarrenal, aunque ésta sea su localización más habitual, sino que también se encuentran, por ejemplo, asociadas a las cadenas de ganglios simpáticos paravertebrales y prevertebrales formando los denominados paraganglios

1.3. INERVACIÓN

Las células corticales no reciben innervación, por lo que la síntesis de esteroides y la actividad celular se controlan a distancia por la hormona adrenocorticotropa (ACTH) liberada por la adenohipófisis, participando además la angiotensina II en la estimulación de la liberación de aldosterona por las células de la zona glomerulosa.

La médula está considerada como un ganglio simpático modificado. Recibe innervación por parte de fibras simpáticas preganglionares, procedentes de cuerpos celulares situados en el asta intermediolateral de las regiones torácica inferior y lumbar superior de la médula espinal (ver fig 1.3). Los axones pasan a través de los ganglios de la cadena simpática prevertebral a ese nivel y siguiendo los nervios esplácnicos llegan a la cápsula suprarrenal donde forman un rico plexo. En la rata, Coupland (Coupland, 1965) describió que tanto fibras mielinizadas y sin mielinizar alcanzan la médula, estando las segundas envueltas por el citoplasma de células de Schwann. Desde aquí las fibras penetran en la glándula, atraviesan la corteza y llevan sus terminales axónicas a contactar con una o varias células cromafines de la médula adrenal.

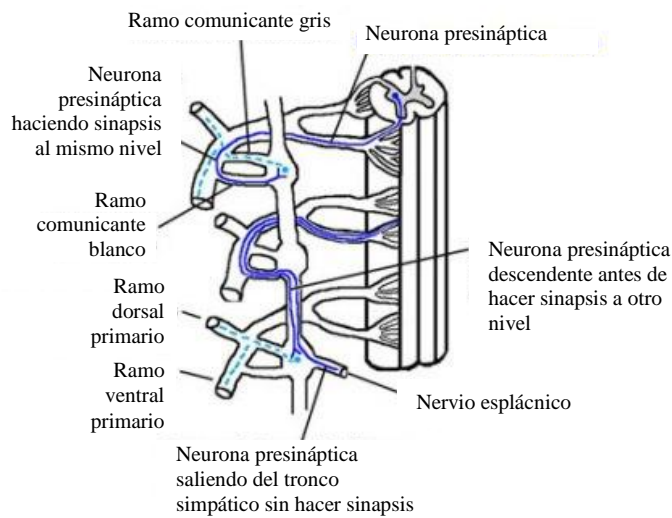


Fig. 1.3. Inervación simpática de la médula adrenal. El soma de las neuronas simpáticas presinápticas residen en el asta intermediolateral de la región torácica inferior y lumbar superior de la médula espinal. Estas neuronas proyectan sus axones que pasan a través del ramo comunicante blanco y de los ganglios de la cadena simpática paravertebral sin hacer sinapsis y salen formando parte del nervio esplácnico hasta llegar a la médula. Otras neuronas simpáticas presinápticas sí hacen sinapsis en estos ganglios sobre la neurona postsináptica efectora que extenderá sus axones hasta el tejido u órgano sobre el que ejercerá su acción.

La población medular de células cromafines se organiza en *clusters* o acinos (Hillarp, 1946) de unas cien células. Cada una puede estar en contacto con varios botones sinápticos de 2-3 μm cada uno (Iijima y col., 1992; Kajiwara y col., 1997; Coupland, 1965), que pueden proceder incluso de la misma fibra (Kajiwara y col., 1997) (ver fig. 1.4).



Fig. 1.4. Microfotografía de una rodaja de glándula adrenal de rata bajo tinción de Bodian. Las células cromafines se organizan en acinos globulares y cada célula presenta entre 1 y 4 botones sinápticos. Escala de la barra: 20 μm . Adaptado de Kajiwara y col., 1997.

La sinapsis “ganglionar” esplácnico-cromafín es de naturaleza colinérgica, aunque también existe secreción de sustancia P (Linnoila y col., 1980; Zhou y Livett, 1990), encefalina (Pelto-Huikko y col., 1985), VIP y PACAP (Malhotra y Wakade, 1987; Wakade, 1988; Wakade, 1998). Se

considera que esta sinapsis es un ganglio modificado puesto que la neurona que se consideraría posganglionar, la célula cromafín, no inerva ningún órgano directamente a través de axones sino que ejerce un control simpático difuso al verter sus neurotransmisores al torrente sanguíneo.

1.4. IRRIGACIÓN

Las glándulas adrenales reciben su irrigación de las arterias aorta, renal y subfrénica. La arteria renal se ramifica en las arterias suprarrenales superiores, medias e inferiores y, a su vez, estos vasos se ramifican en muchas arterias pequeñas antes de atravesar las cápsula, originando un plexo subcapsular y dando origen a tres patrones principales de distribución sanguínea. Los vasos forman un sistema compuesto por:

- Capilares capsulares que irrigan la cápsula.
- Capilares sinusoidales corticales fenestrados que irrigan la corteza y desembocan después en sinusoides capilares medulares.
- Arteriolas medulares que atraviesan la corteza para irrigar con sangre arterial a los sinusoides capilares medulares.

Por lo tanto, la médula tiene una doble irrigación sanguínea ya que recibe sangre de forma indirecta a través de los sinusoides corticales y directamente a través de las arteriolas medulares. A esta múltiple aferencia arterial se opone una sola vena eferente, la vena adrenolumbar o vena medular central, que a su vez recoge parte del drenaje del retroperitoneo. Esta disposición permite a los glucocorticoides liberados por la corteza llegar directamente a la médula, por lo que se puede considerar un sistema porta. La vena adrenal derecha desemboca en la cava inferior, mientras que la izquierda lo hace en la vena renal. En la cápsula y en el tejido conectivo que rodea los vasos sanguíneos

grandes de la glándula hay vasos linfáticos, aunque estos faltan en las regiones secretoras de la misma.

Aunque tienen orígenes embriológicos distintos e innervación e irrigación diferenciadas, las dos porciones de las glándulas suprarrenales presentan algunas funciones relacionadas. Los glucocorticoides sintetizados en la corteza llegan a la médula directamente, a través de la continuidad de los capilares sinusoidales corticales y medulares, e inducen la expresión de la enzima que cataliza la metilación de la noradrenalina para producir adrenalina, la feniletanol-N-metil transferasa PNMT (Wurtman y Axelrod, 1966; Wurtman y Axelrod, 1965). Sin embargo, esta reacción enzimática no ocurre en todas las células secretoras de la médula. Las células que contienen las PNMT transforman y almacenan la noradrenalina en forma de adrenalina; las células que no la contienen acumulan noradrenalina en sus vesículas.

Se creía que la adrenalina y la noradrenalina, por tanto, no se coalmacenaban en las mismas células, existiendo así dos poblaciones celulares distintas: las células adrenérgicas y las células noradrenérgicas (Hillarp y Hökfelt, 1953). Ésta constituiría la única diferencia bioquímica entre ambas. Las células que contienen adrenalina serían más abundantes en las zonas medulares irrigadas por la sangre que ha pasado antes por los sinusoides corticales, es decir, en regiones periféricas de la médula (Hillarp y Hökfelt, 1953; Livett y col., 1982; Eranko, 1952; Criado y col., 1997) y que, por tanto, contiene glucocorticoides. Por su parte, las células que contienen noradrenalina son más abundantes en las regiones de la médula irrigadas por capilares derivados de las arteriolas corticales, es decir, en zonas centrales de la médula (Livett y col., 1982). En consecuencia, la irrigación dual de la médula determina la distribución de las poblaciones celulares que contienen uno u otro neurotransmisor. Sin embargo, recientemente se han observado dos poblaciones distintas de vesículas en una misma célula (Grabner y col., 2005),

lo que podría representar distintos estadios biosintéticos o diferentes rutas de síntesis.

1.5. FUNCIÓN

La corteza está bajo el control del eje hipotálamo-hipofisario y, como se ha mencionado, se encarga de la síntesis y liberación de hormonas esteroideas: mineralocorticoides (aldosterona), glucocorticoides (cortisol) y hormonas sexuales (dehidroepiandrosterona). Entre sus funciones respectivas se encuentran las de regular el equilibrio hídrico y la tensión arterial, controlar el metabolismo energético, modular la respuesta inflamatoria e inmunitaria, y participar como precursor en la síntesis del andrógeno testosterona.

La médula adrenal es la responsable de la respuesta de lucha o huida ante una situación de estrés o amenaza para el organismo. La actividad del nervio esplácnico estimula a nivel postsináptico la liberación de catecolaminas (adrenalina principalmente) al torrente sanguíneo. En el resto del sistema nervioso simpático, el principal neurotransmisor liberado a nivel postsináptico es la noradrenalina. Las catecolaminas liberadas por la célula cromafín se consideran neurohormonas puesto que aún siendo neurotransmisores, median su acción a distancia considerable de su sitio de liberación. La adrenalina es más potente que la noradrenalina para activar receptores tanto α - como β -adrenérgicos (excepto β_1 , sobre el que son equipotentes) y producen una pléyade de respuestas en diferentes órganos o tejidos diana. En el sistema cardiovascular, la adrenalina incrementa la frecuencia cardíaca, el volumen minuto y la presión arterial sistólica, de manera simultánea a un aumento de consumo de oxígeno por el miocardio. Produce vasodilatación de las arteriolas musculares y coronarias pero también la constricción de los vasos que irrigan la piel, mucosas y área esplácnica. En

el sistema respiratorio, ejerce una poderosa broncodilatación a la que se suma la acción descongestionante debida a la vasoconstricción que produce en la mucosa de las vías respiratorias y en la circulación pulmonar. En el iris contrae el músculo radial y produce midriasis. También inhibe la micción relajando el músculo detrusor y contrayendo el esfínter y el trígono, y en el tracto gastrointestinal predomina la acción relajante sobre la contracción. En el útero humano grávido y a término reduce la frecuencia de las contracciones. Los efectos metabólicos tienen como resultado global la elevación de la glucemia para aumentar la disponibilidad de energía en el organismo, y un aumento del metabolismo en el músculo estriado con producción de ácido láctico. En el hígado se inhibe la glucógeno sintetasa impidiendo la incorporación de moléculas de glucosa a las cadenas de glucógeno, y además se activa la glucógeno fosforilasa, que activa la glucogenolisis. A esto se suma un aumento en la gluconeogénesis, la acción inhibidora de la secreción de insulina y un incremento en la lipólisis. En el músculo estriado acorta el estado activo del músculo rojo y facilita la descarga de los husos musculares, lo que desencadena el temblor muscular asociado a la administración de adrenalina.

2. EL MODELO NEURONAL DE LA CÉLULA CROMAFÍN

Las células cromafines de las glándulas adrenales de los mamíferos están emparentadas con las neuronas simpáticas postganglionares (Douglas, 1968; Tischler, 2002) ya que ambas derivan de la cresta neural y liberan catecolaminas, ATP, NPY y opioides en respuesta a la estimulación por ACh. Así, poseen receptores nicotínicos, (Holman y col., 1994; Douglas y Rubin, 1961b; Wilson y Kirshner, 1977; Holman y col., 1995; Barbara y Takeda, 1996; Douglas y Poisner, 1965), muscarínicos (Douglas y Poisner, 1965), sobre los que actúa la ACh liberada por la terminal presináptica. Disparan potenciales de acción (Brandt y col., 1976a; Kidokoro y Ritchie, 1980), poseen canales de calcio, sodio y potasio sensibles a voltaje (Fenwick y col., 1982b; Artalejo y col., 1993), exhiben facilitación de la corriente de calcio por prepulsos despolarizantes repetidos (Fenwick y col., 1982b; Hoshi y col., 1984; Hoshi y Smith, 1987; Ikeda y col., 1991; Artalejo y col., 1992b), y emiten prolongaciones al co-cultivarlas con astrogliá o al exponerlas al factor de crecimiento nervioso NGF (Levi-Montalcini y Aloe, 1980; Tischler y col., 1980; Unsicker y col., 1980; Unsicker y col., 1978). También poseen NGF, TGF β y GDNF (Krieglstein y col., 1996; Unsicker y Krieglstein, 1996). Además poseen receptores para muchos otros neurotransmisores como el GABA (Bormann y Clapham, 1985; Cavadas y col., 2001), ATP, opioides, NPY (Cavadas y col., 2001) y CGRP (Di Angelantonio y col., 2002).

En 1988, Fujita, Kanno y Kobayashi (Fujita y col., 1988) agruparon a las células neuroendocrinas con propiedades similares a las neuronas, y a las células nerviosas con características endocrinas, bajo el término de paraneurona. Se encuentran relacionadas con las neuronas en términos de

estructura, función y metabolismo (Fujita y col., 1976) y pueden considerarse como paraneuronas ya que cumplen los siguientes requisitos:

- Sintetizan neurotransmisores o productos relacionados con éstos (adrenalina, noradrenalina, dopamina, histamina y serotonina).
- Poseen vesículas sinápticas y/o vesículas de secreción (donde se almacenan los neurotransmisores sintetizados).
- Secretan, en respuesta a estímulos adecuados, neurotransmisores que actúan sobre receptores situados en la membrana celular.

En base a estos datos, y al hecho de que puedan ser aisladas y mantenidas en cultivo con facilidad (Livett, 1984), se justifica su empleo como un excelente modelo neuronal humano. Además, debido a que son accesibles a los análisis bioquímicos, a que la sinapsis esplácnico-cromafín es sencilla y a su forma esférica desprovista de dendritas, mucho de lo que se conoce sobre la producción y la secreción de neurotransmisores ha sido establecido a través de estudios realizados en células cromafines (Neher, 1998).

Es importante destacar que las células cromafines en cultivo desarrollan un fenotipo neuronal en cultivo o cuando son trasplantadas en ambientes permisivos (Olson, 1970). Se conoce que se incrementa el porcentaje de células que desarrollan este fenotipo generando procesos neuronales en presencia de NGF (Tischler y col., 1980; Unsicker y col., 1978; Aloe y Levi-Montalcini, 1979), siendo antagonizado este efecto por los glucocorticoides (Unsicker y col., 1978). Sin embargo, los glucocorticoides también favorecen la expresión de marcadores específicos de células cromafines y favorecen la supervivencia de progenitores cromafines (SIF) en cultivo (Doupe y col., 1985a; Doupe y col., 1985b). Es por ello que se postula que estos compuestos

secretados por la corteza adrenal permiten el mantenimiento de un fenotipo cromafín frente a otro neuronal (Doupe y col., 1985a; Tischler, 2002; Hodel, 2001).

Las células cromafines humanas sólo son adrenérgicas y no muestran la separación de grupos celulares adrenérgicos y noradrenérgicos de otras especies (Lloyd y col., 1986; Suzuki y Kachi, 1996). Las células cromafines de rata adulta muestran una respuesta proliferativa a NGF en cultivo (Powers y col., 2009), mientras que las humanas sufren una diferenciación neuronal sin proliferación (Tischler y col., 1980) y las de ratón no muestran ninguna respuesta (Tischler y col., 1997).

Debido a su fenotipo catecolaminérgico, ha habido diversos intentos de generar una línea celular de células cromafines inmortalizadas (Birren y Anderson, 1990; Eaton y col., 2000) para ser empleadas en tratamientos de enfermedades neurodegenerativas o en dolor intratable (Tkaczuk y col., 1997). Partiendo de células de feocromocitoma de rata, un tumor de la médula adrenal, sí se ha conseguido una línea celular noradrenérgica denominada PC12 (Greene y Tischler, 1976) ampliamente utilizada hoy en día en investigación.

2.1. RELEVANCIA FISIOPATOLÓGICA DE LA CÉLULA CROMAFÍN

Los estímulos que disparan la respuesta secretora en la célula cromafín pueden provenir de estímulos químicos que lleguen a la médula adrenal por vía hemática, o bien pueden ser debidos a un incremento de la actividad de los nervios espláncnicos. Las situaciones de alergia o de hipotensión generan estímulos químicos como la histamina, la bradicinina o la angiotensina II que

activan la liberación de catecolaminas (Marley y col., 1989). La secreción de catecolaminas debido a la estimulación del nervio esplácnico se debe a situaciones de miedo, ansiedad o estrés orgánico y/o ambiental.

El concepto de estrés lo definió Selye en el año 1936 como un estado de alerta en el que el principal objetivo del organismo es hacer frente al estímulo estresante, reajustando sus actividades biológicas. Hoy en día se sabe que la cadena de reacciones mediante las cuales el cerebro coordina la respuesta al estrés, el sistema nervioso simpático y la médula adrenal son los componentes con un papel predominante. La médula adrenal ayuda al control del estrés físico (hipoxia, hipoglucemia, hemorragia) y emocional (miedo, alerta, inquietud). El principal papel de las catecolaminas en la sangre es asegurar el flujo sanguíneo adecuado de los órganos vitales para que el organismo pueda combatir el estrés rápidamente. La liberación basal de catecolaminas es muy baja, del orden de nanogramos por minuto; sin embargo, frente a situaciones de estrés se produce un masivo vertido de adrenalina (70%) y noradrenalina (30%) al torrente circulatorio, incrementándose su concentración plasmática hasta 60 veces (Takiyyuddin y col., 1990; Takiyyuddin y col., 1994; Cryer, 1980). Esta súbita liberación de catecolaminas establece condiciones de máxima utilización de energía.

Además, las catecolaminas desempeñan funciones reguladoras importantes en distintas sinapsis dopaminérgicas, noradrenérgicas y adrenérgicas. De hecho, se han asociado diversos estados patológicos con una alteración en la síntesis, almacenamiento, liberación o degradación de las mismas. Entre otros, la hipertensión arterial esencial (Goldstein, 1983), la isquemia coronaria, la insuficiencia vascular cerebral y periférica, la depresión endógena, la esquizofrenia, la enfermedad de Parkinson, diversas arritmias cardíacas y el asma bronquial. A ello se añade el hecho de que junto

con las catecolaminas se liberan múltiples sustancias que se encuentran en las vesículas coalmacenadas con ellas. Los péptidos opiáceos, el ATP, el ascorbato, las cromograninas y sus derivados (ej. catestatina), entre otros, pueden desempeñar funciones reguladoras importantes de los efectos catecolaminérgicos (Mahata y col., 2010b).

2.2. APLICACIONES CLÍNICAS

Las células cromafines no sólo son útiles como modelos neuronales en el laboratorio, sino que también suponen una alternativa como terapia celular para diversas alteraciones neuronales (Drucker-Colin y Verdugo-Diaz, 2004; Fernandez-Espejo y col., 2005b; Jozan y col., 2007).

En la enfermedad de Parkinson hay una pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra que proyectan hacia el cuerpo estriado (núcleo caudado y putamen) y ello se traduce en una disminución en los niveles de dopamina en este último. La terapia de trasplante celular es una alternativa terapéutica en esta enfermedad (Drucker-Colin y Verdugo-Diaz, 2004) debido a las siguientes razones;

- hay pérdida de neuronas capaces de producir dopamina,
- la terapia sustitutiva con L-DOPA produce una mejora dramática de los signos y síntomas,
- existe un área definida para el trasplante,
- los implantes de células dopaminérgicas mejoran los signos de la enfermedad en modelos animales (Freed y col., 1981).

El primer trasplante en humanos usando células cromafines lo llevaron a cabo Backlund y sus colaboradores en el año 1985. Hicieron un implante

intraparenquimatoso de células cromafines de la glándula adrenal en el putamen de dos enfermos de Parkinson, basándose en que las células cromafines producen dopamina como precursor de noradrenalina (revisado en Trifaro, 2002). Aunque la mejoría de los dos pacientes transplantados fue pasajera (Backlund y col., 1985; Lindvall y col., 1987), se produjo posteriormente en México una intervención similar (Madrazo y col., 1987) que obtuvo resultados prometedores hasta un año después (Drucker-Colin y col., 1988). Se cree que parte del éxito se debió al abordaje intraventricular, clásicamente empleado en experimentación animal (Freed y col., 1981; Perlow y col., 1979) que permite la comunicación del implante con el líquido cefalorraquídeo del ventrículo lateral (Drucker-Colin y Verdugo-Díaz, 2004; Lopez-Lozano y col., 2000). Ese mismo año, un equipo de investigadores chinos (Ding y col., 1988; Jiao y col., 1988) realizaba también con éxito el implante de médula adrenal autóloga en pacientes con enfermedad de Parkinson, los cuales mostraron una evolución favorable tras la intervención. En España, el primer trasplante también se realizó en 1987 (Lopez-Lozano y col., 1989). Estos autores hicieron hincapié en la importancia de disecar el tejido cromafín del de la corteza para favorecer el desarrollo de un fenotipo neuronal (Unsicker y col., 1978) ya que los corticoides liberados por estas células inhiben este proceso (*sprouting*) que, por otra parte, es facilitado en presencia de factores tróficos como el NGF, FGFb y GDNF (Olson y col., 1991; Murata y col., 2008a; Murata y col., 2008b; Lopez-Lozano y col., 1996; Lopez-Lozano y col., 1997b; Lopez-Lozano y col., 1997a; Lopez-Lozano y col., 1999). Además, la implantación simultánea junto a otros tejidos que liberan estos factores tróficos también parece influir positivamente en la supervivencia de las células cromafines implantadas (Date y col., 1990; Bing y col., 1990).

Las principales ventajas de la utilización de la médula adrenal frente a otros tejidos son:

- la posibilidad de realizar trasplantes autólogos, lo que evita la inmunosupresión y las cuestiones éticas (ej. si se utilizase tejido mesencefálico fetal),
- el alto número de células que se pueden aislar, frente a otros tejidos como el cuerpo carotídeo o el órgano de Zückerland (Espejo y col., 1998; Espejo y col., 2001).

Sin embargo uno de los principales inconvenientes lo podría representar la escasa supervivencia de las células cromafines de la médula adrenal en la zona implantada. Esta podría verse comprometida en los enfermos de Parkinson de manera similar a lo que le ocurre a las células implantadas del cuerpo carotídeo (Fernandez-Espejo y col., 2005b; Arjona y col., 2003), puesto que estos tejidos de linaje simpatoadrenal podrían sufrir cierto grado de degeneración. Fernández-Espejo y colaboradores (2005) citan como inconveniente adicional que sólo un 1% de la población de células cromafines libera dopamina (Trifaro, 2002), pero es cierto que la ruta biosintética para la obtención de las catecolaminas principales (adrenalina y noradrenalina) implica la síntesis inicial de dopamina que es convertida en noradrenalina y adrenalina debido a la acción de las enzimas DBH y PNMT. Estas dos enzimas podrían representar una diana terapéutica a considerar para interrumpir la biosíntesis catecolaminérgica e incrementar la liberación de dopamina en estos implantes autólogos. Sin embargo, varios autores coinciden en que la mejoría funcional observada en los pacientes tratados no se podrían deber solamente a la liberación de dopamina, porque sólo un pequeño porcentaje de células podría liberarla, sino a los factores tróficos liberados (NGF, FGF, TGF β , GDNF) por el tejido implantado (Fernandez-

Espejo y col., 2005a; Drucker-Colin y Verdugo-Diaz, 2004). De esta misma manera, la utilidad de los implantes de cuerpo carotídeo se basa en la capacidad de estas células de liberar GDNF (Villadiego y col., 2005) y el efecto reparador que tiene este compuesto sobre el tejido nigroestriatal dañado (Lin y col., 1993; Tomac y col., 1995; Toledo-Aral y col., 2003), puesto que se ha descrito que este factor es estrictamente necesario para la supervivencia de células catecolaminérgicas (Pascual y col., 2008).

Otra aplicación en la que se han empleado las células cromafines es en el tratamiento del dolor crónico debilitante, al liberar catecolaminas y opioides (Livett y col., 1981) que parecen ser eficaces en su tratamiento (Tkaczuk y col., 1997; Hama y Sagen, 1994; Sortwell y col., 1995).

Diversos intentos para crear una línea celular de neuronas simpáticas llevaron a producir células cromafines inmortalizadas pero la posibilidad de inducir tumores en el sistema nervioso central representa el principal inconveniente. Una de las líneas creadas fueron las células cromafines inmortalizadas v-myc, que producían neuronas postmitóticas pero éstas morían en ausencia de NGF (Birren y Anderson, 1990). Sin embargo, la creación de una línea inmortalizada condicional parece más prometedora al poder detener a voluntad la división celular (Eaton y col., 2000).

Por último, el aislamiento de progenitores cromafines derivados de la cresta neural, obtenidos a partir de la médula adrenal de vaca representa una oportunidad para desarrollar neuronas potencialmente adaptables para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Chung y col., 2009).

3. EL ACOPLAMIENTO ESTÍMULO-SECRECIÓN

Hace casi 50 años que Douglas y Rubin (Douglas y Rubin, 1961a) acuñaron la expresión “acoplamiento estímulo-secreción”. Tenían en mente el fenómeno similar de “acoplamiento excitación-contracción” que también está mediado por ACh y calcio en la sinapsis neuromuscular. Establecieron el mecanismo por el cual la ACh provoca la secreción de catecolaminas en la célula cromafín, cómo influía la composición iónica del medio en la respuesta secretora y concluyeron que el mecanismo de liberación es un proceso calcio-dependiente. La ACh activa receptores nicotínicos y muscarínicos, lo que lleva a la despolarización de la membrana (Douglas y col., 1967). Los potenciales de acción producidos por la ACh dependen de sodio (Biales y col., 1976) y calcio (Kidokoro y Ritchie, 1980; Brandt y col., 1976b; Kidokoro y col., 1982). Estos últimos autores observaron que el grado de liberación de catecolaminas se incrementaba, de forma dependiente de la frecuencia de disparo de potenciales de acción inducidos por ACh; ésta fue la primera evidencia clara entre el comportamiento eléctrico de la célula cromafín y su función secretora. En particular, el flujo catiónico que discurre a través del ionóforo del receptor nicotínico está compuesto parcialmente por calcio (Vernino y col., 1992; Zhou y Neher, 1993), lo que es suficiente para disparar el proceso exocitótico (Douglas y Rubin, 1963; Gandia y col., 1991; Mollard y col., 1995). El receptor muscarínico ha sido implicado en la activación de canales catiónicos no selectivos (Borges y col., 1987; Inoue y Kuriyama, 1991; Inoue y Imanaga, 1993; Forsberg y col., 1995) y en la formación de IP_3 que induce la liberación de calcio del retículo endoplásmico, produciendo la liberación de catecolaminas (Forsberg y col., 1995; Eberhard y Holz, 1987; Malhotra y col., 1989; Garcia y col., 1992; Xu y col., 1992). Estos receptores regulan la respuesta exocitótica en células cromafines de varias especies como el gato, la rata, el cerdo y el cobayo (Albillos y col.,

1992; Shukla y Wakade, 1991; Finnegan y col., 1996; Xu y Forsberg, 1993; Asano y col., 1995). En la célula cromafín de la vaca, la estimulación muscarínica produce una elevación de calcio mínima, que no conlleva una respuesta secretora (Finnegan y col., 1996; Cheek y Burgoyne, 1987; Ballesta y col., 1989).

La secuencia real de eventos que llevan desde el estímulo a la liberación de catecolaminas en la médula adrenal es desconocida. Sin embargo, diversos estudios empleando diferentes aproximaciones establecen la siguiente secuencia de eventos: tras la unión de la ACh al receptor nicotínico se produce la apertura de su canal iónico, penetrando a su través principalmente iones de sodio y, en menor medida, de calcio ((Brandt y col., 1976a; Douglas y col., 1967; Kidokoro y col., 1982) Douglas y 1967; Brandt y 1976, Kidokoro y 1982). La entrada de sodio va a provocar una ligera despolarización de la membrana, suficiente para incrementar su permeabilidad a este catión (apertura de canales de sodio voltaje-dependientes) (Douglas y Rubin, 1961a; Brandt y col., 1976b; Cena y col., 1983). Esto conduce a la entrada masiva de sodio al interior celular, lo que va a favorecer una mayor despolarización de la membrana plasmática y el disparo de potenciales de acción (Biales y col., 1976). Como consecuencia de esta despolarización se produce la apertura de canales iónicos que permean calcio desde el espacio extracelular y, finalmente, la exocitosis (García y col., 1984).

Sin embargo, a pesar de la hipótesis propuesta, la contribución relativa de los elementos implicados en el acoplamiento estímulo-secreción en las células cromafines no está claramente establecida. La mayoría de los estudios realizados emplearon técnicas de espectrofluorimetría y de radiactividad sobre poblaciones celulares y durante tiempos de estimulación prolongados.

Hoy en día, con la disponibilidad de técnicas con una mayor resolución espacio-temporal, se espera avanzar en el conocimiento de los eventos que tienen lugar en este proceso. Además, muchos de los trabajos que han servido para fundar la hipótesis de la secuencia de eventos antes mencionada, abordan el fenómeno del acoplamiento estímulo-secreción en la célula cromafín bovina, por lo que la posible activación del receptor muscarínico y su implicación en la respuesta exocitótica no está contemplada (ver más adelante).

Una vez el calcio llega al citosol independientemente de la vía que haya utilizado, puede desencadenar la exocitosis pero solamente de las vesículas que están preparadas para ello. Se han caracterizado cuatro poblaciones de vesículas secretoras de acuerdo a su estadio de maduración para sufrir la fusión con la membrana plasmática (Sorensen, 2004; Garcia y col., 2006):

- RRP, o vesículas preparadas para liberarse (*ready release pool*)
- SRP, vesículas de liberación lenta (*slow releasable pool*)
- UPP, vesículas inmaduras (*unprimed pool*)
- RVP, vesículas en reserva (*reserve vesicle pool*).

El primer grupo contiene vesículas en su fase final de maduración, atracadas en la membrana y en el paso previo a su fusión con ésta, proceso que se disparará rápidamente en presencia de calcio. El segundo grupo, el SRP, contiene vesículas atracadas en la membrana, en un estadio de maduración inmediatamente anterior al RRP. Sus vesículas nutren a este último e incluso se pueden fusionar con la membrana plasmática en presencia de calcio, aunque es un proceso más lento (Heinemann y col., 1993). También el paso de vesículas del conjunto de RVP a UPP está mediado por el calcio (von Ruden y Neher, 1993). Ambos son conjuntos de vesículas de reserva que

nutren de manera secuencial a los grupos anteriormente mencionados (ver fig. 2.1).

La sinaptotagmina I es una proteína SNARE (del inglés *Soluble N-ethylmaleimide Sensitive Attachment Receptor*) que se considera el principal sensor de calcio que junto a otras proteínas, dispara la fusión de las vesículas del RRP a la membrana (Sorensen, 2004; Geppert y col., 1994; Sudhof, 1995). Además, el calcio tiene la propiedad de activar la fosforilación mediada por PKC que produce una disrupción de la red de actina del citoesqueleto. Este acontecimiento libera las vesículas de la barrera de F-actina del citoesqueleto y posibilita que migren a sitios activos de exocitosis, incrementando el tamaño del RRP (Vitale y col., 1995; Gillis y col., 1996).

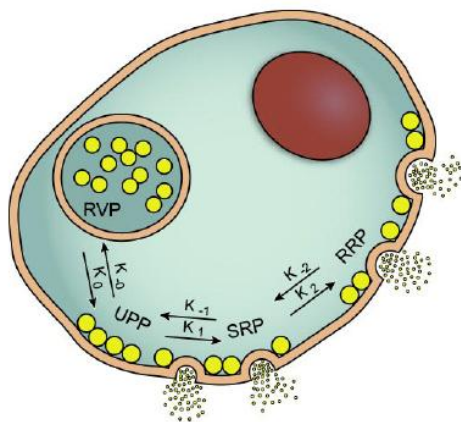


Fig. 2.1. Las diferentes poblaciones de vesículas secretoras de la célula cromafín. Las vesículas que conforman el RRP están preparadas para liberarse. La exocitosis se dispara en presencia de calcio. En la célula cromafín de ratón este pool de vesículas se libera con una constante de tiempo de 20-40 ms (voets y col., 1999) y se rellena con una constante de tiempo de 10 s (Moser y Neher, 1997). La población de SRP se libera con una constante de tiempo más lenta (~230 ms) (Sorensen, 2004). El conjunto de vesículas de reserva RVP nutren el UPP, lo hacen a través de un mecanismo dependiente de calcio (Von Rüden y Neher, 1993). Adaptado de García y col., 2006.

En las células cromafines, se postula que las vesículas se encuentran atracadas a distancia de los canales de calcio y por ello la liberación de catecolaminas en células aisladas en cultivo no está estrechamente acoplada a los potenciales de acción (Zhou y Misler, 1995) y los canales de calcio (Wu y col., 2009) aunque hay cierta controversia a este respecto (Horrigan y Bookman, 1994). Empleando la técnica de “patch clamp” y amperometría en célula única se ha observado experimentalmente que en células cromafines de

rata y vaca, el evento secretor se produce con una latencia de 2s (Zhou y Misler, 1995), 145 ms (Elhamdani y col., 1998), respectivamente. En la especie humana se ha observado una latencia de unos 3 ms en sujetos jóvenes asociada al que se denomina canal L facilitado (Elhamdani y col., 2002). Por tanto, en determinadas especies, los periodos de latencia están alrededor de varias decenas de milisegundos, mientras que la neurotransmisión es un proceso altamente sincronizado (Katz y Miledi, 1965). Este retraso en la liberación de neurotransmisores en las células aisladas en cultivo se debe al tiempo que requiere la difusión del ión calcio desde el sitio de entrada al sitio de exocitosis (Chow y col., 1996). En base a estos datos, se ha establecido una distancia media de difusión de 300 nm (Klingauf y Neher, 1997). A esta distancia, se produce un pico de calcio citosólico de 10 μM (Chow y col., 1994), lo que podría explicar la persistente respuesta secretora una vez cesa la entrada de calcio (Chow y col., 1992).

En base a estos datos, se podría aseverar que los canales de calcio no están en estrecho contacto con la maquinaria de la exocitosis sino que, ante estas grandes distancias, es el calcio reunido por la apertura simultánea de múltiples canales el que contribuye a la liberación de neurotransmisores por parte de una vesícula en particular (Garcia y col., 2006). Sin embargo, en la célula cromafín de ratón *in situ*, Moser y Neher (Moser y Neher, 1997b) han observado un componente de rápida liberación en respuesta a potenciales de acción de 2 ms de duración. Este componente tenía un tamaño de 42 fF o 33 vesículas (Moser y Neher, 1997a), y se encontraba a 30 nm de los canales de calcio puesto que sólo el quelante rápido BAPTA era capaz de abolirlo, al contrario que el EGTA. Estos canales de calcio cercanos a las vesículas preparadas para liberarse (RRP) podrían ser principalmente los canales $\text{Ca}_v2.3$ (Albillos y col., 2000).

Desde un punto de vista fisiológico y como ya se ha indicado anteriormente, las células cromafines están inervadas por fibras nerviosas espláncnicas, que en condiciones de reposo presentan una frecuencia de disparo de 0.1 Hz en células en cultivo (Brandt y col., 1976a), y de 0.01 Hz en células en rodaja (Barbara y Takeda, 1996). En situaciones de estrés la frecuencia de descarga se incrementa hasta tres veces. Este aumento de la actividad espláncnica se va a traducir en la liberación de ACh, que va a unirse a los receptores nicotínicos y muscarínicos presentes en la membrana de la célula cromafín. Aunque el porcentaje de cada uno de los receptores varía con la especie, y se altera en situaciones de estrés crónico, en los mamíferos predomina la acción de la ACh sobre los receptores nicotínicos (Wilson y Kirshner, 1977; Kidokoro y col., 1982; Schneider y col., 1977; O'Sullivan y col., 1989a) aunque los receptores muscarínicos cobrarían relevancia en periodos de estimulación colinérgica prolongados (Olivos y Artalejo, 2008b).

4. LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE

4.1 ESTRUCTURA

Los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDVs) son proteínas transmembrana compuestas de cuatro a cinco subunidades distintas. La subunidad α_1 es la más grande (190-250 kDa) e incorpora el poro iónico, la subunidad β es intracelular y la subunidad α_2 - δ está unida por un puente disulfuro (ver fig. 4.1). Puede existir una subunidad adicional, denominada γ en células del músculo estriado o P95 en neuronas. La diversidad funcional de los diferentes subtipos se debe a la existencia de múltiples genes que codifican para diferentes clases de subunidades α_1 y β , así como variantes de un mismo gen debido a un procesamiento alternativo (Hofmann y col., 1999).

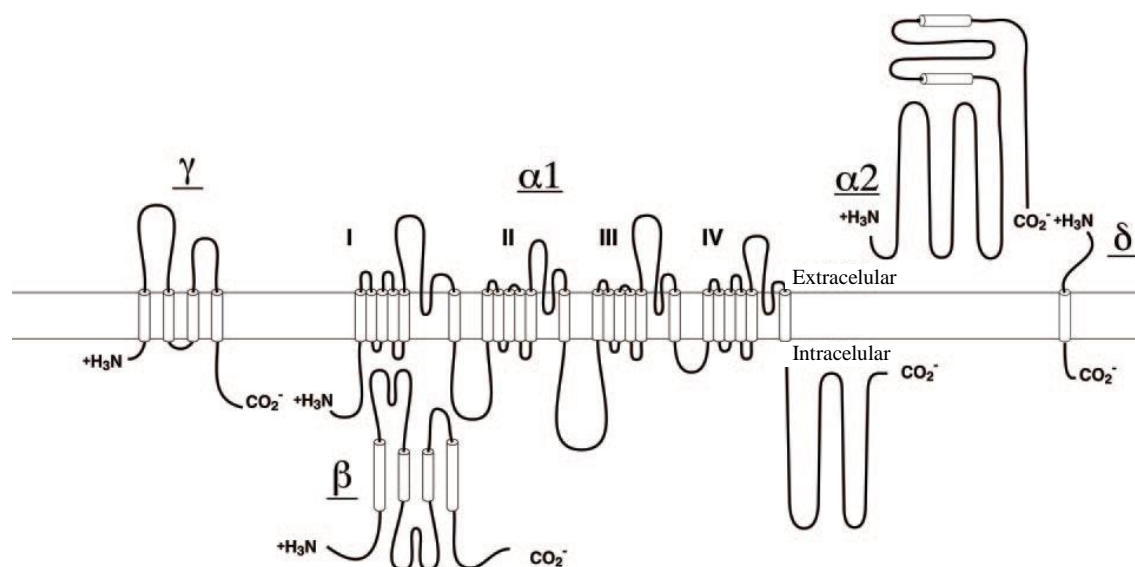


FIG. 4.1. Estructura de las subunidades de los canales Ca_v1 . Se ilustra la composición y estructura de las subunidades del canal de calcio purificado de músculo estriado. Se emplearon como modelo los datos bioquímicos y moleculares de otros canales Ca_v1 y Ca_v2 . Los cilindros representan hélices α . La longitud de las líneas representa aproximadamente la longitud de los segmentos polipeptídicos. Adaptado de Catterall y col., 2005.

La subunidad α_1 comprende el poro iónico altamente selectivo para el calcio que determina la mayoría de los parámetros biofísicos (conductancia del canal, la activación e inactivación) y contiene los sitios de interacción para fármacos, toxinas y segundos mensajeros (ver fig. 4.2). Está compuesta por cuatro segmentos homólogos (I-IV) con seis segmentos transmembrana cada uno entre los cuales el segmento S4 ejerce de sensor de voltaje. El lazo entre los segmentos transmembrana S5 y S6 en cada dominio determina la conductancia y selectividad iónicas.

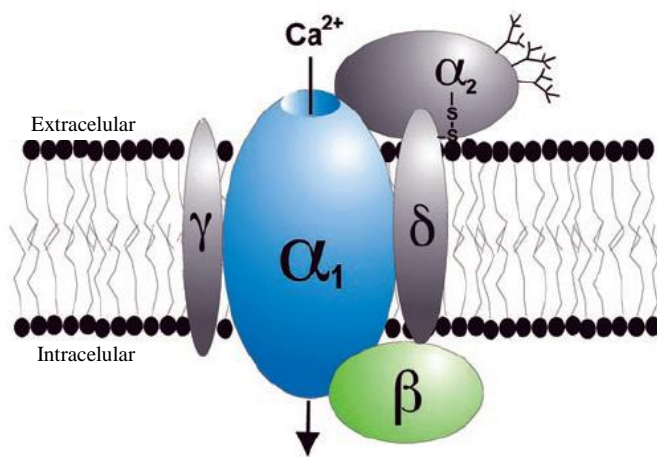


Figura 4.2. Subunidades y estructura de los canales de calcio dependientes de voltaje. Las subunidades accesorias α_2 - δ y β se encuentran asociadas a las subunidades α_1 Ca_v1 y Ca_v2 . Su contribución a los canales de tipo T (familia α_1 Ca_v3) es menos clara. Las propiedades biofísicas y farmacológicas están condicionadas por las subunidades α_1 . Las subunidades γ forman parte del canal $\text{Ca}_v1.1$ pero su papel en la formación de otros VDCCs es menos evidente. Adaptado de Striessnig y Koschack, 2008.

Hasta la fecha se han identificado en el genoma humano diez isoformas de la subunidad α_1 , cada una de ellas susceptibles de sufrir un procesamiento alternativo adicional. Según sus características biofísicas y farmacológicas dan lugar a cinco diferentes canales de calcio (ver tabla 4.1). Las subunidades β y α_2 - δ son necesarias para la inclusión del canal en la membrana plasmática y el ajuste fino de las propiedades de compuerta de la mayoría de las subunidades α_1 . Existen al menos cuatro subunidades β , cuatro α_2 - δ y ocho γ . Además, más de una isoforma de cada una de estas subunidades puede ser expresada en una única célula. Como las subunidades α_1 son necesarias para la formación del canal, la disrupción del gen para una subunidad α_1 en particular debe producir una completa pérdida de las corrientes de calcio

correspondientes. Para corregir este defecto, se puede producir una regulación al alza de otros tipos de canales de calcio (Aldea y col., 2002). Sin embargo, la ablación del gen que codifica para las subunidades β o α_2 - δ no lleva necesariamente a una pérdida total del canal asociado a esta subunidad porque puede existir una compensación con otras isoformas de estas subunidades accesorias.

4.2 SUBTIPOS

Históricamente, se han empleado diferentes nombres para los productos de los 10 genes que codifican para las subunidades α_1 de mamíferos, lo que ha contribuido a crear cierta confusión. En 1994, se adoptó una nomenclatura arbitraria en la cual a las subunidades α_1 se las denominaba α_{1S} si representaban la isoforma original del músculo estriado, α_{1A-E} para los que se descubrieron posteriormente (Birnbaumer y col., 1994). En el año 2000, Ertel y colaboradores propusieron una nomenclatura basada en la adoptada para los canales de potasio (Chandy y Gutman, 1993). Los canales de calcio se nombraron entonces, empleando el símbolo químico del principal ión permeante (Ca) junto a un subíndice indicando el principal regulador fisiológico, el voltaje (Ca_v). El identificador numérico, correspondería a la subfamilia de genes que codifican para la subunidad α_1 de los canales Ca_v (3 subfamilias), y el orden del descubrimiento de dicha subunidad dentro de la subfamilia (de 1 a n). De acuerdo con esta nomenclatura, la subfamilia Ca_v1 ($Ca_v1.1$ - $Ca_v1.4$) incluye canales conteniendo las subunidades α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} y α_{1F} , los cuales median corrientes de tipo L (ver tabla 4.1). La subfamilia Ca_v2 ($Ca_v2.1$ - $Ca_v2.3$) incluye canales que contienen las subunidades α_{1A} , α_{1B} y α_{1E} , que median las corrientes de tipo P/Q, N y R, respectivamente. La subfamilia

Ca_v 3 (Ca_v 3.1-Ca_v 3.3) incluye canales conteniendo las subunidades α_{1G} , α_{1H} y α_{1F} , que median corrientes de calcio de tipo T (ver más adelante).

La secuencia aminoacídica de estas subunidades α_1 tienen una homología del 70% dentro de la misma subfamilia pero menor del 40% entre las tres subfamilias. La división de los canales de calcio en estas tres familias es filogenéticamente antigua hasta el punto de que un representante de cada una de ellas se puede encontrar en el genoma del gusano *C. elegans*.

4.2.1 CANALES Ca_v1

Se caracterizan por mostrar poca inactivación y por ello en un principio se denominaron de tipo L (“long lasting”). Constituyen la principal vía de entrada de calcio el músculo cardíaco y liso, y también controlan la liberación de hormonas y neurotransmisores en células endocrinas y algunas neuronas. Cuatro subunidades α_1 distintas dan lugar a los canales Ca_v1.1, Ca_v1.2, Ca_v1.3 y Ca_v1.4. Las 1,4-dihidropiridinas (DHPs) modulan estos canales de manera positiva (BayK8644) o negativa (isradipina, nifedipina, nitrendipina, nimodipina). La primera prolonga el tiempo de apertura del canal y las últimas se unen a un dominio de alta afinidad a dihidropiridinas (Hockerman y col., 1997; Striessnig y Koschak, 2008). Otro compuesto que también potencia la corriente Cav1, a través del enlentecimiento del cierre del canal es el benzolpirrol FPL 64176, aunque también bloquea los canales de tipo Ca_v2.2 (Liu y col., 2003).

Otros compuestos como algunas arilialquilaminas (verapamilo) y benzotiazepinas (diltiazem) también bloquean estos canales y median efectos inotrópicos negativos y relajantes en células musculares cardíacas y lisas, respectivamente (Fleckenstein, 1983; Spedding, 1985). Algunos derivados piperazínicos (cinarizina, dotarizina, flunarizina) poseen propiedades bloqueantes de éstos y otros canales por lo que se consideran de amplio

espectro (Garcez-Do-Carmo y col., 1993; Lara y col., 1997; Villarroya y col., 1995). A pesar de la relación farmacológica que une a estos canales, presentan una alta diversidad funcional y son incapaces de compensar totalmente la falta de alguno de sus subtipos en los modelos *knock out* (Striessnig y Koschak, 2008).

Se han detectado canales de esta subfamilia en la célula cromafín de la vaca, (Albillos y col., 1993), rata (Gandia y col., 1995), ratón (Hernandez-Guijo y col., 1998), cerdo (Kitamura y col., 1997) , gato (Albillos y col., 1994) y humano (Gandia y col., 1998). A nivel molecular, se ha detectado mRNA para los subtipos $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$ en la célula cromafín de la rata (Baldelli y col., 2004), por lo que es probable que estos canales sean los responsables de la corriente L en este tipo celular.

4.2.2 CANALES Ca_v2

Se expresa predominantemente en neuronas y células neuroendocrinas como las β -pancreáticas (Ligon y col., 1998; Pereverzev y col., 2002), músculo cardíaco ($Ca_v2.3$) (Weiergraber y col., 2000), testículos (Lievano y col., 1996) y las células cromafines de la glándula adrenal (Albillos y col., 2000; Albillos y col., 1993; Albillos y col., 1996a; Garcia-Palomero y col., 2000; Garcia-Palomero y col., 2001). Median la liberación rápida de neurotransmisores de las terminales nerviosas de sinapsis centrales y de motoneuronas de la unión neuromuscular (Jun y col., 1999; Gasparini y col., 2001; Qian y Noebels, 2001). Además de estar presentes en la membrana presináptica, los tres tipos de canales Ca_v2 ($Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$, $Ca_v2.3$) se expresan en las dendritas y en el soma celular (Westenbroek y col., 1998; Yokoyama y col., 1995). La contribución de estos diferentes tipos de canales “no L” a la corriente de calcio y a la liberación de neurotransmisores se puede

cuantificar empleando diversos bloqueantes específicos (ver tabla 4.1). Dada su amplia expresión en el cerebro de mamíferos y su papel crucial en la liberación de neurotransmisores (especialmente los canales $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$), la ablación génica de los genes que los codifican originan importantes alteraciones en la función cerebral (Striessnig y Koschak, 2008).

Los canales $Ca_v2.1$ se denominaron en un principio canales P/Q porque parecían ser dos canales diferentes. El primero, el canal P observado en neuronas cerebelares de Purkinje (Llinas y col., 1989a; Llinas y col., 1989b) poseía una alta sensibilidad a la toxina FTX y a ω -agatoxina IVA (Mintz y col., 1992a; Mintz y col., 1992b), ambas extraídas de la araña *Agelenopsis aperta*. El segundo canal, denominado Q, se diferenció farmacológicamente del anterior por su menor sensibilidad a ω -agatoxina IVA (Randall y Tsien, 1995b; Wheeler y col., 1994). Sin embargo, la evidencia de que la subunidad α_{1A} constituía (Sather y col., 1993) ambos canales llevó a considerarlos como una única entidad. Este canal se ha estudiado ampliamente en las células cromafines de la vaca, (Albillos y col., 1993; Albillos y col., 1996a; Artalejo y col., 1994) y se ha observado que su inactivación es voltaje dependiente (Villarroya y col., 1999).

Los canales $Ca_v2.2$ se inactivan más rápido que los canales Ca_v1 y este comportamiento parece ser voltaje-dependiente (Artalejo y col., 1992b; Villarroya y col., 1999; Fox y col., 1987b; Fox y col., 1987a), aunque en las células cromafines tienen un componente no inactivante y por ello en la célula cromafín bovina, estos canales se han denominado “canales N no clásicos” (Artalejo y col., 1992a). Se bloquean por diferentes toxinas de caracoles del género *Conus* como la ω -conotoxina GVIA (Olivera y col., 1984) y ω -conotoxina MVIIC (Hillyard y col., 1992; Gandia y col., 1997) que lo bloquean de manera irreversible, o las de efecto reversible ω -conotoxina

MVIIA (Valentino y col., 1993; Vega y col., 1995) y MVIID (Gandia y col., 1997; Vega y col., 1995; Monje y col., 1993) (ver tabla 4.1).

Los canales $Ca_v2.3$ se denominaron de tipo R puesto que fueron detectados como una corriente residual en tejidos neuronales, resistente al bloqueo por DHPs, ω -conotoxina GVIA, ω -agatoxina IVA y ω -conotoxina MVIIC (Randall y Tsien, 1995a). Las corrientes generadas por este canal se inactivan en gran medida y rápidamente (Albillos y col., 2000; Randall y Tsien, 1995a). El primer bloqueante selectivo descrito para este canal fue la toxina SNX-482, extraída de la tarántula *Hysteroocrates gigas* (Newcomb y col., 1998). Sin embargo, esta toxina también bloquea canales $Ca_v2.1$ expresados de manera nativa en células cromafines bovinas (Arroyo y col., 2003).

La expresión de este canal en las células cromafines es objeto de controversia puesto que se han observado diferencias en los resultados obtenidos por varios laboratorios. Sin embargo, esto parece deberse al empleo de diferentes configuraciones de la técnica de “patch clamp” (célula entera frente a parche perforado). Los primeros estudios sobre la dotación de canales de calcio de la célula cromafín de mamíferos como la vaca (Albillos y col., 1993; Albillos y col., 1996a; Artalejo y col., 1994; Artalejo y col., 1991a; Artalejo y col., 1991b), gato (Albillos y col., 1994), cerdo (Kitamura y col., 1997), ratón (Albillos y col., 2000; Hernandez-Guijo y col., 1998) y humano (Gandia y col., 1998) no detectaron este tipo de corriente empleando la configuración clásica de célula entera. Sin embargo, en estudios posteriores de “patch clamp” empleando la configuración de parche perforado, un componente resistente del tipo del canal $Ca_v2.3$ sí se detectó en células cromafines de ratón, *in situ* y aisladas en cultivo (Albillos y col., 2000; Aldea y col., 2002), y rata (Hollins y Ikeda, 1996; Cesetti y col., 2003; Carabelli y

col., 2003). La explicación más probable podría ser que existe un factor citosólico soluble necesario para la actividad del canal R que en las condiciones de célula entera se dializa (Albillos y col., 2000).

4.2.3 CANALES Ca_v3

Se caracterizan por su bajo umbral de activación (en torno a -60 mV) y su rápida inactivación, por lo que se denominaron T (del inglés “transient”). Sus características les permiten mediar una corriente de calcio y despolarización de membrana antes de que la célula alcance el potencial para disparar potenciales de acción. Gracias a esta característica, realizan una función de marcapasos en el corazón y en algunas neuronas talámicas de la oliva inferior (Jahnsen y Llinas, 1984; Perez-Reyes, 2003). En neuronas del ganglio de la raíz dorsal, los canales Ca_v3 activados por un potencial de acción inducen una despolarización que contribuye al disparo repetido (Todorovic y Jevtovic-Todorovic, 2007). Este es uno de los mecanismos que permiten a estos canales regular la excitabilidad de las fibras conductoras del dolor. Una característica específica de las neuronas integradoras talamocorticales es que disparan potenciales de acción en respuesta a un estímulo hiperpolarizante como la activación del receptor $GABA_B$. Estos estímulos disparan unas “espigas de bajo umbral” que despolarizan la membrana y evocan breves ráfagas de potenciales de acción (Jahnsen y Llinas, 1984; Kim y col., 2001). La hiperpolarización dispara estas espigas porque activa o reactiva conductancias iónicas, como los canales Ca_v3 , que generan esta respuesta. Las ráfagas resultantes contribuyen a la formación de descargas sincrónicas sostenidas de redes neuronales talámicas que subyacen a las crisis epilépticas de ausencia (Kim y col., 2001). Parecen estar mediadas por los canales Ca_v3 porque los antiepilépticos succinimídicos bloquean sus

corrientes y son eficaces en el tratamiento de las crisis de ausencia (Gomora y col., 2001; Huguenard, 1996).

De la misma manera que los canales Ca_v1 , los Ca_v3 poseen una amplia distribución tisular no restringida solo a las neuronas, sino que también se encuentran en tejido muscular, células neuroendocrinas y riñón (Perez-Reyes, 1999). A nivel farmacológico (ver más adelante), los canales Ca_v3 se distinguen de otros subtipos porque son más sensibles al bloqueo por el ión níquel que por el ión cadmio, un bloqueante inespecífico de canales de calcio de alto umbral (Fox y col., 1987a). También son sensibles al 1-octanol, amilorida y el antihipertensivo mibefradilo (ver tabla 4.1) (Mishra y Hermsmeyer, 1994). En la célula cromafín de la vaca se ha detectado el mRNA para el canal Ca_v3 (Garcia-Palomero y col., 2000) aunque no se ha detectado un correlato funcional. En otros estudios sí fue detectada la corriente Ca_v3 en la célula cromafín de vaca (Diverse-Pierluissi y col., 1991) y de rata (Hollins y Ikeda, 1996; Bournaud y col., 2001), aunque se ha sugerido que estos canales se expresarían en células cromafines inmaduras. La elevación de los niveles de cAMP o la hipoxia favorece la expresión de estos canales (Novara y col., 2004; Carabelli y col., 2007), llegando incluso a participar en la respuesta secretora (Giancippoli y col., 2006).

4.3 FISIOPATOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA

La distribución tisular de los canales de calcio y sus características funcionales determinan su papel en la fisiología y en las patologías derivadas de alguna alteración en su funcionamiento (Striessnig y Koschak, 2008). Ambas características, convierten a estos canales en importantes dianas farmacológicas para el tratamiento de las más diversas alteraciones (ver tabla 4.1).

La farmacología de las tres subfamilias de canales de calcio presenta claras diferencias. Los canales Ca_v1 representan la diana farmacológica de los bloqueantes orgánicos de los canales de calcio empleados ampliamente en la terapia cardiovascular. Estos actúan en tres sitios separados físicamente pero acoplados de manera alostérica (Glossmann y Striessnig, 1990). Las fenilalquilaminas (verapamilo) bloquean el canal iónico introduciéndose en el poro desde el lado citosólico. Su sitio de unión se encuentra en el segmento S6 de los dominios III y IV (ver fig. 4.1) (Hockerman y col., 1997; Hofmann y col., 1999; Striessnig, 1999). Las dihidropiridinas activadoras (BayK 8644) e inhibitoras (nifedipina, nimodipina, isradipina, nicardipina) actuarían de manera alostérica sobre el canal desplazando el equilibrio entre el estado abierto y el estado cerrado.

Los activadores de los canales Ca_v1 , BayK 8644 y FPL 64176 aumentan las corrientes registradas con la técnica de “patch clamp” y retrasan la deactivación que se observa en la cola de la corriente, originada por un cierre más lento de los canales. El sitio de unión de las dihidropiridinas reside en aminoácidos situados en el segmento S6 de los dominios III y IV, y en el segmento S5 del dominio III. Se encuentra cercano al sitio de unión de las fenilalquilaminas (verapamilo) y comparten algunos aminoácidos. Las benzotiazepinas (diltiazem) se unen a un tercer sitio que solapa en gran medida con el de las fenilalquilaminas.

La subfamilia de canales Ca_v2 es relativamente insensible a las dihidropiridinas y se bloquean específicamente y con gran afinidad por toxinas peptídicas de arañas y caracoles marinos (Miljanich y Ramachandran, 1995). Los canales $Ca_v2.1$ se bloquean específicamente por ω -agatoxina IVA, los $Ca_v2.2$ por ω -conotoxina GVIA y algunas toxinas relacionadas, y los

Ca_v2.3 por la toxina de tarántula SNX-482, níquel y mibefradilo (ver tabla 4.1). Estos péptidos son potentes bloqueantes de la transmisión sináptica debido a su efecto específico en esta familia Ca_v2. Un péptido bloqueante del canal Ca_v2.2 y derivado sintético de la ω-conotoxina MVIIA, es el analgésico ziconotida (Prialt®), que se administra por vía intratecal en pacientes cuyo dolor ya no responde a opiáceos.

La subfamilia de canales Ca_v3 es insensible a los bloqueantes de canales Ca_v1 y Ca_v2, y no existen bloqueantes de estos canales que sean útiles desde un punto de vista terapéutico (Perez-Reyes, 2003). El bloqueante orgánico mibefradilo es de dos a cinco veces más selectivo para los canales Ca_v3 que para los Ca_v1, y el péptido kurtoxina inhibe la activación de los canales Ca_v3.1 y Ca_v3.2. El ión níquel bloquea de manera general los canales Ca_v3, aunque es el Ca_v3.2 el que presenta mayor sensibilidad. El desarrollo de bloqueantes más específicos y de alta afinidad para la subfamilia Ca_v3 sería útil para la terapéutica actual y también como herramientas farmacológicas para analizar con más detalle el papel de estos canales en la fisiología.

Tabla 4.1. Canales de calcio: tipos, localización, fisiopatología y farmacología.

Canal	Localización	Función	Patología	Farmacología
Ca _v 1.1	Músculo estriado	Acoplamiento excitación-contracción	Parálisis periódica hipocalémica Hipertemia maligna	Dihidropiridinas, fenilalquilaminas y benzotiazepinas
Ca _v 1.2	Músculo cardíaco y liso, soma neuronal, células endocrinas	Acoplamiento excitación-contracción (o secreción), LTP	Letal en desarrollo embrionario, síndrome de Timothy	Dihidropiridinas, fenilalquilaminas y benzotiazepinas
Ca _v 1.3	Nodo sinoatrial y atrioventricular, neuronas, células endocrinas y sensoriales (cóclea)	Marcapasos, conducción aurículoventricular, acoplamiento excitación-transcripción (o secreción)	Sordera, disfunción del nodo sinoatrial y aurículoventricular	Dihidropiridinas, fenilalquilaminas y benzotiazepinas
Ca _v 1.4	Retina	Acoplamiento estímulo-secreción	Ceguera nocturna estacionaria congénita	Dihidropiridinas, fenilalquilaminas y benzotiazepinas
Ca _v 2.1	Neuronas, células endocrinas	Acoplamiento estímulo-secreción	Migraña hemipléjica familiar, ataxia	ω-Aga-IVA, ω-Ctx-MVIIC, ω-Ctx-MVIID
Ca _v 2.2	Neuronas, células endocrinas	Acoplamiento estímulo-secreción	Transmisión del dolor	ω-Ctx-GVIA, ω-Ctx-MVIA (ziconotida), ω-Ctx-MVIIC
Ca _v 2.3	Neuronas, músculo cardíaco y liso, células endocrinas	Acoplamiento estímulo-secreción, LTP	Transmisión del dolor	SNX-482, cadmio>níquel, mibefradilo, l-octanol
Ca _v 3.1	Neuronas, células neuroendocrinas, nodo sinoatrial	Oscilaciones talámicas, automaticidad cardíaca		Etosuximida, mibefradilo, kurtoxina
Ca _v 3.2	Neuronas, corteza adrenal, músculo liso vascular y cardíaco, riñón, hígado	Contracción y proliferación del músculo liso, secreción de aldosterona y cortisol	Crisis de ausencias infantiles	Etosuximida, mibefradilo, níquel
Ca _v 3.3	Neuronas	Oscilaciones talámicas		Etosuximida, mibefradilo

4.4 MODULACIÓN POR NEUROTRANSMISORES

Los canales de calcio pueden ver modulada su actividad de manera exógena, por la aplicación de compuestos que actúan sobre receptores de membrana, o endógena por el efecto del ión calcio sobre el propio canal (inhibición dependiente de calcio). En células cromafines bovinas, esta modulación endógena está representada por la inactivación dependiente de calcio (CDI) de los canales Cav2.1 y Cav2.2, que está regulada de manera diferencial por calmodulina (CaM). Los canales Cav2.2 sufren una mayor inactivación por calcio que los Cav2.1 y esta CDI es dependiente de calmodulina que actuaría como sensor de calcio, mientras que en estos últimos, su CDI es independiente de calmodulina (Wykes y col., 2007).

En relación a la modulación exógena, los neurotransmisores como la noradrenalina, el GABA o la serotonina disminuyen la conductancia de los canales de calcio de alto umbral en distintos modelos neuronales (Dunlap y Fischbach, 1978; Galvan y Adams, 1982). Esta inhibición es un mecanismo circunscrito a la membrana plasmática mediado a través de proteínas G (Dolphin y Scott, 1987; Hescheler y col., 1987; Holz y col., 1986; Ikeda, 1991).

En la célula cromafín, la aplicación exógena de compuestos presentes en las vesículas secretoras (ATP, opioides, catecolaminas) (Winkler y Westhead, 1980) que son liberados al exterior durante el proceso secretor, ejercen un efecto dual sobre las corrientes de calcio al unirse a receptores presentes en la membrana plasmática e inhibirla y/o potenciarla.

4.4.1 ATP Y OPIOIDES

El ATP se une a receptores purinérgicos P_{2Y} presentes en la membrana de la célula cromafín, y activa un proteína G inhibidora que se une a determinados canales de calcio enlenteciendo su activación y disminuyendo la intensidad de la corriente que pasa a su través hasta en un 50% (Gandia y col., 1993; Currie y Fox, 1996). Esta modulación de la corriente es revertida por un prepulso de alto voltaje positivo que altera el acoplamiento de la proteína G al canal de calcio y “facilita” la corriente, posibilitando que ésta recupere la mayor parte de su intensidad (>80%) y su rápida avivación. Los péptidos opioides (metionina-enkefalina, leucina-enkefalina) también ejercen una modulación similar a la del ATP sobre células cromafines bovinas (Albillos y col., 1996a). Se unen a receptores opioidérgicos de tipo μ y δ que, a través de una proteína G enlentecen la activación y disminuyen la intensidad de la corriente de calcio.

4.4.2. MODULACIÓN AUTOCRINA/PARACRINA

Para el estudio de las corrientes de calcio, la estimulación a la que se someten las células produce una liberación de neurotransmisores los cuales podrían actuar de manera autocrina o paracrina sobre los receptores de la propia célula secretora o de las vecinas. Si estos receptores están acoplados a proteínas G inhibidoras, se produciría una inhibición de la corriente de calcio. En experimentos empleando la técnica de “patch clamp”, se ha observado que la velocidad de activación y la amplitud de las corrientes de calcio (empleando bario como ión portador de carga) pueden estar determinadas por las condiciones de perfusión de la célula bajo estudio (Albillos y col., 1996a; Currie y Fox, 1996; Doupnik y Pun, 1994). La actividad celular en condiciones de “parada de flujo” (sin recibir perfusión) favorece la

acumulación de productos de la secreción alrededor de la membrana celular, lo que posibilita la activación de autoreceptores que conllevaría la inhibición de los canales de calcio. Esta inhibición se revierte a través de prepulsos de voltaje que “facilitan” la corriente o perfundiendo la célula de manera que se laven de los alrededores de la membrana plasmática los compuestos liberados por exocitosis (Albillos y col., 1996a).

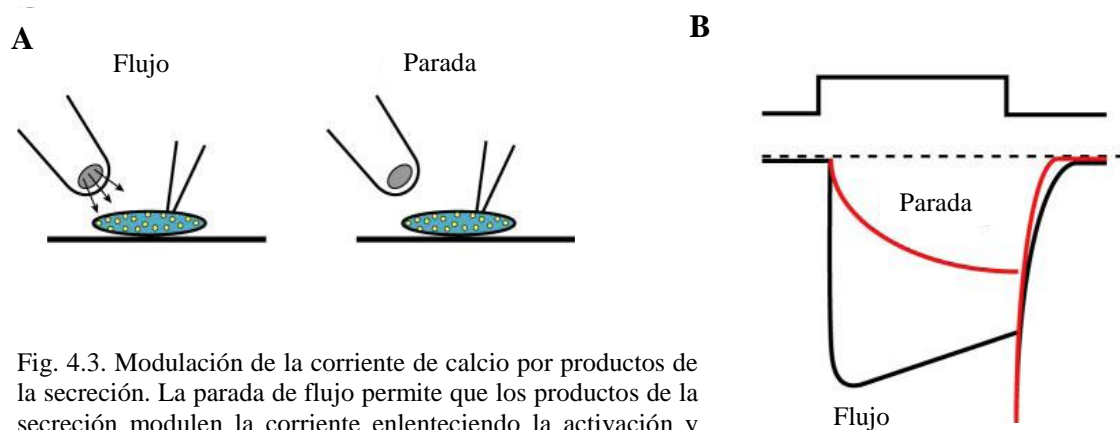


Fig. 4.3. Modulación de la corriente de calcio por productos de la secreción. La parada de flujo permite que los productos de la secreción modulen la corriente enlenteciendo la activación y disminuyendo la intensidad. Un prepulso o la reactivación de la perfusión permite la recuperación parcial de la corriente. Modificado de Garcia y col., 2006.

Además, si ya hemos visto que el ATP y los opioides se coalmacenan en las vesículas secretoras junto a las catecolaminas y que, además modulan los canales de calcio, el contenido vesicular purificado tendría un efecto similar a la aplicación exógena de estos compuestos. Efectivamente, la aplicación de un lisado vesicular soluble (SVL) produce una modulación similar a la que ejerce un cóctel de ATP y opioides (enlentecimiento de la activación y disminución de la intensidad de la corriente) y, además, la perfusión de este cóctel ocluye el efecto del SVL (Albillos y col., 1996a).

Por último, en células dispuestas en clusters o acinos, las corrientes de calcio estudiadas en una única célula con la técnica de “patch clamp”, también se ven moduladas por los productos de la secreción de las células

vecinas si se aplica un secretagogo en la perfusión que baña el grupo de células que rodea a la célula bajo estudio (una solución con una alta concentración de potasio o conteniendo el ión bario) (Hernandez-Guijo y col., 1998; Gandia y col., 1998). Estudios en célula cromafín *in situ* serían necesarios para determinar de qué manera ocurre la modulación de los canales de calcio en la sinapsis intacta, donde la terminal presináptica también podría ser modulada por estos compuestos.

4.4.5 MODULACIÓN DIFERENCIAL DE LOS CANALES

Ya que las células cromafines expresan cuatro tipos de canales de calcio de alto umbral, sería lógico preguntarse si todos ellos experimentan este tipo de modulación por neurotransmisores. En las neuronas, la inhibición por neurotransmisores se circunscribe a canales no Ca_v1 (Lipscombe y col., 1989; Pollo y col., 1992) y, especialmente los canales $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ en células cromafines. El canal $Ca_v2.1$ presenta una menor inhibición por neurotransmisores (40%), siendo la mitad voltaje-dependiente, mientras que el canal $Ca_v2.2$ presenta una gran inhibición (70%) que es principalmente voltaje-dependiente (Albillos y col., 1996a; Currie y Fox, 1996). Además, se ha observado que la facilitación de la corriente $Ca_v2.1$ tras la inhibición se consigue empleando potenciales de acción más cortos y de menor amplitud que para los canales $Ca_v2.2$, lo que indica que podría existir una facilitación diferencial de la corriente en ciertas condiciones (Currie y Fox, 2002). En células cromafines bovinas, los opioides modulan los canales Ca_v1 de manera voltaje-independiente (no hay facilitación con prepulso) (Albillos y col., 1996e; Albillos y col., 1996c) mientras que los canales no Ca_v1 sí presentan una modulación que es principalmente voltaje-dependiente (Currie y Fox, 1996). Sin embargo, sólo en células cromafines de terneras jóvenes (3 meses de edad) el canal “facilitado” parece ser de tipo Ca_v1 (Artalejo, 1997), y las

proteínas G no parecen estar implicadas en su reclutamiento (Artalejo y col., 1992b).

En general, la modulación de los canales Ca_v1 es voltaje-independiente y la velocidad de activación no se ve afectada por esta. Tiene lugar a través de dos vías, una inhibición dependiente de proteínas G y una potenciación mediada por cAMP/PKA (Dolphin, 1996; Dolphin, 1999). En las células cromafines, ambas vías se autoactivan por los neurotransmisores liberados por la propia célula y produce dos efectos de naturaleza opuesta y magnitud similar (Cesetti y col., 2003). La inhibición es completa y rápida (segundos) y tienen lugar a través de proteínas G sensibles a la toxina pertussis (PTX) y acopladas a receptores P_{2Y} , μ , δ , α_2 , y β_2 (Carabelli y col., 1998; Carabelli y col., 2001; Albillos y col., 1996d; Albillos y col., 1996b; Hernandez-Guijo y col., 1999; Gollasch y col., 1991; Kleppisch y col., 1992). La potenciación se activa a través de receptores catecolaminérgicos D_1 (Artalejo y col., 1990) y β_1 y discurre a través de la activación de la vía cAMP/PKA (Baldelli y col., 2004), por lo que precisa de varios minutos para alcanzar el efecto máximo puesto que esta vía emplea segundos mensajeros que actúan a distancia de los receptores catecolaminérgicos (Rockman y col., 2002; Kamp y Hell, 2000). El incremento en los niveles intracelulares de cAMP no sólo aumenta la corriente Ca_v1 en la célula cromafín de la rata, sino también el tamaño del RRP (Carabelli y col., 2003; Lim y col., 1997). Además, el tratamiento crónico con agonistas β_1 o un análogo permeable de cAMP recluta canales de sodio resistentes a TTX y Ca_v3 que son capaces de mediar la respuesta secretora (ver fig. 4.4) (Novara y col., 2004).

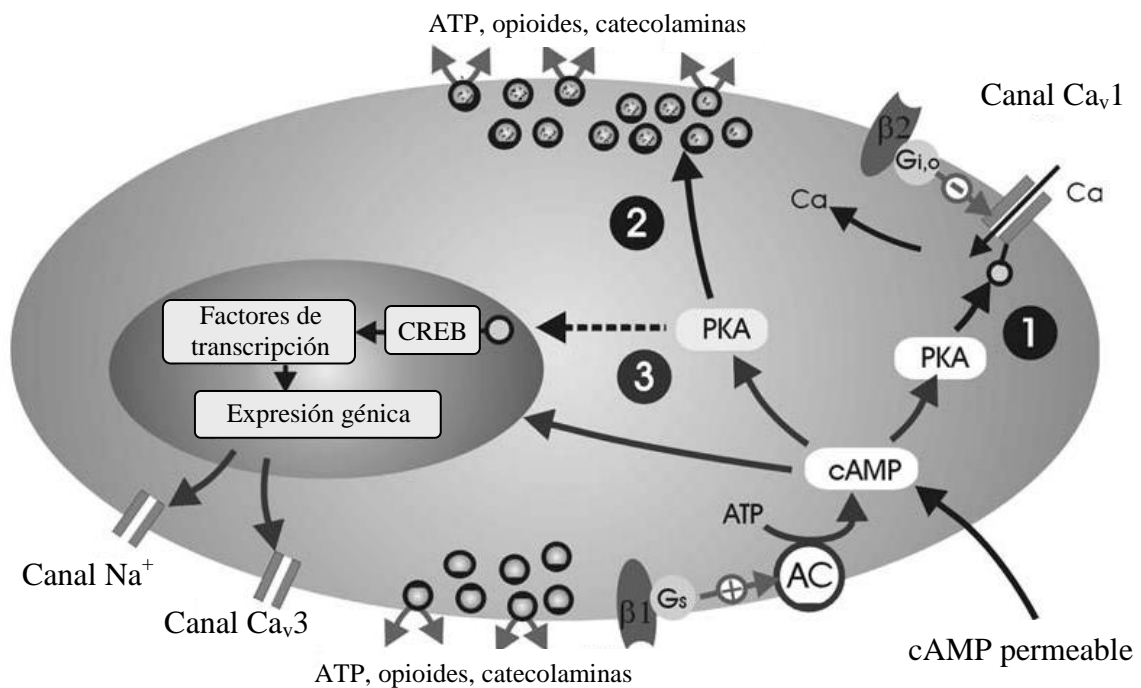


Fig. 4.4. Esquema de las vías de señalización asociadas con la activación de los adrenoreceptores β_1 y β_2 en la célula cromafín de la rata. Los receptores β_2 están acoplados negativamente a los canales Ca_v1 a través de una proteína $G_{i/o}$ sensible a toxina pertussis. La activación de los receptores β_1 incrementa los niveles de cAMP, lo que lleva a la activación de tres vías de señalización diferentes; 1) fosforilación de los canales Ca_v1 por la PKA que incrementa la apertura en un tiempo de unos pocos minutos, 2) una potenciación de la exocitosis de manera independiente del incremento de la corriente de calcio, 3) un reclutamiento dependiente de cAMP de canales de calcio Ca_v3 y canales de sodio resistentes a TTX, lo que disminuye el umbral de disparo de potenciales de acción y aumenta la excitabilidad celular. Adaptado de Baldelli y col., 2004.

4.4.6 PAPEL DE LA MODULACIÓN EN LA FISIOLÓGÍA

Desde un punto de vista fisiológico, la modulación que sufren los canales de calcio puede tener relevancia *in vivo* para limitar la liberación masiva de catecolaminas al torrente sanguíneo que podría ser innecesaria y/o peligrosa. Ante un estímulo estresante que active el eje simpático-adrenal, la ACh liberada por el nervio esplácnico despolariza la célula cromafín que vería sus canales de calcio activados para permitir la entrada de calcio al citosol y producir la liberación de catecolaminas al torrente sanguíneo (Douglas y col., 1967; Garcia y col., 2006). Los productos de la secreción que de manera autocrina o paracrina pudiesen activar los receptores opioidérgicos,

purinérgicos o adrenérgicos limitarían tónicamente la siguiente apertura de los canales de calcio y la consiguiente liberación de catecolaminas. En cuadros de asma, shock o de estrés intenso donde persista la activación simpática, la activación repetida del receptor nicotínico de la célula cromafín produciría potenciales de acción que conseguirían revertir el componente voltaje-dependiente de la modulación. Sin embargo, incluso en estas condiciones extremas, la inhibición voltaje independiente se mantendría para controlar una secreción exacerbada de catecolaminas. De todas maneras, ante una estimulación prolongada de los receptores de membrana, la inhibición de los canales de calcio se vería compensada en cierta medida por la facilitación de la excitabilidad y de la respuesta secretora sin que esto representase una sobrecarga de calcio que podría ser tóxica para la célula (Baldelli y col., 2004). En conjunto, esto representaría un mecanismo de ajuste fino de la excitabilidad y secreción a través de la modulación de los canales de calcio para adaptar el organismo a determinadas situaciones de reposo o estrés, ya sea limitado o prolongado.

Es importante resaltar que los fármacos opiáceos, catecolaminérgicos o gabérgicos presentes en la terapéutica actual pueden ejercer una modulación secundaria sobre los canales de calcio que puede tener un efecto terapéutico coadyuvante (ej. morfina, (McGivern, 2006).

5. LOS RECEPTORES PARA LA ACh

5.1 LA ACETILCOLINA

La acetilcolina (ACh) fue identificada por Henry Dale en 1914 y caracterizada como neurotransmisor por Otto Loewi en 1921. Ambos recibieron en 1936 el premio Nobel en Medicina o Fisiología “por sus descubrimientos en relación a la naturaleza química de la transmisión de los impulsos nerviosos”.

Esta sustancia se encuentra tanto en nuestro organismo como en el resto del reino animal y en las plantas. Su síntesis en el interior celular está catalizada por la enzima colinoacetil transferasa (ChAcT) (Nachmansohn y Machado, 1943) y se produce a partir de la unión de dos moléculas, el acetil coenzima A (Acetil-CoA), y la colina (ver fig. 5.1).

El Acetil-Co-A se obtiene como producto resultante de la glucólisis. La colina proviene de diversas fuentes (dieta, síntesis hepática, hidrólisis de ACh por la acetilcolinesterasa, liberación por neuronas y glía). La colina penetra al interior celular a través de dos transportadores, el transportador de colina de baja (SRchBA) o alta afinidad (SRchAA). El primero es común a la mayoría de las células y el segundo es específico de neuronas colinérgicas. Una vez sintetizada, la ACh se almacena principalmente en vesículas gracias al transportador vesicular de ACh (VAcHT, de sus siglas en inglés). La ACh liberada por las neuronas colinérgicas ejerce su acción tanto en tejidos neuronales y no neuronales al unirse y activar alguno de sus dos tipos de receptores, el receptor muscarínico o el receptor nicotínico (ver fig 5.1). Ambos pertenecen a familias estructuralmente y funcionalmente diferentes ya que el receptor muscarínico (mAChR) es de tipo metabotrópico y el receptor nicotínico (nAChR) tiene naturaleza ionotrópica. Tras ejercer su acción, la

ACh sufre un proceso de hidrólisis catalizado por las enzimas acetilcolinesterasa (AChE), presente en la membrana de las neuronas postsinápticas, o por la butirilcolinesterasa (BChE), que abunda en hígado y plasma. De esta reacción se obtienen dos productos, acetato y colina. Entre un 50-80% de la colina proveniente de esta hidrólisis se recupera a través del CHT SRchAA, lo que permite una producción continuada de ACh (Amenta y Tayebati, 2008).

SINAPSIS COLINÉRGICA

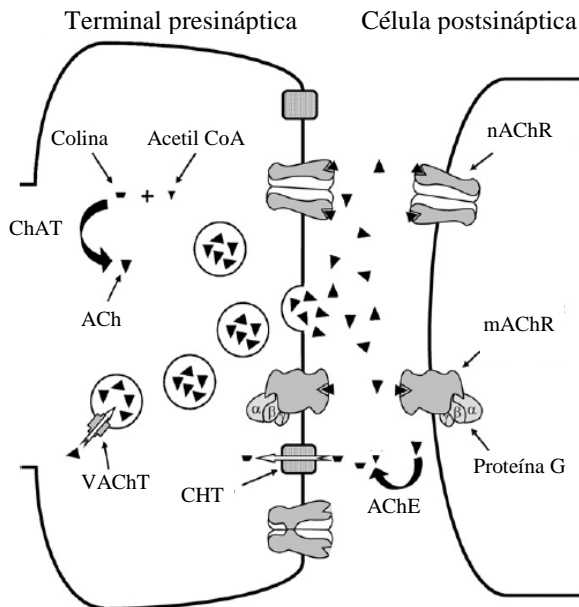


Fig. 5.1. La sinapsis colinérgica. El neurotransmisor ACh se sintetiza a partir de acetyl CoA y colina por la enzima colinoacetiltransferasa (ChAT) y se introduce en las vesículas presinápticas gracias al transportador vesicular de ACh (VAcHT). Cuando la terminal presináptica recibe un estímulo, libera la ACh a la hendidura sináptica donde se unirá a dos tipos de receptores, los receptores ionotrópicos nicotínicos (nAChRs) o los receptores metabotrópicos muscarínicos (mAChRs) que están acoplados a proteínas G. Estos receptores se pueden encontrar en los terminales pre y post sinápticos. Tras ser liberada, la ACh está sometida a la hidrólisis por la enzima acetilcolinesterasa (AChE) principalmente. Los productos que se generan son acetato y colina, la cual será recaptada por la terminal presináptica gracias al transportador de colina de alta afinidad (CHT).

5.2 EL RECEPTOR NICOTÍNICO

El receptor nicotínico para la acetilcolina (nAChR) es una proteína de membrana que pertenece a la superfamilia de canales iónicos activados por ligando y más concretamente a la familia de receptores para neurotransmisores excitadores. De la misma manera que los receptores ionotrópicos de glicina, GABA (subtipos GABA_A y GABA_C) y serotonina (subtipo 5-HT₃), poseen un lazo extracelular de 13 residuos aminoacídicos flanqueados por dos cisteínas unidas covalentemente por un puente disulfuro.

5.2.1 ESTRUCTURA

En su estructura tridimensional está compuesto de **cinco** subunidades transmembrana dispuestas alrededor de un poro central (ver fig 5.1) que pueden ser idénticas o de distinta naturaleza.

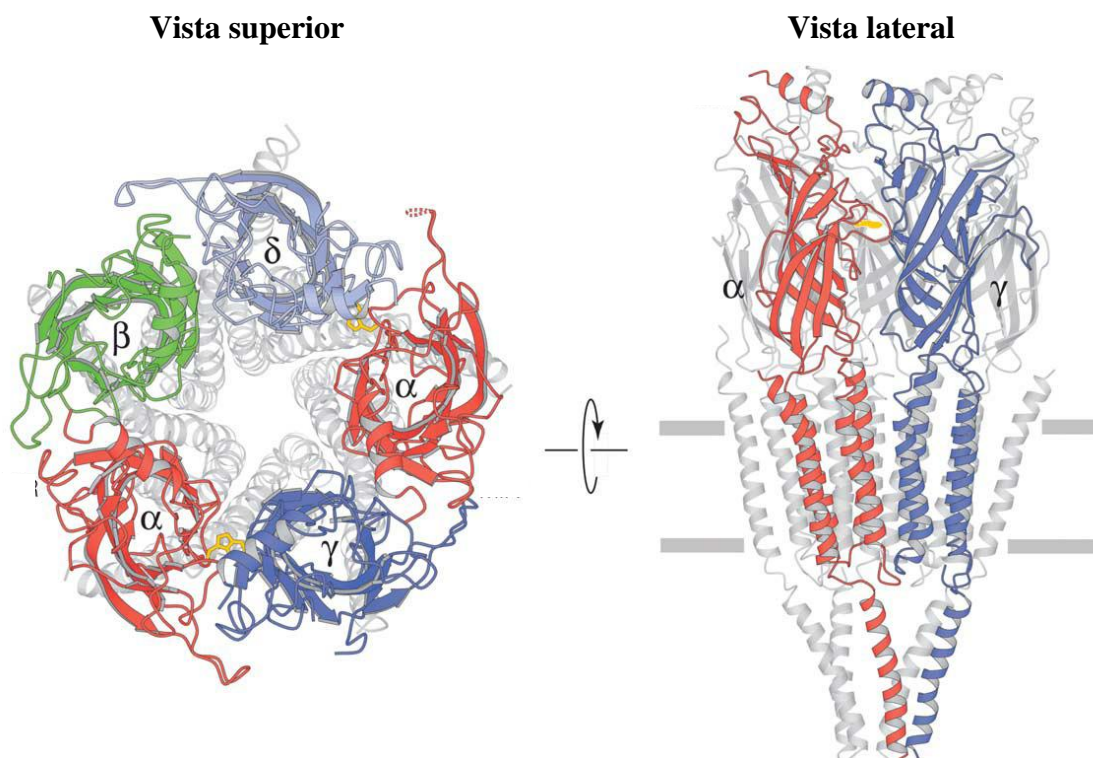


Fig. 5.1. Estructura del receptor nicotínico del órgano eléctrico del pez *Torpedo*. La vista superior desde la sinapsis (izda.) revela la disposición de las subunidades en torno a un poro central. La vista lateral (dcha) muestra la disposición del receptor a través de la membrana. Adaptado de Unwin y col., 2005.

Esta variedad de subunidades es la responsable de las diferencias estructurales y funcionales entre los diversos tipos de nAChRs. Cada una de las subunidades que lo componen consta de (ver fig. 5.2):

- un gran segmento extracelular glucosilado de unos 210 aminoácidos que contiene el extremo N-terminal y sitios críticos para la unión del agonista (en algunos tipos de subunidades),
- cuatro segmentos transmembrana de unos veinte aminoácidos (M1, M2, M3 y M4) separados por lazos pequeños, excepto en el caso de M4. El segmento M1 y el segmento M2 principalmente conforman la pared del poro iónico;
- un gran dominio intracelular variable que se extiende entre los segmentos M3 y M4, que comprende sitios críticos de fosforilación y modulación del receptor,
- un pequeño segmento extracelular que contiene el extremo C-terminal.

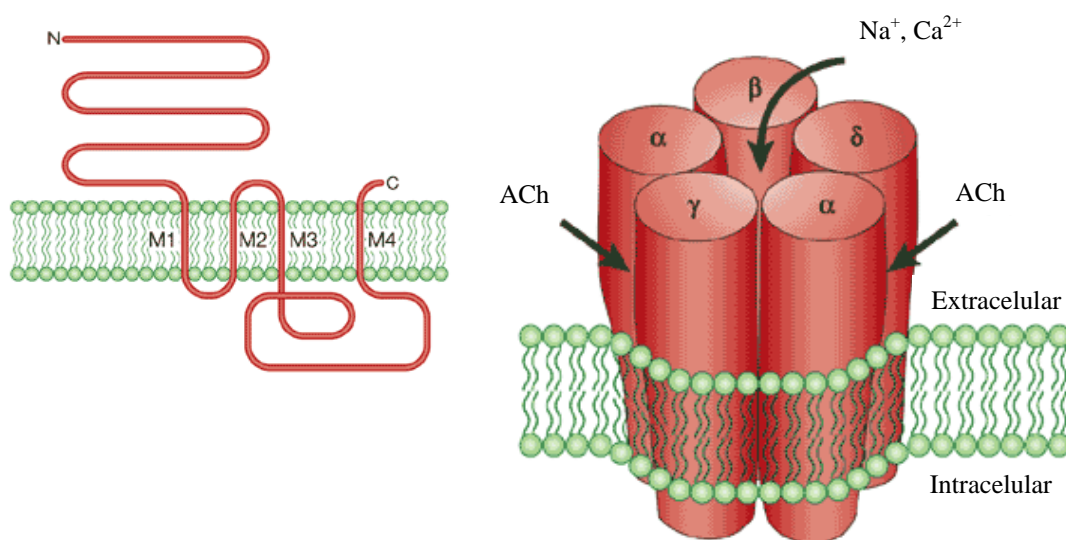


Fig. 5.2. Estructura del receptor nicotínico. Patrón de inserción en la membrana de los segmentos que componen las subunidades del receptor (izda.). Representación esquemática de la estructura cuaternaria del receptor de tipo muscular (dcha.), mostrando el canal iónico y los sitios de unión de ACh (entre α y γ y α y δ). Adaptado de Karlin, 2002.

Los estudios de alta resolución (4\AA) de la estructura del receptor nicotínico de la raya *Torpedo californica*, similar al receptor muscular, han

permitido comprender e interpretar los datos funcionales y farmacológicos disponibles sobre el receptor nicotínico (Unwin, 2005). Otros estudios de alta resolución han sido llevados a cabo empleando proteínas que tienen una estrecha relación estructural con el receptor. Un ejemplo es la proteína de unión a ACh (AChBP), obtenida del caracol del género *Lymnaea* (Brejc y col., 2001) que se ha usado como modelo del dominio extracelular del nAChR. La reciente determinación a nivel atómico (1.94Å) de la estructura del dominio extracelular de la subunidad $\alpha 1$ unido a α -Bgtx, ayudará a incrementar el conocimiento sobre el comportamiento de estos receptores (Dellisanti y col., 2007). La determinación de la estructura de un canal iónico activado por ligando, con estructura pentamérica, presente en la bacteria *Erwinia chrysanthemi*, permitirá profundizar en el conocimiento de la estructura de la superfamilia de los CIALs (Hilf y Dutzler, 2008).

5.2.2 SUBUNIDADES Y NOMENCLATURA

La nomenclatura de las subunidades del nAChR se estableció inicialmente de manera arbitraria. En los primeros estudios bioquímicos realizados sobre el órgano eléctrico de la raya *Torpedo* y la anguila *Electrophorus* se identificaron cuatro subunidades proteicas (Popot y Changeux, 1984) a las que les fueron asignadas las letras griegas α , β , γ , y δ en base a sus pesos moleculares crecientes. Puesto que la subunidad α se marcaba por compuestos de amonio cuaternario, se llegó a la conclusión de que ésta debía contener el principal sitio de unión a agonistas (Weill y col., 1974). La clonación de esta subunidad (Noda y col., 1982; Sumikawa y col., 1982) reveló la existencia de dos residuos de cisteína adyacentes en las posiciones 192 y 193 que parecían ser importantes en la unión a agonistas. La nomenclatura adoptada desde entonces para las subunidades del nAChR contempla que las subunidades que posean dos residuos de cisteína en

posiciones análogas a Cys192 y Cys193 sean denominadas subunidades α . En la unión neuromuscular, las subunidades que no cumplían este requisito (no α) se denominaron β 1, γ , δ y ε , mientras que a las subunidades no α expresadas en el sistema nervioso de los vertebrados les fueron asignados los nombres β 2, β 3 y β 4. A pesar de haber clasificado en el pasado los receptores nicotínicos como de tipo “muscular” o “neuronal”, tal denominación está desaconsejada por la IUPHAR (Lukas y col., 1999) debido a que se han identificado receptores en localizaciones que desafían esa clasificación (Sharma y Vijayaraghavan, 2002).

En base a las evidencias acumuladas, las subunidades α se postularon como exclusivas de unión de agonistas, mientras que las no α desarrollarían un papel estructural. Sin embargo, se ha demostrado que los agonistas se unen en la interfaz entre dos subunidades (Sine, 2002; Sine y Engel, 2006), y que tanto las subunidades α como no α contribuyen al sitio de unión de agonistas (Luetje y Patrick, 1991). Por todo ello, hoy en día nos referiremos a subunidades que contienen el componente principal o el componente complementario del sitio de unión a agonistas (Corringer y col., 1995; Corringer y col., 2000; Arias, 1997). El componente primario lo aportan las subunidades α 1, α 2, α 3, α 4, α 5, α 6, α 7, α 8 o α 9, y consiste en tres lazos aminoacídicos discontinuos (A, B y C). El componente complementario lo aportan las subunidades δ , γ , ε , β 2, β 4, α 7, α 8, α 9 o α 10, que también contribuyen con tres lazos discontinuos (D, E y F) (ver fig. 5.3). En general, la naturaleza similar de los residuos hidrofóbicos del componente primario determina la afinidad de la unión del ligando, y los residuos presentes en el componente complementario determinan la selectividad del ligando. Por lo tanto, estos sitios están constituidos por dos bolsillos hidrofóbicos en los receptores heteroméricos. Sin embargo, los receptores homoméricos α 7, α 8 o

$\alpha 9$ tienen cinco sitios de unión a ligando a los cuales la misma subunidad contribuye con el componente primario y complementario, presentes en lugares opuestos de la subunidad (Gotti y col., 2006b) (ver fig 5.3).

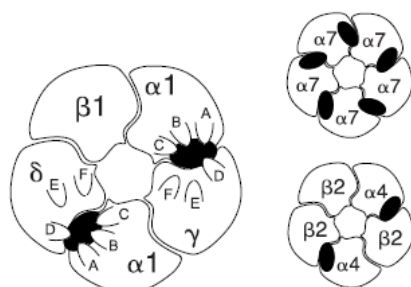


Fig. 5.3. Estructura cuaternaria del receptor nicotínico muscular (izda.), homomérico $\alpha 7$ (arriba dcha.), heteromérico $\alpha 4\beta 2$ (abajo izda.). Los sitios de unión (elipses de color negro) muestran el sitio de unión de la ACh entre las subunidades gracias a los lazos A, B y C del componente principal; y los lazos D, E y F del componente complementario. Adaptado de Corringer y col., 2000.

Por otro lado, aunque el sistema de nomenclatura empleando letras griegas parece agrupar a las subunidades en torno a su equivalencia funcional, esto no siempre se cumple. Mientras que todos los receptores heteroméricos contienen al menos un tipo de subunidad α que actúa como subunidad principal en cuanto al sitio de unión a agonistas, no todas las subunidades α pueden llevar a cabo esta función. Las subunidades $\alpha 5$ y $\alpha 10$ sólo pueden formar receptores funcionales cuando se ensamblan en receptores que poseen otras subunidades α (Ramirez-Latorre y col., 1996; Elgoyhen y col., 2001; Sgard y col., 2002). Además, la subunidad $\alpha 5$ posee mayor similitud en su secuencia con $\beta 3$ que con cualquier otra subunidad (Boulter y col., 1990) puesto que, al contrario que las demás subunidades α , no posee el residuo Tyr190 que parece ser relevante para la unión del agonista. La subunidad $\alpha 10$ sí lo presenta y forma parte del sitio de unión a agonistas, complementando a $\alpha 9$ (Elgoyhen y col., 2001; Sgard y col., 2002; Plazas y col., 2005).

5.2.3 POSIBILIDADES ESTEQUIOMÉTRICAS

En vertebrados se han identificado 17 genes que codifican para otras tantas subunidades ($\alpha 1$ - $\alpha 10$, $\beta 1$ - $\beta 4$, γ , δ , y ϵ). Estas se pueden encontrar en humanos y otras especies de mamíferos, excepto la subunidad $\alpha 8$ que se ha identificado en aves exclusivamente (Gerzanich y col., 1994). Haciendo una clasificación siguiendo el orden evolutivo (ver fig. 5.4), las subunidades se incluyen en las siguientes subfamilias definidas a partir de la secuencia proteica y estructura génica (Corringer y col., 2000):

- subfamilia I ($\alpha 9$ y $\alpha 10$ epitelial)
- subfamilia II ($\alpha 7$ y $\alpha 8$ neuronal),
- subfamilia III ($\alpha 2$ -6 y $\beta 2$ -4) y
- subfamilia IV (subunidades musculares $\alpha 1$, $\beta 1$, γ , δ y ϵ).

Las subfamilias III y IV se pueden dividir a su vez, debido a similitudes en su secuencia, en tres tribus cada una:

- tribu III-1, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$;
- tribu III-2, $\beta 2$, $\beta 4$;
- tribu III-3, $\alpha 5$, $\beta 3$;
- tribu IV-1, $\alpha 1$;
- tribu IV-2, γ , δ , ϵ ; y
- tribu IV-3, $\beta 1$

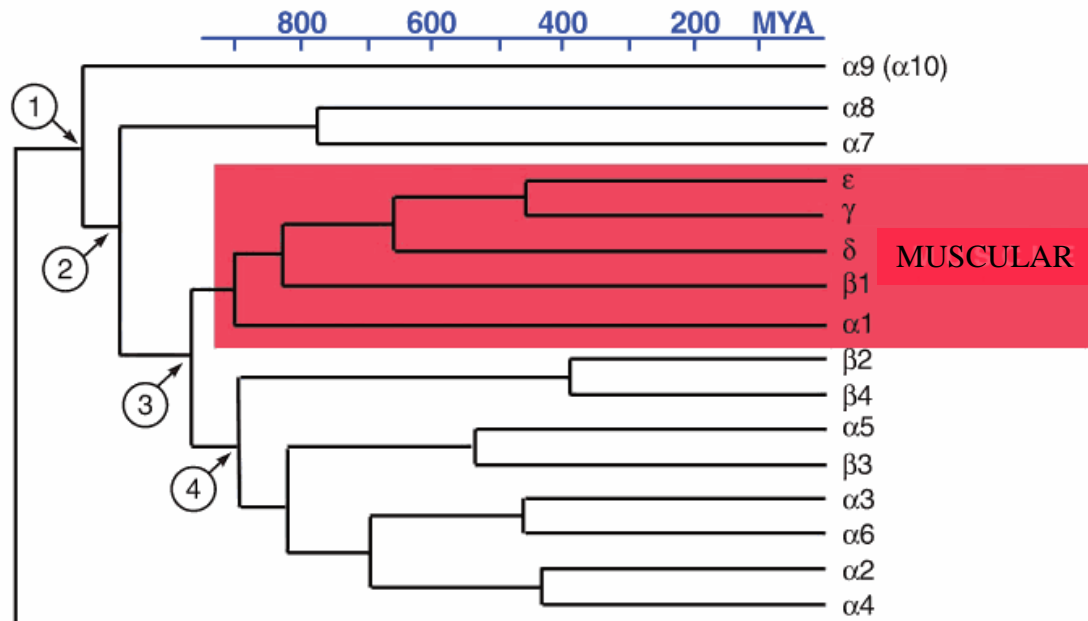


Fig.5.4 Relación evolutiva de las subunidades de los receptores nicotínicos de los amniotas. Los círculos denotan grupos definidos por su (1) activación por ACh; (2) activación por nicotina; (3) participación en un heteropentámero; (4) insensibilidad a α -Bgtx. La barra azul superior muestra la escala temporal de la diversificación evolutiva (MYA; Million Years Ago). Adaptado de Changeux y Edelstein, 2005.

La mayoría de las distintas combinaciones de subunidades que generan receptores funcionales lo hacen componiendo un receptor heteromérico, aunque las subunidades de las subfamilias I y II pueden dar lugar a receptores homoméricos conteniendo cinco copias de la misma subunidad ($\alpha 7$, $\alpha 8$ o $\alpha 9$) (Gerzanich y col., 1994; Couturier y col., 1990; Elgoyhen y col., 1994). Las subfamilias evolutivamente más recientes, como la subfamilia III, conforman receptores funcionales a través de la coexpresión de un miembro de la tribu III-1 y un miembro de la tribu III-2, con una estequiometría de dos subunidades α y tres subunidades β (Cooper y col., 1991; Anand y col., 1991). Sin embargo, estudios recientes han revelado una mayor complejidad puesto que algunos nAChRs pueden presentar estequiometrías alternativas pudiendo modificar su propiedades farmacológicas y funcionales (Zwart y Vijverberg, 1998; Nelson y col., 2003). Algunos de estos receptores incorporan un tercer tipo de subunidad de la tribu III-3, ya sea $\alpha 5$ (Ramirez-

Latorre y col., 1996; Wang y col., 1996) o $\beta 3$ (Groot-Kormelink y col., 1998). Además, el uso de una mutación reportera ha evidenciado que los receptores que contienen las subunidades $\alpha 3$, $\beta 3$ y $\beta 4$ ensamblan sus subunidades con una estequiometría $(\alpha 3)_2\beta 3(\beta 4)_2$ (Boorman y col., 2000). En particular, el nAChR $\alpha 4\beta 2$ puede presentar dos estequiometrías diferentes, $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ o $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$, que difieren en propiedades como la sensibilidad a agonistas y antagonistas (Moroni y col., 2006) y permeabilidad al ión calcio (Tapia y col., 2007). A pesar de la multitud de combinaciones teóricamente posibles y puesto que se requiere una apropiada interacción entre subunidades (Green y Millar, 1995; Millar y Harkness, 2008) que proporcione la adecuada funcionalidad al receptor, el ensamblaje de los receptores es un proceso estrechamente regulado que da lugar a un relativamente restringido número de combinaciones de subunidades en los receptores nativos. Como consecuencia de ello, existe una interesante aproximación al examen de la estequiometría del nAChR que consiste en el estudio, en sistemas de expresión heteróloga, de subunidades covalentemente unidas o concatémicos (Zhou y col., 2003; Groot-Kormelink y col., 2004; Groot-Kormelink y col., 2006; Carbone y col., 2009), a pesar de los inconvenientes que conlleva (Groot-Kormelink y col., 2004; Ericksen y Boileau, 2007).

Por convenio, los receptores se nombran indicando el tipo de subunidades que presentan y, en las ocasiones en las que se desconoce la composición exacta o se sospecha de la presencia de una subunidad adicional, esto se indica con un asterisco (ej. $\alpha 4\beta 2^*$) (Lukas y col., 1999; Luetje, 2004).

En el caso del nAChR presente en la placa motora, formado por las subunidades de la más evolucionada subfamilia IV, la determinación estequiométrica ha sido directa a través de estudios de alta resolución (Unwin,

2005). De la misma manera que el nAChR presente en el órgano eléctrico de *Torpedo*, los receptores expresados en la unión neuromuscular de mamíferos adultos presentan una estequiometría $(\alpha 1)_2\beta 1\delta\varepsilon$. En estado embrionario, sin embargo, la composición es $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$. Por último, el ensamblado de las subunidades parece estar fijada en un orden estricto $\alpha 1-\gamma-\alpha 1-\delta-\beta 1$ (Unwin, 1996; Machold y col., 1995). Los sitios de unión al agonista no son equivalentes puesto que se producen en las interfases entre las subunidades $\alpha-\delta$ y $\alpha-\gamma/\varepsilon$ (Neubig y Cohen, 1979; Sine, 1993), teniendo la subunidad $\beta 1$ un papel estructural.

5.2.4 SUBTIPOS Y DISTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES NATIVOS

Los receptores presentes en tejidos neuronales están principalmente localizados en sitios presinápticos o preterminales, donde modulan la liberación de neurotransmisores (McGehee y col., 1995), y también en el soma neuronal o en las dendritas, donde median efectos postsinápticos como la despolarización (Zhang y col., 1996; Frazier y col., 1998; Conroy y Berg, 1999). Existe una opinión generalizada de que la localización presináptica es la más relevante desde un punto de vista fisiológico (Sher y col., 2004; Jensen y col., 2005).

Las técnicas de unión de radioligandos, de inmunopurificación e inmunoprecipitación, unidas a la generación de ratones *knock out* y transgénicos para distintos nAChRs, han posibilitado la mayoría de los avances en la identificación de la composición y los patrones de distribución de los distintos subtipos de receptores nicotínicos en mamíferos (Gotti y col., 2006b) (ver fig. 5.5).

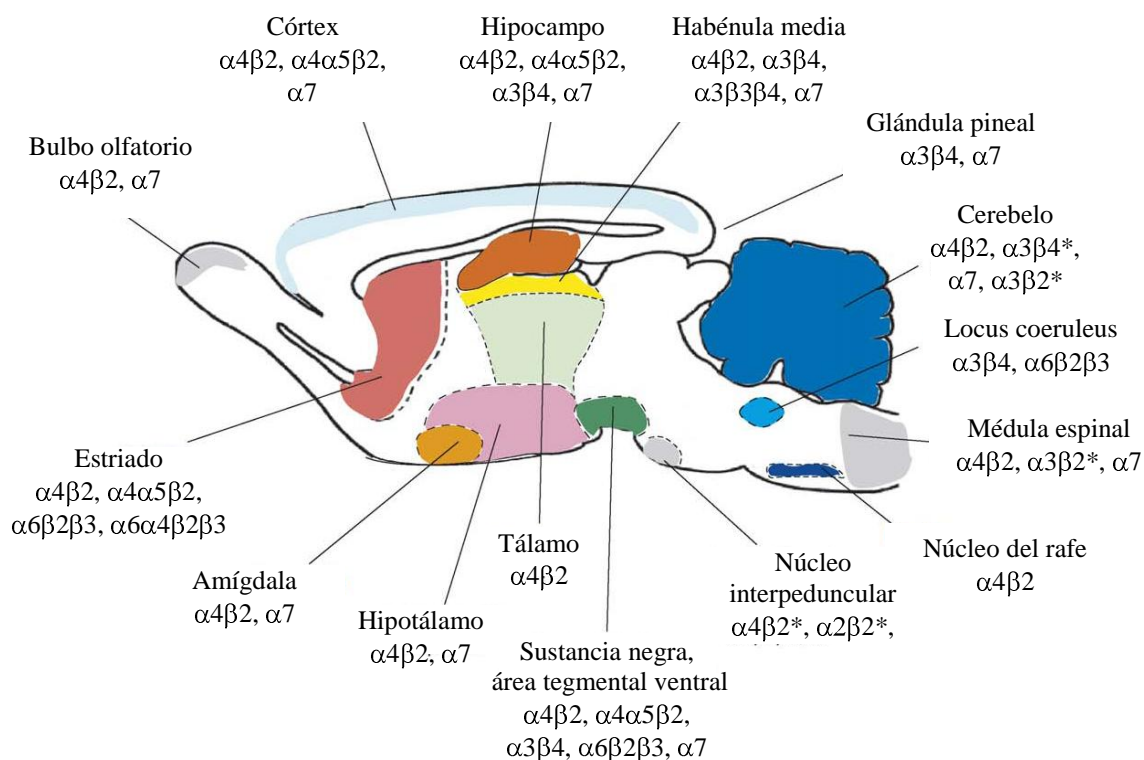


Fig 5.5. Distribución regional y composición de los subtipos de receptores nicotínicos en el sistema nervioso central de roedores. Adaptado de Gotti 2006.

En el cerebro, principalmente se encuentran receptores heteroméricos conteniendo sólo un tipo de subunidad α y otro tipo de subunidad β , pero también receptores $\alpha 7$ homoméricos (Gotti y Clementi, 2004; Albuquerque y col., 2009). De los primeros, el subtipo más abundante y ampliamente distribuido es el $\alpha 4\beta 2$, mientras que el receptor $\alpha 3\beta 4$ se restringe a determinados grupos celulares. En el cerebro del primate *Macaca mulatta*, la amplia distribución de $\alpha 2$ es comparable a la $\alpha 4$ (Han y col., 2000), lo que contrasta con lo que sucede en roedores (Han y col., 2000; Han y col., 2003; Moretti y col., 2004; Grady y col., 2009).

Los receptores $\alpha 4\beta 2^*$

Representa el 90% de los nAChRs de alta afinidad en el cerebro de los mamíferos (Gotti y col., 2006b) y se encuentra en la corteza, bulbo olfatorio, hipocampo, habénula media, tálamo, hipotálamo, amígdala, cuerpo estriado, núcleo interpeduncular, sustancia negra, área tegmental ventral, en el cerebelo, la médula espinal y el núcleo del rafe.

Además, existen múltiples subtipos de este receptor puesto que puede incorporar otras subunidades adicionales como la $\alpha 5$ en la corteza, hipocampo, tálamo, cuerpo estriado, sustancia negra, área tegmental ventral y la vía visual (retina, núcleo lateral geniculado y colículo superior) (Brown y col., 2007). El receptor $\alpha 4\beta 2^*$ contiene la subunidad $\alpha 6$ en el cuerpo estriado de la rata (Zoli y col., 2002) y la vía visual, representando el 40-60% de todos los receptores $\alpha 6^*$.

Los receptores $\alpha 3\beta 4^*$ y $\alpha 3\beta 2^*$

La subunidad $\alpha 3$ forma parte de numerosos tipos de receptores ($\alpha 3\beta 2^*$, $\alpha 3\beta 4^*$) principalmente en el SNP pero también en el SNC (Whiteaker y col., 2002). El receptor periférico (ganglionar) por excelencia es el $\alpha 3\beta 4$ aunque se encuentra también en la habénula media, el núcleo interpeduncular, la médula espinal, la glándula pineal (Hernandez y col., 2004) y la retina (Marritt y col., 2005). Puede incluir la subunidad $\alpha 5$ (Wang y col., 1996) que incrementa la permeabilidad al calcio, la afinidad por agonistas y la desensibilización; la $\beta 3$ (núcleo interpeduncular y habénula media), e incluso la $\beta 2$. El receptor $\alpha 3\beta 2$ se encuentra en la médula espinal pero puede incluir otras subunidades en su estructura ($\alpha 3\beta 2^*$) en la habénula media, el cerebelo, la médula espinal, en la vía visual y en el ganglio cervical superior (Millar y Gotti, 2009).

Receptores $\alpha 6^*$

Estos receptores parecen estar concentrados en neuronas catecolaminérgicas (Le Novere y col., 1996; Goldner y col., 1997) de determinadas áreas cerebrales como el área tegmental ventral ($\alpha 6\beta 2^*$, $\alpha 6\beta 2\beta 3^*$, $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$) y locus coeruleus ($\alpha 3\beta 4$, $\alpha 6\beta 2\beta 3$) (Moretti y col., 2004; Zoli y col., 2002; Salminen y col., 2007) y retina ($\alpha 6\beta 2$) (Moretti y col., 2004) ($\alpha 6\beta 2\beta 3^*$, $\alpha 6\beta 3\beta 4$, $\alpha 6\beta 4$) (Vailati y col., 1999). En la vía mesoestriatal y visual de los roedores, los receptores $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$ representan más de la mitad de todos los receptores $\alpha 6^*$ y presentan diferente afinidad y sensibilidad frente al antagonista a-Ctx-MII (Zoli y col., 2002)). La presencia de estos receptores en el estriado está conservada entre especies (roedores y primates) aunque con algunas diferencias en la composición (Gotti y col., 2006b; Quik y col., 2005; Bordia y col., 2007). Los receptores $\alpha 6^*$ de la retina de mamíferos prácticamente sólo se asocian con la subunidad $\beta 2$ (Moretti y col., 2004; Marritt y col., 2005; Keyser y col., 2000), mientras que en la retina de pollo adulto los receptores $\alpha 6^*$ presentan la subunidad $\beta 4$ (Vailati y col., 1999).

Los receptores $\alpha 7^*$

Son los receptores homoméricos (Couturier y col., 1990; Drisdell y Green, 2000) más abundantes en distintas localizaciones del cerebro (corteza, hipocampo, amígdala, hipotálamo, área tegmental ventral, núcleo interpeduncular, habénula media, glándula pineal) aunque se han encontrado evidencias de que la subunidad $\alpha 7$ puede formar receptores heteroméricos funcionales con otras subunidades, por ejemplo $\alpha 8$ en el sistema nervioso de pollo (Anand y col., 1993; Keyser y col., 1993; Gotti y col., 1997b), o $\beta 2$ en

el cerebro de rata (Khiroug y col., 2002; Azam y col., 2003; Liu y col., 2009). El receptor $\alpha 7$ homomérico se caracteriza por su rápida cinética de activación e inactivación, su bloqueo irreversible por α -Bgtx (Couturier y col., 1990) y reversible por concentraciones en el rango nanomolar bajo de MLA (Alkondon y col., 1992). Destaca su alta permeabilidad a calcio (Seguela y col., 1993) que lo equipara a los receptores NMDA. Regula a nivel presináptico la liberación de neurotransmisores (McGehee y col., 1995) y a nivel postsináptico, sus características cinéticas le permiten mediar una transmisión sináptica rápida (Zhang y col., 1996; Frazier y col., 1998; Alkondon y col., 1998; Chang y Berg, 1999). Dentro de los receptores nicotínicos es de los evolutivamente más antiguos (Le Novere y col., 2002) y es más ubicuo de lo que se pensó en un primer momento (Sharma y Vijayaraghavan, 2002; Wessler y Kirkpatrick, 2008; Grando, 2008) puesto que se ha encontrado en localizaciones no sólo del SNC sino a nivel ganglionar, en linfocitos, piel y epitelio pulmonar.

Los receptores $\alpha 9/\alpha 10$

Las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ se expresan en células pilosas de la cóclea (Elgoyhen y col., 2001; Elgoyhen y col., 1994), donde están implicadas en el proceso auditivo formando receptores heteroméricos $\alpha 9/\alpha 10$ (Elgoyhen y col., 2001; Katz y col., 2004; Vetter y col., 2007). Existen además, evidencias de que el receptor heteromérico estaría implicado en la transmisión del dolor de origen inflamatorio dado que se expresa en los ganglios de la raíz dorsal y en linfocitos (Vincler y col., 2006). La subunidad $\alpha 9$ forma receptores homoméricos en sistemas de expresión heteróloga, pero la adición de la subunidad $\alpha 10$ modifica las características de las corrientes, incrementando la inactivación por agonistas, la relación corriente-voltaje y mostrando una

respuesta bifásica a los cambios en la concentración de calcio extracelular (Elgoyhen y col., 2001). Desde un punto de vista farmacológico, al receptor que contiene estas subunidades se le denomina receptor “muscatínico” puesto que exhibe un comportamiento mixto nicotínico-muscarínico al ser activado por ACh y oxotremorina M, y bloqueado por nicotina, atropina y α -Bgtx (bloqueo reversible) (Elgoyhen y col., 2001; Elgoyhen y col., 1994; Verbitsky y col., 2000).

Los receptores nicotínicos en la célula cromafín

En el sistema nervioso periférico, incluida la médula adrenal, el principal nAChR parece ser del tipo $\alpha 3\beta 4^*$, incluyendo la subunidad $\alpha 5$ en la especie bovina (Criado y col., 1992; Campos-Caro y col., 1997) y en la rata, donde también es probable la existencia de receptores $\alpha 3\beta 2$ (Di Angelantonio y col., 2003b). Ensayos de RT-PCR en la célula cromafín de ratón han mostrado que existe mensajero para todas las subunidades α y β excepto para $\alpha 2$, $\alpha 6$, $\alpha 10$ y $\beta 3$ (Wu y col., 2010). En la especie humana se ha detectado mRNA para las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ (no en estadio fetal), $\beta 3$ y $\beta 4$ (Mousavi y col., 2001) pero no se ha investigado la posible presencia de las restantes subunidades. Hasta la fecha, los datos experimentales parecen coincidir con la corriente de pensamiento generalizada de que son los receptores heteroméricos $\alpha 3\beta 4^*$, tanto como $\alpha 3\beta 4$ o asociado a las subunidades $\alpha 5$ y/o $\beta 2$, los mayoritariamente expresados en ganglios autonómicos y sensoriales (Vernallis y col., 1993; Conroy y Berg, 1995; Mao y col., 2006).

Además de los estudios de Criado (1992) y de Campos-Caro (1997), diversas evidencias indican que en la célula cromafín bovina es el receptor

$\alpha 3\beta 4^*$ el responsable de la despolarización que lleva a la secreción de catecolaminas (Free y col., 2002; Yokotani y col., 2002; Sala y col., 2008). Se ha demostrado que el flujo de calcio a través de su ionóforo produce secreción en ausencia de despolarización (Mollard y col., 1995), puesto que su permeabilidad a este catión se ha estimado en un 2.5-4.1% (Zhou y Neher, 1993; Vernino y col., 1994; Lax y col., 2002).

A pesar de que parece que el receptor funcional identificado en la célula cromafín bovina es insensible a α -Bgtx (ver más abajo), se ha observado que la célula cromafín posee sitios de unión específicos para esta toxina (Wilson y Kirshner, 1977), conteniendo la subunidad $\alpha 7$ (Criado y col., 1997; Garcia-Guzman y col., 1995). Por ello, existe cierta controversia acerca de si este marcaje tiene un correlato funcional contribuyendo a la corriente nicotínica y la secreción (Yokotani y col., 2002; Lopez y col., 1998; Broxton y col., 1999), o si el receptor es de tipo $\alpha 7$ homomérico u heteromérico (Drisdel y Green, 2000; Lopez y col., 1998; El-Hajj y col., 2007). A día de hoy, estas preguntas continúan aún sin respuesta.

5.2.5 ASPECTOS FUNCIONALES

El modelo propuesto por Monod, Wyman y Changeux (MWC) en 1965 (Monod y col., 1965) para proteínas alostéricas describe de manera fidedigna el comportamiento del receptor nicotínico. Según este modelo, el receptor nicotínico en ausencia de agonista fluctúa entre tres estados; reposo (R), activo (A) y desensibilizado (D). Este último, a su vez, se divide en dos estados puesto que puede ser un estado que se alcanza rápidamente (I) o lentamente en presencia de bajas dosis de agonista (D) (Corringer y col., 1998; Giniatullin y col., 2005). El equilibrio entre los estados de reposo y activo está determinado por la diferencia de energía libre existente entre ellos.

Esta barrera energética determina la constante cinética para la transición de un estado a otro. La activación es un proceso transitorio y rápido (de microsegundos a milisegundos), mientras que la desensibilización ocurre lentamente (de milisegundos a segundos) (ver fig. 5.6).

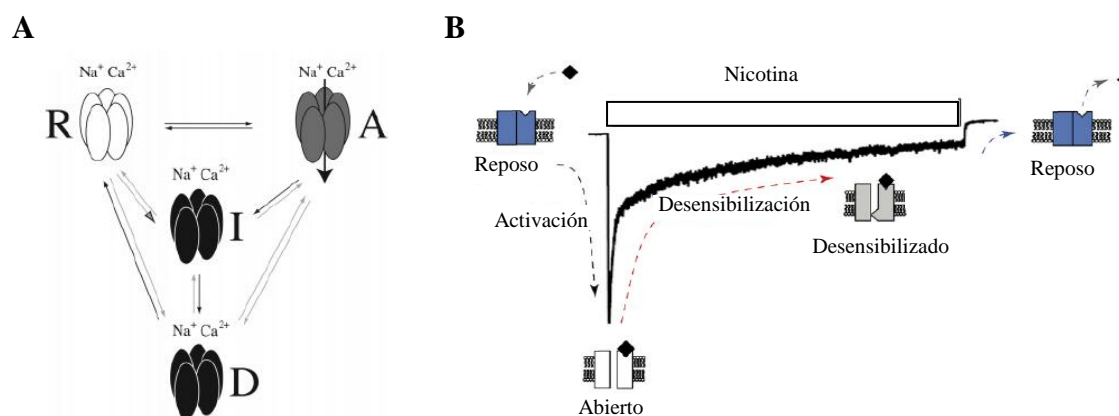


Fig. 5.6. Naturaleza alostérica de los receptores nicotínicos. A) El modelo de Monod, Wyman y Changeux. Las transiciones entre los distintos estados que puede presentar el receptor nicotínico, reposo (R, blanco), activo (A, gris), desensibilizado (I, de rápido inicio, o D de lento inicio; ambos de color negro). Las rutas predominantes están identificadas con una flecha negra. Extraído de Jensen y col., 2005. B) Esquema del curso temporal de la corriente nicotínica y los estados por los que pasa el receptor $\alpha 4\beta 2$ cuando se activa por un agonista como la nicotina (rombo negro). Extraído de Rollema y col., 2007.

Las velocidades de los procesos de activación y desensibilización varían en gran medida entre los distintos subtipos de nAChRs, lo que contribuye a la diversa farmacología de estos receptores (Giniatullin y col., 2005). Una vez que el receptor entra en su estado desensibilizado, se cree que vuelve al estado de reposo a través del estado activo pero sin producir una segunda apertura del canal puesto que es una transición rápida (Changeux y Edelstein, 1998). La unión de un agonista o un antagonista competitivo a los sitios ortostéricos del nAChR estabiliza respectivamente el estado activo o el de reposo (ver fig. 5.7). Los compuestos agonistas se caracterizan por tener una mayor afinidad por el estado activo del receptor que por el de reposo, al

contrario que los antagonistas, que presentan mayor afinidad por los receptores en reposo o desensibilizados.

De acuerdo al modelo de MWC, se ha documentado actividad espontánea (constitutiva) de los receptores nicotínicos en ausencia de agonista (Jackson, 1984). La probabilidad de apertura del canal aumenta con la unión del agonista a uno de los dos sitios ortostéricos del receptor heteromérico, y se ve dramáticamente incrementada cuando el agonista ocupa los dos sitios de unión (Changeux y Edelstein, 1998) (ver fig. 5.7).

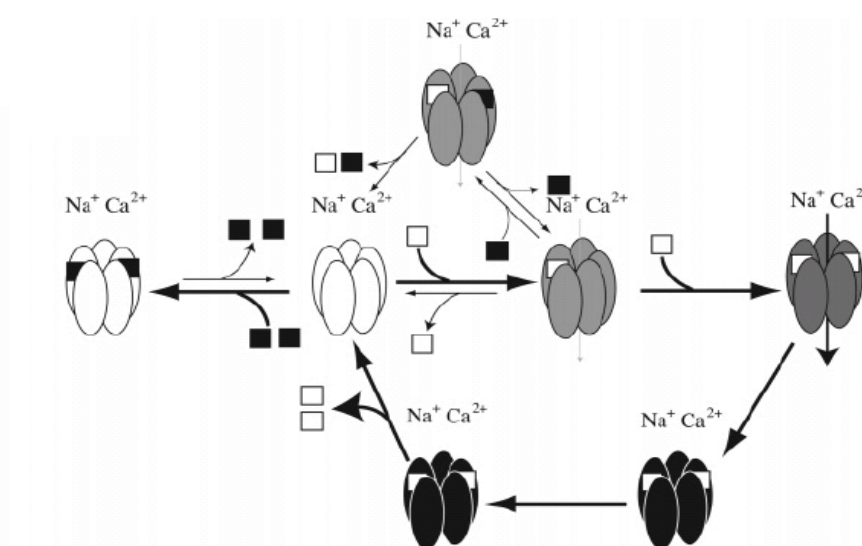


Fig 5.7. Transiciones alostéricas del receptor nicotínico heteromérico en presencia de ligandos ortostéricos. Los agonistas y los antagonistas competitivos se representan como cuadrados blancos y negros, respectivamente. Los estados de reposo, activo y desensibilizado se identifican por los colores blanco, gris y negro, respectivamente. Extraído de Jensen y col., 2005.

La unión de ciertos ligandos a los sitios alostéricos (ver más abajo), localizados a distancia de los sitios ortostéricos, desplaza el equilibrio entre el estado de reposo y el activo o la cinética de desensibilización (Gronlien y col., 2007).

Por último, los dos estados desensibilizados se caracterizan por tener una alta o muy alta afinidad por el agonista, según hablemos respectivamente del estado de desensibilización de rápido o lento inicio (ver fig. 5.6) (Corringer y col., 1998; Giniatullin y col., 2005; Revah y col., 1991). El paso de un estado desensibilizado al estado original de reposo parece estar modulado por el estado de fosforilación de ciertas enzimas, acelerándose en el caso de la fosforilación por PKC o PKA y enlenteciéndose en situaciones donde la calcineurina favorece la defosforilación (ver fig. 5.8) (Khiroug y col., 1997; Khiroug y col., 1998; Paradiso y Steinbach, 2003).

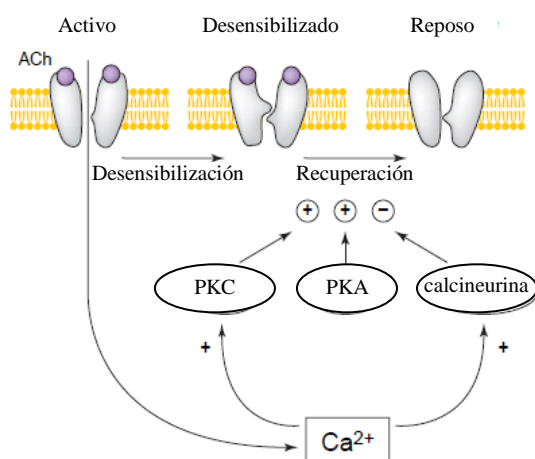


Fig. 5.8. Desensibilización del nAChR y recuperación. Tras la estimulación continuada, el nAChR pasa a un estado desensibilizado no conductivo. La recuperación de la desensibilización de los receptores nicotínicos de la célula cromafín de la rata se ve modulada por el equilibrio fosforilación/defosforilación. Los niveles de calcio intracelular modulan el balance de la actividad de la PKC o PKA versus la calcineurina. Adaptado de Giniatullin y col., 2005.

Se desconoce si el proceso de desensibilización tiene lugar *in vivo* desencadenado por el agonista endógeno ACh. Los receptores nicotínicos hipotalámicos muestran una muy leve desensibilización incluso ante una repetida estimulación presináptica (Hatton y Yang, 2002). De manera similar, en el sistema nervioso periférico, la transmisión sináptica mediada por nAChRs no muestra signos de desensibilización en el ganglio cervical (Birks y Isacoff, 1988) ni en células cromafines (Holman y col., 1994), aún cuando los terminales presinápticos son estimulados a 20-60 Hz.

Es importante resaltar que el modelo MWC ha ido incrementando su complejidad con el refinamiento de las técnicas electrofisiológicas. Recientemente, se ha descubierto un estado intermedio entre el de reposo y el activo, el estado preactivo o “flip state” (Lape y col., 2008), no conductivo y que precede al estado activo. Los autores del mencionado trabajo demuestran en los receptores de glicina y nicotínicos, que el paso a este estado es el limitante para la apertura del canal. Los agonistas totales estabilizan rápidamente este estado, lo que les permite luego estabilizar el estado activo. Sin embargo los agonistas parciales son menos eficaces en facilitar el “flipping” o la transición entre el estado de reposo y el estado preactivo. Una vez en el estado preactivo, el paso al estado activo es igual de rápida independientemente del agonista que haya provocado el paso al estado preactivo (ver fig. 5.9).

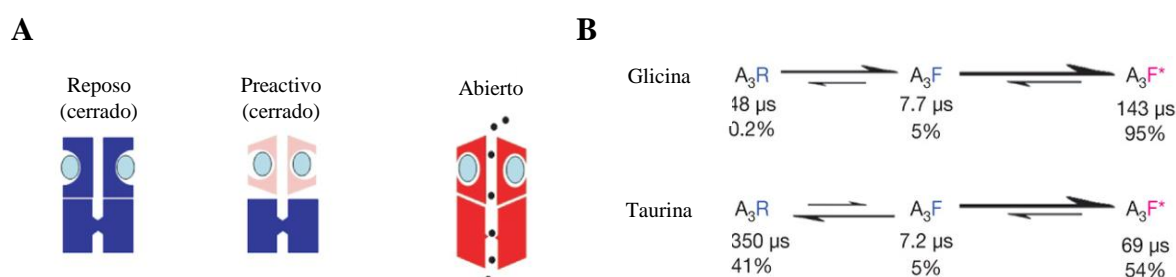


Fig. 5.9. Activación del receptor de glicina por un agonista total o parcial. Paso del estado de reposo al estado activo a través del estado preactivo, tras la unión del agonista al receptor (A). Las cinéticas de activación para el receptor de glicina difieren en gran medida en el primer paso, de reposo a preactivo (B). Ante la unión del agonista parcial taurina, el receptor tarda mucho más tiempo (ver valor absoluto de su vida media y porcentaje) en pasar al estado preactivo que si hubiese unido glicina (arriba). Una vez en el estado preactivo, independientemente del agonista, el receptor pasa rápidamente al estado activo. La probabilidad de apertura frente a la de vuelta al estado de reposo es muy alta (96%). Adaptado de Lape y col., 2008.

Otro aspecto a destacar de este receptor es su permeabilidad al ión calcio y la modulación que este ejerce sobre el propio receptor. A pesar de que el ión permeante principal es el sodio, el ión calcio también pasa a su través a favor de gradiente electroquímico contribuyendo en un porcentaje

relevante a la corriente total nicotínica (2.5-4.1%) (Vernino y col., 1992; Zhou y Neher, 1993; Vernino y col., 1994) y que le permite disparar el evento exocitótico (Mollard y col., 1995). El receptor nicotínico que mayor permeabilidad presenta es el receptor homomérico $\alpha 7$ (Seguela y col., 1993; Bertrand y col., 1993; Fucile, 2004). La modulación que ejerce el ión sobre el receptor se debe a la unión a unos sitios específicos existentes en el receptor que, aunque disminuye la conductancia del canal único por un efecto de apantallamiento de cargas (Cooper y col., 1991; Imoto y col., 1988; Decker y Dani, 1990), aumenta la corriente macroscópica al incrementar la probabilidad de apertura del receptor en presencia de un agonista (Mulle y col., 1992).

5.2.6 FARMACOLOGÍA Y MODULACIÓN

Se distinguen tres clases de compuestos según el lugar del receptor sobre el que actúan y el efecto que producen sobre el receptor; agonistas, antagonistas y moduladores alostéricos. Los agonistas y antagonistas competitivos actuarían al mismo nivel, en el sitio de unión a ligando (sitio ortostérico), mientras que los antagonistas no competitivos y los moduladores alostéricos actuarían en sitios diferentes (ver fig. 6) (Paterson y Nordberg, 2000). Como hemos visto, la afinidad de la unión al ligando agonista viene determinada por los residuos hidrofóbicos del componente primario, mientras que los residuos presentes en el componente complementario determinan la selectividad del ligando. Sin embargo, la inclusión de una determinada quinta subunidad estructural también parece afectar a la sensibilidad frente a agonistas.

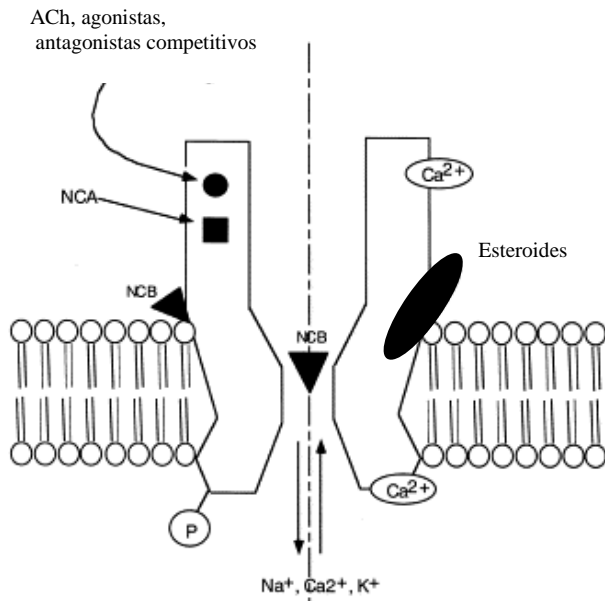


Fig. 6. Sección esquemática del receptor nicotínico mostrando el canal iónico y los sitios de unión de los agonistas y los antagonistas competitivos, los antagonistas no competitivos, moduladores alostéricos, el calcio, los esteroides y los sitios de fosforilación. NCA, sitio alostérico positivo no competitivo; NCB, sitio alostérico negativo no competitivo. Adaptado de Paterson y Nordberg, 2000.

La subunidad $\alpha 5$ aumenta la sensibilidad y la desensibilización del receptor heteromérico $\alpha 3\beta 4$ y sobre todo del $\alpha 3\beta 2$ (Ramirez-Latorre y col., 1996; Wang y col., 1996; Gerzanich y col., 1998). La inclusión de la subunidad $\beta 3$ (Boorman y col., 2000; Boorman y col., 2003) en el receptor $\alpha 3\beta 4$ aumenta también la velocidad de desensibilización. Recientemente, se ha visto en el receptor $\alpha 4\beta 2$ que la inclusión de una u otra subunidad estructural (subunidades $\alpha 4$ o $\beta 2$ que no participan en el sitio de unión a ligando) afecta notablemente a la sensibilidad a ACh (Nelson y col., 2003; Moroni y col., 2006) y que la nicotina incrementa la expresión de la estequiometría de alta afinidad (Moroni y col., 2006; Xiao y col., 2009). Por lo tanto, parece ser que la quinta subunidad tiene algún tipo de efecto sobre la unión de los ligandos, a pesar de no participar en los sitios de unión.

En la naturaleza encontramos numerosos ligandos capaces de interactuar con el receptor nicotínico y por ello han sido empleados por el hombre durante siglos y aún hoy se utilizan como herramientas

farmacológicas en investigación. Actualmente, tanto en la práctica clínica como en la investigación farmacológica realizada por la industria farmacéutica, encontramos diversos compuestos que tienen como diana directa el receptor nicotínico (ver tabla 5.1). Estos compuestos tienen como objetivo paliar un desequilibrio del sistema colinérgico (agonistas parciales o totales y antagonistas), o indirecta por retrasar la degradación del agonista endógeno (inhibidores de la acetilcolinesterasa). La vareniclina es un derivado sintético de la citisina empleado para la deshabituación tabáquica (Champix® o Chantix®). Es agonista parcial de receptores $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$ y $\alpha 6^*$, y total de receptores $\alpha 7$ (Rollema y col., 2007; Mihalak y col., 2006), aunque parece ejercer su efecto a través de su acción sobre el primero. La fisostigmina, rivastigmina, donepezilo y galantamina son inhibidores de la acetilcolinesterasa por lo que se emplean para paliar un déficit del sistema colinérgico endógeno. La galantamina además, posee un efecto modulador alostérico positivo (ver más abajo).

Tabla 5.1. Agonistas y antagonistas de nAChRs.

Agonistas		Antagonistas	
Selectivos	No selectivos	Selectivos	No selectivos
ABT 089 ($\alpha 4\beta 2$)	ACh	α -Ctx ArIB ($\alpha 7$)	α -Bgtx
ABT 594 ($\alpha 4\beta 2$)	anabaseína	α -Ctx AuIB ($\alpha 3\beta 4$) ¹	n-Bgtx
AR-R17779 ($\alpha 7$)	anatoxina	α -Ctx MII[H9A;L15A] ($\alpha 6^*$) ¹	α -Ctx ImI
GTS-21 ($\alpha 7$)	carbacol	α -Ctx RgIA ($\alpha 9$)	α -Ctx MII
4-OH-GTS-21 ($\alpha 7$)	citisina	nicotina ($\alpha 9$)	α -Ctx PeIA
morantel ($\alpha 7$)	colina	muscarina ($\alpha 9$)	α -Ctx Vc1.1
N-metilcocaína ($\alpha 7$)	DMPP	TC 5214 ($\alpha 4\beta 2$)	clorisondamina
PHA 709829 ($\alpha 7$)	epibatidina		cocaína
PNU 282987 ($\alpha 7$)	lobelina		N-metilcocaína
RJR 2403 ($\alpha 4\beta 2$)	nicotina		decametonio
S 24795 ($\alpha 7$)	5-I-A85380		DH β E
TC 5619 ($\alpha 7$)	vareniclina		d-Tubocurarina
tropisetron ($\alpha 7$)			erisodina
			estricnina
			hexametonio
			mecamilamina
			MLA
			trimetafán

¹ A altas concentraciones pueden bloquear el receptor $\alpha 7$ (Cartier y col., 1996; Luo y col., 1998).

Puesto que la mayoría de receptores presentes en el cerebro son los de tipos $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$, los esfuerzos para encontrar compuestos con alta selectividad para estos receptores son muy intensos. Análogos de la anabaseína como el GTS-21 y el 4-OH-GTS-21 se postularon como selectivos para el receptor $\alpha 7$ pero el primero también es antagonista $\alpha 4\beta 2$ (Briggs y col., 1995; de Fiebre y col., 1995; Meyer y col., 1998; Kem y col., 2004). Otros fármacos sintéticos con selectividad $\alpha 7$ son el AR-R17779 (Mullen y col., 2000), PHA 709829 (Acker y col., 2008), PHA 543613 (Wishka y col., 2006), PNU 282987 (Hajos y col., 2005; Bodnar y col., 2005), S24795 (Lopez-Hernandez y col., 2007) y TC5619 (Hauser y col., 2009) que es agonista total a la concentración de 1 μ M. El antagonista serotoninérgico tropisetron (Navoban®) se muestra como agonista sobre $\alpha 7$ de rata y antagonista sobre $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 4\beta 2$ humano (Macor y col., 2001; Papke y col., 2004). La colina se empleó en un primer momento como agonista selectivo $\alpha 7$ (Mandelzys y col., 1995; Papke y col., 1996) pero se ha observado que

también es capaz de activar otros receptores como el $\alpha 9$, (Verbitsky y col., 2000), $\alpha 9/\alpha 10$ (Sgard y col., 2002) o $\alpha 3\beta 4$ (Pereira y col., 2002; Fuentealba y col., 2004; Gonzalez-Rubio y col., 2006). Es interesante el caso de la N-metilcocaína (ver más adelante), un derivado de la cocaína que es un potente agonista específico $\alpha 7$. Gracias a la metilación del grupo amino que presenta la cocaína, pasa de ser una amina terciaria que bloquea el receptor nicotínico, a ser una amina cuaternaria con capacidad de activar el receptor $\alpha 7$ manteniendo las propiedades bloqueantes sobre otros nAChRs (Francis y col., 2000).

Los agonistas selectivos para el receptor $\alpha 4\beta 2$ son el RJR 2403 (Papke y col., 2000) y los fármacos desarrollados por los laboratorios Abbott, ABT 089 y ABT 594, para el tratamiento de déficits cognitivos (Wilens y col., 2006) y dolor (Bannon y col., 1998; Donnelly-Roberts y col., 1998), respectivamente. El compuesto TC 5214 es un antagonista del receptor $\alpha 4\beta 2$ actualmente en fase clínica de desarrollo para tratar la depresión (Lippiello y col., 2008).

Diversas toxinas vegetales y animales se emplearon en un principio como selectivas para el receptor $\alpha 7$ (MLA, α -Bgtx, α -Ctx ImI) y $\alpha 3\beta 2$ (α -Ctx MII). Sin embargo, posteriormente se ha demostrado que MLA y α -Bgtx bloquean también el receptor $\alpha 9^*$ (aunque la α -Bgtx se muestra reversible sobre $\alpha 9^*$ al contrario que sobre $\alpha 7$) (Elgoyhen y col., 1994; Verbitsky y col., 2000), α -Ctx ImI el receptor $\alpha 3\beta 4$ (Broxton y col., 1999), y MLA también el receptor $\alpha 6^*$ (Fucile y col., 1998; Klink y col., 2001; Mogg y col., 2002). α -Ctx MII posee ligeras diferencias en la unión al receptor $\alpha 3\beta 2$ y el $\alpha 6^*$ aunque no es suficiente para encontrar diferencias funcionales (Vailati y col., 1999). Las toxinas α -Ctx PeIA y α -Ctx Vc1.1 bloquean receptores $\alpha 9/\alpha 10$

pero también $\alpha 3^*$ (Sandall y col., 2003; McIntosh y col., 2005; Clark y col., 2006; Vincler y McIntosh, 2007; Nevin y col., 2007). En la actualidad la toxinas bloqueante específica para $\alpha 7$ es la α -Ctx-ArIB (Whiteaker y col., 2007), para $\alpha 9/\alpha 10$ es la α -Ctx RgIA (Ellison y col., 2006), y para $\alpha 6^*$ es la toxina mutante α -Ctx MII[H9A;L15A] (McIntosh y col., 2004). Es importante resaltar que las toxinas α -Ctx-AuIB y α -Ctx MII[H9A;L15A] son altamente selectivas para los receptores $\alpha 3\beta 4$ (Luo y col., 1998) y $\alpha 6^*$ (Cartier y col., 1996; McIntosh y col., 2004) puesto que la IC_{50} identificada para estos receptores está varios órdenes de magnitud por debajo de la IC_{50} para el bloqueo de otros subtipos de receptores. Sin embargo, uno de los receptores que también es sensible al bloqueo es el $\alpha 7$, y su IC_{50} está entre 1 y 2 órdenes de magnitud por encima de la IC_{50} específica, por lo que es preciso tenerlo en cuenta a la hora de emplear estas toxinas en sistemas donde haya expresión conjunta de los receptores $\alpha 3\beta 4$ y/o $\alpha 6^*$ y $\alpha 7$ (Cartier y col., 1996; Luo y col., 1998).

A. MODULACIÓN

Los receptores nicotínicos ven modulada su actividad de manera positiva o negativa por diversos compuestos que se encuentran de manera endógena en nuestro organismo, pero también por compuestos exógenos, la mayoría diseñados específicamente con este fin (ver tabla 5.2).

A.1. Modulación positiva

Entre los compuestos endógenos, destacan la albúmina y el zinc por su actividad moduladora positiva. Este último acompaña a los neurotransmisores en las vesículas y es liberado junto a ellos a través de exocitosis (Assaf y

Chung, 1984; Howell y col., 1984). Se estima que la concentración extracelular de zinc puede variar de 10 a 300 μM durante la actividad neuronal (Assaf y Chung, 1984; Vogt y col., 2000). De esta manera, el zinc actuaría como un verdadero modulador de la transmisión mediada por receptores nicotínicos puesto que tiene un efecto dual activando e inhibiendo distintos subtipos de receptores (ver tabla 5.2).

El péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP, de sus siglas en inglés), es un neuropéptido que se encuentra frecuentemente colocalizado con la sustancia P (Assaf y Chung, 1984; Vogt y col., 2000). Es liberado por las fibras presinápticas neuronales y también se encuentra en la célula cromafín (Kuramoto y col., 1987). El péptido entero y diversos fragmentos presentan una acción dual sobre el receptor nicotínico (Di Angelantonio y col., 2002), además de actuar sobre receptores específicos de CGPR en la membrana que liberan calcio intracelular (Giniatullin y col., 1999).

La prototoxina endógena lynx1 es una proteína que pertenece a la superfamilia de proteínas secretadas Ly-6/neurotoxinas. Se encuentra expresada de manera abundante (Miwa y col., 1999) y paralela a los receptores nicotínicos principales en el SNC de mamíferos ($\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$) (Ibanez-Tallon y col., 2002). Tiene una estructura similar a la α -Bgtx pero no se secreta porque se ancla a la membrana a través de un residuo glucosilado de fosfatidil-inositol (GPI). Cuando se aplica de manera externa, esta proteína modula positivamente el receptor $\alpha 4\beta 2$ expresado en ovocitos, pero si se coexpresa con el receptor en ovocitos o de manera endógena, inhibe la respuesta nicotínica al potenciar la desensibilización (Ibanez-Tallon y col., 2002; Miwa y col., 2006). La ablación génica en ratones del gen que codifica para lynx1 aumenta la sensibilidad a nicotina y la susceptibilidad a estímulos

excitotóxicos, haciéndolos más propensos a la neurodegeneración (Miwa y col., 2006). Por ello se ha propuesto un papel modulador directo sobre el receptor nicotínico, permitiendo la desensibilización para así limitar la excitabilidad celular que se daría en condiciones de estimulación nicotínica continua.

La proteína SLURP-1 también pertenece a la superfamilia de proteínas secretadas Ly-6/neurotoxinas como lynx1. Se ha demostrado que modula el receptor $\alpha 7$ y que podría contribuir a regular la homeostasis del calcio a nivel epidérmico (Chimienti y col., 2003) (ver fisiopatología).

A.1.1. Fármacos moduladores alostéricos positivos (MAPs)

Una aproximación que está cobrando fuerza en la actualidad para paliar déficits colinérgicos es la modulación alostérica positiva, ya empleada con éxito en clínica con los receptores GABA_A (Hevers y Luddens, 1998). Parte de la idea de que un fármaco que potencie la transmisión endógena existente, diana del tratamiento, tendrá menos efectos adversos que introducir un agonista que puede actuar a más niveles de los deseados.

La galantamina (Reminyl®) se emplea en la enfermedad de Alzheimer por su capacidad inhibidora de la AChE pero por los niveles que alcanza en plasma se estima que es quizás su actividad potenciadora alostérica sobre diferentes nAChRs ($\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 6\beta 4$ y sobre todo $\alpha 7$) la que media su efecto (Samochocki y col., 2003). Algunos compuestos antihelmínticos (ver tabla 5.2) basan su efecto en propiedades moduladoras positivas sobre receptores nicotínicos (ivermectina, morantel, levamisol) e incluso son agonistas de algunos subtipos (morantel).

En relación al receptor $\alpha 7$, se han clasificado los moduladores alostéricos positivos (MAPs) en dos tipos (Gronlien y col., 2007): tipo I y tipo II. El primer tipo agrupa compuestos con la capacidad de incrementar la intensidad de la corriente nicotínica aumentando la potencia y eficacia del agonista empleado (albúmina, SLURP-1, PDACHe, LY 2087101, compuesto 6, galantamina, genisteína, 5-hidroxiindol, ivermectina, NS1738), y el segundo grupo contiene MAPs que además enlentecen significativamente la desensibilización del receptor (PNU120596; TQS).

Tabla 5.2. Moduladores positivos de nAChRs.

	Nombre	nAChR y/o tejido	Referencia
Endógenos	péptido derivado de AChE (PDACHe)	Hipocampo (rata), $\alpha 7$ humano	Zbarsky y col., 2004; Greenfield y col., 2004
	albúmina	Sinaptosomas (ratón), $\alpha 7$ (pollo)	Butt y col., 2002; Conroy y Berg, 2003
	CGRP _{1-4/5/6}	Célula cromafín (rata)	Di Angelantonio y col., 2002
	estradiol	$\alpha 4^*$ (humano)	Curtis y col., 2002
	lynx1 (in vitro)	$\alpha 4\beta 2$ (pollo)	Miwa y col., 1999
	SLURP-1	$\alpha 7$ (humano)	Chimienti y col., 2003
Exógenos	Zinc (<100 μ M)	^{L247T} $\alpha 7$ (pollo), $\alpha 2^*$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4^*$ (rata)	Palma y col., 1998; Hsiao y col., 2001
	2-amino-cetotiazoles (LY-2087101)	$\alpha 2\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\beta 4$ y $\alpha 7$ (humano)	Broad y col., 2006
	Compuesto 6	$\alpha 7$ (humano))Ng y col., 2007
	etanol	$\alpha 2^*$, $\alpha 3^*$, $\alpha 4^*$,	Covernton y Connolly, 1997
	fisostigmina	Órgano eléctrico de <i>Torpedo</i>	Maelicke y col., 1997
	galantamina	$\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 6\beta 4$ (humano), $\alpha 7/5$ -HT ₃ (pollo)	Samochocki y col., 2003
	genisteína ¹	$\alpha 7$ (humano)	Gronlien y col., 2007
	5-HI	$\alpha 7$ (humano y rata)	Zwart y col., 2002
	ivermectina	$\alpha 7$ (humano y pollo)	Krause y col., 1998
	levamisol	$\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ (humano)	Levandoski y col., 2003
	morantel	$\alpha 3\beta 2$ (rata), agonista $\alpha 7$ (humano) y $\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$ (ratón)	Wu y col., 2008; Bartos y col., 2009
	NS-1738	$\alpha 7$ (humano)	Timmermann y col., 2007
	PNU120596	$\alpha 7$ (humano y rata)	Hurst y col., 2005
TQS	$\alpha 7$ (humano)	Gronlien y col., 2007	

¹También es inhibidor de kinasas (Akiyama y col., 1987; Charpantier y col., 2005; Cho y col., 2005).

A.2. Moduladores negativos

El péptido β -amiloide₁₋₄₂ se encuentra en el cerebro de pacientes de la enfermedad de Alzheimer formando placas intracelulares que se consideran

responsables de la neurodegeneración. Esta patología se ha relacionado con la capacidad de este péptido de unirse al receptor nicotínico $\alpha 7$, lo que conlleva una pérdida de la función del receptor (Pettit y col., 2001; Liu y col., 2001).

El péptido catestatina es un fragmento de la cromogranina A, presente en las vesículas que contienen neurotransmisores en las células cromafines. Al liberarse por exocitosis, ejerce un efecto inhibitorio sobre la respuesta secretora (Mahata y col., 1997) y la corriente nicotínica (Herrero y col., 2002), lo que constituye un mecanismo de autorregulación de la respuesta secretora en las células cromafines (Mahata y col., 1997). El déficit de catestatina por una alteración genética en el procesamiento de la cromogranina A altera la regulación de la secreción de catecolaminas en el eje simpaticromafín y se ha relacionado con la probabilidad de desarrollar hipertensión arterial en humanos (O'Connor y col., 2008; Mahata y col., 2010a).

La sustancia P se encuentra en sinapsis colinérgicas cerebrales, en los ganglios mesentéricos y en la médula adrenal en los terminales presinápticos (Role y col., 1981). Actúa inhibiendo la secreción de catecolaminas (Livett y col., 1979) al inhibir la corriente nicotínica mediante un aumento en la velocidad de desensibilización (Clapham y Neher, 1984). Se cree que sería un mecanismo similar al que ejercerían el CGRP y la proteína lynx1 para limitar la excitabilidad celular en respuesta a un estímulo (Di Angelantonio y col., 2003a).

Por otra parte, son numerosos los compuestos exógenos que poseen actividad moduladora negativa sobre los distintos receptores nicotínicos. Se ha observado que diversas herramientas farmacológicas empleadas en investigación como bloqueantes de otros canales y/o receptores, también

modulan negativamente la actividad de determinados subtipos de nAChRs (ver tabla 4.5). Las bloqueantes de canales de calcio de tipo Ca_v1 (dihidropiridinas, diltiazem) bloquean el receptor nicotínico (López y col., 1993; Gandía y col., 1996), al igual que algunas toxinas bloqueantes de canales de calcio no Ca_v1 (Granja y col., 1995; Fernández y col., 1995), por lo que resulta un impedimento importante a la hora de estudiar la influencia del receptor nicotínico sobre los canales de calcio y viceversa.

Numerosos grupos de fármacos empleados recientemente y en la actualidad en la práctica clínica también poseen propiedades inhibitoras de nAChRs (ver tabla 5.3). Entre los grupos terapéuticos que exhiben este efecto deletéreo están los antidepresivos (tricíclicos, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina o noradrenalina), antipsicóticos atípicos, antieméticos inhibidores serotoninérgicos y analgésicos opioides.

El etanol y la cocaína, dos sustancias de abuso que generan adicción, bloquean determinados subtipos de receptores nicotínicos pero no se ha esclarecido cuál sería el papel de esta inhibición en los efectos a corto plazo de estos compuestos ni en la adicción que provocan.

Tabla 5.3. Moduladores negativos de nAChRs.

	Nombre	nAChR/localización	Referencia
Endógenos	β -amiloide ₁₋₄₂	hipocampo (rata)	Pettit y col., 2001; Liu y col., 2001
	catestatina	célula cromafín (vaca)	Mahata y col., 1997; Herrero y col., 2002
	CGRP _{1-5/2-7}	célula cromafín (rata)	Giniatullin y col., 1999; Di Angelantonio y col., 2002
	dinorfina A	PC12	Oka y col., 1998; Itoh y col., 2000
	dinorfina B	$\alpha 9/\alpha 10$	Lioudyno y col., 2002
	endomorfina-1	$\alpha 9/\alpha 10$	Lioudyno y col., 2002
	glucocorticoides lynx1 (<i>in vivo</i> , coexpresada)	$\alpha 3^*$, células SHSY5Y $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$ (ratón)	Ke y Lukas, 1996 Ibañez-Tallón y col., 2002; Miwa y col., 2006
	proadrenomedulina	PC12	Mahata y col., 1998
	serotonina (5-HT)	célula cromafín (vaca)	Vijayaraghavan y col., 1993
	sustancia P	célula cromafín (vaca, rata)	Livett y col., 1979; Clapham y Neher, 1984; Di Angelantonio y col., 2003a
	timopentina	célula cromafín (vaca)	Afar y col., 1993
	zinc (>100 μ M)	$\alpha 7$ (pollo), $\alpha 3\beta 2$ (rata)	Palma y col., 1998; Hsiao y col., 2001
Exógenos	citalopram	rodajas hipocampo (rata)	Hennings y col., 1999
	clozapina	$\alpha 7$ (pollo)	Singhal y col., 2007
	cocaína	rodajas hipocampo (rata)	Francis y col., 2000; Hennings y col., 1999; Francis y col., 2001
	ω -CTx-Aga IVA	célula cromafín (vaca)	Granja y col., 1995
	ω -CTx-GVIA	célula cromafín (vaca)	Fernandez y col., 1995
	N-metilcocaína	$\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ (humano)	Francis y col., 2001
	desipramina	célula cromafín (vaca)	Izaguirre y col., 1997; Kiss y col., 1997
	etanol	rodajas hipocampo (rata)	Covernton y Connolly, 1997; Yu y col., 1996; Cardoso y col., 1999
		$\alpha 7$, $\alpha 3\beta 4$ (humano)	
	fluoxetina	$\alpha 1\beta 1\gamma\delta$, $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 3^*$, $\alpha 7$ (humano)	Garcia-Colunga y col., 1997; Maggi y col., 1998; Fryer y Lukas, 1999
	nefazodona	$\alpha 1\beta 1\gamma\delta$, $\alpha 3^*$ (humano)	Fryer y Lukas, 1999
	bloqueantes Ca _v 1 (nifedipina y diltiazem)	Célula cromafín (vaca), células ImR32	Lopez y col., 1993; Gandia y col., 1996; Donnelly-Roberts y col., 1995
	nisoxetina	rodajas hipocampo (rata)	Kiss y col., 1997; Hennings y col., 1999
	nomifensina	rodajas hipocampo (rata)	Kiss y col., 1997, Hennings y col., 1999
	ondansetrón	$\alpha 7$ (rata), $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ (humano)	Papke y col., 2004
	paroxetina	$\alpha 1\beta 1\gamma\delta$, $\alpha 3^*$ (humano)	Fryer y Lukas, 1999
	sertralina	$\alpha 1\beta 1\gamma\delta$, $\alpha 3^*$ (humano)	Fryer y Lukas, 1999
tramadol	célula cromafín (vaca), $\alpha 7$ (pollo)	Shiraishi y col., 2002	
tropisetron	$\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ (humano)	Papke y col., 2004	
venlafaxina	$\alpha 1\beta 1\gamma\delta$, $\alpha 3^*$ (humano)	Fryer y Lukas, 1999	

A.3. Modulación por fosforilación/defosforilación

Los nAChRs presentan un largo lazo citosólico en todas sus subunidades, con residuos de tirosina susceptibles de ser fosforilados (Huganir y col., 1984; Hopfield y col., 1988; Swope y col., 1995), y esta fosforilación en receptores de *Torpedo* aumenta la velocidad de desensibilización (Huganir y Miles, 1989). El equilibrio entre el estado de activación de proteínas que promueven la fosforilación y la defosforilación regula la velocidad de recuperación desde el estado desensibilizado en la célula cromafín (Giniatullin y col., 2005).

La célula cromafín en concreto expresa diversas cinasas de la familia Src (SFKs) (Allen y col., 1996) que facilitan de manera constitutiva la respuesta secretora (Ely y col., 1994; Cox y col., 1996; Matsumura y col., 2007). Como contrapartida, la actividad fosfotirosín-fosfatasa (PTPasa) se encuentra asociada a la cinasa c-Src y el receptor nicotínico, formando complejos multiméricos en la célula cromafín bovina (van Hoek y col., 1997). Wang y colaboradores (2004) observaron que el receptor nicotínico de la célula cromafín bovina, y también un supuesto análogo expresado heterológamente ($\alpha 3\beta 4\alpha 5$), forman un complejo multimérico con las dos enzimas mencionadas de actividades opuestas (van Hoek y col., 1997). De esta manera, el receptor nicotínico heteromérico estaría regulado en estado basal por una actividad fosfatasa indirecta (no sobre el propio receptor, Wang y col., 2004), inhibiendo la actividad del canal. Ante un estímulo nicotínico se produciría la activación de c-Src que facilitaría las corrientes y la secreción a través de la fosforilación de otras proteínas que a su vez fosforilarían los residuos de tirosina del receptor nicotínico (Wang y col., 2004; Matsumura y col., 2007).

El receptor homomérico $\alpha 7$ se modula a través de SFKs y fosfotirosín-fosfatasas de manera inversa a los receptores heteroméricos (Wiesner y Fuhrer, 2006). Dos estudios demuestran que la defosforilación del receptor nicotínico $\alpha 7$, heterólogo y en el hipocampo de rata, aumenta la corriente nicotínica (Cho y col., 2005, Charpantier y col., 2005). En ambos estudios observaron una potenciación de la respuesta pero el grupo de Cho la atribuyó a una regulación rápida al alza de los receptores en la membrana acompañada de un incremento en su sensibilidad a ACh. Sin embargo, el grupo de Charpantier y cols. no observó un cambio similar en el número de receptores en la membrana. Ambos coincidieron en que la verdadera diana afectada por los balances en el equilibrio fosforilación/defosforilación serían otras proteínas que modularían indirectamente la función del receptor nicotínico.

5.2.7 FISIOPATOLOGÍA

Los receptores nicotínicos y las alteraciones en su número y función están implicados en numerosos procesos fisiopatológicos debido a su gran ubicuidad en distintas zonas del sistema nervioso (Gotti y Clementi, 2004; Jensen y col., 2005; Gotti y col., 2006a) y en el resto del organismo (Wessler y Kirkpatrick, 2008).

Adicción y tabaquismo

La liberación de dopamina en el sistema mesolímbico media las propiedades adictivas de varias sustancias de abuso, entre ellas la nicotina (Dani y Heinemann, 1996). Picciotto y colaboradores (1998) observaron que la nicotina inducía la liberación de dopamina en el área ventral del cuerpo estriado de ratones de genotipo silvestre pero no en los ratones a los que se les

había eliminado el gen que codifica para la subunidad $\beta 2$. Además, observaron que al contrario que en el grupo de ratones control, los ratones *knock out* presentaban una autoadministración atenuada de nicotina y sus neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, no respondían a nicotina. Por todo ello, concluyeron que los receptores que contiene la subunidad $\beta 2$, median las propiedades adictivas de la nicotina. La subunidad α acompañante a estos receptores es la subunidad $\alpha 4$ y $\alpha 6$, por lo que se postula que el receptor $\alpha 4\alpha 6\beta 2^*$ es el responsable del reforzamiento de la conducta autoadministrativa de nicotina, mediando la liberación de dopamina en el área tegmental ventral (Pons y col., 2008).

Alteraciones proliferativas

El receptor nicotínico $\alpha 7$ desempeña un papel fundamental en la diferenciación del epitelio estratificado escamoso (Arredondo y col., 2002). En los queratinocitos, los receptores nicotínicos controlan los procesos de viabilidad celular, proliferación, adhesión y movilidad. La ACh secretada de manera paracrina estimula los receptores presentes en la membrana celular y es esencial para la supervivencia celular. Además, durante la muerte celular programada de los queratinocitos, la ACh induce la secreción de una sustancia humectante y, la señalización a través del receptor $\alpha 7$ se ha demostrado necesaria para un recambio continuado de la epidermis en humanos (Nguyen y col., 2001). El empleo de ratones que portan mutaciones en este receptor ha demostrado que podría existir una compensación o redirección de la señalización celular hacia otros receptores nicotínicos como el $\alpha 3^*$ o $\alpha 9^*$ (Nguyen y col., 2001; Zia y col., 2000).

Por otro lado, mutaciones en la proteína SLURP-1 se han relacionado con alteraciones dermatológicas como el Mal de Meleda (Chimienti y col., 2003). Se cree que una alteración en su función moduladora alostérica positiva sobre el receptor nicotínico $\alpha 7$ alteraría la capacidad que tiene esta proteína para regular la homeostasis del calcio a nivel epidérmico y la inflamación cutánea.

Por último, se cree que las nitrosaminas presentes en el humo del tabaco producen transformaciones tumorigénicas al activar nAChRs en queratinocitos inmortalizados. Estas acciones pueden ser revertidas en parte por las proteínas SLURP-1 y SLURP-2 que regulan la proliferación, diferenciación y apoptosis de estas células modulando la actividad de los receptores nicotínicos (Grando, 2008).

Además, se ha descrito la dependencia de la activación de receptores sensibles a α -Bgtx en la proliferación de células neuroendocrinas que componen el carcinoma pulmonar de células pequeñas (Codignola y col., 1996). Por ello, se cree que el receptor estimulador de la proliferación de determinados carcinomas sería el receptor homomérico $\alpha 7$, y por otro lado, el receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$ actuaría inhibiendo su proliferación (Schuller, 2009). Las nitrosaminas presentes en el tabaco actuarían activando y aumentando la expresión del primero y desensibilizando el segundo, produciendo un desequilibrio que desencadenaría el desarrollo del tumor.

Enfermedad de Alzheimer

Es la enfermedad neurodegenerativa más común debido a los más de 26 millones de pacientes que la sufren en todo el mundo. Se estima que más de 100 millones de personas padecerán esta enfermedad hacia 2050 si no se identifica alguna terapia preventiva eficaz (Brookmeyer y col., 2007). Por

ello, se están dedicando enormes esfuerzos por parte de la academia y de la industria farmacéutica para conocer la fisiopatología de la enfermedad y las posibles dianas terapéuticas para su prevención.

Se ha demostrado que el efecto neurotóxico del péptido β -amiloide que se forma en esta enfermedad, se bloquea parcialmente en presencia de agonistas nicotínicos que actúan sobre el receptor $\alpha 7$ (Kihara y col., 1997). Este efecto neuroprotector, estaría mediado por las propiedades metabotrópicas del receptor $\alpha 7$. Al estar asociado a una SFK, activaría la enzima PI3K que, a su vez, fosforilaría la enzima Akt, resultando en una mayor expresión de la proteína antiapoptóticas Bcl-2 (Kihara y col., 2001).

Otros autores han observado que el efecto deletéreo del péptido β -amiloide parece estar mediado por la unión de alta afinidad del péptido al receptor $\alpha 7$ (Wang y col., 2000) y su internalización (Nagele y col., 2002). Este evento podría provocar la neurodegeneración por hiperfosforilación de la proteína tau (Wang y col., 2003) y limitar la liberación de ACh de terminales que proyectan al hipocampo y a la corteza.

El papel crucial del receptor $\alpha 7$ como diana terapéutica en la enfermedad de Alzheimer se confirma en estudios donde se ha demostrado que alterar la unión del péptido β -amiloide al receptor, ya sea por la ablación génica del receptor (Dziewczapolski y col., 2009), su activación o bloqueo (Hu y col., 2008), o al inducir la disociación del complejo péptido-receptor (Wang y col., 2010; Wang y col., 2009), limita el efecto patogénico del péptido.

Por último, recientemente se ha identificado el nuevo receptor $\alpha 7\beta 2$ en cerebro de mamíferos (Khiroug y col., 2002), que representa una diana altamente sensible a la forma oligomérica del péptido β -amiloide (Liu y col., 2009).

Enfermedad de Parkinson

Se caracteriza por ser un trastorno del movimiento en el que hay una degeneración progresiva de la transmisión dopaminérgica en el sistema nigroestriatal. El receptor $\alpha 6^*$ muestra una distribución preferencial en neuronas dopaminérgicas (Goldner y col., 1996; Le Novère y col., 1996) que conectan la sustancia negra con el cuerpo estriado, encontrándose principalmente a nivel presináptico mediando la liberación de dopamina. Estudios de unión de radioligandos con la toxina α -Ctx-MII han demostrado que la lesión nigroestriatal experimental reduce drásticamente el número de los sitios de unión a esta toxina y de las terminales dopaminérgicas en esta área en primates no humanos (Quik y col., 2005). En cerebros humanos de pacientes que presentaban la enfermedad de Parkinson, también se observó un descenso en el número de sitios de unión para nicotina y α -Ctx MII, y en la inmunoreactividad frente a la subunidad $\alpha 3^*$ pero no se registró una alteración apreciable en la inmunoreactividad para $\alpha 7$ (Gotti y col., 1997a; Court y col., 2000; Guan y col., 2002). La nicotina protege *in vitro* frente a diferentes estímulos tóxicos, incluido el MPTP (Jeyarasasingam y col., 2002; O'Neill y col., 2002; Quik y Kulak, 2002) y se ha observado que la exposición a nicotina inhalada o en parches protege frente al desarrollo de la enfermedad de Parkinson (Quik, 2004). Por todo ello, se ha propuesto que los receptores $\alpha 6^*$ podrían constituir nuevas dianas terapéuticas para futuras estrategias que modulasen la liberación de dopamina en el cuerpo estriado, y

tratar la enfermedad de Parkinson (Quik y McIntosh, 2006; Drenan y col., 2008).

Enfermedades autoinmunes

La miastenia gravis es una enfermedad en la que el paciente produce anticuerpos dirigidos contra el receptor nicotínico muscular, lo que causa un defecto de la transmisión en la placa neuromuscular (Drachman, 1994). Esto origina la debilidad muscular característica de los pacientes que sufren esta enfermedad. En la actualidad se emplean inhibidores de la acetilcolinesterasa para su tratamiento.

La gangliopatía autonómica autoinmune es un trastorno neurológico adquirido que se caracteriza por un fallo autonómico difuso. El síndrome clínico se caracteriza por una hipofunción simpática, parasimpática y entérica, y parece deberse a la generación de autoanticuerpos dirigidos contra el receptor nicotínico ganglionar (Vernino y col., 2000), en especial contra la subunidad $\alpha 3$ (Vernino y col., 2008; Vernino y col., 2009). Aunque las neuronas ganglionares pueden expresar numerosas subunidades de receptores nicotínicos, las propiedades de los receptores presentes en las sinapsis ganglionares de mamíferos se asemejan a los formados por las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ (Skok y col., 1999). Los ratones *knock out* para la subunidad $\alpha 3$ muestran un profundo fallo autonómico que lleva a una muerte perinatal de manera similar al síndrome humano de megacistis-microcolon-hipoperistalsis intestinal (Anneren y col., 1991), lo que demuestra que esta subunidad es un requisito imprescindible para la transmisión autonómica ganglionar (Xu y col., 1999).

Epilepsia nocturna del lóbulo frontal (ADNFLE, de sus siglas en inglés)

Los receptores nicotínicos del tipo $\alpha 4\beta 2$ parecen estar implicados en la aparición de la forma autosómica dominante de la epilepsia nocturna del lóbulo frontal (ADNFLE). Se han descrito hasta seis mutaciones del receptor que parecen desencadenar esta alteración (Combi y col., 2004), y existe la hipótesis de que estas mutaciones alterarían la sensibilidad de los receptores al agonista endógeno ACh (Bertrand y col., 2002; Steinlein y Bertrand, 2009). Se ha demostrado que la nicotina (inhalada y en parches) disminuye el número de episodios en pacientes de ADNFLE (Brodtkorb y Picard, 2006), al actuar como una chaperona farmacológica intracelular (Lester y col., 2009) de una determinada estequiometría del receptor nicotínico (Son y col., 2009).

Esquizofrenia

En los pacientes psicóticos existe una alteración cognitiva a la par que dificultad para mantener la atención. Esto se debe a un procesamiento defectuoso de los estímulos sensoriales, el proceso por el cual el cerebro adapta su respuesta a los estímulos que recibe. En pacientes con este tipo de alteraciones se ha encontrado un componente genético relacionado con el locus del cromosoma que contiene el receptor $\alpha 7$ (Freedman y col., 1997) y además se ha observado un descenso en el número de nAChRs en el hipocampo (Freedman y col., 1995; Leonard y col., 1996). El déficit en el procesado de estímulos auditivos (P50) se considera un indicador de la alteración de la capacidad de filtrar estímulos en pacientes esquizofrénicos (Light y Braff, 1999). Es conocido que en la población de pacientes esquizofrénicos, la prevalencia de tabaquismo es muy superior (90%) a la población general (30%) (Hughes y col., 1986) y ello parece deberse en parte a la capacidad de la nicotina para revertir el déficit sensorial auditivo (Adler y

col., 1993) a través de los receptores $\alpha 7$ (Stevens y col., 1998; Stevens y col., 1999). De esta manera los pacientes se automedican con la nicotina inhalada de los cigarrillos para mejorar su capacidad cognitiva alterada por el trastorno esquizofrénico y la medicación antipsicótica. Por todo ello, se ha propuesto la utilización de agonistas específicos $\alpha 7$ para mejorar el procesado sensorial, mejorar las disfunciones cognitivas y los síntomas positivos y negativos en los pacientes esquizofrénicos (Hajos y col., 2005; Bodnar y col., 2005; Hauser y col., 2009; Stevens y col., 1998; Martin y col., 2004; Hashimoto y col., 2005; Koike y col., 2005; Olincy y Stevens, 2007).

Inflamación y dolor

El sistema colinérgico antiinflamatorio atenúa la respuesta inflamatoria sistémica al reducir la liberación de TNF en macrófagos a través de la actividad del nervio vago (Borovikova y col., 2000; Ulloa, 2005). La sustancia encargada de esta acción es la ACh, que actuaría sobre el receptor nicotínico $\alpha 7$ (Wang y col., 2003) que media la inhibición de la liberación de citocinas proinflamatorias.

En relación al dolor, el receptor $\alpha 7$ también se ha involucrado en la atenuación de la nocicepción ante un estímulo de dolor agudo (Damaj y col., 2000; Hamurtekin y Gurun, 2006). Marubio y colaboradores (1999) demostraron que la nicotina tenía un efecto antinociceptivo reducido en los ratones *knock out* para la subunidad $\alpha 4$ y $\beta 2$. La epibatidina, un alcaloide nicotínico con una potencia analgésica mucho mayor que la morfina (Badio y Daly, 1994), tiene numerosos efectos secundarios indeseables, al contrario que su análogo estructural, el agonista $\alpha 4\beta 2$ ABT-594, desarrollado por los laboratorios Abbott (Bannon y col., 1998).

Recientemente se le ha atribuído al bloqueo del receptor $\alpha 9/\alpha 10$ poder analgésico frente al dolor de origen neuropático (Vincler y col., 2006). Las toxinas bloqueantes de este receptor (Clark y col., 2006; Ellison y col., 2006; Clark y col., 2008; Ellison y col., 2008) parecen mediar este efecto a través de la inhibición del receptor pero se ha sugerido también que estas toxinas podrían poseer una actividad adicional, como la de ser agonistas GABA_B. La actividad sobre estos receptores sería el verdadera responsable de la analgesia a través de la inhibición de canales Ca_v2.2 (Nevin y col., 2007; Callaghan y col., 2008). Este efecto estaría mediado por proteínas G y tirosín cinasas c-Src, con un componente dependiente de voltaje y otro independiente (Richman y col., 2005; Raingo y col., 2007).

Síndrome de muerte súbita infantil

La exposición de neonatos a nicotina *in utero*, está relacionada con una mayor incidencia de partos prematuros y del síndrome de muerte súbita infantil. Esta última se atribuye en parte a una secreción catecolaminérgica deficiente por parte de la médula adrenal durante el estrés hipóxico tras el nacimiento (Slotkin y col., 1995; Cohen y col., 2005). Buttigieg y colaboradores (2009) han observado que a través de un mecanismo mediado por el receptor nicotínico $\alpha 7$, la nicotina induce la sobreexpresión de canales de potasio regulados por ATP que disminuye la excitabilidad de las células cromafines y la tolerancia del neonato a periodos de hipoxia.

5.3 EL RECEPTOR MUSCARÍNICO

Los mAChRs pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) de la clase A con dominio N-terminal corto. La estructura tridimensional del receptor muscarínico presenta una gran similitud con la rodopsina, de la que se conoce la estructura tridimensional y se emplea como modelo de GPCR (Henderson y col., 1990). Los GPCRs son receptores compuestos de siete α -hélices transmembrana unidas por tres lazos extracelulares y otros tres intracelulares (ver fig. 5.2). Todos los receptores muscarínicos poseen un residuo de Asp en el extremo N terminal distal de TMIII que interacciona con grupos polares de aminos como la ACh, constituyendo el dominio de unión a ligando (Curtis y col., 1989; Spalding y col., 1994). Un amplio tercer lazo citoplasmático posee una secuencia aminoacídica específica que interacciona con una determinada proteína G y por ello dota al receptor de características funcionales diferenciales (Kubo y col., 1986; Bonner y col., 1987; Caulfield, 1993). Esta secuencia está conservada entre receptores que se acoplan a estas subunidades α de proteínas G (Liu y col., 1995).

El dominio N-terminal extracelular presenta sitios para la N-glicosilación, y el dominio C-terminal intracelular (Lu y col., 1997) posee sitios para fosforilación que modulan la actividad del receptor.

Las proteínas G se denominan de esta manera porque unen nucleótidos de guanina (GDP y GTP) y poseen actividad intrínseca GTPasa. Las proteínas G que interactúan con los mAChRs son heterotriméricas porque contienen la subunidad α (subtipo i/o o q/11), que fija GTP y posee la actividad GTPasa, y el dímero formado por las subunidades β y γ , que activan diversos sistemas efectores (ver fig. 6.1). La cadena de eventos que sigue a la unión del agonista

al receptor es la siguiente; el complejo ligando-receptor se asocia a la subunidad α de la proteína G. Esto hace que fije GTP en lugar del GDP constitutivo, y al hacerlo, se separa el complejo α -GTP del dímero $\beta\gamma$, uniéndose ambos complejos posteriormente a la proteína efectora activándola o inhibiéndola. La rápida hidrólisis del GTP por la subunidad α hace que esta pierda la capacidad de actuación sobre el sistema efector y se vuelva a asociar al dímero $\beta\gamma$ cerrando el ciclo.

5.3.1 SUBTIPOS DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS

Diversos estudios de biología molecular han revelado la existencia de cinco subtipos de mAChRs (M_1 - M_5) en mamíferos (Wess, 1996). Estos receptores se pueden subdividir en dos clases principales de acuerdo a la preferencia de acoplamiento a determinadas proteínas G. Los receptores M_1 , M_3 y M_5 están selectivamente acoplados a proteínas G de la familia G_q/G_{11} , mientras que los de tipo M_2 y M_4 activan principalmente proteínas G_i/G_o que se inhiben por la toxina *pertussis* (PTX) (ver fig. 6.1).

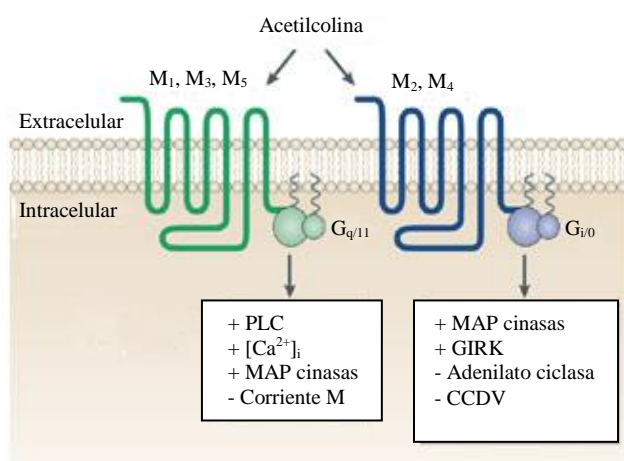


Fig. 6.1. Clasificación de mAChRs atendiendo al acoplamiento a proteínas G. Los receptores muscarínicos M_1 , M_3 y M_5 se acoplan preferencialmente a proteínas G de la familia G_q/G_{11} . Los receptores M_2 y M_4 activan selectivamente proteínas G del tipo G_i/G_o . En este esquema se presentan algunos de los efectores de estos receptores. Adaptado de Wess, 2007.

Debido a este acoplamiento selectivo, la naturaleza precisa de la respuesta muscarínica y los efectos fisiológicos a los que conduce dependen

principalmente de la localización y entidad molecular de los receptores activados. Cada uno de los cinco subtipos de mAChRs exhibe un patrón diferenciado de distribución; se expresan en numerosas regiones del sistema nervioso central (tanto en neuronas como en células de la glía) y en varios tejidos periféricos. Los receptores M₁, M₄ y M₅ se expresan predominantemente en el SNC, mientras que los subtipos M₂ y M₃ se encuentran tanto también en tejidos periféricos (ver tabla 5.4). En general, la mayoría de los tejidos y tipos celulares que presentan mAChRs, expresan al menos dos de sus subtipos. Los roles que cada uno de estos subtipos parece desempeñar en la fisiopatología de los distintos sistemas se ha ido conociendo gracias a la obtención de ratones *knock out* para los distintos tipos de receptores (Wess, 2004).

Tabla 5.4. Receptores muscarínicos: acoplamiento a proteínas G, vías de señalización, localización y respuestas funcionales.

	Subtipo de receptor				
	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
Proteína G	q/11	i/o	q/11	i/o	q/11
Segundos mensajeros	PLC IP ₃ /DAG	AC (-)	PLC IP ₃ /DAG	AC (-)	PLC IP ₃ /DAG Ca ²⁺ /PKC
Localización	SNC (corteza, hipocampo) Glándulas exocrinas Ganglios simpáticos	Corazón Rombencéfalo Músculo liso	Músculo liso Glándulas exocrinas SNC	Prosencéfalo Cuerpo estriado	Sustancia negra Glándulas Exocrinas Iris/M. ciliar
Respuesta funcional	Corriente M (-) LTP _{IP₃}	GIRK (+) CCDVs (-) Inotropía (-) Cronotropía (-) Liberación NTs (presináptico) (-)	Contracción m. liso (+), excepto vascular (NO). Secreción glandular (+) Liberación NTs (-) (presináptico)	CCDVs (-)	

AC, adenilato ciclasa; DAG, diacilglicerol; GIRK, G-protein activated inwardly rectifying potassium channel; IP₃, inositol trifosfato; LTP_{IP₃}, potenciación perdurable producida por IP₃; NO, óxido nítrico; NTs, neurotransmisores; PLC, fosfolipasa C; PKC, proteína cinasa C.

El receptor muscarínico M₁

Están acoplados a una proteína G_{q/11} y la activación de este receptor genera mensajeros secundarios a través de la activación de la proteína efectora fosfolipasa C (PLC). Estos son el inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y el diacilglicerol, provenientes del metabolismo de los lípidos de membrana. El IP₃ se une a receptores presentes en la membrana del retículo endoplásmico y genera salida de calcio al citosol, mientras que el diacilglicerol activa la proteína cinasa C, la cual a su vez media diversos efectos sobre la maquinaria de la exocitosis (Gillis y col., 1996), entre otras funciones. Se expresan en la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado (Caulfield, 1993). De acuerdo a esta distribución, estos receptores parecen estar implicados en procesos de aprendizaje y memoria (Fisher y col., 2003). La potenciación de la activación de estos receptores empleando inhibidores de AChE o agonistas muscarínicos, parece mejorar el deterioro cognitivo. Es importante resaltar que la mayoría de las terapias farmacológicas empleadas en estos casos, incluyen un AChE debido a la teoría colinérgica postulada por Bartus y col. en 1982 (Bartus y col., 1982). A pesar de que se ha sugerido que los receptores M₁ no son esenciales para la formación de la memoria, sí parecen ser importantes en los procesos en los que interacciona la corteza con el hipocampo (Wess y col., 2003). Recientemente se ha descubierto una nueva vía de potenciación perdurable o LTP que se ha denominado LTP_{IP₃}. Esto se debe a que se produce tras la activación de receptores de tipo M₁ en neuronas del área CA1 del hipocampo de rata (Fernandez de Sevilla y col., 2008) .

El receptor muscarínico M₂

Están acoplados a una proteína G_{i/o} y producen la inhibición de la enzima adenilato ciclasa, lo que resulta en una disminución de los niveles de

AMP cíclico (AMPC) disponible para activar la proteína cinasa A. Los efectos de estos receptores van desde la activación a través de la proteína G de los canales de potasio GIRK (G protein activated inwardly rectifying potassium channel) a la inhibición de canales de calcio por descenso de su nivel de fosforilación. Como consecuencia exhiben un efecto negativo en la cronotropía e inotropía cardíacas e inhiben la liberación de neurotransmisores por parte de los terminales presinápticos. Se expresan tanto en el SNC como en el SNP y el bloqueo de autorreceptores M_2 incrementa el tono colinérgico en ambos sistemas. Se ha sugerido el antagonismo M_2 junto al agonismo M_1 como aproximación terapéutica para incrementar la función colinérgica en pacientes de Alzheimer donde el tono colinérgico no está completamente perdido (Longo y Massa, 2005). La investigación realizada por diversos laboratorios no ha encontrado un compuesto que cumpla estos requisitos y ofrezca resultados esperanzadores (Eglen, 2005).

El receptor muscarínico M_3

Están ampliamente distribuidos en el SNC pero en niveles menores que el resto de subtipos (Wess, 2004). Al igual que los receptores M_1 , están acoplados a una proteína $G_{q/11}$ y la activación de este receptor genera mensajeros secundarios a través de la activación de la PLC. Los ratones *knock out* para este receptor son hipofágicos, por lo que se ha sugerido que puede tener un papel regulador de la ingesta a nivel central (Wess, 2004; Yamada y col., 2001b). Diversos estudios farmacológicos (Caulfield, 1993) y empleando ratones *knock out* han demostrado que el receptor M_3 (junto al M_1) desempeña un papel principal en la salivación (Matsui y col., 2000; Nakamura y col., 2004; Gautam y col., 2004). Por ello, agonistas como la pilocarpina, que activasen receptores M_1 y M_3 se emplearían para tratar la sequedad de

mucosas que tiene lugar en el síndrome de Sjögren (Mavragani y col., 2006; Fox y col., 2001).

Las respuestas contráctiles en el músculo liso parecen reflejar la activación de este y otros subtipos de mAChRs. De hecho, actuando de manera sinérgica, M_3 y M_2 modulan la contracción mediada por el músculo liso y la vasodilatación mediada por NO (a través de endotelio) (Eglen y col., 1996). Algunos fármacos empleados en la clínica actual que parecen mediar su acción a través de este receptor son la tolterodina, darifenacina y solifenacina para la vejiga hiperactiva; el otilonio como espasmolítico para el síndrome del colon irritable; y el tiotropio para asma y EPOC.

El receptor muscarínico M_4

En el sistema nervioso central, los receptores muscarínicos M_4 se encuentran en el cuerpo estriado colocalizados con receptores dopaminérgicos en las proyecciones estriatales (Felder y col., 2000; Oki y col., 2005). En la médula espinal, la activación de receptores muscarínicos produce una potente analgesia (Duttaroy y col., 2002; Lazareno y col., 2004; Zhang y col., 2005) aunque no se conoce la naturaleza del subtipo implicado. En los ratones *knock out* para los receptores M_2 y M_4 , se ha observado que la respuesta analgésica a agonistas muscarínicos se ve drásticamente reducida revelando un papel compartido de ambos receptores en la transmisión del dolor (Wess, 2004; Duttaroy y col., 2002).

El receptor muscarínico M_5

Es el único receptor muscarínico expresado por las neuronas de la sustancia negra *pars compacta*, la estructura dopaminérgica que inerva el

estriado (Weiner y col., 1990). La activación de estos receptores facilita la liberación estriatal de dopamina aunque también están implicados los receptores M₄ (Zhang y col., 2002). El subtipo M₅ también predomina en el área tegmental ventral, zona que provee de inervación dopaminérgica a otras áreas como el *nucleus accumbens* (nAcc) y otras áreas límbicas (Vilaro y col., 1990). Es por ello que se cree que emplear un antagonista de estos receptores puede ser una estrategia terapéutica interesante para tratar la esquizofrenia y la adicción.

Este receptor también parece implicado en la perfusión cortical cerebral y la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a través de la inducción de la liberación de NO (Elhusseiny y Hamel, 2000; Yamada y col., 2001a) . A nivel periférico, no tiene un papel claro en tejidos donde presenta una baja expresión (iris, esófago, linfocitos) (Eglen, 2005).

Por último, se ha observado que la ablación génica y algunas mutaciones en la secuencia génica del receptor disminuyen la salivación en ratones (Wess, 2004; Takeuchi y col., 2002).

5.3.2 FARMACOLOGÍA Y DIANAS TERAPÉUTICAS

En el SNC, los mAChRs participan en diversos procesos vegetativos, sensoriales, cognitivos y motores. Sus principales acciones en el SNP tienen lugar en la rama parasimpática donde la ACh tiene un efecto cardíaco cronotrópico negativo y estimulante de la secreción glandular y la contracción del músculo liso (Eglen, 2005). Por todo esto, diversos fármacos de origen natural se emplearon en un principio en la clínica para tratar alteraciones del sistema nervioso central y periférico. En primer lugar, se emplearon agonistas como la muscarina (un alcaloide extraído de la seta *Amanita muscaria*) o la pilocarpina , o antagonistas como la atropina (extraído de la planta *Atropa belladonna*) o la escopolamina (extraída de *Hyoscyamus niger*). Estos

compuestos y sus derivados se muestran selectivos para los receptores muscarínicos frente a los demás GPCRs pero no entre los subtipos muscarínicos. Además, presentan efectos secundarios que restringen su uso terapéutico (Eglen y col., 1996). Hoy en día, los fármacos más empleados en clínica son los agonistas betanecol (parálisis intestinal y retención urinaria postoperatorias), y pilocarpina (para xerostomía, glaucoma y test de sudoración); los antagonistas atropina y escopolamina, la tolterodina (un antagonista muscarínico para la incontinencia urinaria, junto a la darifenacina y solifenacina), el tiotropio, la pirenzepina y telenzepina para la úlcera gástrica, trihexifenidilo y biperideno a nivel central para paliar el temblor y rigidez en la enfermedad de Parkinson, betanecol para la parálisis intestinal postoperatoria. En caso de intoxicación atropínica se emplean inhibidores de acetilcolinesterasas como la fisostigmina.

El mayor problema de la farmacología muscarínica y su aplicación clínica es que el sitio de unión al ligando endógeno ACh está muy conservado entre los cinco diferentes subtipos de mAChRs (Lu y col., 2002). Por ello, son pocos los fármacos que presentan un perfil selectivo *in vivo* para un determinado receptor, lo que dificulta la aplicación clínica de estos fármacos. Exhiben cierta selectividad los antagonistas pirenzepina y telenzepina (M_1), tripitamina y metroctamina (M_2), y darifenacina (M_3). Para conseguir una mayor selectividad en el efecto de los fármacos muscarínicos, se suele emplear cuando es posible, una vía de administración que limite la aplicación del fármaco al tejido a tratar, como por ejemplo la vía ocular para producir midriasis (tropicamida), o la vía pulmonar para producir broncodilatación (tiotropio). La tolterodina se emplea para el tratamiento de la vejiga hiperactiva porque parece ejercer su acción selectivamente a nivel de los receptores M_3 de ese tejido, a pesar de no ser un fármaco selectivo *in vitro*. En virtud de lo descrito anteriormente sobre los posibles roles de cada subtipo de

receptor en distintas patologías, se han propuesto varias aproximaciones terapéuticas para tratarlas (ver tabla 5.5).

Tabla 5.5. Potenciales usos terapéuticos de compuestos selectivos para los mAChRs

Alteración	Diana y estrategia terapéutica
Enfermedad de Alzheimer, déficits cognitivos	M ₁ , M ₅ o agonista M ₁ /M ₅ mixto; antagonista M ₂
Síndrome de Sjögren	M ₁ , M ₃ o agonista mixto M ₁ /M ₃
Esquizofrenia	M ₁ , M ₄ o agonista mixto M ₁ /M ₄
Enfermedad de Parkinson	M ₁ , M ₄ o antagonista mixto M ₁ /M ₄
Diabetes tipo II	Agonista M ₃ periférico
Obesidad	Antagonista M ₃ central
Úlcera péptica	M ₁ , M ₃ o antagonista mixto M ₃ /M ₅ , antagonista M ₁
EPOC/Incontinencia urinaria	Antagonista M ₃
Síndrome de colon irritable/espasmos	M ₃ o antagonista mixto M ₂ /M ₃
Dolor	Agonista M ₄
Cicatrización	Agonista M ₄ , antagonista M ₃
Insuficiencia cerebrovascular	Agonista M ₅
Adicción y síndrome de retirada	Antagonista M ₅

Es importante resaltar que la unión entre los mAChRs y las proteínas G y su activación puede tener lugar en ausencia de agonista, lo que daría lugar a una actividad constitutiva del receptor. En estos casos, los antagonistas muscarínicos regularían su actividad basal aunque no se conoce la existencia de una actividad constitutiva significativa *in vivo*. Esto posibilita que algunos agonistas parciales (Michel y Whiting, 1987) lleguen a comportarse como agonistas totales en los receptores que presenten actividad constitutiva (Caulfield y Birdsall, 1998). Antagonistas como la atropina actuarían como agonistas inversos para silenciar estos receptores tónicamente activos.

Otra característica estructural importante de los mAChRs es que poseen un sitio de unión de ligandos que modifica la unión y el comportamiento de los compuestos que se unen al sitio de unión de la ACh (sitio ortostérico) (Stockton y col., 1983; Ehlert, 1988) de Caulfield. Es más, hoy en día, en lugar de buscar fármacos con mayor selectividad, se están centrando los esfuerzos en potenciar la actividad endógena del sistema que se haya visto afectado por alguna alteración. Un ejemplo lo representan los últimos

hallazgos de moduladores alostéricos positivos de los receptores M_1 y M_4 que pueden representar una alternativa terapéutica para tratar la enfermedad de Alzheimer (Ma y col., 2009) y la esquizofrenia (Chan y col., 2008; Shirey y col., 2008).

5.3.3 RECEPTORES MUSCARÍNICOS EN LA CÉLULA CROMAFÍN

Mientras los receptores nicotínicos aseguran una rápida y eficaz transmisión de los impulsos preganglionares, los receptores muscarínicos desempeñan un papel subsidiario facilitando la respuesta nicotínica. A pesar de ello, la variedad de efectos producidos por la estimulación muscarínica en las células cromafines (liberación de calcio intracelular, activación de canales catiónicos no selectivos y canales de calcio voltaje dependientes, potenciación y bloqueo del disparo de potenciales de acción, etc...) y su naturaleza prolongada, sugiere que los receptores muscarínicos pueden contribuir a la regulación fina de la secreción de neurotransmisores en periodos de estimulación pregangliónica continuada. Sólo en el caso específico de las células cromafines de pollo, la respuesta secretora depende únicamente de la estimulación muscarínica (Knight y Baker, 1986).

Como se ha descrito anteriormente, habitualmente varios tipos de mAChRs coexisten en un determinado tejido tanto a nivel presináptico como postsináptico lo que, unido a que cada subtipo puede presentar diferentes mecanismos de transducción (ver tabla 5.4), genera una pléyade de posibles respuestas en función del nivel de estimulación de cada receptor. Por todo ello, las diferentes especies animales difieren en el mecanismo y la importancia que tiene la estimulación muscarínica en el proceso secretor (Olivos y Artalejo, 2008a).

En la célula cromafín bovina

La existencia de receptores muscarínicos en la célula cromafín de la vaca se demostró en 1986 (Barron y col., 1986; Yamanaka y col., 1986) estudiando la unión de un ligando muscarínico inespecífico (benzilato de quinuclidinio tritiado) en homogenados de médula adrenal. Estos sitios de unión se encuentran principalmente en las células de tipo adrenérgico (Michelena y col., 1991)). Los subtipos de mAChRs que se han encontrado hasta la fecha corresponden a los subtipos M₁, M₂ y M₄ (Aguilar y col., 1992; Fernando y col., 1991). De acuerdo a la expresión de estos subtipos, ya se había demostrado el acoplamiento de la activación muscarínica y el metabolismo de fosfolípidos de membrana (Fisher y col., 1981), a través de la activación de la fosfolipasa C (PLC de sus siglas en inglés) (Eberhard y Holz, 1987; Forsberg y col., 1986). De esta manera se genera inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) pero también ácido fosfatídico a través de la activación de la fosfolipasa D (PLD) (Garcia y col., 1992) lo que desemboca finalmente en producción de DAG. La función de estos productos parece ser diferente, en primer lugar el IP₃ incrementaría el nivel de calcio citosólico promoviendo la salida del catión de depósitos intracelulares como el retículo endoplásmico (Cheek y Burgoyne, 1985; Kao y Schneider, 1985), y en segundo lugar el DAG promovería la activación de la PKC. Sin embargo esta señal citosólica de calcio es débil (10-20 nM) y heterogénea dentro de una misma población celular (O'Sullivan y Burgoyne, 1989; O'Sullivan y col., 1989b; Cheek y col., 1989) lo que, unido a que se produce en una región interna lejana de la membrana plasmática, podría explicar su ineficacia secretora (Finnegan y col., 1996; Ballesta y col., 1989; Schneider y col., 1977; Fisher y col., 1981; Cheek y Burgoyne, 1985; McKay y col., 1991; Yamagami y col., 1991). El papel de la estimulación muscarínica parece estar limitado a la modulación de la respuesta secretora iniciada por estimulación

nicotínica (Forsberg y col., 1986; O'Sullivan y Burgoyne, 1989; TerBush y col., 1988). Sorprendentemente, la respuesta histaminérgica de la célula cromafín va acompañada de un gran incremento en los niveles de calcio citosólico y una robusta respuesta secretora a través de la generación de segundos mensajeros como el IP₃ (Alonso y col., 1999; Nunez y col., 1995).

En la célula cromafín de la rata

La estimulación muscarínica en la célula cromafín de la rata produce una respuesta secretora robusta (Malhotra y col., 1988) ya que la elevación de calcio intracelular es prolongada y alcanza una concentración de hasta 3-5 μM (Inoue y col., 2003; Prakriya y col., 1996). En cuanto a la expresión de estos receptores, Zaika y colaboradores (2004 (Zaika y col., 2004)) propusieron que los mAChRs estarían presentes principalmente en las células de tipo noradrenérgico, lo que sugiere que la liberación diferencial de adrenalina o noradrenalina que se ha visto *in vivo* dependería del receptor colinérgico que predominase en cada subtipo celular ((Morrison y Cao, 2000) Morrison y Cao, 2000). En cuanto a la respuesta eléctrica, existen numerosos trabajos que detallan respuestas con diferentes matices quizás atribuibles en parte a la preparación empleada. En células cromafines dissociadas, Akaike y colaboradores (1990) observaron una despolarización lenta, que incrementó la frecuencia de disparo de potenciales de acción, debida al cierre de canales de potasio que están abiertos al potencial de reposo (Akaike y col., 1990a; Akaike y col., 1990b). Este grupo sugirió que los efectos estaban mediados por el receptor M₁ acoplado a PLC, lo que desembocaría finalmente en una activación de PKC que disminuiría el número de canales abiertos en condiciones basales (Akaike y col., 1993). Estudiando células cromafines en cultivo, Gullo y Wanke (2003), observaron un efecto bifásico sobre la frecuencia de disparo de los potenciales de acción. La oxotremorina M

producía una disminución inicial que era seguida con un incremento sostenido. Este efecto parecía deberse a la inhibición de una corriente de potasio de tipo M similar a la descrita por Wallace y colaboradores (2002) en la especie bovina. En la preparación *in situ* llevada a cabo por Barbara y colaboradores (1998) se observó que los receptores muscarínicos se encontraban tanto en los terminales del nervio esplácnico como en las células cromafines. Los primeros inhibirían la liberación de ACh, mientras que los segundos producirían un efecto bifásico sobre el potencial de membrana de estas células. La liberación de calcio desde depósitos intracelulares activaría canales BK que inducirían un hiperpolarización, pero la consiguiente activación de un canal catiónico no selectivo (Solaro y col., 1995) produciría una respuesta despolarizante sostenida. Este comportamiento dual podría deberse a la presencia de los receptores M₃ y M₄ (Fernando y col., 1991) que activarían respectivamente las respuestas anteriormente mencionadas. En suma, los receptores cooperarían para incrementar el calcio citosólico y producir un efecto estimulante de la liberación de catecolaminas en este tipo de preparación (Barbara y col., 1998b; Barbara y col., 1998a). Sin embargo, *in vivo*, la contribución muscarínica a la respuesta secretora no está clara. La atropina sólo es capaz de reducir la respuesta secretora inducida por ACh exógena, no endógena (por estimulación del nervio esplácnico). Sólo en presencia de inhibidores de AChE se ha podido ver un componente muscarínico en la secreción de catecolaminas inducida por ACh endógena (Akiyama y col., 1993). Esto sugiere que los receptores pueden encontrarse en una localización extrasináptica y que sólo una intensa y prolongada liberación de ACh podría implicar a los receptores muscarínicos en la transmisión esplacno-cromafín de la rata (Olivos y Artalejo, 2008a).

En la célula cromafín del gato

En 1934 Feldberg y colaboradores, en la glándula adrenal de gato *in situ*, observaron un pequeño componente en la secreción de adrenalina, que complementaba al mayoritario nicotínico y que se bloqueaba por atropina. Más adelante, se demostró que la estimulación muscarínica producía una potente respuesta secretora (Borges y col., 1987; Montiel y col., 1995) en la cual el principal componente es la adrenalina (Douglas y Poisner, 1965; Ballesta y col., 1989). Es importante resaltar que, en esta especie, la exocitosis producida por la estimulación muscarínica tiene un componente inicial en el que la elevación de calcio citosólico se debe a la liberación del catión por depósitos intracelulares, seguido de un componente lento y sostenido que depende de calcio extracelular aunque no hay consenso sobre si la entrada se produce a través de un canal dependiente de voltaje (Borges y col., 1987; Uceda y col., 1994). Sin embargo, varios trabajos apoyan la tesis de que esta entrada de calcio produciría potenciales de acción que serían objeto de modulación por canales de potasio SK (Montiel y col., 1995; Uceda y col., 1994; Uceda y col., 1992) . Se ha propuesto al receptor M_2 como subtipo presente en la célula cromafín de gato (Borges y col., 1987; Ballesta y col., 1989), cuyo efecto estaría modulado por el receptor dopaminérgico D_1 que se opone al efecto muscarínico sobre la adenilato ciclasa activándola (Albillos y col., 1992).

En la célula cromafín de cobayo

La secreción de catecolaminas evocada por estimulación colinérgica en células cromafines de cobayo está formada por los componentes nicotínico y muscarínico. De manera similar a lo que ocurre en el gato y en la rata, el incremento de calcio citosólico y la respuesta secretora depende tanto de

calcio movilizado internamente como de una fuente extracelular (Asano y col., 1995; Nakazato y col., 1994; Ohta y col., 2001). La señal de calcio intracelular es bifásica, con una elevación temprana seguida de una elevación sostenida que depende de calcio extracelular puesto que se reduce en células a las que se les fija el voltaje o tratadas con un bloqueante de canales de calcio de tipo L (Ohta y col., 1996). Es importante resaltar que la respuesta electrofisiológica a la estimulación muscarínica es también bifásica. Coincidiendo con la elevación inicial de calcio citosólico, se produce una hiperpolarización de la membrana plasmática a potenciales positivos a -60 mV. Esto se debe a que la activación de receptores M_1 o M_3 (Asano y col., 1995) produce una activación indirecta (a través de la liberación de calcio intracelular) de una corriente de salida sensible a apamina y caribdotoxina, lo que revela la participación de canales SK y BK dependientes de calcio (Ohta y col., 1996; Inoue y Kuriyama, 1990; Holman y col., 1998). Por otro lado, la elevación prolongada de calcio citosólico coincide temporalmente con la despolarización de la membrana y parece deberse a la activación de una corriente de entrada persistente. Se han propuesto varios mecanismos iónicos que contribuyen a esta corriente; un canal catiónico no selectivo abierto por un receptor muscarínico M_4 que activaría una proteína G sensible a toxina *pertussis* (Inoue y Kuriyama, 1991; Inoue y Kuriyama, 1990), o la supresión de una corriente de potasio de tipo M (Holman y col., 1998) o no (Inoue y Imanaga, 1993). En glándulas adrenales diseccionadas, Holman y cols. (1998) observaron que la estimulación de las fibras preganglionares de manera repetida y en presencia de hexametonio producía una respuesta despolarizante sostenida con la consiguiente generación de potenciales de acción que reclutaría canales de calcio dependientes de voltaje que contribuirían de manera eficaz a generar una respuesta secretora.

En la célula cromafín del ratón

Sólo existe un trabajo que concluye que la liberación de catecolaminas depende principalmente de los receptores muscarínicos en las células cromafines de ratón. Estos mediarían una respuesta despolarizante que llevaría la célula a incrementar su frecuencia de disparo de potenciales de acción (Nassar-Gentina y col., 1988). Sin embargo, Arroyo y colaboradores (2006) observaron en la preparación de médula adrenal *in situ* que la respuesta secretora a ACh endógena era prolongada en el tiempo, se bloqueaba en gran medida por hexametonio y no presentaba signos de desensibilización. En un estudio reciente de Wu y colaboradores (2010) se ha observado que la estimulación prolongada con muscarina produce un incremento en el calcio citosólico dependiente del retículo endoplásmico y del calcio extracelular, lo que sugiere la existencia de un receptor M₁, M₃ o M₅ y del fenómeno de CICR (calcium induced calcium release). Será necesario llevar a cabo estudios con mayor resolución para dilucidar exactamente qué receptor está presente puesto que existe ARN mensajero para los cinco tipos de mAChRs (Wu y col., 2010).

En la célula cromafín del cerdo

En células cromafines porcinas, la respuesta secretora muscarínica y la señal de calcio que genera dependen de una entrada de calcio extracelular y de movilización interna (Xu y col., 1991; Nassar-Gentina y col., 1997). La mayor contribución se debe al primer mecanismo y ocurre a través de un canal catiónico no selectivo con una conductancia de 20 pS). En células con el potencial de membrana fijado, los agonistas muscarínicos incrementan la probabilidad de apertura de un canal que da lugar a una corriente cuyo potencial de reversión se encuentra a -20 mV (Forsberg y col., 1995) .

En la célula cromafín del perro

En el perro, la respuesta secretora evocada por la activación de receptores muscarínicos (Tsujimoto y Nishikawa, 1975) depende tanto en la entrada de calcio extracelular al citosol como de la movilización interna de este catión tras la activación de receptores de IP_3 de manera secundaria a la activación de la PLC. La entrada de calcio parece deberse a una despolarización originada por un canal catiónico inespecífico (Ohtsuki y col., 1992).

En general, las evidencias parecen indicar que los receptores de tipo M_1 y M_3 estarían implicados en la movilización de calcio intracelular mientras que los receptores M_4 mediarían la activación de una corriente lenta despolarizante. En la glándula adrenal intacta, donde los terminales presinápticos del nervio esplácnico estarían presentes, los receptores muscarínicos de las células cromafines, activados durante una estimulación pregangliónica repetida facilitarían la secreción favoreciendo el disparo de potenciales de acción. Por otro lado, también habría una limitación de la liberación ACh mediada por los receptores muscarínicos presinápticos, sobre todo en el caso de una actividad sináptica intensa.

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LA RESPUESTA SECRETORA A ACH

Key role of the nicotinic receptor in neurotransmitter exocytosis in human chromaffin cells

Alberto Pérez-Alvarez and Almudena Albillos

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

Abstract

The whole-cell secretory response evoked by acetylcholine (ACh) in human chromaffin cells was examined using a new protocol based on quickly switching from the voltage-clamp to the current-clamp (CC) configuration of the patch-clamp technique. Our experiments revealed that Ca^{2+} entry through the nicotinic receptor at hyperpolarized membrane potentials contributed as much to the exocytosis (100.4 ± 27.3 fF) evoked by 200 ms pulses of ACh, as Ca^{2+} flux through voltage-dependent Ca^{2+} channels at depolarized membrane potentials. The nicotinic current triggered a depolarization event with a peak at +49.3 mV and a 'plateau' phase that ended at -23.9 mV, which was blocked by 10 $\mu\text{mol/L}$ mecamylamine. When a long ACh stimulus (15 s) was applied, the nicotinic current at the end of the pulse reached a value of 15.45 ± 3.6 pA, but the membrane potential depolarization still remained at the 'plateau' stage until withdrawal of the agonist. Perfusion with 200 $\mu\text{mol/L}$ Cd^{2+} during the 15 s ACh

pulse completely abolished the plasma membrane depolarization at the end of the pulse, indicating that Ca^{2+} entry through Ca^{2+} channels contributed to the membrane potential depolarization provoked by prolonged ACh pulses. These findings also reflect that voltage-dependent Ca^{2+} channels were recruited by the small current flowing through the desensitized nicotinic receptor to maintain the depolarization. Finally, muscarinic receptor activation triggered a delayed exocytotic process after prolonged ACh stimulation, dependent on Ca^{2+} mobilization from the endoplasmic reticulum. In summary, we show here that nicotinic and muscarinic receptors contribute to the exocytosis of neurotransmitters in human chromaffin cells, and that the nicotinic receptor plays a key role in several stages of the stimulus–secretion coupling process in these cells.

Keywords: acetylcholine, calcium channel, exocytosis, human chromaffin cell, nicotinic receptor, patch-clamp. *J. Neurochem.* (2007) **103**, 2281–2290.

Our present understanding of the stimulus–secretion coupling process in chromaffin cells is based on many different pieces of evidence. It was first shown that acetylcholine (ACh) activates nicotinic and muscarinic receptors on the chromaffin cell, and that the plasma membrane is consequently depolarized (Douglas *et al.* 1967). The action potentials elicited by ACh have since been shown to be both Na^+ - (Biales *et al.* 1976) and Ca^{2+} -dependent (Brandt *et al.* 1976; Kidokoro and Ritchie 1980; Kidokoro *et al.* 1982). However, voltage-dependent Ca^{2+} channels (VDCC) contribute mostly to the Ca^{2+} increment that evokes the exocytosis of chromaffin vesicles (Douglas and Rubin 1961). A non-selective cationic current flowing through the ionophore of the nicotinic receptor, comprised partly of Ca^{2+} (Vernino *et al.* 1992; Zhou and Neher 1993), also triggers the secretory process (Douglas and Rubin 1963; Gandía *et al.* 1991; Mollard *et al.* 1995). The muscarinic receptor has been implicated in activating non-selective cationic channels (Borges *et al.* 1987; Inoue and Kuriyama 1991; Inoue and Imanaga 1993; Forsberg *et al.* 1995) and in forming IP_3 , which activates Ca^{2+} output from the endoplasmic reticulum, causing catecholamine release (Eberhard and Holz 1987; Malhotra *et al.* 1989; García *et al.* 1992; Xu *et al.* 1992; Forsberg *et al.* 1995). Muscarinic receptors regulate the exocytotic response shown by chromaffin cells in many

species including the cat (Albillos *et al.* 1992), rat (Shukla and Wakade 1991; Finnegan *et al.* 1996), pig (Xu and Forsberg 1993), and guinea-pig (Asano *et al.* 1995), yet in other species such as the cow, they fail to elicit catecholamine release (Cheek and Burgoyne 1987; Ballesta *et al.* 1989; Finnegan *et al.* 1996).

The relative contributions of the different elements involved in stimulus–secretion coupling in chromaffin cells have not yet been clearly established, despite numerous investigations in which spectrofluorometric or radioactivity procedures were mainly applied to a population of chromaffin cells (Ishikawa and Kanno 1978; Ito *et al.* 1978; Kirpekar and Prat 1979; Kilpatrick *et al.* 1981, 1982; Amy and Kirshner 1982; Holz *et al.* 1982; Ceña *et al.* 1983). It therefore seems that to gain further insight into the stimulus–

Received April 13, 2007; revised manuscript received June 30, 2007; accepted August 7, 2007.

Address correspondence and reprint requests to Almudena Albillos, Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, c/ Arzobispo Morcillo 4, 28029 Madrid, Spain. E-mail: almudena.albillos@uam.es

Abbreviations used: ACh, acetylcholine; CC, current-clamp; LBS, Locke's buffer solution; TTX, tetrodotoxin; VC, voltage-clamp; VDCC, voltage-dependent Ca^{2+} channels; VDSC, voltage-dependent sodium channels.

secretion coupling process, techniques with higher spatio-temporal resolution are needed. The 'patch-clamp' technique allows the recording of secretory vesicle fusion with the plasma membrane by capacitance measurements at high resolution (Neher and Marty 1982). Unfortunately, this technique has not been used to determine ACh-evoked secretion, because of the need to fix the voltage to perform capacitance measurements, a condition that would preclude the recruitment of Na⁺ and Ca²⁺ channels for ACh to evoke action potentials.

In the present study, the complete exocytosis response evoked by ACh was characterized for the first time by capacitance measurements using a novel protocol. This protocol provides information – at high spatio-temporal resolution and in the same recording – on the participation and relative contributions of each element playing a role in the stimulus–secretion coupling event in chromaffin cells.

Finally, it should be noted that despite of the large amount of work devoted to neurotransmitter exocytosis in the chromaffin cells of many animal species (see above), to date no study has examined the stimulus–secretion coupling process in human chromaffin cells in detail. Our use of human chromaffin cells was targeted at providing novel information on the physiology of the stimulus–secretion coupling process and on the pharmacology of the receptors involved in the ACh-evoked response in humans.

Materials and methods

Cell culture

This study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Ramón y Cajal and Universidad Autónoma de Madrid. All donors had died of cerebral hemorrhage. Fourteen adrenal glands were harvested from eight patients, four females aged 48, 73, 79, and 79 years, and four males aged 35, 37, 53, and 54 years. After obtaining written informed consent from the donors' relatives, the adrenal glands were collected in cold Locke's buffer solution (LBS) and immediately processed. First, the fatty tissue was rapidly removed. The glands were retrogradely perfused with 1% type XIV protease dissolved in LBS, and transferred to a 50 mL tube containing LBS at 37°C for 10 min. The glands were then sagittally cut and the medulla removed mechanically with a scalpel, cut into pieces and placed in a collagenase type I solution (1 mg/mL) at 37°C for 30 min. The suspension was gently agitated every 5–10 min to allow disaggregation of the tissue. After this period, the suspension was filtered through a 200 µm nylon mesh and centrifuged at 170 g for 10 min. The pellet was then resuspended in LBS and centrifuged again at 40 g for 10 min. The pellet obtained was again resuspended in LBS and filtered through an 80 µm nylon mesh. Bovine albumin 4% was added to the bottom of the 50 mL tube, and the suspension centrifuged again. Finally, the last centrifugation was performed in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, Barcelona, Spain) supplemented with 5% fetal calf serum, 50 IU/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin. Cells were plated on 12 mm polylysine-treated

coverslips, and kept for up to 10 days in an incubator at 37°C in a water-saturated, 5% CO₂ atmosphere.

Electrophysiological recordings

For perforated patch whole-cell recordings, the external solution was (in mmol/L): 2 CaCl₂, 145 NaCl, 5.5 KCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES, and 10 glucose. The pH was adjusted to 7.4 with NaOH. Intracellular solution composition was (in mmol/L): 145 K-glutamate, 8 NaCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES, and 0.5 amphotericin B (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and the pH was adjusted to 7.2 with KOH. An amphotericin B stock solution was prepared every day at a concentration of 50 mg/mL in dimethyl sulphoxide and kept protected from light. The final concentration of amphotericin B was prepared by ultrasonication 10 µL of stock amphotericin B in 1 mL of K-glutamate internal solution in the dark. Pipettes were tip-dipped in amphotericin-free solution for several seconds and back-filled with freshly mixed intracellular amphotericin solution.

The perfusion system for drug application consisted of a multi-barrelled polyethylene pipette positioned close to the cell under study that allowed the complete exchange of solutions near the cell within 50 ms. The level of the bath fluid was continuously controlled by a custom designed fiber optics system coupled to a pump used to aspirate excess fluid.

Electrophysiological measurements were carried out using an EPC-10 amplifier and PULSE software (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany) running on a PC computer. Pipettes of 2–3 MΩ resistance were pulled from borosilicate glass capillary tubes, partially coated with wax and fire polished. After seal formation and perforation, only recordings in which the access resistance of the pipette and the leak current were lower than 20 MΩ and 20 pA, respectively, were accepted. The switch between the voltage-clamp (VC) and the current-clamp (CC) configuration was performed using the tool 'Gentle-CC-Switch' implemented in the PULSE software. This tool holds the cell membrane potential while changing the configuration mode, avoiding cell activation. Cell membrane capacitance changes were estimated by the Lindau-Neher technique implemented as the 'Sine + DC' feature of the 'PULSE' lock-in software. A 1 kHz, 70 mV peak-to-peak amplitude sine wave was applied at a holding potential of –80 mV. Analysis of data was conducted on a PC computer using IGOR Pro software (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA). Unless otherwise stated, data are given as the mean ± SEM. Statistical analyses of the data were performed using the paired Student's *t*-test.

Results

The ACh-evoked secretory response

Using our new protocol, we examined stimulus–secretion coupling and the possible contributions of nicotinic and muscarinic receptors and Ca²⁺ channels to the exocytosis triggered by ACh. To select the concentration of ACh to use in the experiments, we first applied 200 ms pulses of 30, 100, and 300 µmol/L and 1 mmol/L ACh to the surface of voltage-clamped human chromaffin cells. Original representative traces for each agonist concentration are shown in Fig. 1a. Current density, charge density, and secretion

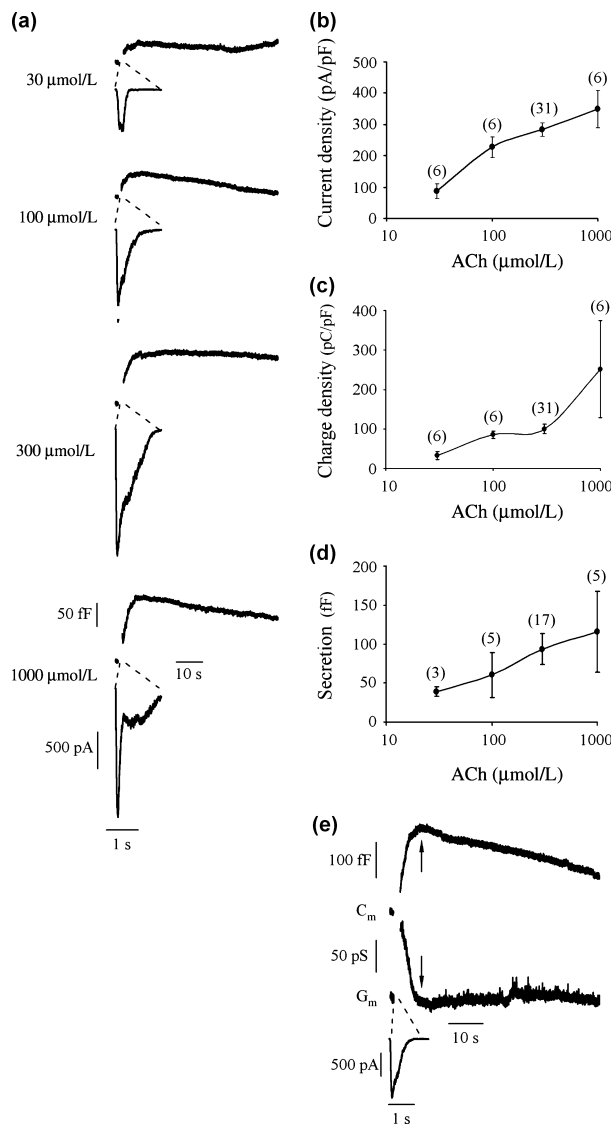


Fig. 1 Nicotinic currents and secretion yielded by acetylcholine (ACh) superfusion of human chromaffin cells. (a) Nicotinic currents and the corresponding C_m increment elicited by 200 ms of superfusion with 30, 100, and 300 $\mu\text{mol/L}$ or 1 mmol/L ACh. Cells were voltage-clamped at a holding potential (V_h) of -80 mV. The peak current density (b), charge density (c), and secretion (d) are displayed versus the ACh concentration. Points represent the mean \pm SEM of the number of cells shown in parentheses. (e) C_m increase was determined at the maximal C_m value after the stabilization of G_m . This occurred at a mean time of 8.3 ± 1.3 s ($n = 30$) after the constant fragment where ACh was applied.

elicited by ACh versus the agonist concentration are shown in Fig. 1b–d, respectively. Maximal currents were obtained using 300 $\mu\text{mol/L}$ ACh. At 1 mmol/L, the agonist elicited a second peak current, attributed to the open-channel block by the agonist as described elsewhere (Maconochie and Knight 1992). Based on these results, we used 300 $\mu\text{mol/L}$ ACh for the remaining experiments, as this concentration was suffi-

cient to evoke healthy currents, and the large rebound produced using 1 mmol/L ACh rarely appeared. Mean cell capacitance was 6.8 ± 0.3 pF ($n = 48$). A current peak of 2.1 ± 0.2 nA (current peak density of 307.3 ± 36.9 pA/pF and charge density of 111 ± 18.9 pC/pF) that elicited a ΔC_m of 93.4 ± 20 fF was rendered by 300 $\mu\text{mol/L}$ ACh ($n = 17$). During activation of the current, large membrane conductance (G_m) increments, which returned to the baseline in 2 ± 0.3 s, could also be observed. Given that large conductance changes affect capacitance measurements, these were determined after the G_m increases had ceased (Fig. 1e).

To determine the overall ACh-evoked secretory response through membrane capacitance recordings, a new protocol was designed as a three-step procedure (Fig. 2a–c). In the first step (step 1, Fig. 2a) in the VC configuration, a sine wave was applied 1 s before the 200 ms perfusion of ACh at a holding potential of -80 mV. The current was then recorded during a 2 s period, during which the potential was kept constant, and finally, it was returned to the sine wave for 58 s, to allow the measurement of plasma membrane capacitance (C_m). This first step pursued two goals: to determine the exocytosis of vesicles elicited by the nicotinic and muscarinic components of the ACh-evoked secretory response, and to establish the baseline exocytosis so that the total exocytotic response could subsequently be calculated in step 3.

In step two (step 2, Fig. 2b), the CC configuration was selected, and 1 s later, a 200 ms ACh pulse was applied again, recording changes in membrane potential for 3 s. This second step was designed to allow ACh to depolarize the cell, to record the membrane potential changes elicited by ACh, and to identify the different elements giving rise to this depolarizing response.

In the final step (step 3, Fig. 2c), we returned to the VC configuration, and a sine wave at a V_h of -80 mV was applied for 60 s. In this step, we were able to measure the whole secretory response induced by ACh in step 2, using the C_m trace just before step 2 as the reference for basal capacitance.

Figure 2d shows the results of applying the triple protocol described above to a human chromaffin cell. In step 1, perfusion with 300 $\mu\text{mol/L}$ ACh for 200 ms elicited a current of 2.38 nA and a capacitance increment of 156 fF. In step 2, an initial depolarization with a peak at $+45$ mV was observed, which decreased to -8.5 mV and remained almost as a ‘plateau’ that finished at -22.8 mV. Step 3 revealed an increase in membrane capacitance of 227 fF after ACh perfusion for 200 ms, followed by an endocytosis that exhibited a 51.5 s time constant. This protocol was tested in 12 cells, giving the following results: 2.2 ± 0.3 nA (current and charge densities of 320.6 ± 48.4 pA/pF and 106.8 ± 25.7 pC/pF, respectively) and 100.4 ± 27.3 fF in step 1, a peak depolarization of $+49.3 \pm 2.8$ mV and a ‘plateau’ depolarization that started at -8.8 ± 1.3 mV and ended at

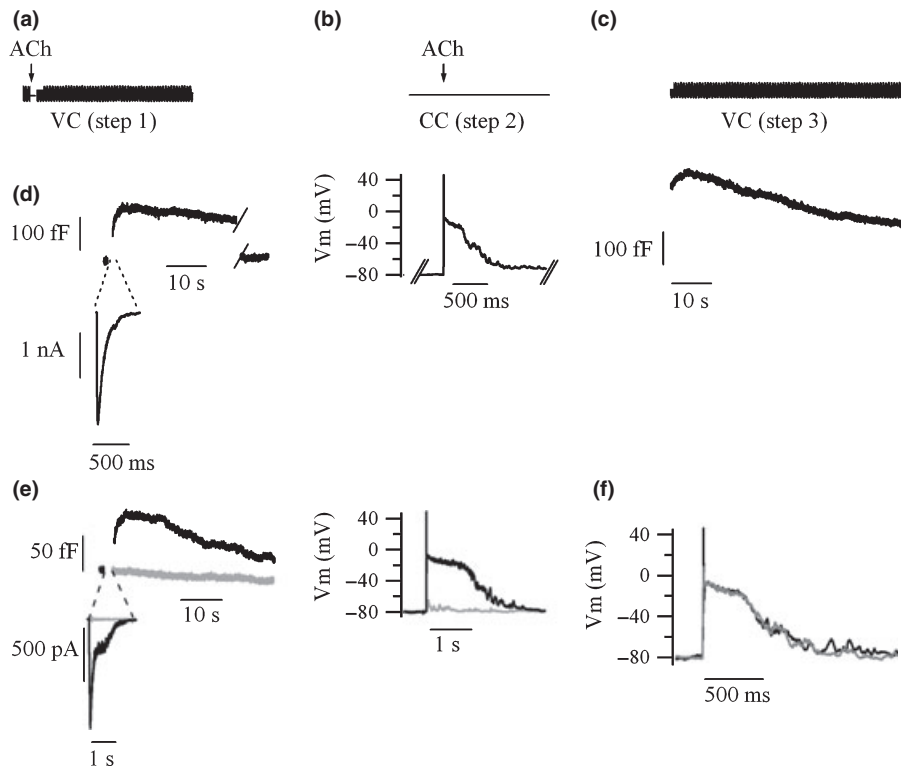


Fig. 2 Contributions of the nicotinic receptor and voltage-dependent sodium channels (VDSC) to stimulus–secretion coupling in human chromaffin cells; 300 $\mu\text{mol/L}$ acetylcholine (ACh) pulses of 200 ms duration were applied every 5 min. (a–c) The different stages of the three-step protocol are shown: (a) Step 1: The cell was voltage-clamped at a V_h of -80 mV. Agonist application is indicated by the arrow. C_m and ionic currents were measured. (b) Step 2: Switch to the current-clamp (CC) mode. One second after switching, the agonist was applied (see arrow). The membrane potential (V_m) was monitored. The total time spent in the CC mode was 4 s. (c) Step 3: Switch to the VC mode. C_m was recorded. (d) Original traces

-23.9 ± 1 mV in step 2, and 178.2 ± 41.6 fF in step 3. Before the triple protocol was performed, three initial pulses of ACh were delivered in the VC mode at interpulse intervals of 5 min, giving similar current and capacitance responses (data not shown).

Nicotinic component of the ACh response

To investigate the nature of the ACh response, we pharmacologically blocked the nicotinic receptor using mecamylamine (10 $\mu\text{mol/L}$) and then undertook steps 1 and 2 of the protocol (Fig. 2e). In step 1, 200 ms pulses of ACh 300 $\mu\text{mol/L}$ were applied every 5 min to achieve reproducible secretory responses while avoiding desensitization of the nicotinic receptor. This yielded similar currents of an amplitude of 1.5 nA. Step 2 revealed the typical double-stage depolarization evoked by ACh described above. After 3–4 pulses of similar ACh responses, mecamylamine 10 $\mu\text{mol/L}$ was perfused 5 min before performing the next

obtained in a human chromaffin cell after running each step of the above protocol. The break in the C_m and V_m traces (steps 1 and 2) indicates that only the initial and the final part of the recordings are displayed. (e) Steps 1 (left) and 2 (right) of the protocol were performed under control conditions (black trace) and after superfusing with 10 $\mu\text{mol/L}$ mecamylamine for 5 min before ACh was administered (gray trace). The antagonist was coperfused with the agonist during the stimulus. (f) Depolarization curves (step 2) under control conditions (black trace) and after superfusing with 2 $\mu\text{mol/L}$ tetrodotoxin (TTX) for 1 min before the ACh pulse (gray trace).

complete protocol. Both current and capacitance increments were blocked by mecamylamine, which was also perfused during ACh application. Thus, short pulses of ACh activated only nicotinic currents, which were responsible for the corresponding exocytotic responses. Next, step 2 of the protocol was performed, still in the presence of mecamylamine. ACh could not elicit any depolarizing effect on the membrane potential. Thus, the depolarization evoked by 200 ms ACh pulses could be fully attributed to nicotinic receptor activation by the agonist. From these results we can conclude that Ca^{2+} entry through the nicotinic receptor triggers the secretory process at hyperpolarized membrane potentials before VDCC have been activated. The question that now arises is whether voltage-dependent sodium channels (VDSC) also contribute to the depolarization response once the threshold membrane potential has been reached. Tetrodotoxin (TTX) (at a 2 $\mu\text{mol/L}$ concentration) was applied before step 2, and the same depolarizing curve was

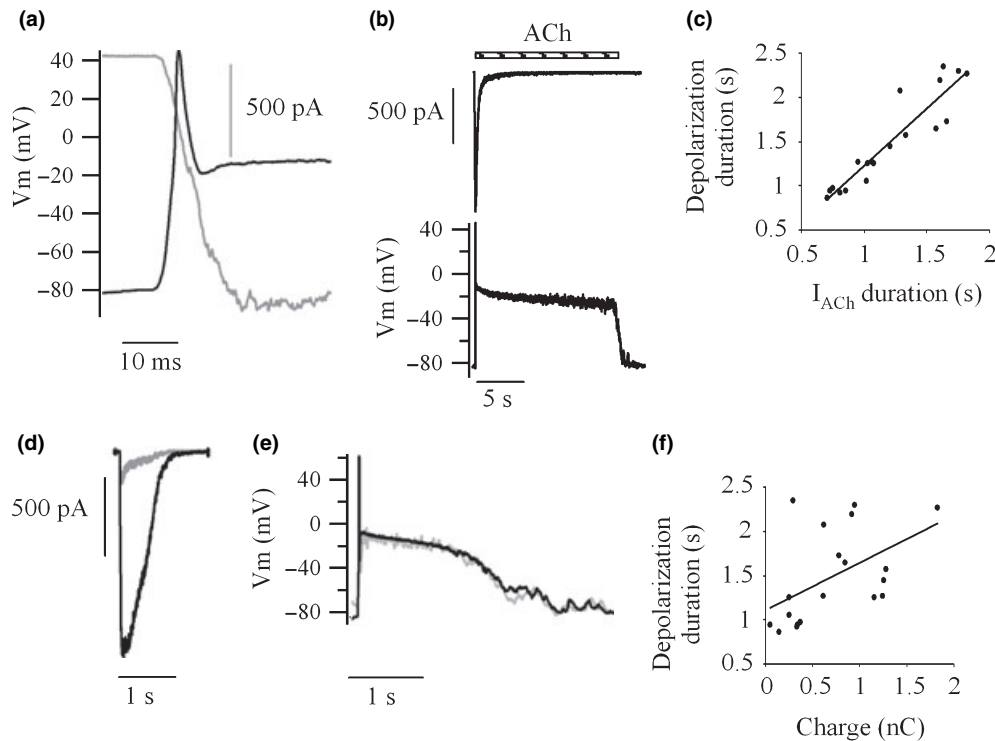


Fig. 3 Role of the nicotinic current in stimulus-secretion coupling in chromaffin cells. (a) Enlargement of the initial part of the superimposed original traces of the nicotinic current (gray line, from step 1 of the protocol, $V_h = -80$ mV) and plasma membrane depolarization (black line, step 2 of the protocol) elicited by 200 ms pulses of 300 $\mu\text{mol/L}$ acetylcholine (ACh) in the same cell. (b) Original traces of the nicotinic current (step 1 of the protocol, $V_h = -80$ mV) and plasma membrane depolarization (step 2) evoked by 15 s pulses of 300 $\mu\text{mol/L}$ ACh. (c) Correlation between nicotinic current duration (from step 1) and membrane depolarization duration (from step 2) obtained with

200 ms pulses of 300 $\mu\text{mol/L}$ ACh ($n = 19$). (d) Nicotinic currents recorded in a voltage-clamped cell ($V_h = -80$ mV) under control conditions (black line) and following washout from blockade with 10 $\mu\text{mol/L}$ mecamylamine (gray line). Stimulus: 200 ms pulses of 300 $\mu\text{mol/L}$ ACh. (e) Depolarizations elicited by ACh under control conditions (black line), and following washout from the blockade of 10 $\mu\text{mol/L}$ mecamylamine (gray line). (f) Correlation between the nicotinic current charge (from step 1) and membrane depolarization duration (from step 2) obtained from the same recordings as in (c).

produced. Only the voltage peak at +45 mV was blocked by the toxin (Fig. 2f). Thus, the injection of current that flows initially through the nicotinic receptor is sufficient to achieve the threshold potential at which VDSC, and possibly VDCC, could be recruited.

From the correlation between the nicotinic current and the depolarization curve (Fig. 3a), it was possible to determine that threshold depolarization was reached before the current had attained its maximal amplitude. This indicates that smaller currents than the peak current are needed to obtain the depolarization response (see below). Also, if the initial nicotinic current was sufficient to trigger the depolarizing event, the question arises as to whether the tiny current flowing through the nicotinic receptor in its desensitized state plays a role in the depolarization process.

To determine the possible relevance of this current and its correlation with the depolarization attained, we applied the agonist for long periods of time. Original recordings of the nicotinic current and plasma membrane depolarization elic-

ited by 15 s of perfusion with the agonist are provided in Fig. 3b. Strikingly, the depolarization 'plateau' always persisted until the removal of the agonist, despite the fact that nicotinic currents were completely desensitized. When ACh was perfused for 15 s, nicotinic currents achieved a stationary state of 15.45 ± 3.6 pA ($n = 4$) at 5 s from the peak current. It should be considered that the real flux of current through the desensitized receptor at the corresponding potential in the depolarization curve could be even smaller than that recorded at -80 mV, because of the inward rectification of the nicotinic current (Hirano *et al.* 1987; Nooney *et al.* 1992). This suggests that the presence of the agonist is needed to maintain the depolarization by means of the injection of a few pA of current through the nicotinic receptor.

To corroborate this idea, we also examined the relationship between plasma membrane depolarization duration in response to 200 ms pulses of 300 $\mu\text{mol/L}$ ACh and nicotinic current duration, and found that the depolarization response

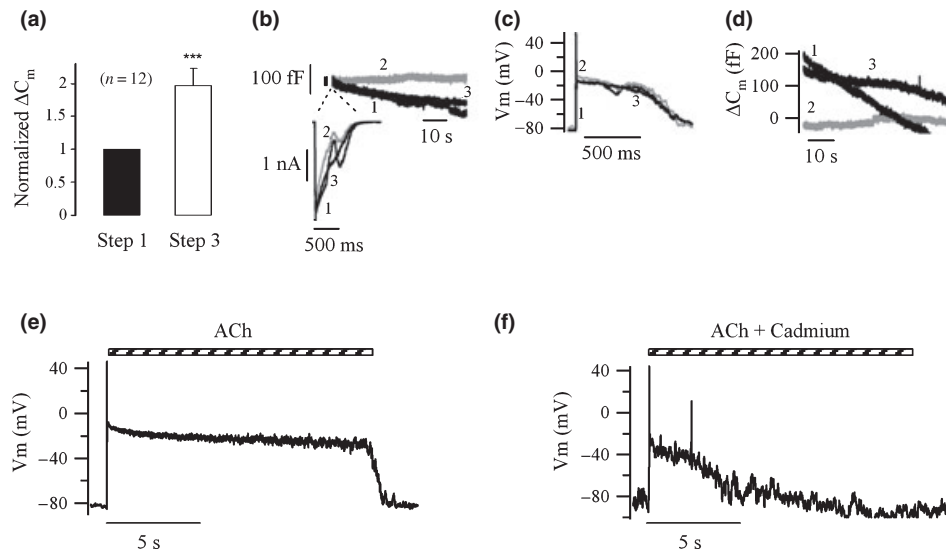


Fig. 4 Contributions of voltage-dependent Ca^{2+} channels (VDCC) to stimulus–secretion coupling in human chromaffin cells. (a) Normalized secretion (ΔC_m) obtained in steps 1 and 3. Secretion obtained in step 1 was considered as the unit. Data represent the mean \pm SEM of the number of cells shown in parentheses (***) $p < 0.001$). (b–d) Step 1 (b), step 2 (c), and step 3 (d) of the protocol were performed under control

conditions (1), then after perfusing for 1 min with CdCl_2 200 $\mu\text{mol/L}$ (2, gray traces), and finally under washout conditions (3). Stimulus: 200 ms pulses of 300 $\mu\text{mol/L}$ acetylcholine (ACh). (e and f) Membrane depolarizations elicited by 15 s pulses of 300 $\mu\text{mol/L}$ ACh applied every 5 min, under control conditions (e), and after perfusing for 1 min with 200 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 (f).

was dependent on the duration of the nicotinic current (Fig. 3c, $r = 0.93$, r stands for Pearson's regression coefficient). Finally, to obtain an idea of the relationship between plasma membrane depolarization and nicotinic current charge, we compared depolarizations elicited by very different current charges, for example, those evoked by the nicotinic current under control conditions (1.55 nA) with those obtained after blockade washout of the nicotinic receptor with mecamylamine (226 pA) in the same cell (Fig. 3d and e). Both currents elicited identical depolarization curves under the CC configuration. Similar results were obtained when comparing the depolarization curves evoked by the nicotinic currents elicited by 100 $\mu\text{mol/L}$ and 1 mmol/L ACh for the same cell (data not shown). Hence, the duration of the depolarization response was independent of the total charge flowing through the receptor (Fig. 3f, $r = 0.49$).

Ca^{2+} channels

The secretion evoked in step 3 after the CC configuration (178.2 ± 41.6 fF) differed significantly to that produced in step 1 (100.4 ± 27.3 fF) (***) $p < 0.001$). When normalized, secretion in step 3 was 2.013-fold that obtained in step 1 (***) $p < 0.001$ (Fig. 4a). This means there must be an additional source of Ca^{2+} , besides the Ca^{2+} flux through the nicotinic receptor recruited during step 2. The most plausible candidate for this Ca^{2+} entry is VDCC. To check this possibility, the three-step protocol was performed before and after perfusing the cell with 200 $\mu\text{mol/L}$ Cd^{2+} , using as

stimulus 200 ms pulses of 300 $\mu\text{mol/L}$ ACh. Nicotinic currents and the corresponding charge were blocked to the extent of $12 \pm 3.5\%$ and $29.5 \pm 5.4\%$ by the cation ($n = 6$), respectively. Hence, to better investigate the contribution of VDCC to the overall ACh-elicited exocytosis, the effect of Cd^{2+} on VDCC was studied in cells in which Ca^{2+} entry through the nicotinic receptor triggered no secretion. In this situation, Cd^{2+} blockade of the exocytosis was fully attributable to VDCC blockade by the cation (Fig. 4b–d) ($n = 4$). Moreover, we should mention that the complete endocytosis blockade achieved by Cd^{2+} reflects the Ca^{2+} dependence of endocytosis in human chromaffin cells. Thus, Ca^{2+} flux through nicotinic receptors at hyperpolarized potentials contributed to the exocytotic process as much as Ca^{2+} entry through VDCC at depolarized membrane potentials.

The depolarization curve was not affected by Cd^{2+} , indicating no contribution of Ca^{2+} influx through VDCC to the depolarizing response. Clear blockade of plasma membrane depolarization by the cation was only observed with longer ACh pulses (Fig. 4e and f). These data indicate that nicotinic currents were sufficient to evoke the depolarization elicited by short pulses of the agonist (200 ms). However, when long stimuli were applied (15 s), Ca^{2+} influx through VDCC was required to maintain the depolarizing response.

Muscarinic component of the ACh response

We observed that 200 ms ACh pulses exclusively activated nicotinic receptors. To explore the muscarinic component of the ACh response, long pulses (15 s) of 300 $\mu\text{mol/L}$ ACh

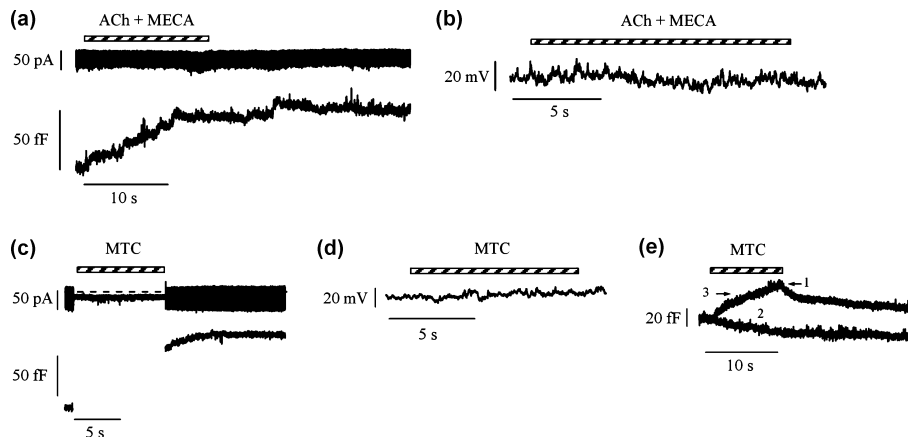


Fig. 5 Contribution of the muscarinic receptor to stimulus–secretion coupling in human chromaffin cells. (a) Original trace of the plasma membrane capacitance recorded during perfusion of 300 $\mu\text{mol/L}$ acetylcholine (ACh) plus 10 $\mu\text{mol/L}$ mecamylamine for 15 s. Mecamylamine was perfused for 6 min before the pulse. $V_h = -80$ mV. (b) Original trace of the membrane potential (step 2 of the protocol) recorded when 300 $\mu\text{mol/L}$ ACh plus 10 $\mu\text{mol/L}$ mecamylamine were perfused for 15 s. Mecamylamine was perfused for 11 min before the pulse. (c) Original traces of the ion current and plasma membrane

capacitance (sine wave broken off during the agonist pulse) obtained in step 1 ($V_h = -80$ mV) and, (d) the membrane depolarization recorded during step 2 of the protocol evoked by 10 s pulses of 100 $\mu\text{mol/L}$ methacholine. (e) Membrane capacitance traces recorded in a voltage-clamped chromaffin cell under control conditions (1), after 30 s of treatment with 50 mmol/L caffeine, 10 $\mu\text{mol/L}$ ryanodine and 1 $\mu\text{mol/L}$ thapsigargin (2), and following washout (3). Stimulus: 10 s pulses of 100 $\mu\text{mol/L}$ methacholine applied every 2 min.

together with the nicotinic receptor antagonist mecamylamine (10 $\mu\text{mol/L}$) were applied. In the presence of mecamylamine, the agonist could still elicit a delayed exocytotic response of 62 ± 8.4 fF that reached its maximum value at 21.6 ± 6.2 s ($n = 6$) (Fig. 5a). The membrane potential was, however, unaffected by ACh in the presence of mecamylamine (Fig. 5b).

To further establish whether activation of the muscarinic receptor produces an exocytotic response in these cells, the pure muscarinic agonist methacholine (100 $\mu\text{mol/L}$) was tested. Methacholine is known to activate the muscarinic receptor and elicit catecholamine release in chromaffin cell preparations from other species (Albillos *et al.* 1992; Xu and Forsberg 1993; Uceda *et al.* 1994; Finnegan *et al.* 1996; Gandía *et al.* 1996).

Pulses of methacholine lasting 200 ms, 1, and 2 s evoked no current or capacitance increments when performing step 1 of the protocol. Pulses of 5 and 10 s in the same cell elicited no inward current in the VC configuration, but instead, evoked capacitance increments. On average, 10 s pulses of methacholine triggered an exocytotic response of 50.7 ± 11 fF in eight out of 12 cells tested. A representative recording is shown in Fig. 5c. No change in membrane potential was produced when methacholine was applied in the CC configuration (Fig. 5d).

The secretion elicited by the agonist could be due to Ca^{2+} mobilization from internal stores. To check this possibility, a cocktail of compounds was used to deplete the endoplasmic reticulum containing: 50 mmol/L caffeine, an agonist of the ryanodine receptor that allows the extrusion of Ca^{2+} from this

organelle; 10 $\mu\text{mol/L}$ ryanodine, which maintains the ryanodine receptor in a semiconductance state after receptor activation by caffeine, also promoting the depletion of Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum; and 1 $\mu\text{mol/L}$ thapsigargin, an inhibitor of endoplasmic reticulum ATPase that avoids Ca^{2+} replenishment in the organelle (Fig. 5e). A 10 s pulse of methacholine was applied in the VC configuration. A slow increase in the capacitance was observed ($\tau = 5.8 \pm 2.2$ s, $n = 4$) that was highly reproducible during the next 3–4 agonist pulses applied every 2 min. After this, the cocktail of compounds was perfused 30 s before the next application of methacholine plus the cocktail, completely abolishing the secretory response. The same result was obtained after application of the next three pulses of methacholine plus the cocktail. Finally, washout of the cocktail served to recover the exocytotic response elicited by methacholine in the subsequent pulses. These results suggest that activation of the muscarinic receptor and the subsequent triggering of secretion require a cascade of secondary messengers, which need long periods of time to be activated. They also confirm that the secretory response evoked by the muscarinic receptor in human chromaffin cells is triggered by Ca^{2+} released from the endoplasmic reticulum.

Discussion

We examined the stimulus–secretion coupling process in human adrenal gland chromaffin cells using the patch-clamp technique. First investigated, was the function of the nicotinic receptor. Two hundred millisecond pulses of

300 $\mu\text{mol/L}$ ACh in the VC configuration elicited exocytotic responses in human chromaffin cells that were blocked by mecamylamine (10 $\mu\text{mol/L}$), a selective nicotinic receptor antagonist. This experiment revealed that nicotinic receptors were responsible for initiating the process that leads to the exocytotic response evoked by short pulses of ACh in human chromaffin cells. This secretion is triggered by Ca^{2+} flowing through the receptor, since fixing the voltage at -80 mV prevented activation of VDCC. Ca^{2+} influx through the nicotinic receptor has been previously reported to trigger secretion in chromaffin cells of the cat (Douglas and Rubin 1963) and cow (Gandía *et al.* 1991; Mollard *et al.* 1995). In these cells, nicotinic currents were also abolished by mecamylamine in the cow (Nooney *et al.* 1992) and rat (Giniatullin *et al.* 2000). In addition, the depolarization response obtained in the CC configuration was completely blocked by mecamylamine.

The contribution of VDSC to stimulus–secretion coupling in human chromaffin cells was explored using TTX. We observed that these channels exclusively contributed to generating the peak depolarization, which was blocked by the toxin. The remaining depolarization response was unaffected by TTX. This again points to the nicotinic current as the only element triggering the depolarizing process, and thus, the secretory event. These results are in good agreement with reported data, also obtained through electrophysiological techniques in rat (Brandt *et al.* 1976; Kidokoro and Ritchie 1980) and human chromaffin cells (Biales *et al.* 1976). It should be stressed that the high peak voltage of 49.3 ± 2.8 mV achieved during the ACh-evoked depolarization is much higher than the maximum $+30$ mV attained during evoked action potentials in rat or bovine chromaffin cells (Novara *et al.* 2004; González-Rubio *et al.* 2006).

From the correlation obtained between the nicotinic current and the evoked depolarization (Fig. 3a), it was possible to observe that the threshold depolarization was achieved before the nicotinic current had reached its peak, reflecting that smaller nicotinic currents were required to depolarize the cell membrane. It is interesting also to note that nicotinic currents of very different charges (ranging from 49 to 1830 pC) were able to evoke the same depolarization (Fig. 3c–e). We did not investigate the minimum charge required for depolarization, but an idea can be obtained from the studies of Fenwick *et al.* (1982) and Barbara and Takeda (1996). Fenwick *et al.* (1982) suggested that a single-channel opening of 2.4 pA at -80 mV would suffice to trigger an action potential in bovine chromaffin cells. Further, Barbara and Takeda (1996) noted in rat chromaffin cells that a quantum of ACh released from the splanchnic nerve activated between 7 and 18 nicotinic receptors (quantal size = 20 pA). This is consistent with the large safety margin of synaptic transmission reported for the splanchnic nerve-chromaffin cell synapse in the guinea-pig (Holman *et al.* 1994) and rat (Barbara and Takeda 1996). Moreover, in the

present study we observed close correlation between nicotinic current duration and membrane depolarization duration (Fig. 3c), strengthening the idea that a small injection of current through the desensitized nicotinic receptor is sufficient to maintain depolarization (Fig. 3b).

With these novel findings, the concept of ligand-operated ion channels acquires a new dimension. These channels have been classically considered as inductors of rapid changes in electrical activity. The data presented here suggest that this is indeed the case: nicotinic currents were capable of initiating the depolarization event and triggering the secretory process even at hyperpolarized membrane potentials. However, our data also provide evidence for the long-term functions of neuronal nicotinic receptors, as previously suggested (Mulle *et al.* 1992). Thus, these receptors were observed here to contribute to maintain the depolarizing signal during prolonged periods of time, allowing continued neurotransmitter release. The fact that these data were obtained in human chromaffin cells adds to the interest of these results.

The contribution of Ca^{2+} channels to the whole ACh-evoked exocytosis event was supported by Cd^{2+} blockade of the increase in plasma membrane capacitance detected between steps 1 and 3 of the protocol. Ca^{2+} entry through Ca^{2+} channels has been shown to be the main trigger for the exocytotic process, using as stimulus long pulses of ACh (Douglas and Rubin 1961). Here, we show that the secretion evoked by Ca^{2+} entry through the nicotinic receptor was able to elicit a similar amount of secretory vesicle fusion when the agonist was applied rapid and briefly (200 ms). This key observation can be explained in several possible ways including: (i) colocalization of the nicotinic receptor and active exocytotic zones in the possible case of a low fractional Ca^{2+} current passing through the receptor in human chromaffin cells, as occurs in bovine chromaffin cells (2.5%; Zhou and Neher 1993); (ii) amplification of this discrete Ca^{2+} entry through the receptor by a mechanism related to the endoplasmic reticulum (as in bovine chromaffin cells, Mollard *et al.* 1995); and (iii) Ca^{2+} entry through the nicotinic receptor at hyperpolarized membrane potentials similar to Ca^{2+} entry through VDCC at depolarized membrane potentials (e.g. in the rat medial habenular nucleus, Mulle *et al.* 1992). In future work, we will explore these three options.

Does Ca^{2+} influx through VDCC contribute to depolarization? The fact that Cd^{2+} did not affect the depolarization curve yielded by brief ACh pulses indicates that Na^{+} entry through the nicotinic receptor, but not Ca^{2+} flux through VDCC, is sufficient for short ACh pulses to achieve depolarization. However, using long ACh pulses as stimulus, Cd^{2+} blocked the depolarizing curve. Thus, VDCC were recruited by the nicotinic current flowing through the desensitized nicotinic receptor to maintain the depolarizing response.

To determine the role of the muscarinic receptor in the secretory response, long ACh pulses were perfused in the presence of mecamylamine, a nicotinic receptor antagonist, and a delayed secretory response, which provoked no current, was observed. In addition, a pure agonist of the muscarinic receptor, methacholine, was tested. This agonist evoked no response when administered as short pulses lasting 200 ms to 2 s. However, a 5 s pulse of methacholine elicited exocytosis in the VC configuration, reaching its maximum after 10 s of perfusion with the drug, without eliciting any current. Hence, this exocytosis could be evoked by Ca^{2+} from intracellular stores. To check this possibility, we used a cocktail of caffeine, ryanodine, and thapsigargin. After treatment with this cocktail of compounds, methacholine induced no exocytotic response. However, when the cocktail was washed out, the secretory response could be again elicited. We can conclude that the muscarinic receptor contributed to the exocytotic response elicited by ACh in human chromaffin cells when this agonist was applied for a prolonged period. This effect was mediated by Ca^{2+} released from the endoplasmic reticulum. It is plausible that the repeated release of ACh from the splanchnic nerve could mimic the prolonged and sustained stimulation of the 5–10 s of methacholine applied here. One-third of the cells tested did not respond to methacholine, probably because of a lack of muscarinic receptors on some of the cells comprising a cell population, as reported for rat chromaffin cells (Zaika *et al.* 2004). As observed in the present study, the muscarinic receptor also participates in the exocytotic process in other animal species such as the cat (Albillos *et al.* 1992), rat (Shukla and Wakade 1991; Finnegan *et al.* 1996), pig (Xu and Forsberg 1993), and guinea-pig (Asano *et al.* 1995).

In summary, our data indicate that both nicotinic and muscarinic receptors control the secretion of neurotransmitters in human chromaffin cells. The nicotinic receptor plays a key role in this process, contributing at hyperpolarized membrane potentials in the same order of magnitude as VDCC at depolarized potentials. Further, in response to a short ACh pulse, the nicotinic current is sufficient to depolarize the cell and evoke the exocytotic event. However, after a prolonged ACh stimulus, the current flowing through the nicotinic receptor in its desensitized state is also necessary to recruit VDCC, which helps to maintain the depolarization state. Only under this type of stimulus, does the muscarinic receptor contribute to the secretory process.

Finally, we would like to stress that the three-step protocol proposed provides – for the first time – high-resolution capacitance recordings of the whole-cell exocytotic response evoked by ACh, the physiological neurotransmitter at the splanchnic nerve-chromaffin cell synapse and at the sympathetic nerve synapse. Such recordings will be useful for the study of near physiological responses produced at these synapses.

Acknowledgements

The authors wish to thank the donors of the human adrenal glands and their relatives. We also thank Dr Agustín Albillos and the Transplant Team of the Hospital Ramón y Cajal for their excellent coordination in supplying human adrenal glands. We are also grateful to Dr Erwin Neher for critical comments and to Drs Antonio R. Artalejo, Emilio Carbone, and Kevin Gillis for helpful discussions on the manuscript. APA holds a fellowship award from the Comunidad Autónoma de Madrid. This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología No. BFU2005-00743/BFI, and the Comunidad Autónoma de Madrid and Universidad Autónoma de Madrid No. 11/BCB/003 awarded to AA.

References

- Albillos A., Abad F. and García A. G. (1992) Cross-talk between M_2 muscarinic and D_1 dopamine receptors in the cat adrenal medulla. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**, 1019–1024.
- Amy C. and Kirshner N. (1982) 22Na^+ uptake and catecholamine secretion by primary cultures of adrenal medulla cells. *J. Neurochem.* **39**, 132–142.
- Asano T., Ohta T., Otsuguro K., Ito S. and Nakazato Y. (1995) Muscarinic receptor subtypes mediating catecholamine secretion and increase in intracellular Ca^{2+} concentration in adrenal chromaffin cells of the guinea pig. *J. Vet. Med. Sci.* **57**, 1067–1071.
- Ballesta J. J., Borges R., García A. G. and Hidalgo M. J. (1989) Secretory and radioligand binding studies on muscarinic receptors in bovine and feline chromaffin cells. *J. Physiol.* **418**, 411–426.
- Barbara J. G. and Takeda K. (1996) Quantal release at a neuronal nicotinic synapse from rat adrenal gland. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 9905–9909.
- Biales B., Dichter M. and Tischler A. (1976) Electrical excitability of cultured adrenal chromaffin cells. *J. Physiol.* **262**, 743–753.
- Borges R., Ballesta J. J. and García A. G. (1987) M_2 muscarinoceptor-associated ionophore at the cat adrenal medulla. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**, 965–972.
- Brandt B. L., Hagiwara S., Kidokoro Y. and Miyazaki S. (1976) Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *J. Physiol.* **263**, 417–439.
- Ceña V., Nicolás G. P., Sánchez-García P., Kirpekar S. M. and García A. G. (1983) Pharmacological dissection of receptor-associated and voltage-sensitive ionic channels involved in catecholamine release. *Neuroscience* **10**, 1455–1462.
- Cheek T. R. and Burgoyne R. D. (1987) Cyclic AMP inhibits both nicotine-induced actin disassembly and catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* **262**, 11663–11666.
- Douglas W. W. and 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. and Rubin R. P. (1963) The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling. *J. Physiol.* **167**, 288–310.
- Douglas W. W., Kanno T. and 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. *J. Physiol.* **188**, 107–120.
- Eberhard D. A. and Holz R. W. (1987) Cholinergic stimulation of inositol phosphate formation in bovine adrenal chromaffin cells: distinct nicotinic and muscarinic mechanisms. *J. Neurochem.* **49**, 1634–1643.

- Fenwick E. M., Marty A. and Neher E. (1982) A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J. Physiol.* **331**, 577–597.
- Finnegan J. M., Borges R. and Wightman R. M. (1996) Comparison of cytosolic Ca^{2+} and exocytosis responses from single rat and bovine chromaffin cells. *Neuroscience* **71**, 833–843.
- Forsberg E. J., Li Q. and Xu Y. (1995) Cation channel activated by muscarinic agonists on porcine adrenal chromaffin cells. *Am. J. Physiol.* **269**, E43–E52.
- Gandía L., Casado L. F., López M. G. and García A. G. (1991) Separation of two pathways for calcium entry into chromaffin cells. *Br. J. Pharmacol.* **103**, 1073–1078.
- Gandía L., López M. G., Villarroya M., Gilabert J. A., Cárdenas A., García A. G. and Borges R. (1996) Blocking effects of otilonium on Ca^{2+} channels and secretion in rat chromaffin cells. *Eur. J. Pharmacol.* **298**, 199–205.
- García M. C., López M. G., García A. G. and Sánchez Crespo M. (1992) Muscarinic acetylcholine receptor enhances phosphatidylcholine hydrolysis via phospholipase D in bovine chromaffin cells in culture. *J. Neurochem.* **59**, 2244–2250.
- Giniatullin R. A., Sokolova E. M., Di Angelantonio S., Skorinkin A., Talantova M. V. and Nistri A. (2000) Rapid relief of block by mecamlamine of neuronal nicotinic acetylcholine receptors of rat chromaffin cells in vitro: an electrophysiological and modeling study. *Mol. Pharmacol.* **58**, 778–787.
- González-Rubio J. M., García de Diego A. M., Egea J., Olivares R., Rojo J., Gandía L., García A. G. and Hernández-Guijo J. M. (2006) Blockade of nicotinic receptors of bovine adrenal chromaffin cells by nanomolar concentrations of atropine. *Eur. J. Pharmacol.* **535**, 13–24.
- Hirano T., Kidokoro Y. and Ohmori H. (1987) Acetylcholine dose–response relation and the effect of cesium ions in the rat adrenal chromaffin cell under voltage clamp. *Pflugers Arch.* **408**, 401–407.
- Holman M. E., Coleman H. A., Tonta M. A. and Parkington H. C. (1994) Synaptic transmission from splanchnic nerves to the adrenal medulla of guinea-pigs. *J. Physiol.* **478**, 115–124.
- Holz R. W., Senter R. A. and Frye R. A. (1982) Relationship between Ca^{2+} uptake and catecholamine secretion in primary dissociated cultures of adrenal medulla. *J. Neurochem.* **39**, 635–646.
- Inoue M. and Imanaga I. (1993) G protein-mediated inhibition of inwardly rectifying K^{+} channels in guinea pig chromaffin cells. *Am. J. Physiol.* **265**, C946–C956.
- Inoue M. and Kuriyama H. (1991) Muscarinic receptor is coupled with a cation channel through a GTP-binding protein in guinea-pig chromaffin cells. *J. Physiol.* **436**, 511–529.
- Ishikawa K. and Kanno T. (1978) Influences of extracellular calcium and potassium concentrations on adrenaline release and membrane potential in the perfused adrenal medulla of the rat. *Jpn. J. Physiol.* **28**, 275–289.
- Ito S., Nakazato Y. and Ohga A. (1978) Pharmacological evidence for the involvement of Na^{+} channels in the release of catecholamines from perfused adrenal glands. *Br. J. Pharmacol.* **62**, 359–361.
- Kidokoro Y. and Ritchie A. K. (1980) Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. *J. Physiol.* **307**, 199–216.
- Kidokoro Y., Miyazaki S. and Ozawa S. (1982) Acetylcholine-induced membrane depolarization and potential fluctuations in the rat adrenal chromaffin cell. *J. Physiol.* **324**, 203–220.
- Kilpatrick D. L., Slepets R. and Kirshner N. (1981) Ion channels and membrane potential in stimulus–secretion coupling in adrenal medulla cells. *J. Neurochem.* **36**, 1245–1255.
- Kilpatrick D. L., Slepets R. J., Corcoran J. J. and Kirshner N. (1982) Calcium uptake and catecholamine secretion by cultured bovine adrenal medulla cells. *J. Neurochem.* **38**, 427–435.
- Kirpekar S. M. and Prat J. C. (1979) Release of catecholamines from perfused cat adrenal gland by veratridine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **76**, 2081–2083.
- Maconochie D. J. and Knight D. E. (1992) A study of the bovine adrenal chromaffin nicotinic receptor using patch clamp and concentration-jump techniques. *J. Physiol.* **454**, 129–153.
- Malhotra R. K., Wakade T. D. and Wakade A. R. (1989) Cross-communication between acetylcholine and VIP in controlling catecholamine secretion by affecting cAMP, inositol triphosphate, protein kinase C, and calcium in rat adrenal medulla. *J. Neurosci.* **9**, 4150–4157.
- Mollard P., Seward E. P. and Nowycky M. C. (1995) Activation of nicotinic receptors triggers exocytosis from bovine chromaffin cells in the absence of membrane depolarization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 3065–3069.
- Mulle C., Choquet D., Korn H. and Changeux J. P. (1992) Calcium influx through nicotinic receptor in rat central neurons: its relevance to cellular regulation. *Neuron* **8**, 135–143.
- Neher E. and Marty A. (1982) Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **79**, 6712–6716.
- Nooney J. M., Peters J. A. and Lambert J. J. (1992) A patch clamp study of the nicotinic acetylcholine receptor of bovine adrenomedullary chromaffin cells in culture. *J. Physiol.* **455**, 503–527.
- Novara M., Baldelli P., Cavallari D., Carabelli V., Giaccipoli A. and 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**, 433–449.
- Shukla R. and Wakade A. R. (1991) Functional aspects of calcium channels of splanchnic neurons and chromaffin cells of the rat adrenal medulla. *J. Neurochem.* **56**, 753–758.
- Uceda G., Artalejo A. R., de la Fuente M. T., López M. G., Albillos A., Michelena P., García A. G. and Montiel C. (1994) Modulation by L-type Ca^{2+} channels and apamin-sensitive K^{+} channels of muscarinic responses in cat chromaffin cells. *Am. J. Physiol.* **266**, C1432–C1439.
- Vernino S., Amador M., Luetje C. W., Patrick J. and Dani J. A. (1992) Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron* **8**, 127–134.
- Xu Y. and Forsberg E. J. (1993) Effects of caffeine on cholinergic agonist- and K^{+} -induced cytosolic Ca^{++} signals and secretion in porcine adrenal chromaffin cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **264**, 770–775.
- Xu Y., Duarte E. P. and Forsberg E. J. (1992) Role of thapsigargin-sensitive intracellular Ca^{2+} pools in secretion induced by muscarinic agonists in porcine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.* **59**, 2224–2229.
- Zaika O. L., Pochynuk O. M., Kostyuk P. G., Yavorskaya E. N. and Lukyanetz E. A. (2004) Acetylcholine-induced calcium signalling in adrenaline- and noradrenaline-containing adrenal chromaffin cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **424**, 23–32.
- Zhou Z. and Neher E. (1993) Calcium permeability of nicotinic acetylcholine receptor channels in bovine adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch.* **425**, 511–517.

2. CARACTERIZACIÓN DE LOS CANALES DE CALCIO

Pharmacological and biophysical properties of Ca²⁺ channels and subtype distributions in human adrenal chromaffin cells

Alberto Pérez-Alvarez · Alicia Hernández-Vivanco ·
María Cano-Abad · Almudena Albillos

Received: 10 December 2007 / Revised: 28 February 2008 / Accepted: 5 March 2008 / Published online: 29 April 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract In this study, we explored the pharmacological and biophysical properties of voltage-activated Ca²⁺ channels in human chromaffin cells using the perforated-patch configuration of the patch-clamp technique. According to their pharmacological sensitivity to Ca²⁺ channel blockers, cells could be sorted into two groups of similar size showing the predominance of either N- or P/Q-type Ca²⁺ channels. R-type Ca²⁺ channels, blocked by 77% with 20 μM Cd²⁺ and not affected by 50 μM Ni²⁺, were detected for the first time in human chromaffin cells. Immunocytochemical experiments revealed an even distribution of α_{1E} Ca²⁺ channels in these cells. With regard to their biophysical properties, L- and R-type channels were activated at membrane potentials that were 15–20 mV more negative than P/Q- and N-type channels. Activation time constants showed no variation with voltage for the L-type channels, decreased with increasing potentials for the R- and P/Q-type channels, and displayed a bell shape with a maximum at 0 mV for the N-type channels. R-type channels were also the most inactivated channels. We thus show here that human chromaffin cells possess all the Ca²⁺ channel types described in neurons, L, N, P/Q, and R channels, but the relative contributions of N and P/Q channels differ among cells. Given that N- and P/Q-type Ca²⁺ channel types can be differentially modulated, these findings suggest the possibility of cell-specific regulation in human chromaffin cells.

Keywords Perforated patch · Chromaffin cells · Toxin · Patch clamp · Voltage-dependent calcium channel

Introduction

Chromaffin cells are innervated by the sympathetic splanchnic nerve, which releases acetylcholine (ACh). In recent work using the patch-clamp technique, we elucidated the sequence of events leading to the stimulus-secretion coupling process in human chromaffin cells. Thus, in response to a short ACh pulse, the nicotinic current is sufficient to depolarize the cell and evoke the exocytotic event. However, after a prolonged agonist stimulus, the tiny current flowing through the nicotinic receptor is necessary to recruit voltage-dependent Ca²⁺ channels (VDCC), which maintain the depolarization state and, therefore, the exocytotic process. Continued stimulation by the agonist also activates muscarinic receptors, which participate in secretory vesicle fusion [1].

During the acute sympathetic stress response, elevated plasma catecholamine concentrations increase the metabolism of the organism to provide energy for defense or escape. In response to the increased synaptic activity, chromaffin cells also release a pool rich in neuropeptides that further act by regulating blood vessels and peripheral nerve function. Thus, Ca²⁺-dependent transmitter release from chromaffin cells seems to be an important control mechanism for regulating relevant metabolic functions in the organism. To understand this regulatory system in humans, the main pathways of Ca²⁺ entry that trigger the secretory process in these cells need to be unveiled. To date, this has not been possible owing to the scarce availability of human chromaffin cells.

Since the 1990s, investigators have relied upon molecular, biophysical, and pharmacological approaches to

A. Pérez-Alvarez · A. Hernández-Vivanco · M. Cano-Abad ·
A. Albillos (✉)
Departamento de Farmacología y Terapéutica,
Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid,
c/ Arzobispo Morcillo 4,
28029 Madrid, Spain
e-mail: almudena.albillos@uam.es

characterize the different types of VDCC in excitable cells. According to their pharmacological properties, neuronal high voltage-activated Ca^{2+} channels have been classified as dihydropyridine (DHP)-sensitive (L-type channels), ω -conotoxin GVIA (ω -CTX-GVIA)-sensitive (N-type channels), and ω -conotoxin MVIIC (ω -CTX-MVIIC) or ω -agatoxin IVA (ω -Aga-IVA)-sensitive channels (P/Q-type channels) [2–4]. An R-type Ca^{2+} channel, resistant to blockade by DHP and toxins, has also been described [4–7].

VDCC constitute the main pathways of Ca^{2+} entry to the cytosol in chromaffin cells. In the last 20 years, many studies have elucidated the complete set of VDCC in these cells using the whole cell configuration of the patch-clamp technique, as: L- [8–10], N- [9–13], and P/Q- type Ca^{2+} channels [14–16]. The percentage of each type of Ca^{2+} channel in chromaffin cells has been found to vary among animal species. Hence, L channels are more abundant in the cat [10], rat [17], and mouse [18–20]; N-type channels predominate in the pig [21], and P/Q channels are the most abundant type in cows [14, 15] and humans [22]. Human chromaffin cells have been reported to possess 20%, 30%, and 50% L-, N-, and P/Q-type channels, respectively [22]. An interesting feature, revealed in bovine chromaffin cells, is the different participation in Ca^{2+} signaling and secretion of L-type Ca^{2+} channels in noradrenergic chromaffin cells and of P/Q-type Ca^{2+} channels in adrenergic chromaffin cells [23].

It was not until the introduction of the perforated-patch configuration of the patch-clamp technique that evidence for the R-type Ca^{2+} channel in chromaffin cells was found. While in the studies mentioned above, it was not possible to detect the R-type channel in the whole-cell configuration; using the perforated patch technique, we were able to detect a healthy R-type current in mouse chromaffin cells both in culture and in situ in adrenal tissue slices [19]. Accordingly in this configuration, the proportions of the other Ca^{2+} channel types differed with respect to the proportions observed in the conventional whole-cell configuration.

In chromaffin cells, N-, and P/Q-type channels have been described to be voltage-dependent and are inhibited by neurotransmitters through a direct G-protein mechanism [24–28]. However, the two types of channel are modulated to different extents. N-type channels are more potently inhibited by opioids [25] and ATP [29] than P/Q-type channels. Also, a larger percentage of the voltage-dependent inhibition of N-type Ca^{2+} channels is reversed during a train of action potentials compared to P/Q-type Ca^{2+} channels [30]. Recently, the differential regulation of endogenous N- and P/Q-type Ca^{2+} channel inactivation by Ca^{2+} /calmodulin has been reported. While robust Ca^{2+} -dependent inactivation of N-type channels was observed in response to prolonged stimulation, this inactivation was modest in the case of P/Q-

type channels. As a consequence, an increasing stimulus intensity caused a significant reduction in the exocytotic efficiency of N-type channels compared to P/Q-type channels [31].

As mentioned above, only one study using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique has been performed in chromaffin cells obtained from humans [22]. Given the recent advances in this field, the present study was designed to characterize the subset of Ca^{2+} channels existing in these cells through experiments undertaken in the perforated-patch configuration.

Materials and methods

Cell cultures

The study protocol was approved by the Ethics Committees of the Hospital Ramón y Cajal and Universidad Autónoma de Madrid. After obtaining informed consent from the donors' relatives, nine adrenal glands were harvested from five organ donors who had died of cerebral hemorrhage. The adrenal glands were collected in cold Locke's buffer solution (LBS) and immediately processed. Once all fatty tissue had been removed, the glands were retrogradely perfused with 1% type XIV protease dissolved in LBS and transferred to a 50-ml conical tube containing LBS at 37°C for 10 min. The glands were then sagittally cut, the medulla removed mechanically with a scalpel, cut into pieces, and introduced in a collagenase type I solution (1 mg/ml) at 37°C for 30 min. The suspension was gently agitated every 5–10 min to allow disaggregation of the tissue. After this period of time, the suspension was filtered through a 200- μm nylon mesh and centrifuged at 170 $\times g$ for 10 min. The pellet was then resuspended in LBS and centrifuged again at 40 g for 10 min. The pellet obtained was once again resuspended in LBS and filtered through a 80- μm nylon mesh. Bovine albumin 4% was added to the bottom of the 50 ml tube, and the suspension centrifuged again. Finally, the last centrifugation was performed in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, Barcelona, Spain) supplemented with 5% fetal calf serum, 50 IU/ml penicillin, and 50 mg/ml streptomycin. Cells were plated on 12 mm polylysine-treated coverslips and kept for up to 10 days in an incubator at 37°C in a water-saturated, 5% CO_2 atmosphere.

Electrophysiological recordings

For the perforated patch whole-cell recordings, the external solution was (in mM): 5 CaCl_2 , 100 NaCl , 45 TEACl , 5.5 KCl , 1 MgCl_2 , 0.2 *d*-tubocurarine, 0.002 TTX, 0.0002

apamin, 10 (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (HEPES), and 10 glucose. The pH was adjusted to 7.4 with NaOH. The intracellular solution composition was (in mM): 145 Cs glutamate, 8 NaCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES, and 0.5 amphotericin B (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), and the pH was adjusted to 7.2 with CsOH. An amphotericin B stock solution was prepared everyday at a concentration of 50 mg/mL in dimethyl sulfoxide (DMSO) and kept protected from light. The final concentration of amphotericin B was prepared by ultrasonating 10 µL of stock amphotericin B in 1 mL of Cs glutamate internal solution in the dark. Pipettes were tip-dipped in amphotericin-free solution for several seconds and back-filled with freshly mixed intracellular amphotericin solution.

The perfusion system for drug application consisted of a multi-barreled glass pipette positioned close to the cell under study, which allowed the complete exchange of solutions near the cell within 100 ms. The level of the bath fluid was continuously controlled by a homemade fiber optics system coupled to a pump that removed excess fluid.

To pharmacologically characterize the Ca²⁺ channels, each Ca²⁺ channel blocker was added sequentially and cumulatively for at least 4–5 min (except ω-CTX-MVIIC which was perfused for at least 17 min): 3 µM nifedipine was used to block L-type channels, 1 µM ω-CTX-GVIA to block N-type channels, and 3 µM ω-CTX-MVIIC to block P/Q-type channels. All toxins were purchased from Peptide Institute, Osaka, Japan. Nifedipine was obtained from Sigma. This protocol was preferred to the use of a single blocker per cell due to the unselectivity of the toxins [20]. Also, ω-CTX-MVIIC was used to target P/Q-type channels instead of ω-Aga-IVA because this last toxin has been reported to block non-P/Q-type channels in α_{1A} null mutant mice [20] and the nature of those channels is not yet known.

Electrophysiological measurements were made using an EPC-10 amplifier and PULSE software (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany) running on a PC computer. Pipettes of resistance 2–3 MΩ were pulled from borosilicate glass capillary tubes, partially coated with wax and fire polished. After seal formation and perforation, only recordings in which the access resistance of the pipette and leak current were lower than 20 MΩ and 20 pA, respectively, were accepted. The voltage dependence of activation was determined from normalized conductance versus voltage curves, which were fitted according to Eq. 1:

$$G/G_{\max} = G_{-50}/G_{\max} + \{1/1 + \exp[(V_{1/2} - V)/k]\} \quad (1)$$

where G is defined as $I_{\text{peak}}/(V - E_{\text{rev}})$, G_{-50} is the G value obtained at -50 mV, G_{\max} is the maximal G value attained,

$V_{1/2}$ is the voltage for half maximal activation and k the slope factor of the Boltzmann function.

Experiments were performed at room temperature (22–24°C). Analysis of data was conducted on a PC computer using IGOR Pro software (Wavemetrics, Lake Oswego, Oregon). The nonspecific background current recorded under 200 µM CdCl₂ was subtracted offline from all current traces. Unless otherwise stated, data are given as the mean ± SEM. Statistical analysis of the data was performed using the Student's t test.

Immunocytochemistry for dopamine β-hydroxylase, phenylethanol-amine *N*-methyltransferase, and α_{1E} Ca²⁺ channel subunits

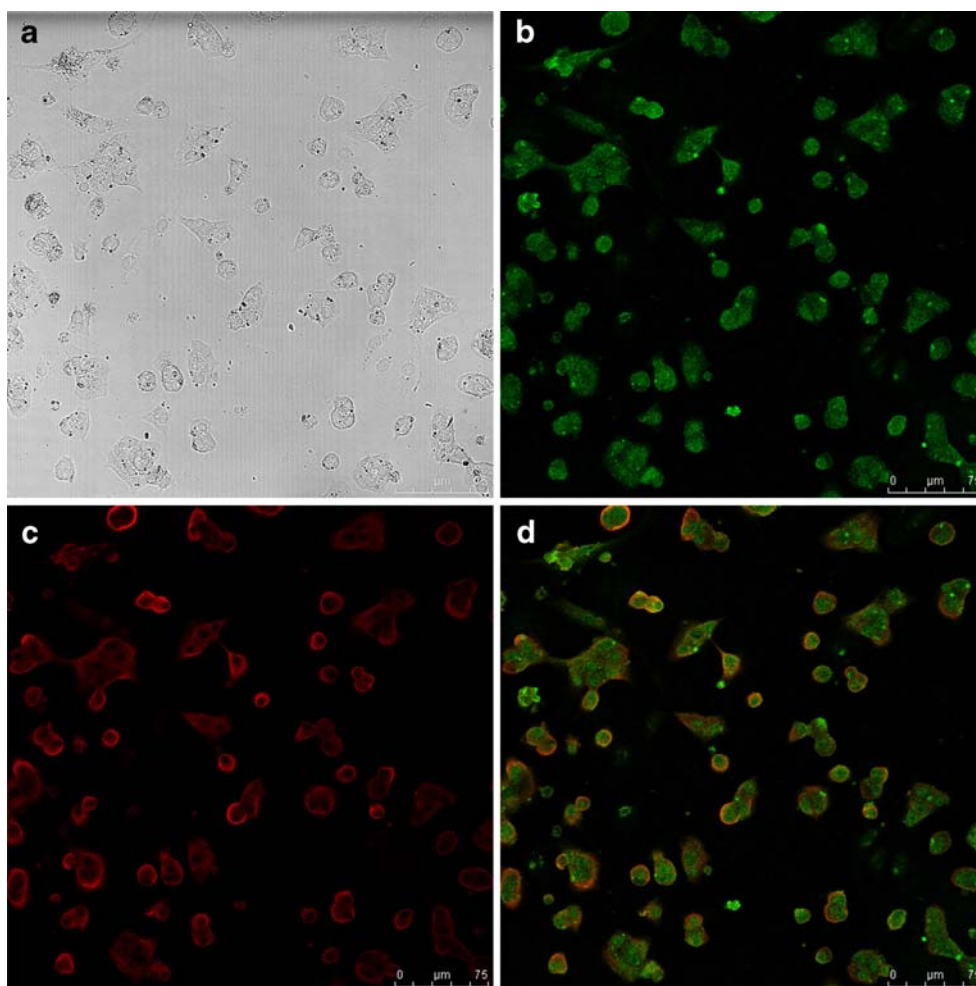
Human chromaffin cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in 3.5% *p*-formaldehyde in PBS for 20 min. After extensive washing of the coverslips, cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 15 min. The coverslips were then washed in PBS and incubated with Enhancer Image IT-FX (Molecular Probes, Barcelona, Spain) for 30 min. After removal of this compound, the coverslips were again washed in PBS and incubated with the corresponding primary antibody for 45 min [dopamine β-hydroxylase (DBH)/phenylethanol-amine *N*-methyltransferase (PNMT)] or 3 h (α_{1E}) at room temperature. The primary antibodies (used at a dilution 1:200 or 1:1,000) were mouse monoclonal anti-DBH (Chemicon, Temecula, USA), rabbit polyclonal anti-PNMT (Chemicon), or rabbit anti-α_{1E} (Alomone, Jerusalem, Israel). After incubation, the coverslips were washed and incubated with the secondary antibody for 45 min. The secondary antibodies used were Alexa Fluor-488 goat anti-mouse (to label DBH, dilution 1:200, Molecular Probes) and Alexa Fluor-594 goat anti-rabbit (diluted 1:200 to label PNMT or α_{1E}, Molecular Probes). Fluorescence was determined using a Leica TCS SP5 confocal microscope.

Results

Immunocytochemical characterization of human chromaffin cells

Chromaffin cells were immunocytochemically identified using DBH and PNMT antibodies (n=2). While the DBH enzyme characterizes adrenergic and noradrenergic cells, PNMT only identifies adrenergic cells. Both types of enzyme were found in most of the cells (99% of cells), implying an adrenergic phenotype (Fig. 1). Panel *a* shows the bright field image for a population of isolated human chromaffin cells that were stained with antibodies against PNMT and DBH. Panels *b* and *c* show confocal images

Fig. 1 Immunocytochemical characterization of human chromaffin cells. **a** Bright field image of an isolated population of human chromaffin cells that were double stained with antibodies against PNMT and DBH (dilution of 1:200) and the corresponding secondary antibodies. **b–d** Confocal images of the same population of cells as in **(a)**, excited at a wave length of 488 nm **(b)**, or 594 nm **(c)**; images **b** and **c** were superimposed **(d)**



scoring positive for the anti-DBH and anti-PNMT antibodies, respectively. Panel *d* displays the image for double-stained cells. The corresponding control experiments, performed in the absence of the primary antibodies, rendered no signal (data not shown).

Pharmacological dissection of Ca^{2+} channels

First, a ramp protocol was applied to search for the peak current voltage. Square step depolarizing pulses of 50 or 200 ms duration at the peak current voltage were applied every 20 or 60 s, respectively. After obtaining stable currents under control conditions, Ca^{2+} channel blockers were added sequential and cumulatively, to search out the different Ca^{2+} channel types. Nifedipine at a concentration of 3 μM was perfused initially to block L-type Ca^{2+} channels for 4–5 min; 1 μM ω -CTX-GVIA was then added for a further 5–7 min to block N-type channels, and finally 3 μM ω -CTX-MVIIIC was added to the other Ca^{2+} channel blockers for at least 17 min, to further eliminate P/Q-type channels. At the end of the protocol, 200 μM Cd^{2+} was

applied to abolish the current resistant to blockade by the previously perfused Ca^{2+} channel blockers.

Two types of cells could be distinguished according to the contributions of N- and P/Q-type Ca^{2+} channels to the total Ca^{2+} charge density (designated N- and P/Q-groups, respectively; Fig. 2). The time course of the peak Ca^{2+} current is shown in panels *a* and *d* of the figure for the N- and P/Q-groups, respectively. Original recordings of Ca^{2+} currents appear in panels *b* and *e*. Figure 2c and *f* show the corresponding percentage of Ca^{2+} charge density blockade for each Ca^{2+} channel blocker. Thus, while in 12 cells, N- and P/Q-type channels contributed $51.4 \pm 2.9\%$ and $18 \pm 2.7\%$, respectively, to the whole cell Ca^{2+} charge density (N-group), in 11 cells, these values were $20.4 \pm 1.4\%$ and $45.6 \pm 1.5\%$, respectively (P/Q-group). The percentages of each channel differed significantly between the two groups ($***p < 0.001$). L- and R-type Ca^{2+} channel contributions did not vary between the two cell groups established, which were on average $14.5 \pm 0.8\%$ and $17.7 \pm 1.2\%$ for the L- and R-types, respectively ($n = 23$).

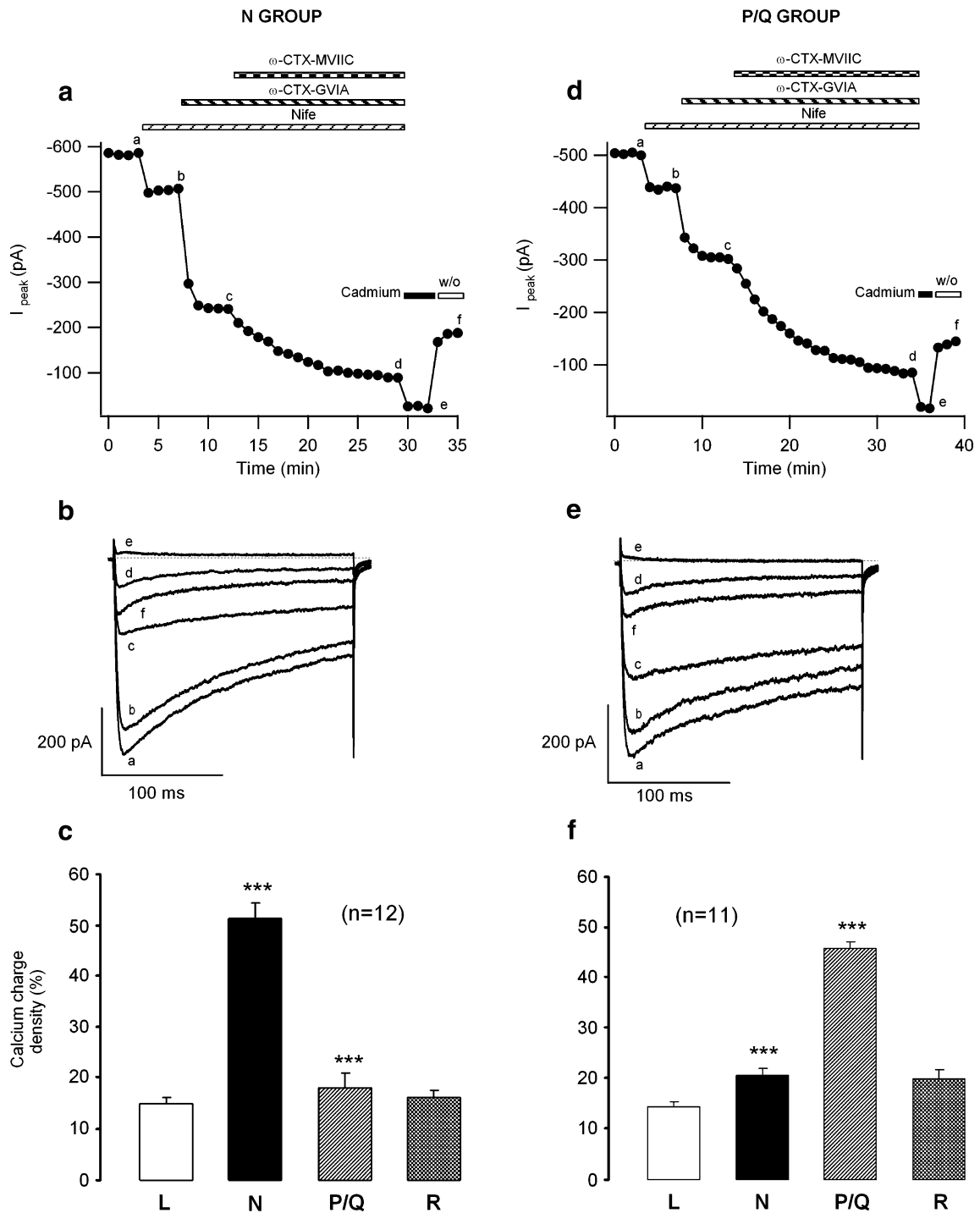


Fig. 2 Pharmacological dissection of Ca^{2+} channels in human chromaffin cells. **a** and **d** Time course of the peak current blockade by the different Ca^{2+} channel blockers added sequentially and cumulatively for the N and P/Q groups of cells, respectively: 3 μ M nifedipine was used to block L-type channels, 1 μ M ω -CTX-GVIA to block N-type channels, 3 μ M ω -CTX-MVIIC to block P/Q-type channels, and 200 μ M Cd^{2+} to block the residual Ca^{2+} current.

Experiments were performed the same day on two different cells from the same culture. **b** and **e** Original traces of the Ca^{2+} currents recorded at the stationary stage reached using each Ca^{2+} channel blocker (corresponding to points *a-f* in **(a)** and **(d)**). **c** and **f** Charge densities of Ca^{2+} channels for the N ($n=12$) and P/Q ($n=11$) cell groups, respectively. *** $p<0.001$, versus the percentage of the same channel in the other cell group

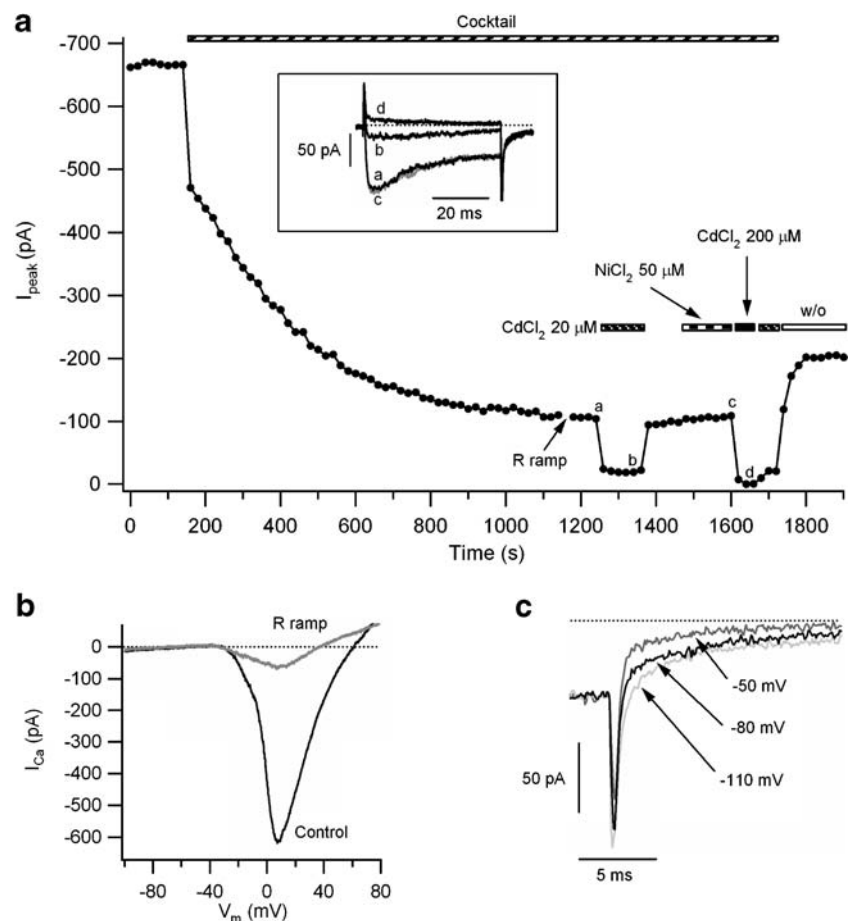
Regarding the possible contribution of low-voltage-activated Ca^{2+} channels, we detected no sign of T-type channels in our recordings. The absence of T-type channels was supported by the following: control I - V curves showed no “shoulder” with a peak around -20 mV [32–35] (see below, Fig. 4a and g); no current was activated at -40 mV from a holding potential of -80 mV (Fig. 4a and g) [32–35]; τ of deactivation (τ_{deact}) of resistant currents were faster than 1 ms (0.74 ± 0.06 ms, $n=30$) [32, 33, 35, 36]; and currents, displayed at different test potentials, did not cross each other (see below, Fig. 4e and k) [32–34]. However, to unequivocally characterize the nature of the residual current after the application of the Ca^{2+} channel blockers, additional experiments were carried out (Fig. 3). The time course of the peak Ca^{2+} current of a voltage-clamped cell is displayed in panel a in which, after perfusing with the whole cocktail of blockers (nifedipine+ ω -CTX-GVIA+ ω -CTX-MVIIC), followed by $20 \mu\text{M}$ CdCl_2 , the resistant peak Ca^{2+} current was diminished by 72.75% (72.75% Ca^{2+} charge density). In four cells tested, the extent of this blockade was $77 \pm 4\%$ on average ($77 \pm 4\%$ Ca^{2+} charge density). Blockade of the whole cell peak Ca^{2+}

current amounted to 96% (94.65% Ca^{2+} charge density; $n=4$). In addition, $50 \mu\text{M}$ NiCl_2 failed to block the residual current. On average, blockade by $50 \mu\text{M}$ NiCl_2 of the resistant peak Ca^{2+} current was $6.7 \pm 7\%$ ($7 \pm 4\%$ Ca^{2+} charge density; $n=4$), providing additional evidence that the nature of this current is not of the T-type. The absence of a “shoulder” in the ramps, whether under control conditions or after perfusion with the cocktail of blockers, is further evidence of the absence of a T-type channel in this cell (Fig. 3b). Finally, τ_{deact} of tail currents were slower at more hyperpolarizing membrane potentials, being 1.14 ms when returning to -110 mV, 0.67 ms when returning to -80 mV, and 0.46 ms when returning to -50 mV (Fig. 3c). On average, these values were 0.83 ± 0.18 ms, 0.67 ± 0.12 ms, and 0.41 ± 0.05 ms, respectively for -110 mV, -80 mV and -50 mV ($n=4$).

Voltage-dependent activation of Ca^{2+} channels

Ca^{2+} current density versus voltage (I - V) curves were prepared by applying 50 ms square step depolarizations at increasing potentials of 10 mV, from -50 mV to $+80$ mV, every

Fig. 3 The nature of the resistant Ca^{2+} current. **a** Time course of the peak Ca^{2+} current recorded under control conditions, after perfusion of a cocktail of Ca^{2+} channel blockers ($3 \mu\text{M}$ nifedipine + $1 \mu\text{M}$ ω -CTX-GVIA + $3 \mu\text{M}$ ω -CTX-MVIIC), $20 \mu\text{M}$ CdCl_2 , or $50 \mu\text{M}$ NiCl_2 . **b** A 200-ms ramp protocol from -100 to 80 mV was applied under control conditions (black trace) and after perfusion with the cocktail of Ca^{2+} channel blockers (grey trace). **c** Expanded tail currents recorded at a holding potential of -50 , -80 , and -110 mV



20 s ($V_h = -80$ mV; Fig. 4a and g). This protocol was repeated under control conditions, and then with the cell perfused with each Ca^{2+} channel blocker. Finally, Cd^{2+} was applied at the end of the experiment. Original recordings of Ca^{2+} currents are shown in Fig. 4b–f for the N-group, and Fig. 4h–l for the P/Q-group. The outward current in the presence of Cd^{2+} could be due to Cs^+ flowing out through VDCC [37].

From the I – V curves obtained after perfusion with the Ca^{2+} channel blockers, we obtained an idea of the voltage-dependence of activation of the different types of Ca^{2+} channels (Fig. 5a and b).

The L-type channel I – V curve was constructed by subtracting the I – V curve recorded under perfusion with nifedipine from the I – V curve obtained under control conditions (Fig. 5c). Inward currents were just detectable upon depolarization to -30 mV, clearly visible at -20 mV, and reached a maximal amplitude at 0 mV.

The N-type channel I – V curve was obtained by subtracting the ω -CTX-GVIA I – V curve from the nifedipine curve (Fig. 5d). Inward currents were barely detectable upon depolarization to -10 mV and reached maximal amplitude with a step to $+10$ mV.

To obtain the P/Q-type channel I – V curve, the ω -CTX-MV1IC Q– V curve was subtracted from the ω -CTX-GVIA I – V curve (Fig. 5e). As for N-type channels, currents started activation at -10 mV, and the maximal value was reached at $+10$ mV. Differences in N- and P/Q-type channels were significant at depolarized potentials when compared to the percentage of the same channel in the other cell group (Fig. 5d and e).

Finally, the R-type channel I – V curve was generated by subtracting the I – V curve recorded in the presence of the unspecific Ca^{2+} channel blocker Cd^{2+} , from the I – V curve obtained after perfusion with the whole cocktail of Ca^{2+} channel blockers (Fig. 5f). Inward currents were detectable at -20 mV and yielded maximal amplitude at $+10$ mV.

The voltage-dependence of peak conductance of the different Ca^{2+} channel types, obtained from the peak current–voltage relations in Fig. 5, was calculated by smooth curve fitting to standard Boltzmann functions, according to Eq. 1 (see “Material and methods” section; Fig. 6). These fittings yielded estimates for $V_{1/2}$ of -13.6 , 1.3 , -1 , and -9.2 mV, respectively, and for k of 6.1 mV, 3.7 mV, 4.6 mV, and 7.3 mV, respectively, for L-, N-, P/Q, and R-type channels. Using these values, we calculated $V_{\text{threshold}}$, the test potential at which 5% of G_{max} was activated, attaining -32.8 , -10.9 , -15.7 , and -31.9 mV for L-, N-, P/Q, and R-type channels, respectively.

From these data, we were able to infer the complete picture of the Ca^{2+} channel types existing in human chromaffin cells. As can be observed in the overlapping curve fittings in Fig. 6e, L- and R-type channels exhibited a similar voltage-dependence of activation, and were activat-

ed at 15 – 20 mV more negative membrane potentials than P/Q- and N-type channels, which also attained similar voltage-dependence of activation curves.

Ca^{2+} channel kinetics

Activation time constants (τ_{act}) were analyzed at different test potentials. They were fitted by a single exponential function. τ_{act} did not change with the different potentials for the L-type channels, decreased with increasing potentials for the R- and P/Q-type channels, and exhibited a bell-shape with a maximum at 0 mV for the N-type channels (Fig. 7a). At 0 mV, R-type channels were activated faster than L- and P/Q-type channels, which were in turn activated faster than N-type channels.

When we examined the inactivation of the different Ca^{2+} channel types at the different potentials, determined as the Ca^{2+} current remaining at the end of the 50 ms pulse expressed as a percentage of the peak current (I_{50}/I_{peak}), it emerged that the R-type Ca^{2+} channels were inactivated more than the L- and N-type Ca^{2+} channels, which exhibited identical inactivation rates, and these channels were more inactivated than the P/Q-type channels at 0 mV (Fig. 7b, upper panel). Inactivation time constants (τ_{inact}) could be fitted to a single exponential function for L-type (in some cells) and R-type channels, but not for N- or P/Q-type channels. τ_{inact} for L- and R-type channels were found to be similar and showed a discrete tendency to increase with increasing potentials (Fig. 7b, lower panel).

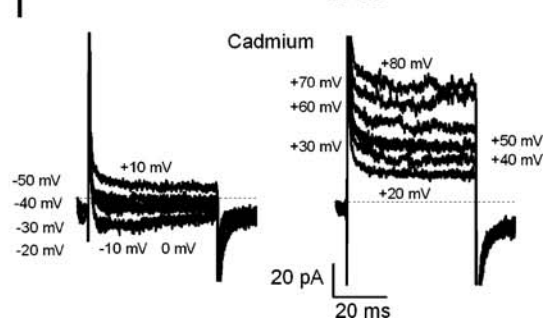
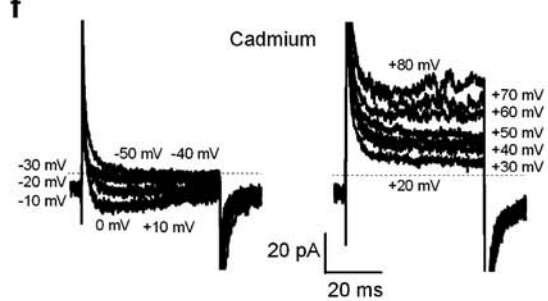
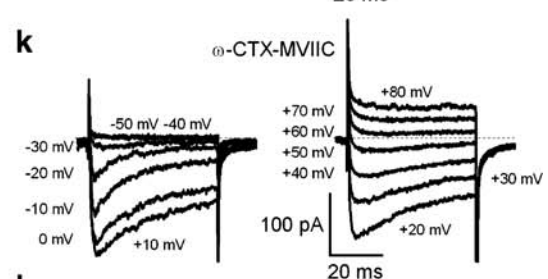
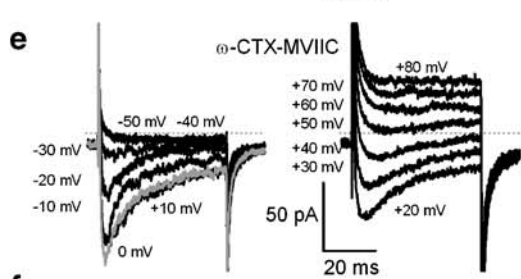
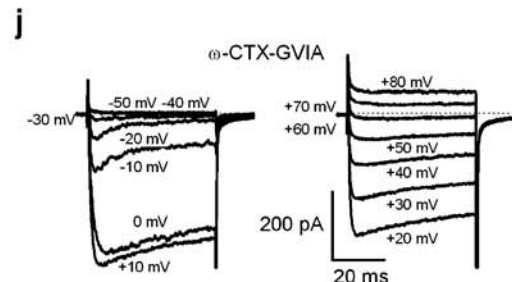
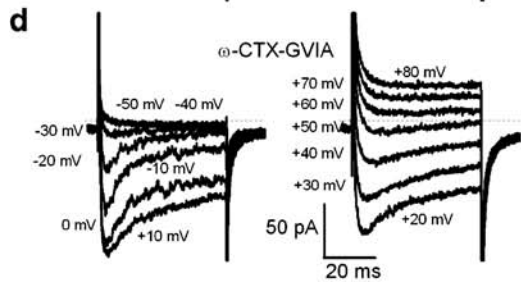
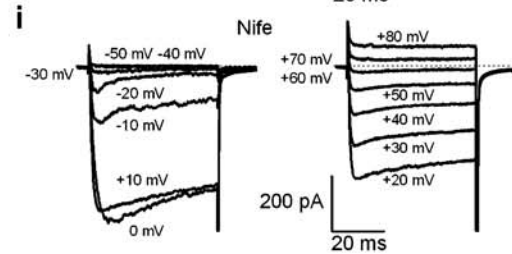
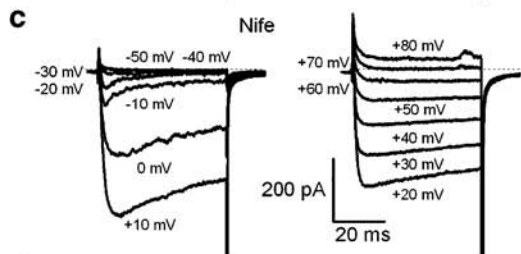
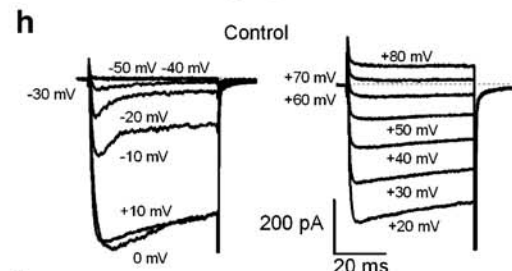
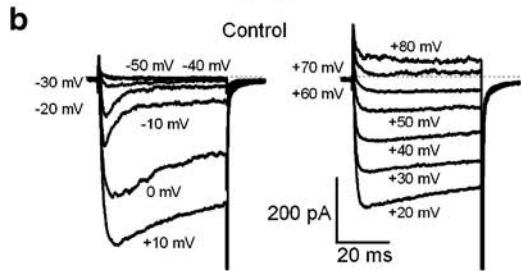
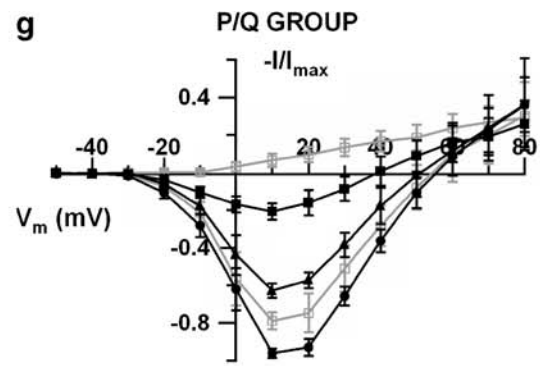
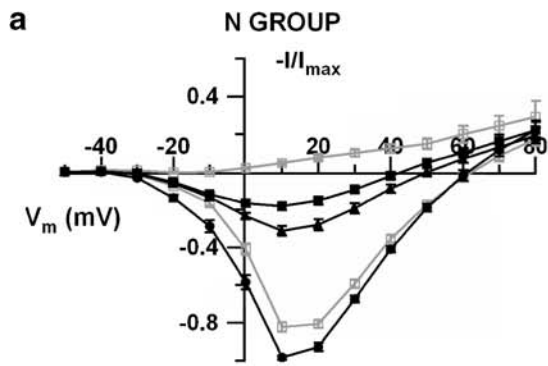
Immunocytochemical staining of α_{1E} Ca^{2+} channels

The discovery of an R-type Ca^{2+} current in human chromaffin cells prompted us to explore the distribution of the pore-forming Ca^{2+} channel subunit α_{1E} by immunocytochemically staining for this protein ($n=4$). Figure 8 shows the bright field image (a) and the confocal microscope image (b) of a population of stained cells. Cells were not stained in the absence of the primary antibody (data not shown). The α_{1E} subunit appears evenly distributed throughout the human chromaffin cells.

Discussion

This study is the first to report the presence of two groups of chromaffin cells distinguished by the predominance of either functional N- or P/Q-type Ca^{2+} channels. Ca^{2+} channels were characterised using the perforated-patch configuration of the patch-clamp technique, which served to detect R-type channels.

The kinetic behaviour of the N- and P/Q-type channels was similar for both groups of cells, which only varied in



◀ **Fig. 4** Voltage-dependence of activation of Ca^{2+} channels in human chromaffin cells. **a** and **g** $I-V$ curves for the N and P/Q groups of cells, respectively. Data were normalized as the percentage of current in control conditions at +10 mV, plotted as the mean \pm SEM. N group: $n =$

9–11 cells; P/Q group: $n = 3-5$ cells. **b-f** Original traces of Ca^{2+} currents at each potential under control conditions using the different Ca^{2+} channel blockers in an N group cell, or **h-i** P/Q group cell

terms of Ca^{2+} charge density. Observations were made in cells from the same culture grown for the same number of days. Thus, it seems that human chromaffin cells show a nonuniform distribution of N- and P/Q-type channels. These findings are in line with observations in neuron cultures, in which relative proportions of N- and P/Q-type channels have been reported to vary at different synapses [38–47]. Neuromodulators can differentially affect specific Ca^{2+}

channel subtypes [48–51]. This particular distribution of Ca^{2+} channels in neurons could enable terminal-specific modulation and permit the selective modification of transmitter release at groups of terminals on a single afferent.

In chromaffin cells, N-type channels are inhibited by opioids [25] and ATP [29] to a greater extent than P/Q-type channels. Both types of channels are capable of differential facilitation during trains of action potential-like waveforms

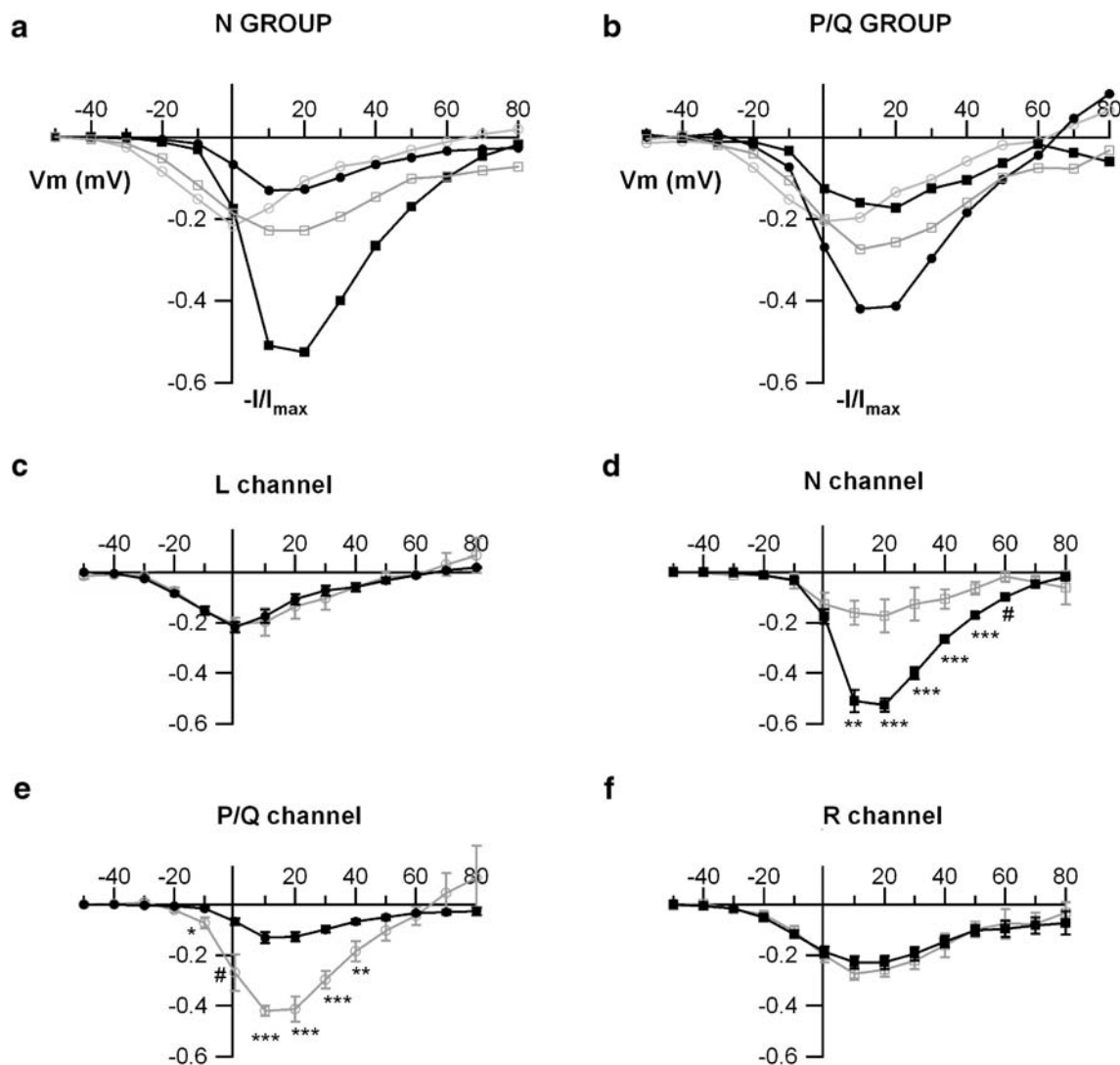
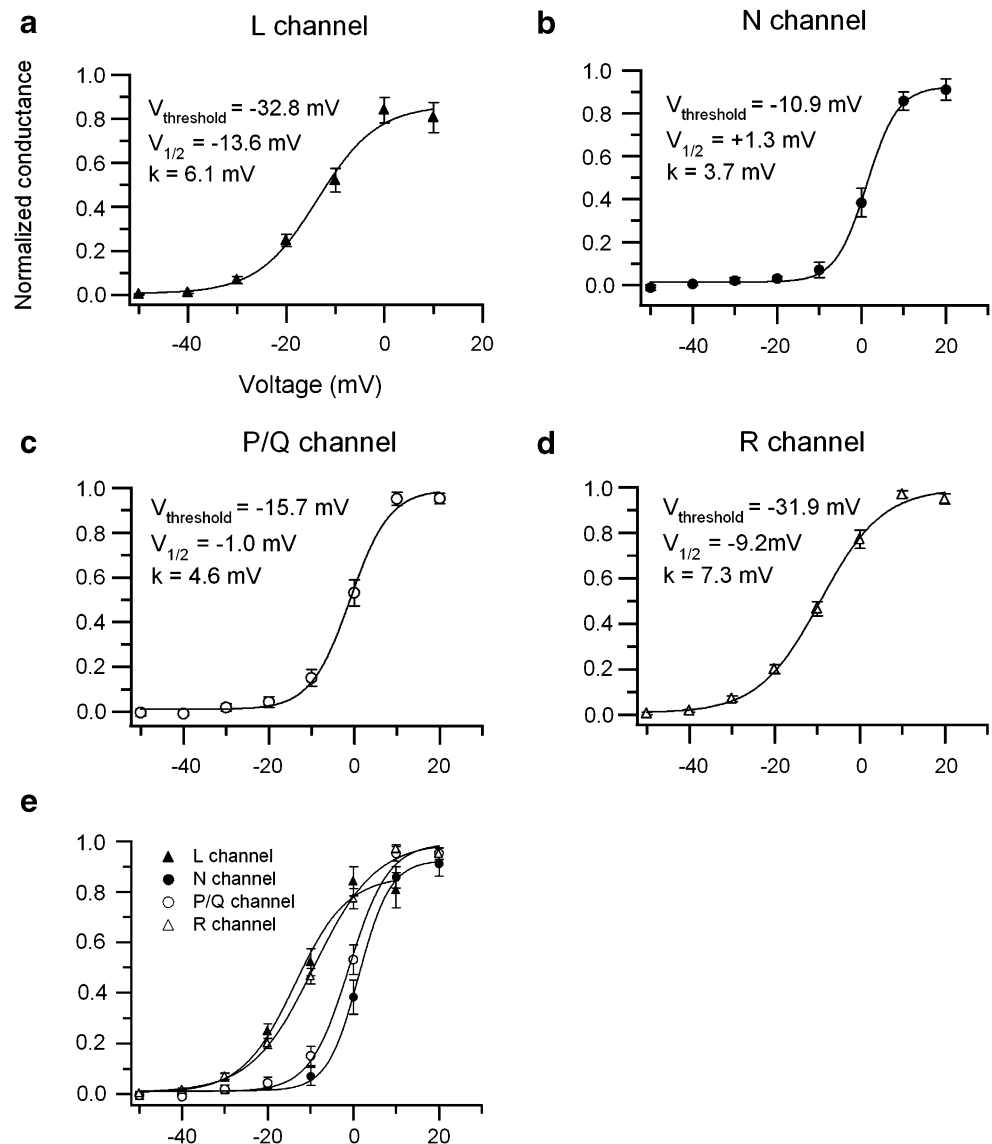


Fig. 5 Voltage-dependence of activation of Ca^{2+} channels in human chromaffin cells. **a** and **b** Superimposed $I-V$ curves of L-, N-, P/Q-, and R-type Ca^{2+} channels (open circles, filled squares, filled circles, and open squares, respectively), normalized as the percentage of the current in control conditions at +10 mV (SEM bars omitted for clarity), for the N and P/Q cell groups, respectively. **c-f** Normalized $I-V$

$I-V$ curves of L-, N-, P/Q-, and R-type Ca^{2+} channels, respectively, as the percentage of the current plotted as the mean \pm SEM of nine cells in the N cell group (filled symbols) and three cells in the P/Q cell group (open symbols). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.005$, * $p < 0.01$, # $p < 0.05$, versus the percentage of the same channel in the other cell group

Fig. 6 Voltage-dependence of peak conductance of the different Ca^{2+} channel types in human chromaffin cells. Smooth curve fittings to Eq. 1 defined in the “Material and methods” section plotted for **a** L-type, **b** N-type, **c** P/Q-type, and **d** R-type channels. **e** Overlapped Boltzmann fittings obtained for the different Ca^{2+} channel types. ($n=12$)



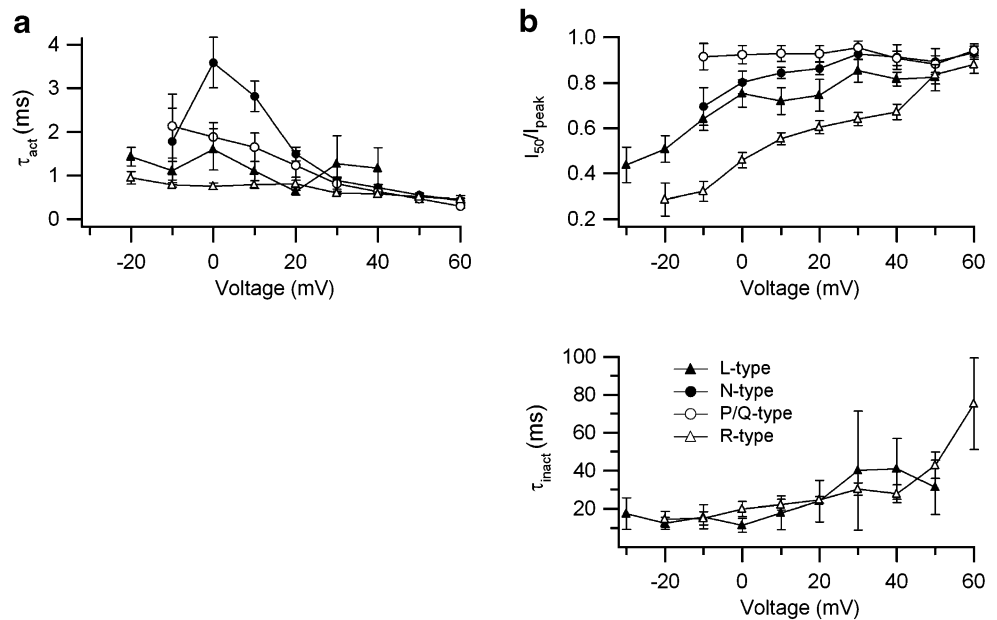
[30]. Recently, the differential regulation of endogenous N- and P/Q-type Ca^{2+} channel inactivation by Ca^{2+} /calmodulin has been reported [31]. Collectively, these data become more relevant if we consider a nonuniform distribution of Ca^{2+} channels in chromaffin cells. Hence, the predominance of a given type of Ca^{2+} channel per cell would allow for the fine regulation of synaptic transmission, as previously observed in neurons. We observed here that the relative proportions of N- and P/Q-type channels differed from one human chromaffin cell to another. The specific regulation achieved in this manner will presumably have a great impact on the efficiency of both channels in supported exocytosis, as has been effectively demonstrated [31].

In 1971, Goldstein et al. [52] established by electron microscopy and confirmed by immunocytochemical studies, that there are two main secretory cell types in adrenal medullary tissue, adrenergic and noradrenergic. In bovine

chromaffin cells, a cytosolic Ca^{2+} concentration rise evoked by high K^{+} and the release of epinephrine and norepinephrine have been shown to be preferentially controlled by Q- and L-type Ca^{2+} channels, respectively [23]. In situ hybridization using riboprobes specific for α_{1D} , α_{1B} , and α_{1A} subunits has indicated the homogenous distribution of α_{1B} across the whole bovine adrenal medulla, although α_{1D} and α_{1A} appear at higher densities in the inner medullary area, where noradrenergic chromaffin cells also show a higher density than adrenergic cells [53]. In our case, however, according to our immunocytochemistry experiments, 99% of cells are adrenergic cells. Interestingly, insulin-induced hypoglycemia evoked catecholamine secretion from human adrenal medulla in vivo [54], resulting in the predominant release of adrenaline over noradrenaline [55–59]. Cavadas et al. [60] found percentages of 62% adrenaline and 38% noradrenaline of the total catechol-

Fig. 7 Activation and inactivation of Ca^{2+} channel types.

a Activation time constants (τ_{act}) of the Ca^{2+} channel types obtained at different voltages ($n=12$). **b** *Upper panel*: Ca^{2+} current remaining at the end of the 50 ms pulse expressed as a percentage of the peak current (I_{50}/I_{peak}), versus the voltage ($n=12$); *lower panel*: inactivation time constants (τ_{inact}) versus the voltage plotted for the L- ($n=6-12$) and R-type channels ($n=12$)



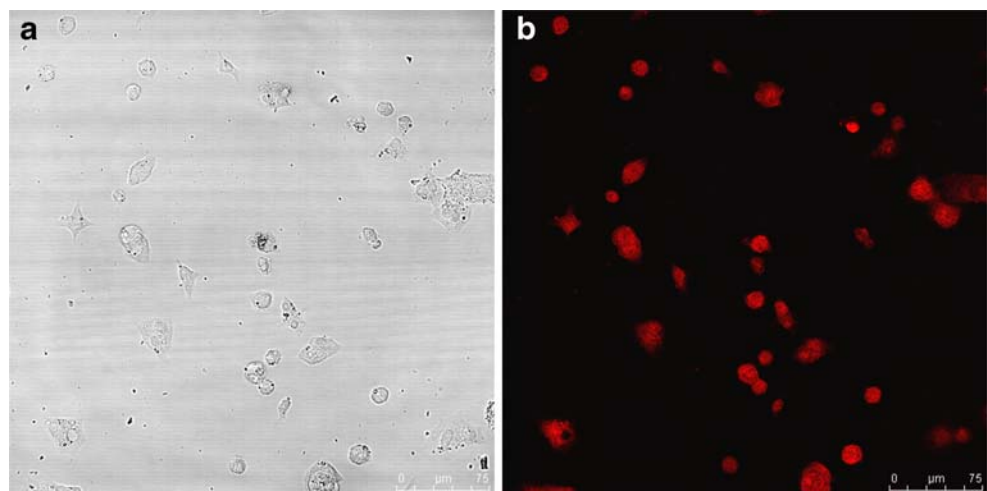
amine content in cultures of human adrenal chromaffin cells obtained from brain-dead organ donors. However, Takiyuddin et al. [58] obtained a ratio of adrenaline/noradrenaline of 97% versus 3% of total catecholamines in adrenal medulla homogenates obtained from autopsy tissues, under the assumption that catecholamines were stable in human post mortem tissues at 4°C [61]. Thus, the predominance of adrenergic cells in our cell cultures precludes assigning the N- or P/Q-groups of cells to an adrenergic or noradrenergic phenotype.

Using the perforated-patch technique, it has been established that R-type Ca^{2+} channels contribute to the whole cell Ca^{2+} current configuration in chromaffin cells [19]. However, Gandia et al. [22] were unable to detect this channel in human chromaffin cells, probably because they

used the whole-cell configuration of the patch-clamp technique to characterize Ca^{2+} channels (see “Introduction” section). Here, we managed to identify a healthy R-type Ca^{2+} current in human cells, with a τ_{inact} of 19.9 ± 3.9 ms at 0 mV. This figure is similar to those previously reported by Zhang et al. [5], who obtained a τ_{inact} of 19 ms for the R-type current in cerebellar granule cells in 5 mM Ca^{2+} ; and Albillos et al. [19], who recorded a τ_{inact} of 19.5 ± 2.5 ms for this channel in mouse chromaffin cells in adrenal gland slices using 2 mM Ca^{2+} as charge carrier. The resistant current was blocked by $77 \pm 4\%$ with 20 μM CdCl_2 , a value slightly lower to the values reported in other cell systems [62, 63] in a human recombinant class E Ca^{2+} channel [64]. The sensitivity of the R-type channel to NiCl_2 was much lower (7% blockade achieved by 50 μM NiCl_2) than previously

Fig. 8 Immunocytochemical staining of α_{1E} Ca^{2+} channels.

a Bright field image of a population of chromaffin cells stained with antibodies against α_{1E} ; and **b** Confocal image of the population of chromaffin cells displayed in (a) stained with a 1:200 dilution of anti- α_{1E} and the corresponding secondary antibody



inferred [5, 62–64]. Finally, our immunocytochemical experiments revealed a homogeneous distribution of the α_{1E} subunit over the entire cell surface.

The absence of a T-type channel in our recordings was confirmed by the following findings: $I-V$ curves failed to show a second peak around -20 mV [32–35]; there was no current activated at -40 mV from a holding potential of -80 mV [32–35]; τ_{deact} of resistant currents were 0.74 ms when returning to -80 mV, as opposed to longer than 2 ms for T-type channels in a neuroblastoma cell line [4] and in rat chromaffin cells [35]; τ_{deact} decreased when returning to more depolarized potentials, unlike the case for T-type channels [4–35]; currents displayed at different test potentials did not cross over each other, which is a typical signature of T channels [32–34]; NiCl_2 , at a concentration of 50 μM , practically failed to affect the residual current, which again argues against the presence of a T-type channel [35, 63].

In the present study, R-type channels were activated faster than L- and P/Q-type channels, which were in turn activated faster than N-type channels at 0 mV. In cat chromaffin cells, ω -CTX-GVIA resistant channels, mainly composed of L-type channels, were also more quickly activated than ω -CTX-GVIA-sensitive channels, which showed a slow activation phase in 10 mM Ba^{2+} [10].

R-type channels were also the most inactivated channels. P/Q-type channels were almost resistant to inactivation, while N-type channels exhibited a certain degree of inactivation in response to 50 ms depolarizing pulses. A higher inactivation rate of N-type channels compared to the P/Q-type, which were only mildly inactivated, has also been observed in murine [65] and bovine chromaffin cells [31].

In summary, we report the presence of rapidly inactivated R-type channels besides the previously described L-, N- and P/Q-type Ca^{2+} channels in human chromaffin cells. In addition, N and P/Q channels were found to contribute very differently to the whole-cell Ca^{2+} current of each cell. Given the differential regulation of these two channels by neurotransmitters and calmodulin observed in cells of other species, these data point to the possibility of cell-specific regulation in human chromaffin cells.

Acknowledgements The authors wish to thank the donors of the human adrenal glands and their relatives. We also thank Dr. Agustín Albillos and the Transplant Team of the Hospital Ramón y Cajal for their excellent coordination in supplying human adrenal glands. We are also grateful to Dr. Emilio Carbone for helpful discussions. APA holds a fellowship award from the Comunidad Autónoma de Madrid. This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología No. BFU2005-00743/BFI, and the Comunidad Autónoma de Madrid and Universidad Autónoma de Madrid No. 11/BCB/003 awarded to AA.

References

- Pérez-Alvarez A, Albillos A (2007) Key role of the nicotinic receptor in neurotransmitter exocytosis in human chromaffin cells. *J Neurochem* 103:2281–2290
- Mintz IM, Venema VJ, Swiderek K, Lee T, Bean BP, Adams ME (1992) P-type calcium channels blocked by the spider toxin ω -Agat-IVA. *Nature* 355:827–829
- Sather WA, Tanabe T, Zhang JF, Mori Y, Adams ME, Tsien RW (1993) Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel $\alpha 1$ subunits. *Neuron* 11:291–303
- Randall A, Tsien RW (1995) Pharmacological dissection of multiple types of Ca^{2+} channel currents in rat cerebellar neurons. *J Neurosci* 15:2995–3012
- Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, Horne WA, Sather WA, Tanabe T, Schwarz TL, Tsien RW (1993) Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca^{2+} channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* 32:1075–1088
- Tottene A, Moretti A, Pietrobon D (1996) Functional diversity of P-type and R-type calcium channels in rat cerebellar neurons. *J Neurosci* 16:6353–6363
- Magnelli V, Baldelli P, Carbone E (1998) Antagonists-resistant calcium currents in rat embryo motoneurons. *Eur J Neurosci* 10:1810–1825
- Hoshi T, Smith SJ (1987) Large depolarization induces long openings of voltage-dependent calcium channels in adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 7:571–580
- Bossu JL, De Waard M, Feltz A (1991) Inactivation characteristics reveal two calcium currents in adult bovine chromaffin cells. *J Physiol* 437:603–620
- Albillos A, Artalejo AR, López MG, Gandía L, García AG, Carbone E (1994) Ca^{2+} channel subtypes in cat chromaffin cells. *J Physiol* 477:197–213
- Hans M, Illes P, Takeda K (1990) The blocking effects of ω -conotoxin on Ca current in bovine chromaffin cells. *Neurosci Lett* 114:63–68
- Bossu JL, De Waard M, Feltz A (1991) Two types of calcium channels are expressed in adult bovine chromaffin cells. *J Physiol* 437:621–634
- Artalejo CR, Perlman RL, Fox AP (1992) ω -Conotoxin GVIA blocks a Ca^{2+} current in chromaffin cells that is not of the “classic” N Type. *Neuron* 8:85–95
- Albillos A, García AG, Gandía L (1993) ω -Agatotoxin-IVA-sensitive calcium channels in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett* 336:259–262
- Albillos A, García AG, Olivera B, Gandía L (1996) Re-evaluation of the P/Q Ca^{2+} channel components of Ba^{2+} currents in bovine chromaffin cells superfused with solutions containing low and high Ba^{2+} concentrations. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 432:1030–1038
- Artalejo CR, Adams ME, Fox AP (1994) Three types of Ca^{2+} channels trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. *Nature* 367:72–76
- Gandía L, Borges R, Albillos A, García AG (1995) Multiple types of calcium channels are present in rat chromaffin cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 430:55–63
- Hernández-Guijo JM, de Pascual R, García AG, Gandía L (1998) Separation of calcium channel current components in mouse chromaffin cells superfused with low- and high-barium solutions. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 436:696–704
- Albillos A, Neher E, Moser T (2000) R-type Ca^{2+} channels are coupled to the rapid component of secretion in mouse adrenal slice chromaffin cells. *J Neurosci* 20:8323–8330
- Aldea M, Jun K, Shin H, Andrés-Mateos E, Solís-Garrido L, Montiel C, García AG, Albillos A (2002) A perforated patch-

- clamp study of calcium currents and secretion in mouse chromaffin cells of wild-type and α_{1A} knockout mice. *J Neurochem* 81:911–921
21. Kitamura N, Ohta T, Ito S, Nakazato Y (1997) Calcium channels subtypes in porcine adrenal chromaffin cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 434:179–187
 22. Gandía L, Mayorgas I, Michelena P, Cuchillo I, de Pascual R, Abad F, Novalbos JM, Larrañaga E, García AG (1998) Human adrenal chromaffin cell calcium channels: drastic current facilitation in cell clusters, but not in isolated cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 436:696–704
 23. Lomax RB, Michelena P, Núñez L, García-Sancho J, García AG, Montiel C (1997) Different contributions of L- and Q-type Ca^{2+} channels to Ca^{2+} signals and secretion in chromaffin cell subtypes. *Am J Physiol* 272:C476–484
 24. Gandía L, García AG, Morad M (1993) ATP modulation of calcium channels in chromaffin cells. *J Physiol* 470:55–72
 25. Albillos A, Carbone E, Gandía L, García AG, Pollo A (1996) Opioids inhibition of Ca^{2+} channel subtypes in bovine chromaffin cells: selectivity of action and voltage-dependence. *Eur J Neurosci* 8:1561–1570
 26. Albillos A, Gandía L, Michelena P, Gilabert JA, Valle M, Carbone E, García AG (1996) The mechanism of calcium channel facilitation in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 494:687–695
 27. Currie KP, Fox AP (1996) ATP serves as a negative feedback inhibitor of voltage-gated Ca^{2+} channel currents in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Neuron* 16:1027–1036
 28. Carabelli V, Carra I, Carbone E (1998) Localized secretion of ATP and opioids revealed through single Ca^{2+} channel modulation in bovine chromaffin cells. *Neuron* 20:1255–1268
 29. Currie KP, Fox AP (1997) Comparison of N- and P/Q-type voltage-gated calcium channel current inhibition. *J Neurosci* 17:4570–4579
 30. Currie KP, Fox AP (2002) Differential facilitation of N- and P/Q-type calcium channels during trains of action potential-like waveforms. *J Physiol* 539:419–431
 31. Wykes RC, Bauer CS, Khan SU, Weiss JL, Seward EP (2007) Differential regulation of endogenous N- and P/Q-type Ca^{2+} channel inactivation by Ca^{2+} /calmodulin impacts on their ability to support exocytosis in chromaffin cells. *J Neurosci* 9:5236–5248
 32. Carbone E, Lux HD (1984) A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310:501–502
 33. Randall AD, Tsien RW (1997) Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacology* 36:879–893
 34. Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Lee JH (1998) Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391:896–900
 35. Novara M, Baldelli P, Cavallari D, Carabelli V, Giancippoli A, Carbone E (2004) Exposure to cAMP and beta-adrenergic stimulation recruits Ca_v3 T-type channels in rat chromaffin cells through Epac cAMP-receptor proteins. *J Physiol* 558:433–449
 36. Armstrong CM, Matteson DR (1985) Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells. *Science* 227:65–67
 37. Fenwick EM, Marty A, Neher E (1982) Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 331:599–635
 38. Luebke JI, Dunlap K, Turner TJ (1993) Multiple calcium channel types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuron* 11:895–902
 39. Takahashi T, Momiyama A (1993) Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* 366:156–158
 40. Regehr WG, Mintz IM (1994) Participation of multiple calcium channel types in transmission at single climbing fiber to Purkinje cell synapses. *Neuron* 12:605–613
 41. Wheeler DB, Randall A, Tsien RW (1994) Roles of N-type and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 264:107–111
 42. Reuter H (1995) Measurements of exocytosis from single presynaptic nerve terminals reveal heterogeneous inhibition by $\text{Ca}(2+)$ -channel blockers. *Neuron* 14:773–779
 43. Poncer JC, McKinney RA, Gahwiler BH, Thompson SM (1997) Either N- or P-type calcium channels mediate GABA release at distinct hippocampal inhibitory synapses. *Neuron* 18:463–472
 44. Reid CA, Clements JD, Bekkers JM (1997) Nonuniform distribution of Ca^{2+} channel subtypes on presynaptic terminals of excitatory synapses in hippocampal cultures. *J Neurosci* 17:2738–2745
 45. Millán C, Lujan R, Shigemoto R, Sánchez-Prieto J (2002) Subtype-specific expression of group III metabotropic glutamate receptors and Ca^{2+} channels in single nerve terminals. *J Biol Chem* 277:47796–47803
 46. Millán C, Castro E, Torres M, Shigemoto R, Sánchez-Prieto J (2003) Co-expression of metabotropic glutamate receptor 7 and N-type Ca^{2+} channels in single cerebrocortical nerve terminals of adult rats. *J Biol Chem* 278:23955–23962
 47. Miyazaki K, Ishizuka T, Yawo H (2005) Synapse-to-synapse variation of calcium channel subtype contributions in large mossy fiber terminals of mouse hippocampus. *Neuroscience* 136:1003–1014
 48. Mogul DJ, Adams ME, Fox AP (1993) Differential activation of adenosine receptors decreases N-type but potentiates P-type Ca^{2+} current in hippocampal CA3 neurons. *Neuron* 10:327–334
 49. Wu LG, Saggau P (1994) Pharmacological identification of two types of presynaptic voltage-dependent calcium channels at CA3-CA1 synapses of the hippocampus. *J Neurosci* 14:5613–5622
 50. Tsien RW, Lipscombe D, Madison D, Bley K, Fox A (1995) Reflections on $\text{Ca}(2+)$ -channel diversity, 1988–1994. *Trends Neurosci* 18:52–54
 51. Scholz KP, Miller RJ (1996) Presynaptic inhibition at excitatory hippocampal synapses: development and role of presynaptic Ca^{2+} channels. *J Neurophysiol* 76:39–46
 52. Goldstein M, Fuxe K, Hokfelt T, Joh TH (1971) Immunohistochemical studies on phenylethanolamine-N-methyltransferase, dopa-decarboxylase and dopamine-b-hydroxylase. *Experientia* 27:951–952
 53. García-Palomero E, Renart J, Andrés-Mateos E, Solís-Garrido LM, Matute C, Herrero CJ, García AG, Montiel C (2001) Differential expression of calcium channel subtypes in the bovine adrenal medulla. *Neuroendocrinology* 74:251–261
 54. Garber AJ, Cryer PE, Santiago JV, Haymond MW, Pagliara AS, Kipnis DM (1976) The role of adrenergic mechanisms in the substrate and hormonal response to insulin-induced hypoglycemia in man. *J Clin Invest* 58:7–15
 55. Cryer PE (1980) Physiology and pathophysiology of the human sympathoadrenal neuroendocrine system. *N Engl J Med* 303:436–444
 56. Shah SD, Tse TF, Clutter WE, Cryer PE (1984) The human sympathochromaffin system. *Am J Physiol* 247:E380–384
 57. Young JB, Rosa RM, Landsberg L (1984) Dissociation of sympathetic nervous system and adrenal medullary responses. *Am J Physiol* 247:E35–40
 58. Takiyuddin MA, Cervenka JH, Sullivan PA, Pandian MR, Parmer RJ, Barbosa JA, O'Connor DT (1990) Is physiologic sympathoadrenal catecholamine release exocytotic in humans? *Circulation* 81:185–195
 59. Takiyuddin MA, Brown MR, Dinh TQ, Cervenka JH, Braun SD, Parmer RJ, Kennedy B, O'Connor DT (1994) Sympatho-adrenal secretion in humans: factors governing catecholamine and storage vesicle peptide co-release. *J Auton Pharmacol* 14:187–200

60. Cavadas C, Silva AP, Mosimann F, Cotrim MD, Ribeiro CA, Brunner HR, Grouzmann E (2001) NPY regulates catecholamine secretion from human adrenal chromaffin cells. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5956–5963
61. Wilk S (1986) Tissue analysis. In: Krstulovic AM (ed) *Quantitative analysis of catecholamines and related compounds*. Wiley, London
62. Williams ME, Marubio LM, Deal CR, Hans M, Brust P, Philipson LH, Miller RJ, Johnson EC, Harpold MM, Ellis SB (1994) Structure and functional characterization of neuronal alpha 1E calcium channel subtypes. *J Biol Chem* 269:22347–22357
63. Magnelli V, Baldelli P, Carbone E (1998) Antagonists-resistant calcium currents in rat embryo motoneurons. *Eur J Neurosci* 10:1810–1825
64. Jouvenceau A, Giovannini F, Bath CP, Trotman E, Sher E (2000) Inactivation properties of human recombinant class E calcium channels. *J Neurophysiol* 83:671–684
65. Polo-Parada L, Chan SA, Smith C (2006) An activity-dependent increased role for L-type calcium channels in exocytosis is regulated by adrenergic signaling in chromaffin cells. *Neuroscience* 143:445–459

3. IDENTIFICACIÓN DEL RECEPTOR NICOTÍNICO $\alpha 7$

Human native $\alpha 7$ nicotinic receptors mediate fast onset depolarization and neurotransmitter secretion in chromaffin cells

Alberto Pérez-Alvarez*, Alicia Hernández-Vivanco, Sergio Alonso y Gregorio¹,
Angel Taberero¹ and Almudena Albillos*

¹Servicio de Urología, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain
Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

*Corresponding authors: Almudena Albillos (almudena.albillos@uam.es) or Alberto Pérez-Alvarez (a.perez@uam.es). Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, c/ Arzobispo Morcillo 4, 28029 Madrid, Spain.

ABSTRACT

Patch-clamp experiments to characterize and examine the role of $\alpha 7$ receptors were performed in human chromaffin cells from organ donors. The current provoked by acetylcholine (ACh) in voltage clamped cells was blocked by the nicotinic receptor antagonists α -bungarotoxin (α -Bgtx) (1 μ M) ($6\pm 1.7\%$) or methyllycaconitine (MLA) (10 nM) ($7\pm 1.6\%$), in an irreversible and reversible manner, respectively, without affecting exocytosis. Choline pulses induced a biphasic current with an initial quickly activated (5.5 ± 0.4 ms rise time) and inactivated component (8.5 ± 0.4 ms time constant) (termed $\alpha 7$), followed by a slower component (non $\alpha 7$). The $\alpha 7$ component was irreversibly inhibited by α -Bgtx, while MLA blockade was reversed upon wash out. PNU 282987, an $\alpha 7$ specific agonist, elicited at 3 and 30 μ M rapidly activated currents that were also rapidly inactivated. $\alpha 7$ positive allosteric modulators such as 5-hydroxyindole (1 mM) and PNU 120596 (10 μ M), potentiated responses that were blocked by α -Bgtx or MLA. Depolarization elicited by choline or ACh was delayed in the presence of MLA. PNU 282987 also induced a depolarization capable of producing neurotransmitter secretion. Here we provide evidence of functional $\alpha 7$ nAChRs in primary human neurosecretory cell cultures that play a crucial role in the early onset of depolarization and neurotransmitter secretion.

Key words: Acetylcholine, adrenal medulla, neurosecretion, patch clamp, nAChR

The nicotinic $\alpha 7$ subunit forms homomeric channels when heterologously (1-5) or endogenously expressed (6, 7). However, there is also evidence of heteromeric $\alpha 7$ expression in heterologous (8-10) and native systems (11, 12). Upon activation, homomeric $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) generate a quickly inactivated current that is readily blocked by α -Bgtx or MLA (13-15).

These currents raise intracellular Ca^{2+} (16, 17) due to their high Ca^{2+} permeability (18-20) and depolarize the plasma membrane when located postsynaptically (21-23). Presynaptically, they can modulate neurotransmitter release (24-27). They are considered pharmacological targets to treat tobacco addiction (28, 29), Alzheimer's disease (30, 31), schizophrenia (32), inflammation (33, 34) and pain (35, 36).

Chromaffin cells are postsynaptic sympathetic neurons of the adrenal medulla that release catecholamines into the bloodstream upon presynaptic stimulation by splanchnic nerve cholinergic fibres. nAChR subunits in these cells have generated controversy regarding their sensitivity to α -Bgtx, the homomeric or heteromeric distribution of $\alpha 7$ receptors and their functionality. In bovine chromaffin cells, expression of $\alpha 7$ nAChRs has been determined by specific α -Bgtx binding (37, 38), cloning (39) and antibody detection (40). However, in these cells nAChRs have also be found to be insensitive to α -Bgtx (41) as is the catecholamine release process (42-45). These findings contrast with those of other researchers who report partial or full α -Bgtx blockade of currents and secretion in bovine chromaffin or PC12 cells (46-48). Evidence for the presence of $\alpha 7$ subunits in human chromaffin cells (49) and PC12 cells (7) has been provided through $\alpha 7$ mRNA detection and affinity purification and immunoblotting of α -Bgtx receptors, respectively.

The present study was designed to explore the presence and functions of $\alpha 7$ nAChRs in primary cultures of human neurosecretory cells. Our data point to a role of rapidly activated and inactivated $\alpha 7$ nAChRs in the fast onset of depolarization that leads to neurosecretion in these cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell cultures

The study protocol was approved by the Ethics Committees of the Hospital Ramón y Cajal, Hospital Universitario La Paz, and Universidad Autónoma de Madrid. After obtaining informed consent from the donors' relatives, adrenal glands were harvested from 7 organ adult donors who had died of cerebral haemorrhage. The adrenal glands were collected in cold Locke's buffer solution (LBS) and immediately processed. Once all fatty tissue had been removed, the glands were retrogradely perfused with 1% type XIV protease (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) dissolved in LBS and transferred to a 50 ml conical flask containing LBS at 37°C for 10 min. The glands were then sagittally cut, the medulla removed mechanically with a scalpel, cut into pieces and introduced in collagenase type I (Gibco, Barcelona, Spain) solution (1 mg/ml) at 37°C for 30 min. The suspension was gently agitated every 5-10 min to allow disaggregation of the tissue. Next, the suspension was filtered through a 200- μ m nylon mesh and centrifuged at 170 g for 10 min. The pellet was then resuspended in LBS and centrifuged again at 40 g for 10 min. The pellet obtained was once again resuspended in LBS and filtered through a 80 μ m nylon mesh. Bovine albumin 4% was added to the bottom of the 50 ml tube, and the suspension centrifuged again. Finally, the last centrifugation was performed in DMEM (Gibco, Barcelona, Spain) supplemented with 5% foetal calf serum, 50 IU/ml penicillin, and 50 mg/ml streptomycin. Cells were plated on 12 mm polylysine-treated coverslips and kept for up to 10 days in an incubator at 37°C in a water-saturated, 5% CO₂ atmosphere. Experiments were started 48 h after plating to allow recovery of the nicotinic receptor after collagenase treatment (50).

Electrophysiological recordings

Perforated patch recordings were made in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. The external solution used to record nicotinic currents was (in mM): 2 CaCl₂, 145 NaCl, 5.5 KCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES and 10 glucose; the pH was adjusted to 7.4 with NaOH. Intracellular solution composition was (in mM): 145 Kglutamate, 8 NaCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES and 0.5 amphotericin B (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain); the pH was adjusted to 7.2 with KOH.

For Ca²⁺ current recordings, the external solution was (in mM): 5 CaCl₂, 100 NaCl, 45 TEACl, 5.5 KCl, 1 MgCl₂, 0.2 d-tubocurarine, 0.002 TTX, 0.0002 apamin, 10 HEPES and 10 glucose; the pH was adjusted to 7.4 with NaOH. Intracellular solution composition was (in mM): 145 Cs glutamate, 8 NaCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES and 0.5 amphotericin B; the pH was adjusted to 7.2 with CsOH.

An amphotericin B stock solution was prepared daily at a concentration of 50 mg/mL dimethyl sulphoxide (DMSO) and kept protected from light. The final concentration of amphotericin B was prepared by ultrasonically mixing 10 μ L of stock amphotericin B in 1 mL of internal solution in the dark. Pipettes were tip-dipped in amphotericin-free solution for several seconds and back-filled with freshly mixed intracellular amphotericin solution.

The perfusion system for drug application consisted of a multi-barrelled polyethylene pipette positioned close to the cell under study that allowed the complete exchange of solutions near the cell within 50 ms. The level of the bath fluid was continuously controlled by a custom designed fibre optics system coupled to a pump used to aspirate excess fluid.

Simultaneous electrophysiological current and plasma membrane capacitance measurements (as an index of exocytosis) were undertaken using an EPC-10 amplifier and PULSE software (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany) running on a PC computer. Increments in membrane capacitance accurately measure the fusion of vesicles to the plasma membrane that takes place during the exocytotic event (51-54), and have been previously employed to record secretory responses induced by nicotinic agonists (55, 56).

Pipettes of 2-3 M Ω resistance were pulled from borosilicate glass capillary tubes, partially coated with wax and fire polished. After seal formation and perforation, only recordings in which the access resistance of the pipette and the leak current were lower than 20 M Ω and 20 pA, respectively, were accepted. The holding potential (V_h) was -80 mV in all cases except in Figure 6 (V_h =-60 mV). Capacitance changes were estimated by the Lindau-Neher (57, 58) technique implemented in the "Sine+DC" feature of the "PULSE" lock-in software. A 1 kHz, 70 mV peak-to-peak amplitude sinewave was applied at the holding potential. The triple step protocol employed in this study is a slight modification of the method reported previously (56) to measure agonist induced exocytosis by means of membrane capacitance changes. It combines the voltage clamp and the current clamp configurations of the patch-clamp technique. Initial plasma membrane capacitance is recorded in the voltage clamp configuration (Step 1), then by switching to the current clamp configuration, the agonist is able to depolarize the plasma membrane (Step 2), and finally by returning to the voltage clamp mode the increase produced in plasma membrane capacitance can be recorded, reflecting the exocytosis evoked by the agonist (Step 3).

Analysis of data was conducted on a PC computer using IGOR Pro software (Wavemetrics, Lake Oswego, Oregon). Unless otherwise stated, data are given as the mean \pm S.E.M. The paired Student's t-test was used to compare data.

Drugs

PNU 120596 was purchased from TOCRIS Bioscience (Bristol, UK). ACh, choline, PNU 282987, 5-HI, α -Bgtx and MLA were from Sigma (Madrid, Spain). All drugs were dissolved in water, except PNU 120596, PNU282987 and 5-HI that were dissolved in DMSO. Stock aliquots were stored at -20°C.

RESULTS

$\alpha 7$ nAChR antagonists partially block currents elicited by ACh but not secretion

Using the voltage clamp mode in the perforated patch configuration of the patch-clamp technique, the presence of functional $\alpha 7$ receptors in the plasma membrane was investigated using ACh as stimulus (300 μ M, 200 ms pulses applied every 2 min). After obtaining stable responses, α -Bgtx (1 μ M) or MLA (1 nM or 10 nM) were perfused to rapidly and selectively block $\alpha 7$ receptors. The nicotinic peak currents elicited by ACh (2.6 ± 0.3 nA, $n=10$) were blocked by $6.0 \pm 1.7\%$ using α -Bgtx ($n=5$) and by $7.1 \pm 1.6\%$ using 10 nM MLA ($n=5$). Blockade was irreversible after wash out of α -Bgtx (Fig. 1a and b) but not MLA (Fig. 1d and e). Secretion, measured as a plasma membrane capacitance (C_m) increase, was unaffected by the antagonists ($n=5$) (Fig 1 c and f).

$\alpha 7$ nAChR positive allosteric modulators (PAMs) potentiate ACh elicited current and secretion

Another strategy was used to unveil the presence of $\alpha 7$ receptors. Positive allosteric modulators such as PNU-120596 (59, 60) or 5-hydroxyindole (5-HI) (61) can increase the current through homomeric $\alpha 7$ nAChRs. We tested these compounds in human chromaffin cells to assess their effects on the nicotinic currents elicited by ACh.

Perfusion with PNU 120596 (10 μ M) potentiated the nicotinic current charge (1.7 ± 0.2 nC) and the corresponding ACh elicited secretion (116.2 ± 69 fF) up to 2 ± 0.3 fold (3.4 ± 0.9 nA) ($n=4$) and 3.3 ± 0.7 fold (414 ± 233 fF) ($n=4$) respectively, but did not increase the peak current. This effect was reversible after wash out (Fig. 2a and b), and fully and irreversibly abolished after α -Bgtx perfusion in the presence of PNU 120596 (Fig. 2c and d).

Surprisingly, 5-HI, at a concentration of 1 mM, blocked the peak current and the current charge elicited by ACh by $37 \pm 5.6\%$ and $64 \pm 3\%$ ($n=5$), without significantly affecting secretion (Fig. 2e). This could be explained by a modest potentiation of 5-HI and the blocking effect of DMSO (0.1%), the solvent used to dilute PAMs, on nicotinic currents (Fig 2f).

A summary of the effects of these compounds on the peak current, charge and secretion is provided in Fig. 2g. It should be noted that the potentiation elicited by PNU 120596 was underestimated due to the DMSO effect.

Choline and PNU 282987 evoke $\alpha 7$ nicotinic currents that do not trigger secretion in human chromaffin cells

Choline is an $\alpha 7$ nAChR agonist (22, 62-64) with an almost negligible agonist effect on non $\alpha 7$ currents in chromaffin cells (47). Using this agonist at a concentration of 10 mM, we set out to characterize its response and to assess the effects of selective $\alpha 7$ nAChR antagonists or PAMs on the choline elicited current.

Cell stimulation with choline 10 mM (200 ms) evoked a biphasic current with two clearly defined components. The first component was rapidly activated and inactivated. The second current component exhibited a slow activated stage with no inactivation (Fig. 3a). The peak current and charge amounted to 130 ± 16.2 pA and 49.7 ± 3.1 pC, respectively ($n=31$). However, the Ca^{2+} entry

elicited by choline could not trigger neurotransmitter secretion (Fig. 3a, inset). In response to perfusion with the $\alpha 7$ receptor antagonist α -Bgtx, only the quickly activated and inactivated component was blocked by $97.7 \pm 1\%$ ($n=6$), and this component could not be recovered after wash out (Fig. 3b). When tested in different cells, the $\alpha 7$ receptor antagonist MLA also blocked the initial current component elicited by choline by $96.8 \pm 1.7\%$ ($n=8$). MLA wash out resulted in recovery of the fast component of the nicotinic current (Fig. 3c). A summary of the effects of $\alpha 7$ receptor antagonist blockade and wash out is provided in Fig. 3d. These data show that the initial component of the biphasic current elicited by choline corresponds to activation of $\alpha 7$ nAChRs.

In addition, we evaluated the effect of PNU 282987, a synthetic selective $\alpha 7$ agonist. This compound evoked a peak current and charge of 42 ± 9.8 pA and 23 ± 4.6 pC, respectively, at $3 \mu\text{M}$, and a peak current and charge of 57.7 ± 9.2 pA and 14.8 ± 2.6 pC, respectively, at $30 \mu\text{M}$ ($n=6$). Choline was applied to the same cells as PNU 282987 to compare their responses (Fig. 3e and f). The PNU 282987 peak current and charge amounted to $37.3 \pm 5.2\%$ and $51.4 \pm 4.9\%$ (at $3 \mu\text{M}$), and $41.7 \pm 6.2\%$ and $30.0 \pm 4.6\%$ (at $30 \mu\text{M}$) of the peak current and charge response shown by the choline $\alpha 7$ component (Fig. 3g). MLA (10 nM) fully abolished the nicotinic current elicited by PNU 282987 as well as the initial peak current evoked by choline in the same cells, confirming the $\alpha 7$ nature of the PNU 282987 response (Fig. 3e).

As observed for choline, PNU282987 failed to trigger neurotransmitter secretion (Fig. 3e and f, inset). If we assume that $\alpha 7$ receptors are located at least at the same distance as Ca^{2+} channels from the exocytotic machinery, the currents elicited by those $\alpha 7$ agonists would not reach the Ca^{2+} charge threshold needed to evoke exocytosis. This threshold value was determined by performing experiments in which square step depolarizing pulses of different duration were applied to elicit multiple Ca^{2+} current charges. The minimum Ca^{2+} entry charge needed to evoke secretion was elicited by 20 ms pulses, amounting to 10.9 ± 1.6 pC ($n=5$, Fig. 1 Supplemental Material). The fractional Ca^{2+} current for human homomeric $\alpha 7$ receptors has been reported to be 10% of the total nicotinic current (65-67), implying that only about 5 pC of the $\alpha 7$ current charge component elicited by choline is attributable to Ca^{2+} ions. According to the calculated Ca^{2+} charge threshold needed to elicit exocytosis, this amount of Ca^{2+} entry would be insufficient to trigger this process.

The $\alpha 7$ current kinetics elicited by choline and PNU 282987 are analyzed and compared in Fig. 3h. In the case of choline, the time measured for 10% to 90% activation (t_{10-90}) was $5.5 \pm 0.4 \text{ ms}$. The inactivation phase could be fitted to a single exponential curve, giving a time constant of inactivation (τ_{inactiv}) of $8.5 \pm 0.4 \text{ ms}$ ($n=31$). The kinetic study of the currents yielded by PNU 282987 indicated quickly activated and inactivated stages for both concentrations, with $t_{10-90} = 7.1 \pm 0.4 \text{ ms}$ and $\tau_{\text{inactiv}} = 10.0 \pm 0.9 \text{ ms}$ for $3 \mu\text{M}$, and $t_{10-90} = 5.5 \pm 0.4 \text{ ms}$ and $\tau_{\text{inactiv}} = 9.8 \pm 1.8 \text{ ms}$ for $30 \mu\text{M}$ ($n=6$).

$\alpha 7$ nAChR PAMs potentiate choline- and PNU 282987- elicited responses

When the agonist used was choline, 5-HI (1 mM) evoked a large increase in the initial peak current ($\alpha 7$ component as previously described). The potentiation achieved by 5-HI was 3.5 fold in the cell shown in Fig. 4a. On average, the peak current elicited by choline ($132 \pm 43 \text{ pA}$) was augmented 3.2 ± 0.4 fold ($426 \pm 139 \text{ pA}$) in 5 cells tested (Fig. 4c). This increase was abolished, together with the initial peak current elicited by choline, by $99.5 \pm 0.2\%$ after perfusion with MLA 10 nM , and was fully recovered after wash-out. 5-HI $\alpha 7$ peak current potentiation, however, did

not cause overall current charge ($\alpha 7$ and non $\alpha 7$) potentiation. This may be explained by the blocking effects of DMSO and 5-HI on the non $\alpha 7$ component of the choline elicited current (Fig. 4a and c). Secretion was not immediately potentiated after the pulse. A continuous plasma membrane capacitance increase was observed after perfusion with 5-HI, but this increase was also produced using DMSO alone (data not shown) (Fig. 4b).

PNU 120596 caused a marked potentiation of the choline response, which was reversible after wash out. The choline evoked peak current was increased by 22 ± 4.5 fold (1.5 ± 0.4 nA), the current charge by 129 ± 42.4 fold (5.7 ± 2.2 nC), and the secretory response by 72.2 ± 25 fold (361.5 ± 119.3 fF) ($n=6$) (Fig. 4d, e and f). Current charge and secretion increments could be completely abolished after application of $1 \mu\text{M}$ α -Bgtx, whose blocking effect was irreversible (Fig. 4g, h and f).

When the agonist was PNU 282987 used at a $3 \mu\text{M}$ concentration, the potentiation effect elicited by PNU 120596 on the peak current, current charge and secretion were 72.5 ± 19.4 fold (2.4 ± 0.2 nA), 626.4 ± 206.1 fold (12.5 ± 2.9 nC) and 131.9 ± 27.2 fold (659.5 ± 136.1 fF) ($n=5$) respectively (Fig. 4i, j and k).

The kinetics of the fast current component was preserved in the 5-HI potentiated-choline elicited currents ($t_{10-90}=7.2 \pm 0.7$ ms, $\tau_{\text{inactiv}}=10.1 \pm 0.6$ ms), in good agreement with the kinetic properties of type I PAMs, which do not influence inactivation (Gronlien et al., 2007). However, in the presence of PNU 120596, the current elicited by choline showed significantly slower kinetics ($t_{10-90}=776.2 \pm 33.3$ ms, $\tau_{\text{inactiv}}=2.32 \pm 0.2$ s) consistent with the actions of a type II PAM (60). When the agonist was PNU 282987, PNU 120596 potentiated current kinetics was also significantly slower as compared to controls ($t_{10-90}=890.7 \pm 113.8$ ms, $\tau_{\text{inactiv}}=4.8 \pm 0.6$ s) ($n=5$) (Fig. 4l).

$\alpha 7$ mediates fast-onset membrane depolarization

The functional role of the $\alpha 7$ nAChR in mediating transmission in the synapse splanchnic nerve-chromaffin cell was also addressed. In the current clamp configuration, 200 ms pulses of choline or ACh elicited a series of initial membrane potential spikes that were followed by a plateau phase. The effects of the $\alpha 7$ receptor antagonist MLA (10 nM) on choline- or ACh elicited depolarizations were analyzed. Perfusion with the antagonist delayed the peak and the onset of the choline evoked depolarizing spikes by 6.3 ms and 2 ms (Fig. 5a and b), and 12.8 ± 5.4 ms (range 4.1-42.7) and 8.9 ± 2.2 ms (range 2-17.5), respectively, on average (7 cells) (Fig. 5h). This effect was completely reversible after wash out of the antagonist (Fig. 5b, dashed line). In a different cell, the blockade by MLA of the initial peak current evoked by choline (Fig. 5c) recorded in the voltage clamp configuration is shown. The depolarizing response obtained in that cell in the current clamp configuration showed 42.7 ms and 14.9 ms delay of the peak and onset of the depolarization, respectively, after application of MLA (Fig. 5d).

Similar results were achieved after MLA addition to the ACh evoked depolarization, which also delayed the peak and onset of the depolarization by 6.3 ms and 6.5 ms (Fig. 5e and f), and 5.7 ± 2 ms (range 1.9-6.3) and 5.9 ± 2.4 ms (range 2.2-17.8) on average in 6 cells tested (Fig. 5h). The peak of the nicotinic current occurred later after MLA perfusion, as can be observed in Fig. 5g, which corresponds to the same cell as in 5e and f.

Thus, activation of $\alpha 7$ nAChRs allows rapid transmission at this synapse, conferring these receptors a prominent role in a fast response in stressful situations.

$\alpha 7$ activation triggers secretion by depolarizing the cell membrane

Although Ca^{2+} entry through the ionophore associated with the $\alpha 7$ nAChR yielded no secretory response, we next tried to determine whether this receptor could contribute to secretion by depolarization and subsequent recruitment of Ca^{2+} channels. Exocytosis elicited by agonist depolarization can be measured using a “triple step” protocol (see materials and methods).

The depolarization elicited by choline, which showed a peak of 40 mV followed by a plateau at -20 mV, generated a secretory response of 69 fF (Fig. 6a) and 53.3 ± 14.5 fF ($n=3$) on average. PNU 282987 evoked a mild depolarization response with a peak at -40 mV. The elicited secretion amounted to 58 fF (Fig. 6b) and 93.3 ± 24 fF on average in 3 cells tested. In the presence of PNU 120596, the depolarization and secretion evoked by PNU 282987 were largely potentiated, the former increasing in magnitude (from -42.4 to 27.9 mV) and duration (from 1.9 to 21.5 s), and the latter in magnitude from 138 to 639 fF (Fig. 6c). These data indicate that the depolarization evoked by the $\alpha 7$ nAChR agonist is able to trigger neurotransmitter release, possibly by recruiting voltage-dependent Ca^{2+} channels (56).

DISCUSSION

Our results provide the first evidence of functional $\alpha 7$ nAChRs in primary cultures of human neurosecretory cells and of their role in the fast onset of depolarization, leading to the rapid neurosecretory process needed for the fight-or-flight response. ACh-evoked currents attributable to $\alpha 7$ nAChRs have been previously described in the peripheral (17, 68) or central (14, 69) nervous systems of other mammals.

Choline has been established to behave as an agonist of $\alpha 7$ ACh receptors (22, 62-64), with a dual effect potentiating or inhibiting $\alpha 4\beta 4$ nAChRs (70) as well as activating $\alpha 3\beta 2$ or $\alpha 3\beta 4$ receptors expressed in *Xenopus* oocytes (47). This could perhaps explain the biphasic current elicited by choline in the present study, which showed an initial peak and a second plateau stage. The initial peak current was evoked through activation of the rapidly activated and inactivated $\alpha 7$ receptors; it was blocked by the $\alpha 7$ nAChR antagonists MLA or α -Bgtx, and potentiated by the $\alpha 7$ nAChR PAMs 5-HI or PNU 120596. The rapid inactivation reported here in human chromaffin cells of the initial $\alpha 7$ current peak yielded in the presence of choline (8.5 ± 0.4 ms) was of the same order of magnitude as that reported in native systems, such as cultured postnatal rat hippocampal neurons (8 ± 2 ms), elicited by ACh (14), or tuberomammillary histamine neurons of the posterior hypothalamus, elicited by choline (9.65 ± 1.1 ms) (71). The second stage of the choline evoked current may be attributed to activation of non $\alpha 7$ nAChRs.

α -Bgtx and MLA have been shown to block $\alpha 9^*$ nicotinic receptors (72-74). However, the irreversible nature of the α -Bgtx block, the fast kinetics of activation and desensitization, and the selective action of the modulators on $\alpha 7$ receptors (59, 61) make this possibility unlikely.

What is the physiological significance of $\alpha 7$ nAChR signaling in human chromaffin cells? $\alpha 7$ nAChRs are essential for rapid synaptic transmission (21, 22, 75, 76), especially in periods of high frequency stimulation (23, 77) in peripheral autonomic neurons, and also in rat chromaffin cells *in situ* (78). For the short stimuli that occur in physiological conditions, the behavior of

these receptors will be more relevant compared to the slowly activated non $\alpha 7$ receptors. Here, we show that $\alpha 7$ receptors cause the fast firing of action potentials that would otherwise be delayed by several milliseconds and therefore fail to take place. Thus, the response mediated by $\alpha 7$ nAChRs could be crucial for the fast release of neurotransmitters to the bloodstream, in an attempt to prepare the muscle and cardiovascular systems to respond to different stress conditions. The more sustained release of these compounds would be achieved through activation of non $\alpha 7$ nAChRs.

Human chromaffin cells mainly display an adrenergic phenotype (99% of cells) (79), perhaps due to the contiguous structure of the adrenal cortex and medulla and the influence of glucocorticoids on the PNMT enzyme (80). Moreover, the colocalization of $\alpha 7$ receptors in cells containing PNMT has been reported (81). Thus, if glucocorticoid-activated PNMT expression increases with stress (82-84), it is plausible that $\alpha 7$ nAChR expression also increases. Indeed, these receptors have been attributed roles in transsynaptic induction (85) and gene transcription of tyrosine hydroxylase (TH) (86), and in inducing dopamine biosynthetic enzymes in rat brain (87).

Our data also reveal that $\alpha 7$ nAChR agonist-evoked secretion occurs postsynaptically via cell membrane depolarization, which would allow the opening of Ca^{2+} channels with subsequent Ca^{2+} entry and neurotransmitter release (56). In bovine chromaffin cells, $\alpha 7$ nAChRs have been reported to contribute to exocytosis using the amperometric technique and applying 1s pulses of 100 μM ACh and the nAChR antagonists MLA, ImI or α -Bgtx, to a population of cells (46). In other cell systems, $\alpha 7$ nAChRs have been found to modulate (24-27) or influence (88) neurotransmitter release presynaptically. Postsynaptically, they have been shown to generate depolarizing currents (22) but no evidence for a role in exocytosis has been reported.

$\alpha 7$ nAChRs might also play a key role in the early stages of splanchnic nerve-chromaffin cell synapse maturation. These receptors are present on neonatal adrenal chromaffin cells (49, 78, 89). This hypothesis is based on the idea that choline acts as the primary endogenous agonist of nAChRs, given the expression of the ACh synthesizing enzyme, choline acetyltransferase (90-92) and high-affinity choline uptake sites (91, 92), follows the appearance of nAChRs in developing neurons. In addition, $\alpha 7$ nAChRs contribute to hypoxia-induced catecholamine secretion in neonatal adrenomedullary chromaffin cells (89). $\alpha 7$ nAChRs are also required to ensure reliable and synchronous firing of synaptically evoked APs in ciliary neurons, a requirement that appears relatively early in ganglion development and plays a less prominent role later on (23).

In conclusion, our findings indicate the presence of $\alpha 7$ nAChRs in human neurosecretory cells that show fast activation and inactivation kinetics that mediate fast-onset membrane depolarization and neurotransmitter release. In addition, we validate the use of human chromaffin cells as an excellent model to investigate the functional roles of $\alpha 7$ nAChRs in physiological and disease processes such as cognitive disorders and neurodegeneration, and their use as targets of new drugs designed to treat these disorders.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the donors of the human adrenal glands and their relatives. We also thank Dr. Agustín Albillos and the Transplant Teams of the Hospital Ramón y Cajal and Hospital Universitario La Paz for their excellent coordination in supplying the human adrenal glands. AHV holds a fellowship award from the Universidad Autónoma de Madrid. This work was supported by a grant from the Ministerio de Ciencia y Tecnología No. BFU2008-01382/BFI awarded to AA.

REFERENCES

1. Couturier, S., Bertrand, D., Matter, J. M., Hernandez, M. C., Bertrand, S., Millar, N., Valera, S., Barkas, T., and Ballivet, M. (1990) A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX. *Neuron* **5**, 847-856
2. Puchacz, E., Buisson, B., Bertrand, D., and Lukas, R. J. (1994) Functional expression of nicotinic acetylcholine receptors containing rat alpha 7 subunits in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *FEBS Lett.* **354**, 155-159
3. Gopalakrishnan, M., Buisson, B., Touma, E., Giordano, T., Campbell, J. E., Hu, I. C., Donnelly-Roberts, D., Arneric, S. P., Bertrand, D., and Sullivan, J. P. (1995) Stable expression and pharmacological properties of the human alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **290**, 237-246
4. Quik, M., Choremis, J., Komourian, J., Lukas, R. J., and Puchacz, E. (1996) Similarity between rat brain nicotinic alpha-bungarotoxin receptors and stably expressed alpha-bungarotoxin binding sites. *J. Neurochem.* **67**, 145-154
5. Peng, J. H., Lucero, L., Fryer, J., Herl, J., Leonard, S. S., and Lukas, R. J. (1999) Inducible, heterologous expression of human alpha7-nicotinic acetylcholine receptors in a native nicotinic receptor-null human clonal line. *Brain Res.* **825**, 172-179
6. Chen, D., and Patrick, J. W. (1997) The alpha-bungarotoxin-binding nicotinic acetylcholine receptor from rat brain contains only the alpha7 subunit. *J. Biol. Chem.* **272**, 24024-24029
7. Drisdell, R. C., and Green, W. N. (2000) Neuronal alpha-bungarotoxin receptors are alpha7 subunit homomers. *J. Neurosci.* **20**, 133-139
8. Palma, E., Maggi, L., Barabino, B., Eusebi, F., and Ballivet, M. (1999) Nicotinic acetylcholine receptors assembled from the alpha7 and beta3 subunits. *J. Biol. Chem.* **274**, 18335-18340
9. Khiroug, S. S., Harkness, P. C., Lamb, P. W., Sudweeks, S. N., Khiroug, L., Millar, N. S., and Yakel, J. L. (2002) Rat nicotinic ACh receptor alpha7 and beta2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels. *J. Physiol.* **540**, 425-434
10. Azam, L., Winzer-Serhan, U., and Leslie, F. M. (2003) Co-expression of alpha7 and beta2 nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within rat brain cholinergic neurons. *Neuroscience* **119**, 965-977

11. Yu, C. R., and Role, L. W. (1998) Functional contribution of the alpha7 subunit to multiple subtypes of nicotinic receptors in embryonic chick sympathetic neurones. *J. Physiol.* **509** (Pt 3), 651-665
12. 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., and Wu, J. (2009) A novel nicotinic acetylcholine receptor subtype in basal forebrain cholinergic neurons with high sensitivity to amyloid peptides. *J. Neurosci.* **29**, 918-929
13. Bertrand, D., Bertrand, S., and Ballivet, M. (1992) Pharmacological properties of the homomeric alpha 7 receptor. *Neurosci. Lett.* **146**, 87-90
14. Zorumski, C. F., Thio, L. L., Isenberg, K. E., and Clifford, D. B. (1992) Nicotinic acetylcholine currents in cultured postnatal rat hippocampal neurons. *Mol. Pharmacol.* **41**, 931-936
15. Alkondon, M., Pereira, E. F., Wonnacott, S., and Albuquerque, E. X. (1992) Blockade of nicotinic currents in hippocampal neurons defines methyllycaconitine as a potent and specific receptor antagonist. *Mol. Pharmacol.* **41**, 802-808
16. Vijayaraghavan, S., Pugh, P. C., Zhang, Z. W., Rathouz, M. M., and Berg, D. K. (1992) Nicotinic receptors that bind alpha-bungarotoxin on neurons raise intracellular free Ca²⁺. *Neuron* **8**, 353-362
17. Zhang, Z. W., Vijayaraghavan, S., and Berg, D. K. (1994) Neuronal acetylcholine receptors that bind alpha-bungarotoxin with high affinity function as ligand-gated ion channels. *Neuron* **12**, 167-177
18. Bertrand, D., Galzi, J. L., Devillers-Thiery, A., Bertrand, S., and Changeux, J. P. (1993) Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neuronal alpha 7 nicotinic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 6971-6975
19. Seguela, P., Wadiche, J., Dineley-Miller, K., Dani, J. A., and Patrick, J. W. (1993) Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: A nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J. Neurosci.* **13**, 596-604
20. Delbono, O., Gopalakrishnan, M., Renganathan, M., Monteggia, L. M., Messi, M. L., and Sullivan, J. P. (1997) Activation of the recombinant human alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor significantly raises intracellular free calcium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **280**, 428-438
21. Zhang, Z. W., Coggan, J. S., and Berg, D. K. (1996) Synaptic currents generated by neuronal acetylcholine receptors sensitive to alpha-bungarotoxin. *Neuron* **17**, 1231-1240
22. Frazier, C. J., Buhler, A. V., Weiner, J. L., and Dunwiddie, T. V. (1998) Synaptic potentials mediated via alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* **18**, 8228-8235
23. Chang, K. T., and Berg, D. K. (1999) Nicotinic acetylcholine receptors containing alpha7 subunits are required for reliable synaptic transmission in situ. *J. Neurosci.* **19**, 3701-3710

24. McGehee, D. S., Heath, M. J., Gelber, S., Devay, P., and Role, L. W. (1995) Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science* **269**, 1692-1696
25. Gray, R., Rajan, A. S., Radcliffe, K. A., Yakehiro, M., and Dani, J. A. (1996) Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature* **383**, 713-716
26. Guo, J. Z., Tredway, T. L., and Chiappinelli, V. A. (1998) Glutamate and GABA release are enhanced by different subtypes of presynaptic nicotinic receptors in the lateral geniculate nucleus. *J. Neurosci.* **18**, 1963-1969
27. Li, X., Rainnie, D. G., McCarley, R. W., and Greene, R. W. (1998) Presynaptic nicotinic receptors facilitate monoaminergic transmission. *J. Neurosci.* **18**, 1904-1912
28. Mihalak, K. B., Carroll, F. I., and Luetje, C. W. (2006) Varenicline is a partial agonist at alpha4beta2 and a full agonist at alpha7 neuronal nicotinic receptors. *Mol. Pharmacol.* **70**, 801-805
29. Rose, J. E. (2007) Multiple brain pathways and receptors underlying tobacco addiction. *Biochem. Pharmacol.* **74**, 1263-1270
30. Kihara, T., Shimohama, S., Sawada, H., Kimura, J., Kume, T., Kochiyama, H., Maeda, T., and Akaike, A. (1997) Nicotinic receptor stimulation protects neurons against beta-amyloid toxicity. *Ann. Neurol.* **42**, 159-163
31. Wang, H. Y., Lee, D. H., D'Andrea, M. R., Peterson, P. A., Shank, R. P., and Reitz, A. B. (2000) Beta-amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. implications for alzheimer's disease pathology. *J. Biol. Chem.* **275**, 5626-5632
32. Freedman, R., Coon, H., Myles-Worsley, M., Orr-Urtreger, A., Olincy, A., Davis, A., Polymeropoulos, M., Holik, J., Hopkins, J., Hoff, M., Rosenthal, J., Waldo, M. C., Reimherr, F., Wender, P., Yaw, J., Young, D. A., Breese, C. R., Adams, C., Patterson, D., Adler, L. E., Kruglyak, L., Leonard, S., and Byerley, W. (1997) Linkage of a neurophysiological deficit in schizophrenia to a chromosome 15 locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 587-592
33. 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., and Tracey, K. J. (2003) Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* **421**, 384-388
34. Medhurst, S. J., Hatcher, J. P., Hille, C. J., Bingham, S., Clayton, N. M., Billinton, A., and Chessell, I. P. (2008) Activation of the alpha7-nicotinic acetylcholine receptor reverses complete Freund adjuvant-induced mechanical hyperalgesia in the rat via a central site of action. *J. Pain* **9**, 580-587
35. Damaj, M. I., Meyer, E. M., and Martin, B. R. (2000) The antinociceptive effects of alpha7 nicotinic agonists in an acute pain model. *Neuropharmacology* **39**, 2785-2791
36. Hamurtekin, E., and Gurun, M. S. (2006) The antinociceptive effects of centrally administered CDP-choline on acute pain models in rats: The involvement of cholinergic

system. *Brain Res.* **1117**, 92-100

37. Wilson, S. P., and Kirshner, N. (1977) The acetylcholine receptor of the adrenal medulla. *J. Neurochem.* **28**, 687-695
38. Quik, M., Geertsen, S., and Trifaro, J. M. (1987) Marked up-regulation of the beta-bungarotoxin site in adrenal chromaffin cells by specific nicotinic antagonists. *Mol. Pharmacol.* **31**, 385-391
39. Garcia-Guzman, M., Sala, F., Sala, S., Campos-Caro, A., Stuhmer, W., Gutierrez, L. M., and Criado, M. (1995) Alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors on bovine chromaffin cells: Molecular cloning, functional expression and alternative splicing of the alpha 7 subunit. *Eur. J. Neurosci.* **7**, 647-655
40. El-Hajj, R. A., McKay, S. B., and McKay, D. B. (2007) Pharmacological and immunological identification of native alpha7 nicotinic receptors: Evidence for homomeric and heteromeric alpha7 receptors. *Life Sci.* **81**, 1317-1322
41. Free, R. B., McKay, S. B., Boyd, R. T., and McKay, D. B. (2002) Evidence for constitutive expression of bovine adrenal $\alpha 3\beta 4^*$ nicotinic acetylcholine receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **971**, 145-147
42. Kumakura, K., Karoum, F., Guidotti, A., and Costa, E. (1980) Modulation of nicotinic receptors by opiate receptor agonists in cultured adrenal chromaffin cells. *Nature* **283**, 489-492
43. Trifaro, J. M., and Lee, R. W. (1980) Morphological characteristics and stimulus-secretion coupling in bovine adrenal chromaffin cell cultures. *Neuroscience* **5**, 1533-1546
44. Kilpatrick, D. L., Slepatis, R., and Kirshner, N. (1981) Inhibition of catecholamine secretion from adrenal medulla cells by neurotoxins and cholinergic antagonists. *J. Neurochem.* **37**, 125-131
45. Tachikawa, E., Mizuma, K., Kudo, K., Kashimoto, T., Yamato, S., and Ohta, S. (2001) Characterization of the functional subunit combination of nicotinic acetylcholine receptors in bovine adrenal chromaffin cells. *Neurosci. Lett.* **312**, 161-164
46. Lopez, M. G., Montiel, C., Herrero, C. J., Garcia-Palomero, E., Mayorgas, I., Hernandez-Guijo, J. M., Villarroja, M., Olivares, R., Gandia, L., McIntosh, J. M., Olivera, B. M., and Garcia, 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**, 14184-14189
47. Fuentealba, J., Olivares, R., Ales, E., Tapia, L., Rojo, J., Arroyo, G., Aldea, M., Criado, M., Gandia, L., and Garcia, A. G. (2004) A choline-evoked $[Ca^{2+}]_i$ signal causes catecholamine release and hyperpolarization of chromaffin cells. *FASEB J.* **18**, 1468-1470
48. Blumenthal, E. M., Conroy, W. G., Romano, S. J., Kassner, P. D., and 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**, 6094-6104

49. Mousavi, M., Hellstrom-Lindahl, E., Guan, Z. Z., Bednar, I., and Nordberg, A. (2001) Expression of nicotinic acetylcholine receptors in human and rat adrenal medulla. *Life Sci.* **70**, 577-590
50. Almazan, G., Aunis, D., Garcia, A. G., Montiel, C., Nicolas, G. P., and Sanchez-Garcia, P. (1984) Effects of collagenase on the release of [3H]-noradrenaline from bovine cultured adrenal chromaffin cells. *Br. J. Pharmacol.* **81**, 599-610
51. Neher, E., and Marty, A. (1982) Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 6712-6716
52. Albillos, A., Dernick, G., Horstmann, H., Almers, W., Alvarez de Toledo, G., and Lindau, M. (1997) The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature* **389**, 509-512
53. Neher, E. (1998) Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: New tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* **20**, 389-399
54. Neher, E. (2006) A comparison between exocytic control mechanisms in adrenal chromaffin cells and a glutamatergic synapse. *Pflugers Arch.* **453**, 261-268
55. Mollard, P., Seward, E. P., and Nowycky, M. C. (1995) Activation of nicotinic receptors triggers exocytosis from bovine chromaffin cells in the absence of membrane depolarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 3065-3069
56. Perez-Alvarez, A., and Albillos, A. (2007) Key role of the nicotinic receptor in neurotransmitter exocytosis in human chromaffin cells. *J. Neurochem.* **103**, 2281-2290
57. Lindau, M., and Neher, E. (1988) Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells. *Pflugers Arch.* **411**, 137-146
58. Gillis, K. D. (1995) Techniques for membrane capacitance measurements. In (Sackmann, B., and Neher, E. eds) pp. 155-198, Plenum, New York
59. Hurst, R. S., Hajos, M., Raggenbass, M., Wall, T. M., Higdon, N. R., Lawson, J. A., Rutherford-Root, K. L., Berkenpas, M. B., Hoffmann, W. E., Piotrowski, D. W., Groppi, V. E., Allaman, G., Ogier, R., Bertrand, S., Bertrand, D., and Arneric, S. P. (2005) A novel positive allosteric modulator of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor: In vitro and in vivo characterization. *J. Neurosci.* **25**, 4396-4405
60. Gronlien, J. H., Hakerud, M., Ween, H., Thorin-Hagene, K., Briggs, C. A., Gopalakrishnan, M., and Malysz, J. (2007) Distinct profiles of alpha7 nAChR positive allosteric modulation revealed by structurally diverse chemotypes. *Mol. Pharmacol.* **72**, 715-724
61. Zwart, R., De Filippi, G., Broad, L. M., McPhie, G. I., Pearson, K. H., Baldwinson, T., and Sher, E. (2002) 5-hydroxyindole potentiates human alpha 7 nicotinic receptor-mediated responses and enhances acetylcholine-induced glutamate release in cerebellar slices. *Neuropharmacology* **43**, 374-384

62. Papke, R. L., Bencherif, M., and 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**, 201-204
63. Alkondon, M., Pereira, E. F., Cortes, W. S., Maelicke, A., and Albuquerque, E. X. (1997) Choline is a selective agonist of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 2734-2742
64. Alkondon, M., Pereira, E. F., Eisenberg, H. M., and Albuquerque, E. X. (1999) Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *J. Neurosci.* **19**, 2693-2705
65. Fucile, S., Renzi, M., Lax, P., and Eusebi, F. (2003) Fractional Ca^{2+} current through human neuronal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* **34**, 205-209
66. Gusev, A. G., and Uteshev, V. V. (2010) Physiological concentrations of choline activate native alpha7-containing nicotinic acetylcholine receptors in the presence of PNU-120596 [1-(5-chloro-2,4-dimethoxyphenyl)-3-(5-methylisoxazol-3-yl)-urea]. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **332**, 588-598
67. Uteshev, V. V. (2010) Evaluation of Ca^{2+} permeability of nicotinic acetylcholine receptors in hypothalamic histaminergic neurons. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* **42**, 8-20
68. Cuevas, J., and Berg, D. K. (1998) Mammalian nicotinic receptors with alpha7 subunits that slowly desensitize and rapidly recover from alpha-bungarotoxin blockade. *J. Neurosci.* **18**, 10335-10344
69. Alkondon, M., and Albuquerque, E. X. (1993) Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. I. pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **265**, 1455-1473
70. Zwart, R., and Vijverberg, H. P. (2000) Potentiation and inhibition of neuronal alpha4beta4 nicotinic acetylcholine receptors by choline. *Eur. J. Pharmacol.* **393**, 209-214
71. Uteshev, V. V., Meyer, E. M., and Papke, R. L. (2002) Activation and inhibition of native neuronal alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic ACh receptors. *Brain Res.* **948**, 33-46
72. Elgoyhen, A. B., Johnson, D. S., Boulter, J., Vetter, D. E., and Heinemann, S. (1994) Alpha 9: An acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* **79**, 705-715
73. Elgoyhen, A. B., Vetter, D. E., Katz, E., Rothlin, C. V., Heinemann, S. F., and 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**, 3501-3506
74. Verbitsky, M., Rothlin, C. V., Katz, E., and Elgoyhen, A. B. (2000) Mixed nicotinic-muscarinic properties of the alpha9 nicotinic cholinergic receptor. *Neuropharmacology* **39**, 2515-2524

75. Ullian, E. M., McIntosh, J. M., and Sargent, P. B. (1997) Rapid synaptic transmission in the avian ciliary ganglion is mediated by two distinct classes of nicotinic receptors. *J. Neurosci.* **17**, 7210-7219
76. Alkondon, M., Pereira, E. F., and Albuquerque, E. X. (1998) Alpha-bungarotoxin- and methyllycaconitine-sensitive nicotinic receptors mediate fast synaptic transmission in interneurons of rat hippocampal slices. *Brain Res.* **810**, 257-263
77. Bibevski, S., Zhou, Y., McIntosh, J. M., Zigmond, R. E., and Dunlap, M. E. (2000) Functional nicotinic acetylcholine receptors that mediate ganglionic transmission in cardiac parasympathetic neurons. *J. Neurosci.* **20**, 5076-5082
78. Martin, A. O., Alonso, G., and Guerineau, N. C. (2005) Agrin mediates a rapid switch from electrical coupling to chemical neurotransmission during synaptogenesis. *J. Cell Biol.* **169**, 503-514
79. Perez-Alvarez, A., Hernandez-Vivanco, A., Cano-Abad, M., and Albillos, A. (2008) Pharmacological and biophysical properties of Ca²⁺ channels and subtype distributions in human adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch.* **456**, 1149-1162
80. Coupland, R. E. (1953) On the morphology and adrenaline-nor-adrenaline content of chromaffin tissue. *J. Endocrinol.* **9**, 194-203
81. Criado, M., Dominguez del Toro, E., Carrasco-Serrano, C., Smillie, F. I., Juiz, J. M., Viniegra, S., and 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**, 6554-6564
82. Wurtman, R. J., and Axelrod, J. (1965) Adrenaline synthesis: Control by the pituitary gland and adrenal glucocorticoids. *Science* **150**, 1464-1465
83. Kvetnansky, R., Kubovcaková, L., Tillinger, A., Micutkova, L., Krizanová, O., and Sabban, E. L. (2006) Gene expression of phenylethanolamine N-methyltransferase in corticotropin-releasing hormone knockout mice during stress exposure. *Cell. Mol. Neurobiol.* **26**, 735-754
84. Tai, T. C., Claycomb, R., Siddall, B. J., Bell, R. A., Kvetnansky, R., and Wong, D. L. (2007) Stress-induced changes in epinephrine expression in the adrenal medulla in vivo. *J. Neurochem.* **101**, 1108-1118
85. Mueller, R. A., Thoenen, H., and Axelrod, J. (1970) Inhibition of neuronally induced tyrosine hydroxylase by nicotinic receptor blockade. *Eur. J. Pharmacol.* **10**, 51-56
86. Gueorguiev, V. D., Frenz, C. M., Ronald, K. M., and Sabban, E. L. (2004) Nicotine and epibatidine triggered prolonged rise in calcium and TH gene transcription in PC12 cells. *Eur. J. Pharmacol.* **506**, 37-46
87. Serova, L., and Sabban, E. L. (2002) Involvement of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors in gene expression of dopamine biosynthetic enzymes in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **303**, 896-903

88. Coggan, J. S., Paysan, J., Conroy, W. G., and Berg, D. K. (1997) Direct recording of nicotinic responses in presynaptic nerve terminals. *J. Neurosci.* **17**, 5798-5806
89. Buttigieg, J., Brown, S., Holloway, A. C., and Nurse, C. A. (2009) Chronic nicotine blunts hypoxic sensitivity in perinatal rat adrenal chromaffin cells via upregulation of KATP channels: Role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor and hypoxia-inducible factor-2alpha. *J. Neurosci.* **29**, 7137-7147
90. Chiappinelli, V. A., and Giacobini, E. (1978) Time course of appearance of alpha-bungarotoxin binding sites during development of chick ciliary ganglion and iris. *Neurochem. Res.* **3**, 465-478
91. Yamada, S., Kagawa, Y., Isogai, M., Takayanagi, N., and Hayashi, E. (1986) Ontogenesis of nicotinic acetylcholine receptors and presynaptic cholinergic neurons in mammalian brain. *Life Sci.* **38**, 637-644
92. Aubert, I., Cecyre, D., Gauthier, S., and Quirion, R. (1996) Comparative ontogenic profile of cholinergic markers, including nicotinic and muscarinic receptors, in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **369**, 31-55

Received April 8, 2010; currently under review.

Fig. 1

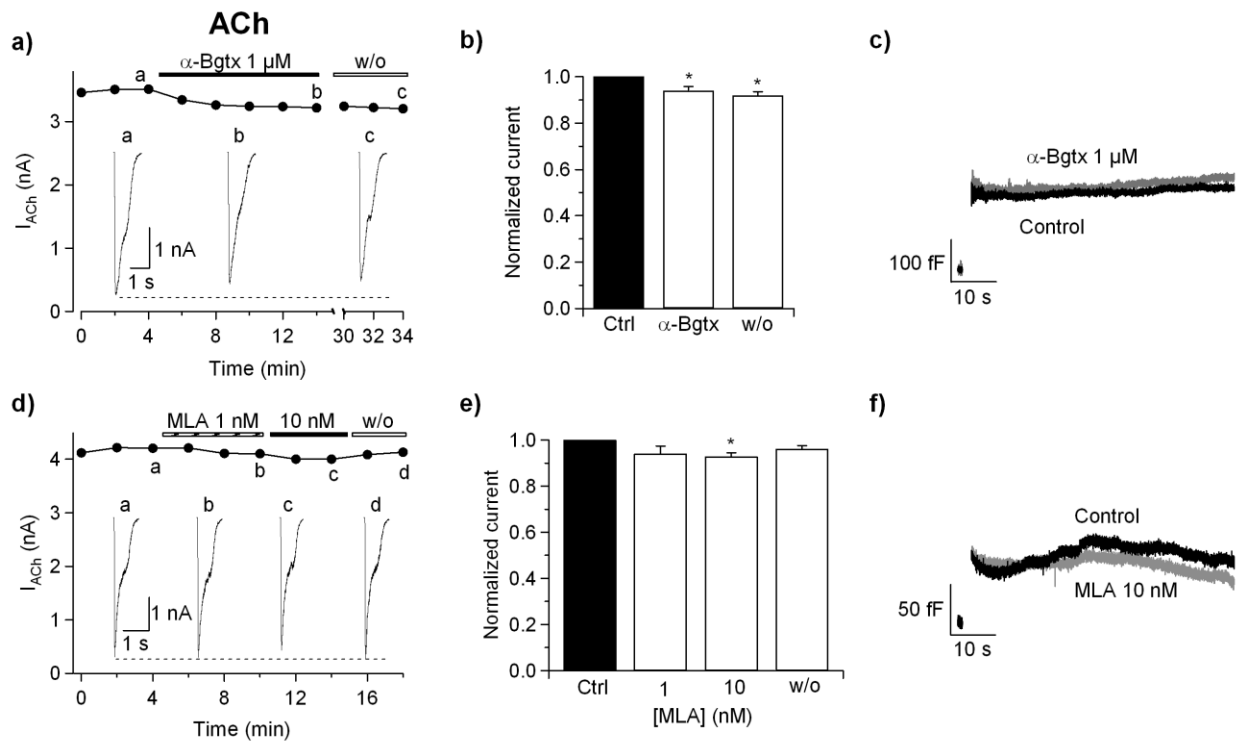


Figure 1. α -Bgtx and MLA blockade of ACh evoked currents and secretion.

200 ms pulses of 300 μ M ACh were applied every 2 min. Time course of blockade exerted by α -Bgtx 1 μ M (a) or MLA 1-10 nM (d) on the ACh elicited currents. Bar diagrams represent means \pm SEM and show the extent and reversibility of blockade by α -Bgtx (n=5) (b) or MLA (n=5) (e). Secretory responses as measured by membrane capacitance were unaffected by α -Bgtx (c) or MLA (f). Asterisk indicates statistical significance (*P<0.05). Paired Student's t-test.

Fig. 2

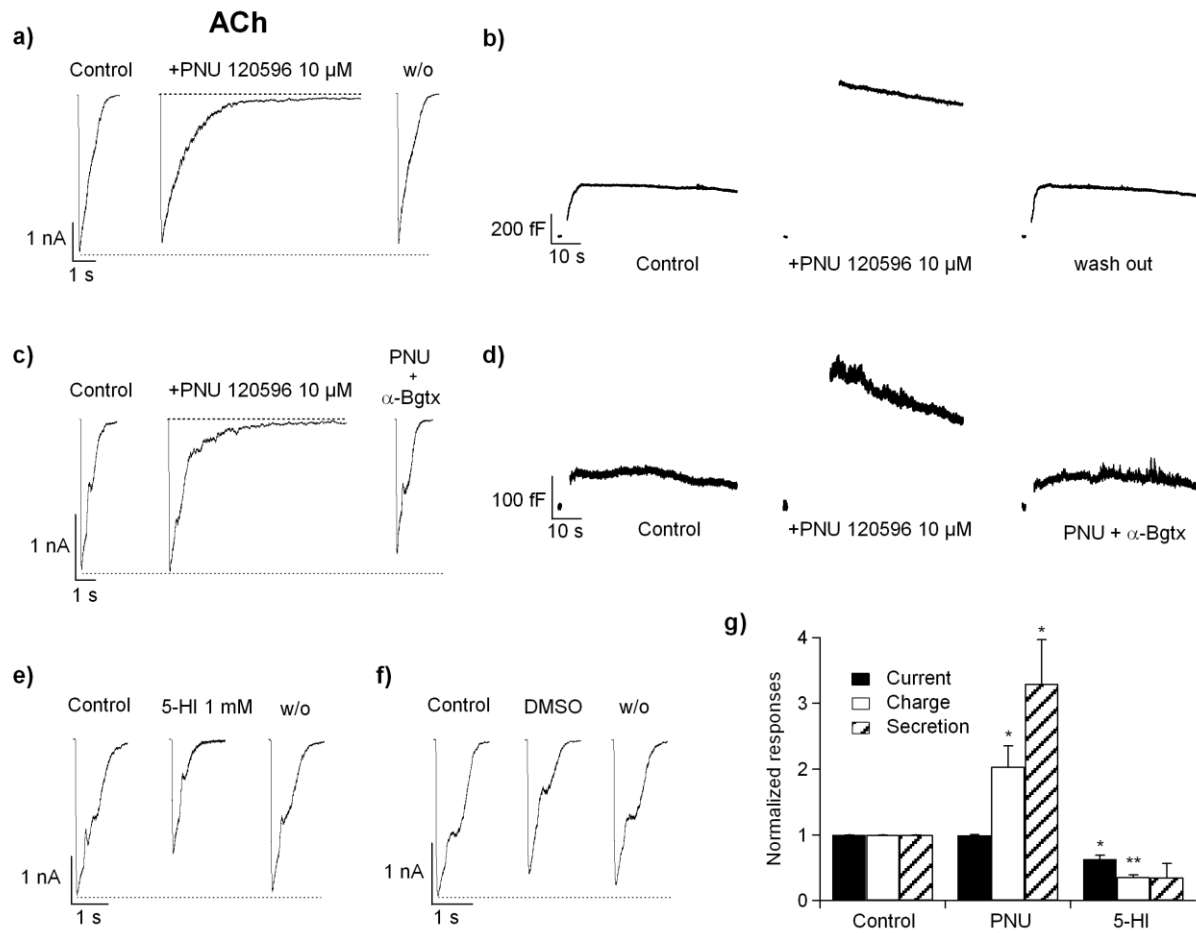
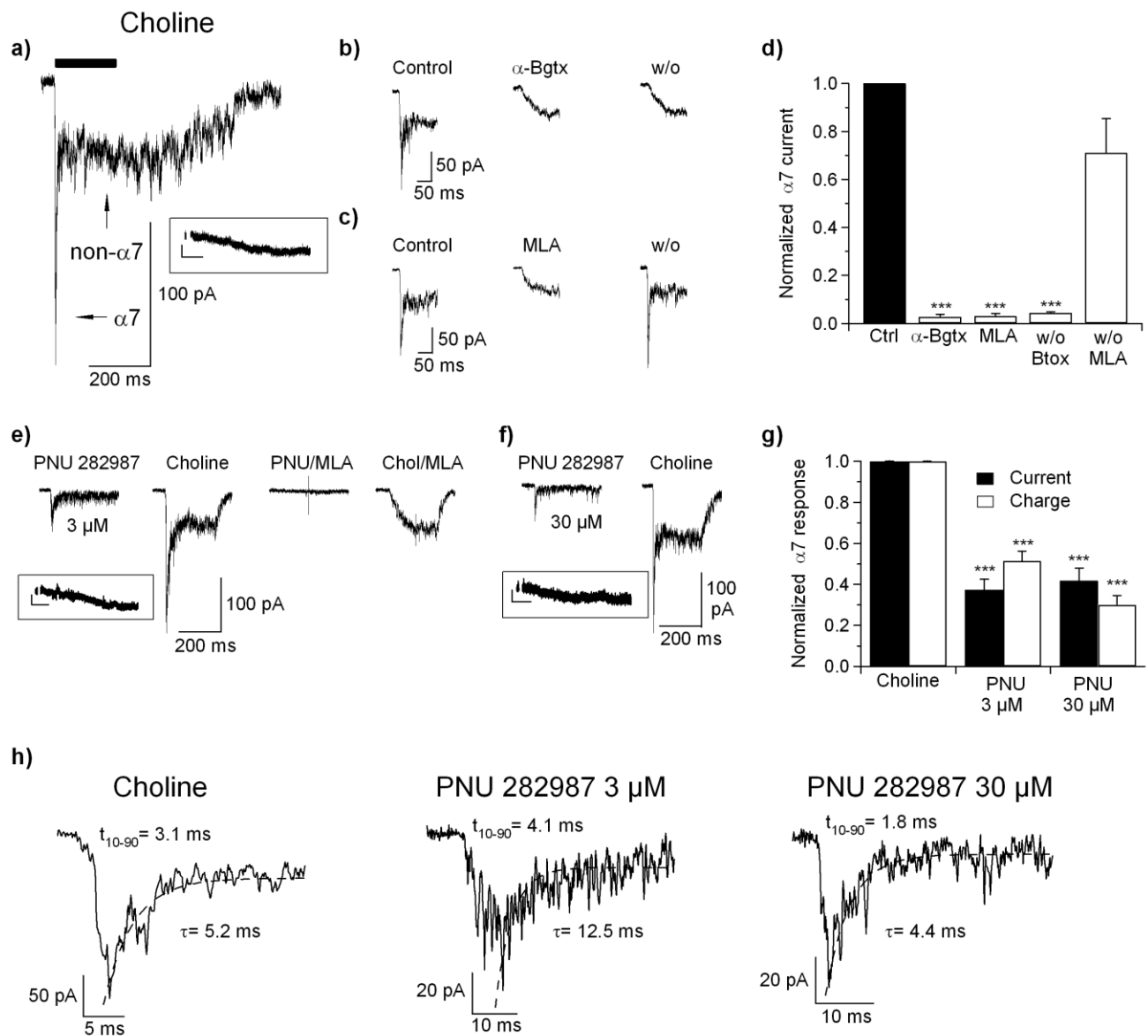


Figure 2. Effect of $\alpha 7$ nAChR PAMs on ACh evoked currents.

200 ms pulses of 300 μ M ACh were applied every 5 min. Original recordings of currents (a) and membrane capacitance (b) evoked by ACh in the presence or absence of PNU 120596 10 μ M. Blockade of PNU 120596 potentiation of ACh elicited currents and secretion by α Bgtx are shown in panels c and d, respectively. Perfusion and wash out of 5-HI 1 mM (e), or the solvent DMSO (f) at 0.1%, used to dissolve 5-HI or PNU 120596. Bar diagram comparing the effects of PNU 120596 (n=4) and 5-HI (n=5) on the ACh current, charge, and secretion (g). Asterisks indicate statistical significance (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). Student's paired t-test.

Fig. 3**Figure 3. Characterization of $\alpha 7$ currents evoked by $\alpha 7$ nAChR agonists.**

Choline pulses (10 mM, bar represents 200 ms of drug application) elicit a biphasic current response (a) with a fast ($\alpha 7$) and slow component (non- $\alpha 7$). There is no sizeable secretory response to this stimulus (see inset to the membrane capacitance recording, calibration bar 20 fF, 10 s). Original recordings showing selective blockade of the $\alpha 7$ component by α -Bgtx 1 μ M (b) or MLA 10 nM (c). Bar diagram (d) showing statistical significance of the $\alpha 7$ component blockade (and wash out) exerted by α -Bgtx (n=6), and MLA (n=8). Original recordings of currents and membrane capacitances elicited by the selective $\alpha 7$ agonist 3 μ M PNU 282987 and choline in the same cell (e). MLA abolished the $\alpha 7$ component activated by both agonists. PNU 282987 at 30 μ M elicits an $\alpha 7$ current of similar magnitude to 3 μ M and no secretion (f). Bar diagram comparing the current and charge elicited by pulses of PNU 282987 3 μ M and 30 μ M (n=6) normalized to the choline response in the same cell (g). Asterisks indicate statistical significance (***P < 0.001). Student's paired t test. In panel h, current activation and inactivation kinetics elicited by choline or PNU282987 were analyzed and compared. Activation was determined as the time between 10% and 90% activation (t_{10-90}), while inactivation was fitted to a single exponential curve (dashed line is the fitted curve).

Fig. 4

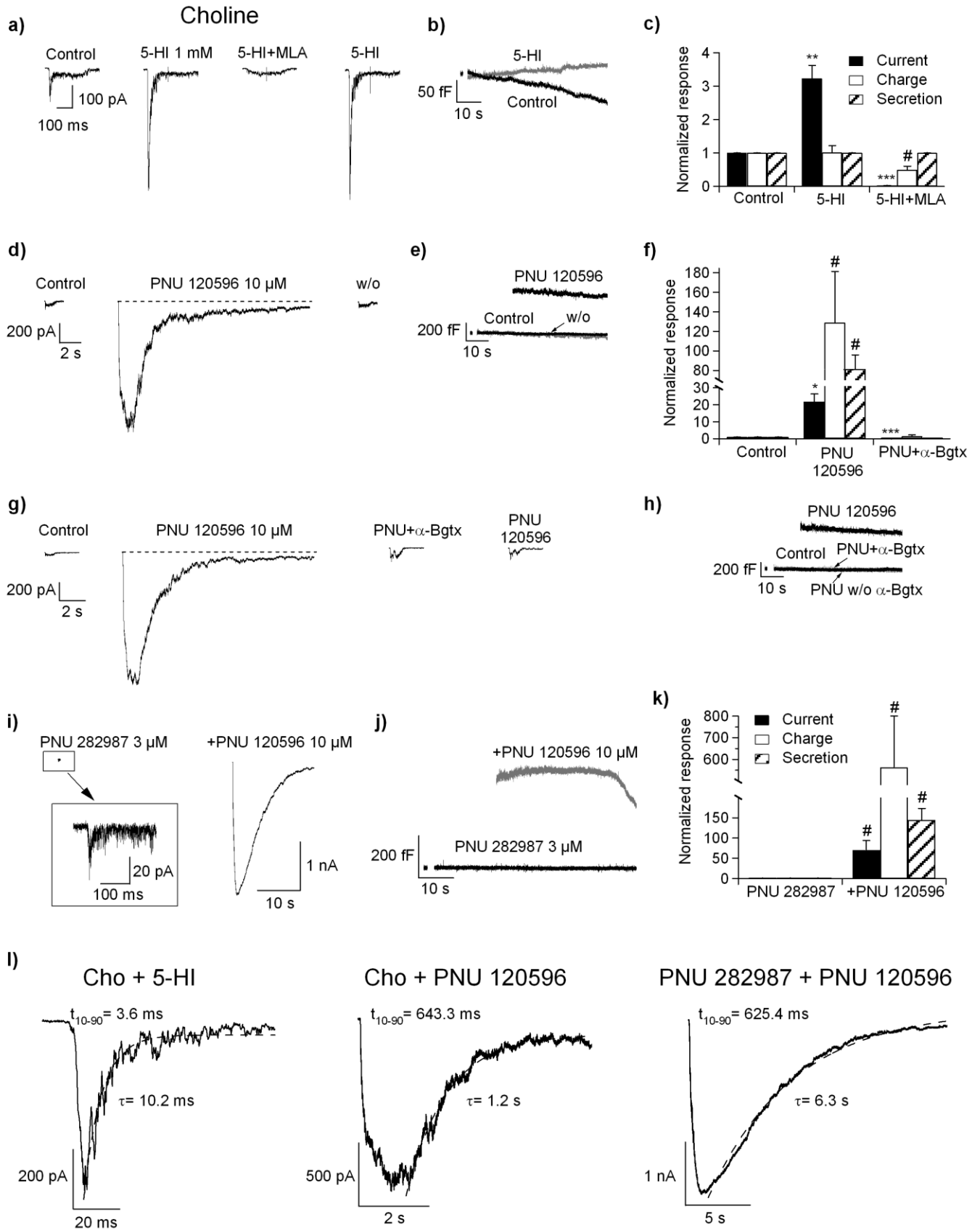


Fig. 4

Figure 4. Potentiation of the $\alpha 7$ nAChR current and secretion by PAMs.

Original recordings of potentiation and blockade of choline currents by 5-HI 1 mM and 5-HI+MLA (a). Current potentiation did not affect the secretory response (b). Potentiation by 10 μ M PNU 120596 of choline elicited currents is shown in panels *d* and *g* along with wash out and specific blockade of $\alpha 7$ current potentiation by α -Bgtx. The corresponding secretory responses were also selectively potentiated and blocked (e, h). Bar diagrams showing the effect on choline responses exerted by 5-HI (n=5) or 5-HI+MLA (c), PNU 120596 (n=6) or PNU120596 plus α -Bgtx (f).

3 μ M PNU 282987-elicited currents (i) and secretion (j) were also strongly potentiated by PNU 120596. Bar diagrams showing the effect of PNU 120596 on the 3 μ M PNU 282987 responses (n=5) (k). Asterisks indicate statistical significance (#P<0.05, *P<0.01, **P<0.005, ***P<0.001). Student's paired t test. The current activation and inactivation kinetics elicited by choline in the presence of 5-HI or PNU 120596, or PNU 282987 plus PNU 120596, were analyzed and compared. Activation was determined as the time between 10% and 90% activation (t_{10-90}), while inactivation was fitted to a single exponential curve (dashed line is the fitted curve) (h).

Fig. 5

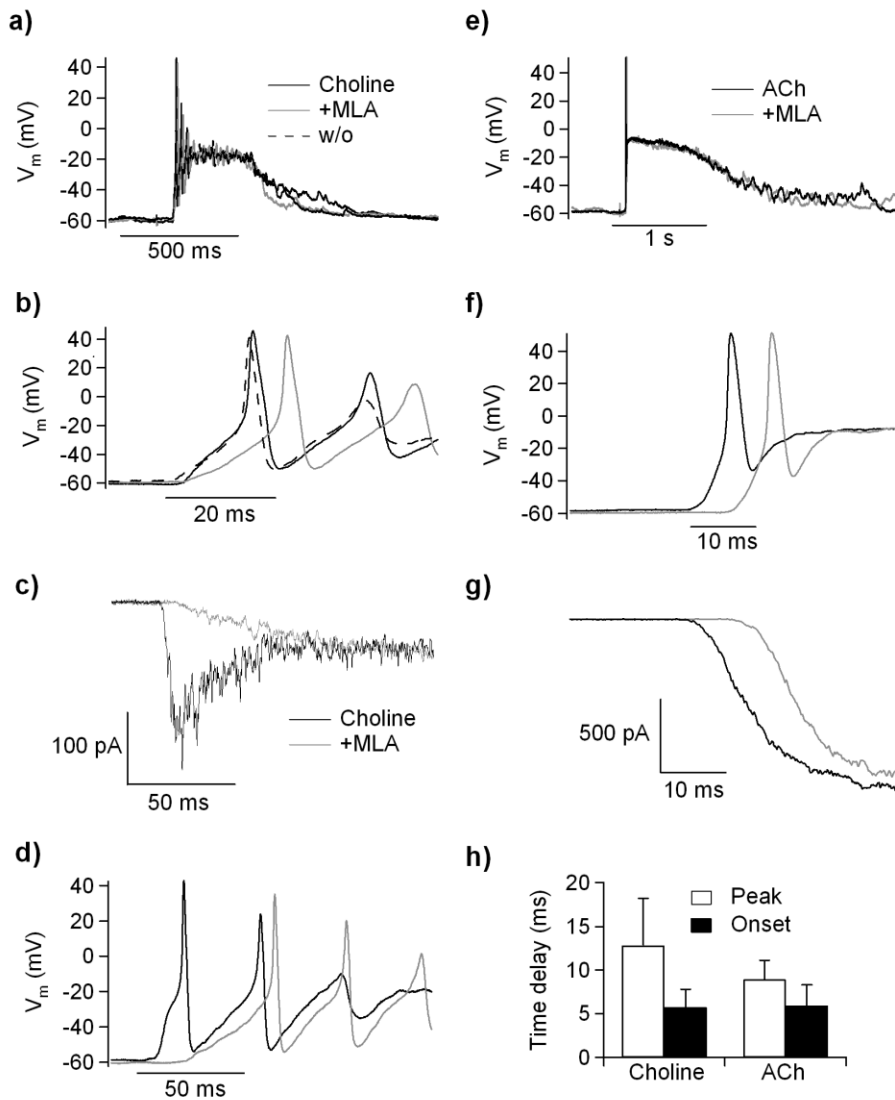


Figure 5. Fast-onset membrane depolarization mediated by $\alpha 7$ nAChRs.

Original recordings obtained in the current clamp configuration by applying 200 ms choline pulses in the presence or absence of MLA 10 nM (a). Detail of the initial part of the previous recordings, showing a delay in depolarization onset (b). Blockade of the initial fast component of the current (recorded in the voltage clamp mode) elicited by choline (c) correlates with a clear delay in depolarization (recorded in the current clamp mode) produced in the same cell (d). Responses to ACh pulses recorded in the current clamp configuration before and after perfusion with MLA 10 nM (e) and detail of the initial part of this response showing a delay in depolarization onset (f). In addition, the nicotinic current recorded under voltage clamping in the same cell shows an onset delay (g). Bar diagram showing mean delay of the peak and onset of the depolarization in response to MLA 10 nM plus choline (n=7) or ACh (n=6). Bars represent mean \pm SEM.

Fig. 6

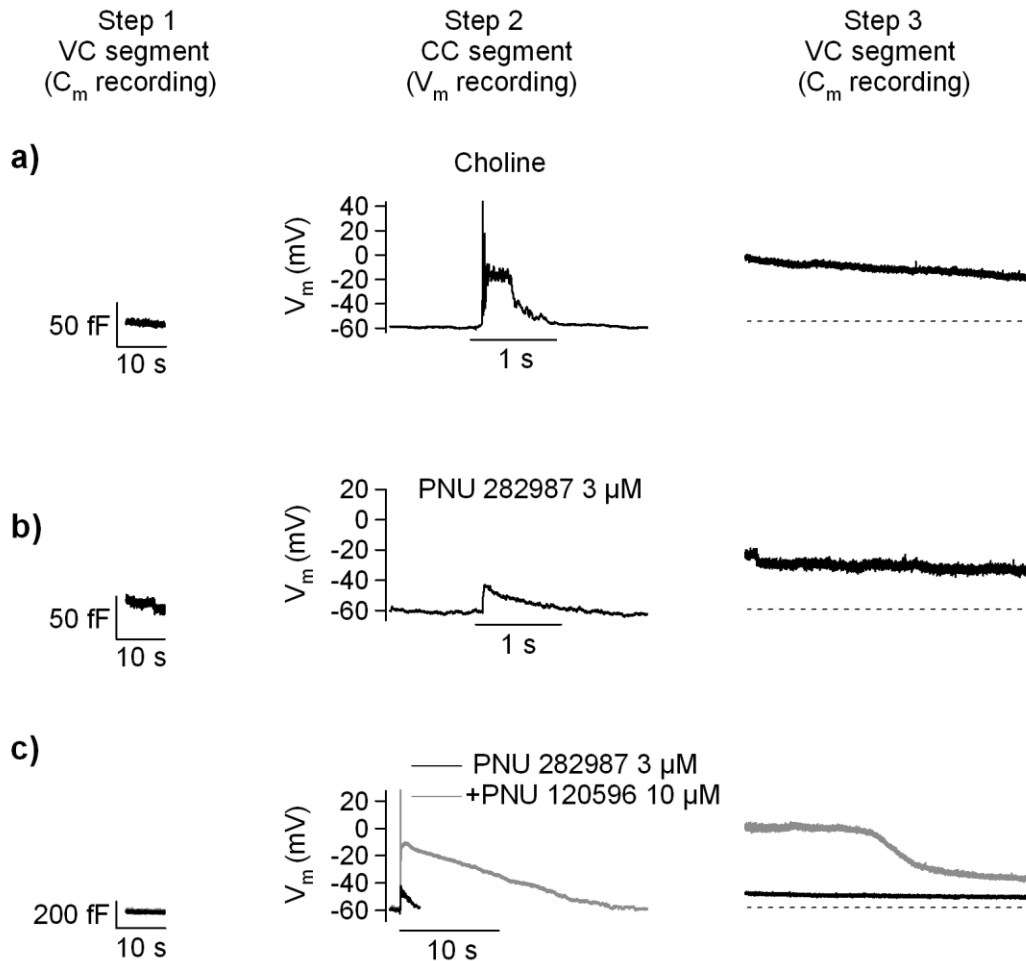
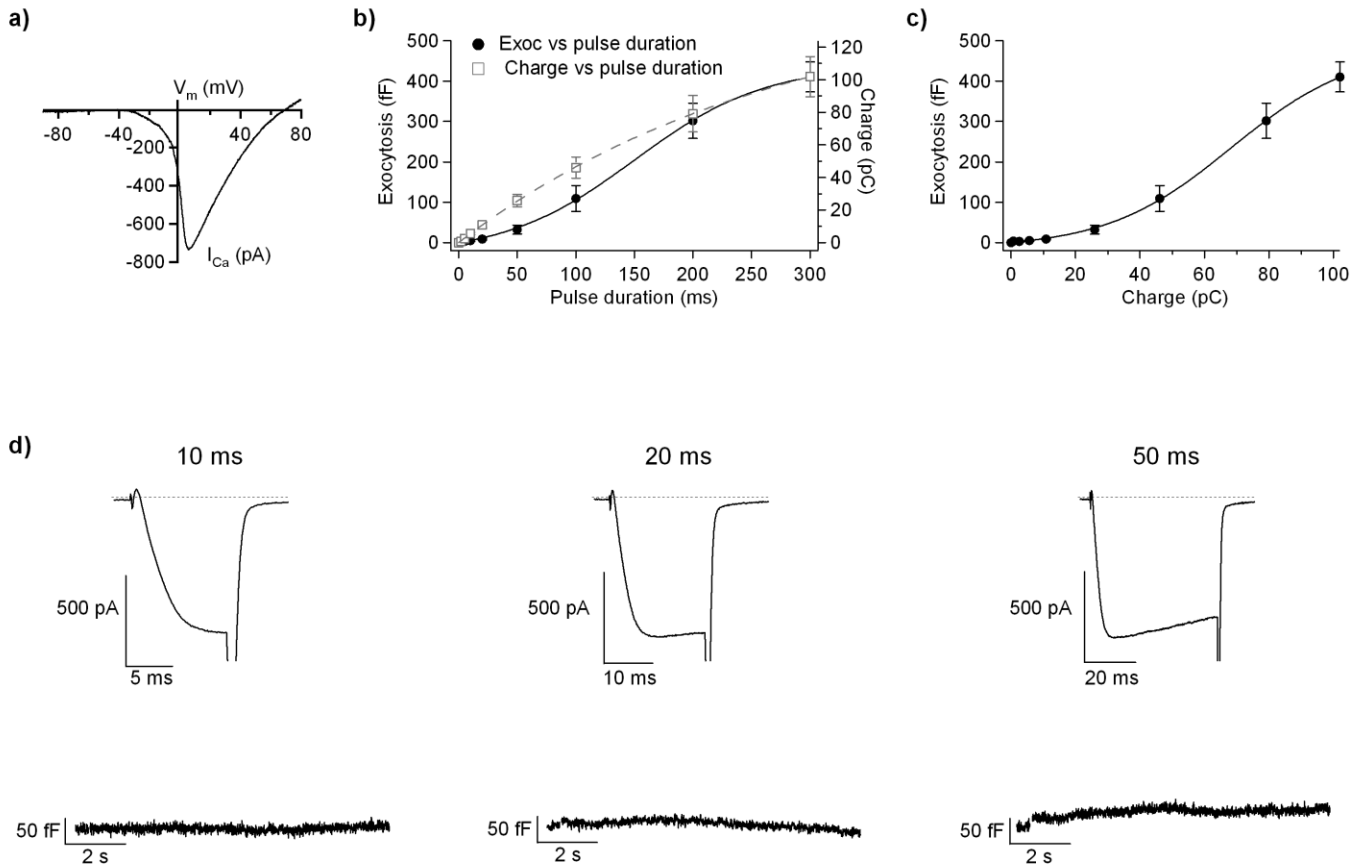


Figure 6. Secretion induced by $\alpha 7$ nAChR mediated depolarization.

Secretory responses recorded after applying either choline (a) or PNU 282987 3 μ M (b) in the current clamp configuration to induce depolarization. A modification of the “triple step” protocol described by Pérez-Alvarez and Albillos (56) was performed to measure the secretory responses evoked by 10 mM choline (a), 3 μ M PNU 282987 (b) or 3 μ M PNU 282987 plus 10 μ M PNU 120596 (c), applied in the current clamp configuration to induce depolarization. In the first step, the basal C_m was recorded by applying a sine wave in the voltage clamp mode. Step 2 was performed under the current clamp configuration to allow the agonist to depolarize the plasma membrane and evoke exocytosis, which was measured in Step 3 by recording C_m in the voltage clamp configuration. V_h was -60 mV, as a potential close to the resting membrane potential of human chromaffin cells.



Supplemental figure 1. Ca^{2+} currents and secretion. Threshold Ca^{2+} charge for secretion.

A ramp protocol from -100 mV to +80 mV was undertaken to obtain the peak Ca^{2+} current voltage (a). Square-step depolarizing pulses of increasing duration at that voltage, usually around +10 mV, were then applied every 30 s and 1 min for pulses of duration below and above 100 ms, respectively. The plots show current charge and exocytosis against pulse duration (b) and exocytosis against charge (c) for the different pulses. Threshold secretion was obtained at 20 ms pulses, rendering secretory responses of 8.9 ± 2.9 fF (c). The Ca^{2+} current charge corresponding to these responses was 10.9 ± 1.6 pC. Original recordings of Ca^{2+} currents and membrane capacitances produced by pulses of 10 ms, 20 ms and 50 ms are shown in panel d (n=5).

DISCUSIÓN

1. EL PAPEL FUNDAMENTAL DEL RECEPTOR NICOTÍNICO

En este primer trabajo, abordamos el estudio del acoplamiento estímulo-secreción en la célula cromafín humana (Douglas y Rubin, 1961). Estudiamos la respuesta secretora total al agonista endógeno ACh, empleando la técnica de “patch clamp” en célula única.

En primer lugar, observamos la capacidad de pulsos cortos de ACh 300 μ M (200 ms) de activar selectivamente el receptor nicotínico humano. La corriente nicotínica en la célula cromafín bovina está compuesta de ~2% de calcio (Vernino y col., 1992; Zhou y Neher, 1993), suficiente para generar una respuesta secretora (Douglas y Rubin, 1963; Gandía y col., 1991; Mollard y col., 1995). En nuestro estudio, el receptor humano nativo también parece permear calcio, y es capaz de generar una respuesta secretora en ausencia de despolarización. Estudiamos la dependencia de la respuesta secretora de los depósitos intracelulares de calcio pero la perfusión de un cóctel de depleción de calcio de depósitos (cafeína, rianodina y tapsigargina) produjo un importante bloqueo de la corriente nicotínica, lo que nos impidió llegar a ninguna conclusión. En la célula cromafín bovina, la exocitosis producida por la activación del receptor nicotínico sí parece depender de depósitos intracelulares de calcio (Mollard y col., 1995), pero cabe resaltar que en este estudio se compararon células tratadas con tapsigargina y células sin tratar. Este método impide conocer cuál era la respuesta inicial de corriente y secreción y si en las células tratadas, además de presentar una secreción menor que el grupo control, la corriente era mayor antes del tratamiento o no. Además, el tratamiento con tapsigargina afecta a los niveles citosólicos basales de calcio, bloquea la corriente de calcio e induce una respuesta secretora que podría afectar a la exocitosis inducida por agonistas nicotínicos (Fomina y Nowycky, 1999).

En segundo lugar, la técnica de patch clamp no permite la medida de la capacidad de la membrana en el modo de fijación de corriente. Para poder medir la respuesta secretora total en respuesta a ACh diseñamos un protocolo electrofisiológico innovador que permite el cambio rápido entre las configuraciones de fijación de voltaje y fijación de corriente. De esta manera pudimos registrar con alta resolución tanto la la respuesta secretora a ACh debido al flujo por el ionóforo del receptor en la configuración de voltaje como la secreción total en respuesta a ACh. Esta última se produce debido a la corriente del receptor nicotínico que genera una despolarización y una respuesta secretora que dobla el valor obtenido en la configuración de fijación de voltaje. La despolarización consta de una rápida espiga inicial, similar a un potencial de acción, seguida de una fase de despolarización intermedia y estable. En la generación de la espiga inicial hemos observado que contribuyen los canales de sodio dependientes de voltaje sensibles a TTX puesto que la perfusión de la toxina eliminó el pico generado. La causa del incremento en la respuesta secretora producida por la despolarización, respecto a la observada en ausencia de despolarización, se debe a la participación de los canales de calcio dependientes de voltaje puesto que la perfusión de cadmio consiguió abolir esta respuesta secretora (en células que sólo presentaban respuesta secretora tras la despolarización).

En tercer lugar, la aplicación prolongada de ACh (15s) reveló una amplia desensibilización de la corriente inicial al final del pulso. Sin embargo, la pequeña corriente resistente a la inactivación (~15 pA) fue capaz de mantener una despolarización sostenida durante la perfusión del agonista. En esta respuesta despolarizante sostenida participarían los canales de calcio dependientes de voltaje puesto que la perfusión del bloqueante inespecífico cadmio (200 μ M) afectó drásticamente al mantenimiento de la despolarización en los pulsos largos.

En cuarto y último lugar, observamos que la estimulación muscarínica prolongada (pulsos de 15s de metacolina 100 μ M o ACh en presencia de mecamilamina 10 μ M) produjo una respuesta secretora de lento inicio. Mientras que en otras especies, excepto la bovina, la estimulación muscarínica afecta a la excitabilidad celular (Olivos y Artalejo, 2008), en la célula cromafín humana no observamos ninguna corriente ni despolarización. La respuesta secretora observada se debe a la liberación de calcio de depósitos intracelulares, puesto que la perfusión del cóctel de depleción de calcio de depósitos intracelulares (cafeína, rianodina y tapsigargina) abolió la respuesta. Esta respuesta se recuperó tras el lavado del cóctel. La liberación de calcio de depósitos intracelulares inducida por la estimulación de receptores muscarínicos está ligada a la activación de los subtipos M_1 , M_3 o M_5 , lo que nos sugiere que uno de estos subtipos estaría presente en la célula cromafín humana.

En suma, la estimulación con pulsos cortos de ACh de la célula cromafín humana en cultivo revela que: i) el receptor nicotínico genera una respuesta secretora a potenciales de membrana hiperpolarizados (Mollard y col., 1995); ii) a potenciales despolarizados, los canales de calcio dependientes de voltaje contribuyen a la secreción. Estos serían reclutados por la despolarización generada por la corriente que fluye a través del receptor nicotínico, amplificando la señal de calcio citosólico (Khiroug y col., 1997) y la respuesta secretora producida por éste, duplicándola. Esta situación podría darse *in vivo* en condiciones de estimulación fásica, si la transmisión es exclusivamente sináptica (Coupland, 1965).

En situaciones de estimulación prolongada con pulsos largos de ACh (15s) hemos observado que la activación sostenida del receptor nicotínico mantiene una despolarización de larga duración debido a la contribución de los canales de calcio dependientes de voltaje. Además, este tipo de estímulo también

evocaría una respuesta secretora por la activación muscarínica, lo que podría compensar una posible inactivación de conductancias dependientes de voltaje. En el caso de un hipotético fenómeno de transmisión por volumen ((Zoli y col., 1999)Zoli y col., 1999), es posible que el amplio factor de seguridad del receptor nicotínico permitiese la generación de corrientes nicotínicas capaces de despolarizar la membrana (Fenwick y col., 1982a) y evocar una respuesta secretora.

2. LOS SUBTIPOS DE CANALES DE CALCIO Y SU DISTRIBUCIÓN

Hemos abordado el estudio de los canales de calcio presentes en la célula cromafín humana aislada en cultivo empleando la técnica de “patch clamp” en su configuración de parche perforado. Esta técnica parece ser determinante para la detección del canal $Ca_v2.3$ en la célula cromafín. Se postula que en la configuración tradicional de célula entera, algún componente citosólico imprescindible para la función de este canal se dializa (Albillos y col., 2000), lo que imposibilita el registro de sus corrientes. Se han encontrado hasta cinco tipos de canales de calcio dependientes de voltaje en la célula cromafín (García y col., 2006). En este trabajo hemos observado la presencia de los canales Ca_v1 , $Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$ y $Ca_v2.3$ en todas las células estudiadas. Pudimos observar dos poblaciones celulares atendiendo al canal de calcio predominante en respuesta a pulsos despolarizantes: una población presentó predominancia del canal $Ca_v2.1$ (51%) y otra del canal $Ca_v2.2$ (46%) mientras la población restante de canales (Ca_v1 y $Ca_v2.3$) guardaba la misma proporción entre ambos grupos (15% y 18%). Estos resultados se obtuvieron de manera consistente en experimentos realizados en el mismo día, empleando las mismas soluciones y en células cromafines provenientes de cinco cultivos diferentes. Las diferencias no pueden atribuirse a diferentes fenotipos catecolaminérgicos ya que el 99% de las células cromafines

humanas en cultivo mostraron un fenotipo adrenérgico al ser tratadas con un anticuerpo anti-PNMT.

El canal $Ca_v2.3$ fue detectado con técnicas electrofisiológicas e inmunocitoquímicas. Si embargo, en un estudio electrofisiológico previo realizado en células cromafines cultivadas a partir de un fragmento de un tumor benigno de médula adrenal humana (Gandía y col., 1998), este subtipo de canal no había sido identificado. Esto se debe probablemente al empleo de la configuración clásica de célula entera (Albillos y 2000).

Tampoco detectamos ninguna corriente atribuible a un canal Ca_v3 puesto que en las curvas de intensidad-voltaje no observamos el característico hombro a potenciales en torno a -20 mV debido a este canal (Novara y col., 2004; Randall y Tsien, 1997; Perez-Reyes y col., 1998). En experimentos adicionales para confirmar que la corriente resistente, tras el bloqueo de los canales Ca_v1 , $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ era debida al canal $Ca_v2.3$, dicha corriente no mostró sensibilidad a níquel ni cinéticas lentas de deactivación de la corriente esperadas para un canal Ca_v3 (Randall y Tsien, 1995; Novara y col., 2004).

La presencia de diferentes proporciones de canales de tipo $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ también ha sido documentada en neuronas (Wheeler y col., 1994; Luebke y col., 1993; Takahashi y Momiyama, 1993). Este hecho cobra especial relevancia ante la regulación diferencial que pueden sufrir estos canales. En las células cromafines, el ATP y los opioides inhiben en mayor medida los canales $Ca_v2.2$ (Currie y Fox, 1996; Albillos y col., 1996b). Además, ambos tipos de canales sufren una modulación diferencial durante la estimulación mediante potenciales de acción (Currie y Fox, 2002) y recientemente se ha descrito cómo la calmodulina afecta de manera diferente a la inactivación de estos dos canales (Wykes y col., 2007). La corriente debida a los canales $Ca_v2.2$ sólo se facilita un 20% frente a más de un 40% la

de los canales $Ca_v2.1$ (Currie y Fox, 2002) y también la inactivación dependiente de calcio regulada por calmodulina afecta principalmente a los canales $Ca_v2.2$ y a la respuesta exocitótica mediada por éstos (Wykes y 2007). Estos datos nos llevan a pensar que, en la médula adrenal humana, una misma señal presináptica podría producir una respuesta postsináptica diferente dependiendo de la distribución específica de canales del tipo celular donde dicha señal se transmita.

3. IDENTIFICACIÓN DEL RECEPTOR NICOTÍNICO $\alpha7$ Y SU FUNCIÓN EN LA CÉLULA CROMAFÍN HUMANA

En este trabajo abordamos el estudio del receptor nicotínico $\alpha7$ (Couturier y 1990; Séguela y 1993), su posible expresión en membrana y su función en la célula cromafín humana. Mousavi y (2001) detectaron la presencia de ARN mensajero para la subunidad $\alpha7$ en médula adrenal en la etapa fetal y adulta. Sin embargo, no existen evidencias previas de la expresión en membrana de un receptor conteniendo esta subunidad ni de cuál es su función en la célula cromafín de la especie humana. En la rata y el ratón se ha identificado la presencia de ARN mensajero que codifica para esta subunidad (Di Angelantonio y 2003; Wu y 2010) pero no se ha observado su presencia en membrana ni la formación de un receptor que contribuya a la corriente nicotínica (Di Angelantonio y 2003). En la célula cromafín bovina se detectó la presencia de receptores que unen α -Bgtx en la membrana celular en 1977 (Wilson y Kirshner). Más adelante, esta subunidad fue clonada (García-Guzman y 1995) y detectada en colocalización con la enzima PNMT, es decir, en células de fenotipo adrenérgico (Criado y col., 1997). Los autores de este trabajo determinaron que el factor de transcripción Egr-1 es el responsable de promover la expresión diferencial de estas proteínas en la célula cromafín bovina. Sin embargo, existe una gran controversia sobre si

este receptor que contiene la subunidad $\alpha 7$ es homomérico o no (Maneu y col., 2002), o si desempeña alguna función en la célula cromafín bovina (López y col., 1998; Broxton y 1999; Yokotani y col., 2002; Free y col., 2002).

En nuestro estudio observamos que en la especie humana, la célula cromafín en cultivo expresa receptores que contienen la subunidad $\alpha 7$, probablemente de naturaleza homomérica, y que son activados por pulsos cortos (200 ms) de los agonistas endógenos ACh (300 μ M) y colina (10 mM) (Albuquerque y 2009), y por el agonista sintético $\alpha 7$ PNU282987 (a 3 y 30 μ M) (Bodnar y col., 2005; Hajós y col., 2005).

La contribución del receptor $\alpha 7$ a la corriente nicotínica evocada por ACh se determinó empleando los bloqueantes selectivos α -Bgtx 1 μ M (bloqueo irreversible) y MLA 10 nM (bloqueo reversible). Esta contribución es de un 7%, y no parece ser de una magnitud suficiente como para participar en la respuesta secretora generada en ausencia de despolarización (en fijación de voltaje). El empleo del agonista colina permitió observar de manera más clara la corriente generada por el receptor $\alpha 7$, puesto que es un agonista total de este receptor (Papke y col., 1996; Alkondon y col., 1997) y muy parcial de los receptores no $\alpha 7$ (Papke y col., 1996; Fuentealba y col., 2004; Alkondon y col., 1997). La respuesta a colina es bifásica, con un primer componente de rápida activación e inactivación, y un segundo componente de lenta activación e inactivación inapreciable. El primero de los componentes se bloqueó de manera irreversible por α -Bgtx y de manera reversible por MLA. La irreversibilidad del bloqueo por α -Bgtx, y las características cinéticas del primer componente nos llevaron a denominarlo componente $\alpha 7$, en contraposición al segundo componente, que denominamos no $\alpha 7$.

La aplicación del agonista $\alpha 7$ específico PNU282987 generó una corriente rápida de una magnitud un 50% menor que el componente $\alpha 7$ de la respuesta a colina, y que se bloqueó totalmente por MLA 10 nM. Esta menor magnitud de la corriente podría deberse a una menor eficacia del agonista sobre los receptores $\alpha 7$ humanos o al efecto deletéreo sobre la corriente nicotínica que tiene el solvente (DMSO) en el que se disolvió el fármaco. Las corrientes generadas por colina y PNU282987 no generaron una respuesta secretora detectable a través de la medida de la capacidad de la membrana. El receptor nicotínico $\alpha 7$ humano presenta una alta permeabilidad a calcio (Fucile y 2003). Sin embargo, la magnitud de su corriente en la célula cromafín humana no parece ser suficiente para evocar una respuesta secretora por sí mismo. La carga de calcio que podría introducir no sería suficiente si se asume que el receptor puede encontrarse a la misma distancia de las vesículas secretoras que los canales de calcio (Klingauf y Neher, 1997).

Para profundizar en la caracterización de la corriente $\alpha 7$, analizamos la cinética de activación e inactivación de la corriente generada por colina 10 mM y PNU282987 a 3 y 30 μ M. Obtuvimos valores de activación ($t_{10-90\%}$) de 5.5 ms para colina y de 7.1 y 5.5 ms para las dos concentraciones de PNU282987, mientras que los valores de inactivación ($\tau_{inactiv}$) fueron de 8.5, 10 y 9.8 ms, respectivamente. Esta cinética rápida de activación y de inactivación es característica de los receptores $\alpha 7$ descritos en la literatura (Couturier y 1990; Zorumski y 1992; Alkondon y Albuquerque, 1993; Alkondon y 1997).

Hoy en día, la terapia con fármacos moduladores de la neurotransmisión endógena es una de las estrategias en la que la industria farmacéutica está centrando grandes esfuerzos y que ha dado buenos

resultados en el caso de la modulación del receptor GABA_A (Hevers y Luddens, 1998). Uno de los frutos resultantes de esta estrategia es la aparición de moduladores alostéricos positivos (MAPs) del receptor homomérico $\alpha 7$ como el 5-hidroxiindol (5-HI, Zwart y col., 2002) y el PNU120596 (Hurst y col., 2005). Empleamos estos potenciadores selectivos $\alpha 7$ para confirmar la presencia funcional de los receptores $\alpha 7$ en la célula cromafín humana. Perfundiendo 5-HI (1 mM) observamos un efecto potenciador selectivo sobre el componente $\alpha 7$ de la corriente en respuesta a colina que fue revertido por el lavado, o bloqueado por MLA 10 nM. Sin embargo, sobre la respuesta a ACh, la perfusión de 5-HI produjo un bloqueo significativo, probablemente debido al efecto bloqueante que tanto el solvente DMSO y el propio 5-HI producen sobre los receptores no $\alpha 7$ (Zwart y col., 2002) que participan en la respuesta a ACh (93% de contribución). El efecto potenciador de PNU120596 (10 μ M) fue mucho mayor que el obtenido con 5-HI tanto sobre la corriente y la secreción en respuesta a ACh y colina. Proporcionalmente, la respuesta de corriente y secreción que mayor potenciación sufrió fue la generada por el agonista PNU282987. En resumen, ambos potenciadores se comportaron de acuerdo al efecto descrito sobre la cinética de desensibilización de la corriente $\alpha 7$ (Gronlien y col., 2007). Los MAPs de tipo I como el 5-HI potencian el pico de la corriente sin afectar apreciablemente su cinética. Sin embargo, los de tipo II ralentizan notablemente la desensibilización de la corriente al margen de la enorme potenciación en la corriente al pico que producen a concentraciones en el rango submicromolar. En todos los casos, la potenciación se revirtió con el lavado del MAP y se bloqueó por la presencia en la solución de perfusión de MLA o α -Bgtx.

El ARN mensajero para la subunidad $\beta 2$ observado en la médula adrenal humana en sujetos adultos (Mousavi y col., 2001) y la reciente

identificación de receptores funcionales $\alpha 7$ heteroméricos ($\alpha 7\beta 2$) en el cerebro de la rata (Liu y col., 2009) nos llevó a preguntarnos si la respuesta $\alpha 7$ en la cromafín humana podría estar mediada por este receptor. La cinética observada para el receptor homomérico expresado de manera heteróloga (Kirough y col., 2002) o nativa (Liu y col., 2009) es significativamente más lenta que el de su análogo $\alpha 7$ homomérico. La constante de inactivación del receptor homomérico nativo (10.2 ± 1.5 ms) es similar a la que hemos encontrado en la célula cromafín humana (8.5 ± 0.4 ms). Por otro lado, la sensibilidad a DH β E observada para el receptor heteromérico es mucho mayor ($IC_{50} \sim 0.17$ μ M) que para el receptor homomérico ($IC_{50} > 100$ μ M). En experimentos preliminares no hemos observado un bloqueo significativo de la corriente evocada por ACh al perfundir DH β E 3 μ M (Pérez-Alvarez y col., datos sin publicar). En conjunto, estos datos en relación al receptor $\alpha 7\beta 2$, el bloqueo irreversible por α -Bgtx y la potenciación selectiva por los MAPs de la corriente $\alpha 7$ en la célula cromafín humana nos llevan a pensar que podría poseer un receptor $\alpha 7$ de tipo homomérico.

Por último, quisimos determinar cuál era la función que podía desempeñar el receptor nicotínico $\alpha 7$ en la célula cromafín humana. Atendiendo a sus características cinéticas, estudiamos cómo la presencia del receptor $\alpha 7$ afectaba a la respuesta despolarizante generada por ACh y colina.

Esta respuesta constaba de una espiga inicial similar a un potencial de acción seguida de una despolarización mantenida un periodo de tiempo equivalente a la duración de la corriente (1-2 s). Observamos que la perfusión de MLA 10 nM retrasaba la generación de la espiga inicial tanto en respuesta a ACh como a colina, si bien en este último caso la desaparición del componente rápido $\alpha 7$ inicial producía efectos más drásticos. El retraso del

inicio de la respuesta despolarizante y del pico de la espiga generada por ACh fue de 5.9 y 5.7 ms, respectivamente. Cuando el agonista empleado fue colina, el retraso de ambos parámetros fue de 8.9 y 12.8 ms, respectivamente. Por lo tanto, la presencia del componente nicotínico $\alpha 7$ permitía la generación temprana de una respuesta despolarizante ante un agonista endógeno como la ACh o la colina (Albuquerque y col., 2009). La ACh se libera en pulsos muy breves (1-2 ms) (Katz y Miledi, 1977), alcanza una concentración elevada (300 μM) en la hendidura sináptica (Corringer y col., 2000; Kuffler y Yoshikami, 1975; Changeux y Edelman, 2005) y se degrada rápidamente por la enzima AChE (Katz y Miledi, 1973). Durante los tiempos extremadamente cortos en los que la ACh permanecería en la hendidura sináptica, creemos que el receptor nicotínico $\alpha 7$, debido a sus características cinéticas, tendría un papel crucial para el inicio rápido de una respuesta postsináptica (ej. un potencial de acción o un EPSP y la liberación de neurotransmisores) que, de otra manera, no se llegaría a producir. Se ha observado que el papel del receptor $\alpha 7$ es crucial para una transmisión sináptica rápida (Zhang y col., 1996; Frazier y col., 1998; Alkondon y col., 1998; Ullian y col., 1997), especialmente en periodos de estimulación fásica a alta frecuencia (Chang y Berg, 1999; Bibevski y col., 2000). Gracias al desarrollo del protocolo triple desarrollado en el primer trabajo presentado (Perez-Alvarez y Albillos, 2007), también pudimos observar que la activación del receptor $\alpha 7$ produce una respuesta secretora debida a la despolarización que genera. A pesar de no permear el suficiente calcio o no estar a suficiente distancia de las vesículas secretoras para producir de por sí una respuesta secretora, el receptor nicotínico $\alpha 7$ genera una respuesta despolarizante que produce la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje que permear calcio y conducen a la liberación de neurotransmisores. Por lo tanto, el papel del receptor nicotínico $\alpha 7$ en la célula cromafín humana estaría directamente relacionado con una

liberación rápida de catecolaminas para preparar al organismo frente a una situación estresante de lucha o huída.

CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que conducen los resultados obtenidos son:

- Los receptores nicotínicos y muscarínicos controlan la secreción de neurotransmisores en la célula cromafín humana.
- El receptor nicotínico juega un papel primordial en este proceso, disparando la exocitosis a potenciales hiperpolarizados y reclutando canales de calcio que contribuyen en la misma medida a la secreción a potenciales despolarizados.
- El receptor nicotínico es el responsable de generar una respuesta secretora ante una estimulación corta de ACh (200 ms). Su factor de seguridad le permite generar despolarizaciones robustas con corrientes de intensidad variable. Sin embargo, ante una estimulación larga (15s), la pequeña corriente que persiste tras una gran inactivación mantiene una despolarización que recluta canales de calcio dependientes de voltaje que, a su vez, contribuyen al mantenimiento de la respuesta despolarizante prolongada.
- La estimulación muscarínica prolongada genera una lenta respuesta secretora, en ausencia de corriente o despolarización, y dependiente de depósitos intracelulares de calcio. Esto podría indicar la presencia de un receptor muscarínico de los subtipos M_1 , M_3 o M_5 .
- La célula cromafín humana expresa en su membrana canales de calcio funcionales Ca_v1 , $Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$ y $Ca_v2.3$, pero no Ca_v3 .
- Existen dos poblaciones diferenciadas según la contribución predominante del canal $Ca_v2.1$ o $Ca_v2.2$ a la corriente total. Esta circunstancia podría permitir una regulación diferencial a nivel celular de la entrada de calcio y la respuesta secretora.
- Las células cromafines humanas en cultivo presentan un fenotipo adrenérgico.

- El receptor nicotínico $\alpha 7$ se expresa en la membrana de las células cromafines humanas y contribuye a la corriente inducida por ACh, colina y PNU282987.
- El receptor posee probablemente una distribución homomérica de las subunidades.
- Ante la presentación rápida de agonistas nicotínicos, su función es la de generar una respuesta despolarizante temprana que permite la apertura de canales de calcio que conduce a la secreción de neurotransmisores.

BIBLIOGRAFÍA

- 1-Acker, B.A., E.J. Jacobsen, B.N. Rogers, D.G. Wishka, S.C. Reitz, D.W. Piotrowski, J.K. Myers, M.L. Wolfe, V.E. Groppi, B.A. Thornburgh, P.M. Tinholt, R.R. Walters, B.A. Olson, L. Fitzgerald, B.A. Staton, T.J. Raub, M. Krause, K.S. Li, W.E. Hoffmann, M. Hajos, R.S. Hurst, y D.P. Walker. 2008. Discovery of N-[(3R,5R)-1-azabicyclo[3.2.1]oct-3-yl]furo[2,3-c]pyridine-5-carboxamide as an agonist of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor: in vitro and in vivo activity. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 18:3611-3615.
- 2-Adler, L.E., L.D. Hoffer, A. Wisner, y R. Freedman. 1993. Normalization of auditory physiology by cigarette smoking in schizophrenic patients. *Am.J.Psychiatry.* 150:1856-1861.
- 3-Afar, R., J.M. Trifaro, y M. Quirk. 1993. Modulation of nicotinic acetylcholine receptor function in bovine adrenal chromaffin cells by thymopentin. *Brain Res.* 606:346-350.
- 4-Aguilar, J.S., J.J. Ballesta, J.A. Reig, M. Palmero, S. Viniegra, y M. Criado. 1992. Muscarinic receptor subtypes in bovine adrenal medulla. *Neurochem.Res.* 17:1235-1239.
- 5-Akaike, A., Y. Mine, M. Sasa, y S. Takaori. 1990a. A patch clamp study of muscarinic excitation of the rat adrenal chromaffin cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 255:340-345.
- 6-Akaike, A., Y. Mine, M. Sasa, y S. Takaori. 1990b. Voltage and current clamp studies of muscarinic and nicotinic excitation of the rat adrenal chromaffin cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 255:333-339.
- 7-Akaike, A., M. Sasa, Y. Tamura, H. Ujihara, y S. Takaori. 1993. Effects of protein kinase C on the muscarinic excitation of rat adrenal chromaffin cells. *Jpn.J.Pharmacol.* 61:145-148.
- 8-Akiyama, T., J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya, y Y. Fukami. 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J.Biol.Chem.* 262:5592-5595.
- 9-Albillos, A., F. Abad, y A.G. Garcia. 1992. Cross-talk between M2 muscarinic and D1 dopamine receptors in the cat adrenal medulla. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 183:1019-1024.
- 10-Albillos, A., A.R. Artalejo, M.G. Lopez, L. Gandia, A.G. Garcia, y E. Carbone. 1994. Calcium channel subtypes in cat chromaffin cells. *J.Physiol.* 477 (Pt 2):197-213.
- 11-Albillos, A., E. Carbone, L. Gandia, A.G. Garcia, y A. Pollo. 1996a. Opioid inhibition of Ca²⁺ channel subtypes in bovine chromaffin cells: selectivity of action and voltage-dependence. *Eur.J.Neurosci.* 8:1561-1570.
- 12-Albillos, A., E. Carbone, L. Gandia, A.G. Garcia, y A. Pollo. 1996b. Opioid inhibition of Ca²⁺ channel subtypes in bovine chromaffin cells: selectivity of action and voltage-dependence. *Eur.J.Neurosci.* 8:1561-1570.
- 13-Albillos, A., E. Carbone, L. Gandia, A.G. Garcia, y A. Pollo. 1996c. Opioid inhibition of Ca²⁺ channel subtypes in bovine chromaffin cells: selectivity of action and voltage-dependence. *Eur.J.Neurosci.* 8:1561-1570.
- 14-Albillos, A., L. Gandia, P. Michelena, J.A. Gilabert, M. del Valle, E. Carbone, y A.G. Garcia. 1996d. The mechanism of calcium channel facilitation in bovine chromaffin cells. *J.Physiol.* 494 (Pt 3):687-695.
- 15-Albillos, A., L. Gandia, P. Michelena, J.A. Gilabert, M. del Valle, E. Carbone, y A.G. Garcia. 1996e. The mechanism of calcium channel facilitation in bovine chromaffin cells. *J.Physiol.* 494 (Pt 3):687-695.
- 16-Albillos, A., A.G. Garcia, y L. Gandia. 1993. omega-Agatoxin-IVA-sensitive calcium channels in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett.* 336:259-262.
- 17-Albillos, A., E. Neher, y T. Moser. 2000. R-Type Ca²⁺ channels are coupled to the rapid component of secretion in mouse adrenal slice chromaffin cells. *J.Neurosci.* 20:8323-8330.
- 18-Albuquerque, E.X., E.F. Pereira, M. Alkondon, y S.W. Rogers. 2009. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol.Rev.* 89:73-120.

- 19-Aldea, M., K. Jun, H.S. Shin, E. Andres-Mateos, L.M. Solis-Garrido, C. Montiel, A.G. Garcia, y A. Albillos. 2002. A perforated patch-clamp study of calcium currents and exocytosis in chromaffin cells of wild-type and alpha(1A) knockout mice. *J.Neurochem.* 81:911-921.
- 20-Alkondon, M., E.F. Pereira, y E.X. Albuquerque. 1998. Alpha-Bungarotoxin- and Methyllycaconitine-Sensitive Nicotinic Receptors Mediate Fast Synaptic Transmission in Interneurons of Rat Hippocampal Slices. *Brain Res.* 810:257-263.
- 21-Alkondon, M., E.F. Pereira, W.S. Cortes, A. Maelicke, y E.X. Albuquerque. 1997. Choline is a selective agonist of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Eur.J.Neurosci.* 9:2734-2742.
- 22-Alkondon, M., E.F. Pereira, S. Wonnacott, y E.X. Albuquerque. 1992. Blockade of nicotinic currents in hippocampal neurons defines methyllycaconitine as a potent and specific receptor antagonist. *Mol.Pharmacol.* 41:802-808.
- 23-Allen, C.M., C.M. Ely, M.A. Juaneza, y S.J. Parsons. 1996. Activation of Fyn tyrosine kinase upon secretagogue stimulation of bovine chromaffin cells. *J.Neurosci.Res.* 44:421-429.
- 24-Aloe, L., y R. Levi-Montalcini. 1979. Nerve growth factor-induced transformation of immature chromaffin cells in vivo into sympathetic neurons: effect of antiserum to nerve growth factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 76:1246-1250.
- 25-Alonso, M.T., M.J. Barrero, P. Michelena, E. Carnicero, I. Cuchillo, A.G. Garcia, J. Garcia-Sancho, M. Montero, y J. Alvarez. 1999. Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in chromaffin cells seen from inside the ER with targeted aequorin. *J.Cell Biol.* 144:241-254.
- 26-Amenta, F., y S.K. Tayebati. 2008. Pathways of acetylcholine synthesis, transport and release as targets for treatment of adult-onset cognitive dysfunction. *Curr.Med.Chem.* 15:488-498.
- 27-Anand, R., W.G. Conroy, R. Schoepfer, P. Whiting, y J. Lindstrom. 1991. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes have a pentameric quaternary structure. *J.Biol.Chem.* 266:11192-11198.
- 28-Anand, R., X. Peng, y J. Lindstrom. 1993. Homomeric and native alpha 7 acetylcholine receptors exhibit remarkably similar but non-identical pharmacological properties, suggesting that the native receptor is a heteromeric protein complex. *FEBS Lett.* 327:241-246.
- 29-Anneren, G., S. Meurling, y L. Olsen. 1991. Megacystis-microcolon-intestinal hypoperistalsis syndrome (MMIHS), an autosomal recessive disorder: clinical reports and review of the literature. *Am.J.Med.Genet.* 41:251-254.
- 30-Arias, H.R. 1997. Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 25:133-191.
- 31-Arjona, V., A. Minguez-Castellanos, R.J. Montoro, A. Ortega, F. Escamilla, J.J. Toledo-Aral, R. Pardal, S. Mendez-Ferrer, J.M. Martin, M. Perez, M.J. Katati, E. Valencia, T. Garcia, y J. Lopez-Barneo. 2003. Autotransplantation of human carotid body cell aggregates for treatment of Parkinson's disease. *Neurosurgery.* 53:321-8; discussion 328-30.
- 32-Arredondo, J., V.T. Nguyen, A.I. Chernyavsky, D. Bercovich, A. Orr-Urtreger, W. Kummer, K. Lips, D.E. Vetter, y S.A. Grando. 2002. Central role of alpha7 nicotinic receptor in differentiation of the stratified squamous epithelium. *J.Cell Biol.* 159:325-336.
- 33-Arroyo, G., M. Aldea, J. Fuentealba, A. Albillos, y A.G. Garcia. 2003. SNX482 selectively blocks P/Q Ca²⁺ channels and delays the inactivation of Na⁺ channels of chromaffin cells. *Eur.J.Pharmacol.* 475:11-18.
- 34-Arroyo, G., J. Fuentealba, N. Sevane-Fernandez, M. Aldea, A.G. Garcia, y A. Albillos. 2006. Amperometric study of the kinetics of exocytosis in mouse adrenal slice chromaffin cells: physiological and methodological insights. *J.Neurophysiol.* 96:1196-1202.

- 35-Artalejo, A.R., A.G. Garcia, y E. Neher. 1993. Small-conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels in bovine chromaffin cells. *Pflugers Arch.* 423:97-103.
- 36-Artalejo, C.R. 1997. More on calcium currents. *Trends Neurosci.* 20:448-450.
- 37-Artalejo, C.R., M.E. Adams, y A.P. Fox. 1994. Three types of Ca²⁺ channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. *Nature.* 367:72-76.
- 38-Artalejo, C.R., M.A. Ariano, R.L. Perlman, y A.P. Fox. 1990. Activation of facilitation calcium channels in chromaffin cells by D1 dopamine receptors through a cAMP/protein kinase A-dependent mechanism. *Nature.* 348:239-242.
- 39-Artalejo, C.R., M.K. Dahmer, R.L. Perlman, y A.P. Fox. 1991a. Two types of Ca²⁺ currents are found in bovine chromaffin cells: facilitation is due to the recruitment of one type. *J.Physiol.* 432:681-707.
- 40-Artalejo, C.R., D.J. Mogul, R.L. Perlman, y A.P. Fox. 1991b. Three types of bovine chromaffin cell Ca²⁺ channels: facilitation increases the opening probability of a 27 pS channel. *J.Physiol.* 444:213-240.
- 41-Artalejo, C.R., R.L. Perlman, y A.P. Fox. 1992a. Omega-conotoxin GVIA blocks a Ca²⁺ current in bovine chromaffin cells that is not of the "classic" N type. *Neuron.* 8:85-95.
- 42-Artalejo, C.R., S. Rossie, R.L. Perlman, y A.P. Fox. 1992b. Voltage-dependent phosphorylation may recruit Ca²⁺ current facilitation in chromaffin cells. *Nature.* 358:63-66.
- 43-Asano, T., T. Ohta, K. Otsuguro, S. Ito, y Y. Nakazato. 1995. Muscarinic receptor subtypes mediating catecholamine secretion and increase in intracellular Ca²⁺ concentration in adrenal chromaffin cells of the guinea pig. *J.Vet.Med.Sci.* 57:1067-1071.
- 44-Assaf, S.Y., y S.H. Chung. 1984. Release of endogenous Zn²⁺ from brain tissue during activity. *Nature.* 308:734-736.
- 45-Aunis, D., y K. Langley. 1999. Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta Physiol.Scand.* 167:89-97.
- 46-Azam, L., U. Winzer-Serhan, y F.M. Leslie. 2003. Co-expression of alpha7 and beta2 nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within rat brain cholinergic neurons. *Neuroscience.* 119:965-977.
- 47-Backlund, E.O., P.O. Granberg, B. Hamberger, E. Knutsson, A. Martensson, G. Sedvall, A. Seiger, y L. Olson. 1985. Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. First clinical trials. *J.Neurosurg.* 62:169-173.
- 48-Badio, B., y J.W. Daly. 1994. Epibatidine, a potent analgetic and nicotinic agonist. *Mol.Pharmacol.* 45:563-569.
- 49-Baldelli, P., J.M. Hernandez-Guijo, V. Carabelli, M. Novara, T. Cesetti, E. Andres-Mateos, C. Montiel, y E. Carbone. 2004. Direct and remote modulation of L-channels in chromaffin cells: distinct actions on alpha1C and alpha1D subunits? *Mol.Neurobiol.* 29:73-96.
- 50-Ballesta, J.J., R. Borges, A.G. Garcia, y M.J. Hidalgo. 1989. Secretory and radioligand binding studies on muscarinic receptors in bovine and feline chromaffin cells. *J.Physiol.* 418:411-426.
- 51-Bannon, A.W., M.W. Decker, M.W. Holladay, P. Curzon, D. Donnelly-Roberts, P.S. Puttfarcken, R.S. Bitner, A. Diaz, A.H. Dickenson, R.D. Porsolt, M. Williams, y S.P. Arneric. 1998. Broad-spectrum, non-opioid analgesic activity by selective modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Science.* 279:77-81.
- 52-Barbara, J.G., V.S. Lemos, y K. Takeda. 1998a. Pre- and post-synaptic muscarinic receptors in thin slices of rat adrenal gland. *Eur.J.Neurosci.* 10:3535-3545.

- 53-Barbara, J.G., J.C. Poncer, R.A. McKinney, y K. Takeda. 1998b. An adrenal slice preparation for the study of chromaffin cells and their cholinergic innervation. *J.Neurosci.Methods.* 80:181-189.
- 54-Barbara, J.G., y K. Takeda. 1996. Quantal release at a neuronal nicotinic synapse from rat adrenal gland. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93:9905-9909.
- 55-Barron, B.A., L.C. Murrin, y T.D. Hexum. 1986. Muscarine binding sites in bovine adrenal medulla. *Eur.J.Pharmacol.* 122:269-273.
- 56-Bartos, M., K.L. Price, S.C. Lummis, y C. Bouzat. 2009. Glutamine 57 at the complementary binding site face is a key determinant of morantel selectivity for $\alpha 7$ nicotinic receptors. *J.Biol.Chem.* 284:21478-21487.
- 57-Bartus, R.T., R.L. Dean 3rd, B. Beer, y A.S. Lipka. 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science.* 217:408-414.
- 58-Bertrand, D., J.L. Galzi, A. Devillers-Thiery, S. Bertrand, y J.P. Changeux. 1993. Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90:6971-6975.
- 59-Bertrand, D., F. Picard, S. Le Hellard, S. Weiland, I. Favre, H. Phillips, S. Bertrand, S.F. Berkovic, A. Malafosse, y J. Mulley. 2002. How mutations in the nAChRs can cause ADNFLE epilepsy. *Epilepsia.* 43 Suppl 5:112-122.
- 60-Biales, B., M. Dichter, y A. Tischler. 1976. Electrical excitability of cultured adrenal chromaffin cells. *J.Physiol.* 262:743-753.
- 61-Bibeovski, S., Y. Zhou, J.M. McIntosh, R.E. Zigmond, y M.E. Dunlap. 2000. Functional nicotinic acetylcholine receptors that mediate ganglionic transmission in cardiac parasympathetic neurons. *J.Neurosci.* 20:5076-5082.
- 62-Bing, G., M.F. Notter, J.T. Hansen, C. Kellogg, J.H. Kordower, y D.M. Gash. 1990. Cografts of adrenal medulla with C6 glioma cells in rats with 6-hydroxydopamine-induced lesions. *Neuroscience.* 34:687-697.
- 63-Birks, R.I., y E.Y. Isacoff. 1988. Burst-patterned stimulation promotes nicotinic transmission in isolated perfused rat sympathetic ganglia. *J.Physiol.* 402:515-532.
- 64-Birnbaumer, L., K.P. Campbell, W.A. Catterall, M.M. Harpold, F. Hofmann, W.A. Horne, Y. Mori, A. Schwartz, T.P. Snutch, y T. Tanabe. 1994. The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* 13:505-506.
- 65-Birren, S.J., y D.J. Anderson. 1990. A v-myc-immortalized sympathoadrenal progenitor cell line in which neuronal differentiation is initiated by FGF but not NGF. *Neuron.* 4:189-201.
- 66-Bodnar, A.L., L.A. Cortes-Burgos, K.K. Cook, D.M. Dinh, V.E. Groppi, M. Hajos, N.R. Higdon, W.E. Hoffmann, R.S. Hurst, J.K. Myers, B.N. Rogers, T.M. Wall, M.L. Wolfe, y E. Wong. 2005. Discovery and structure-activity relationship of quinuclidine benzamides as agonists of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *J.Med.Chem.* 48:905-908.
- 67-Bonner, T.I., N.J. Buckley, A.C. Young, y M.R. Brann. 1987. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science.* 237:527-532.
- 68-Boorman, J.P., M. Beato, P.J. Groot-Kormelink, S.D. Broadbent, y L.G. Sivilotti. 2003. The effects of $\beta 3$ subunit incorporation on the pharmacology and single channel properties of oocyte-expressed human $\alpha 3\beta 4$ neuronal nicotinic receptors. *J.Biol.Chem.* 278:44033-44040.
- 69-Boorman, J.P., P.J. Groot-Kormelink, y L.G. Sivilotti. 2000. Stoichiometry of human recombinant neuronal nicotinic receptors containing the $\beta 3$ subunit expressed in *Xenopus* oocytes. *J.Physiol.* 529 Pt 3:565-577.

- 70-Bordia, T., S.R. Grady, J.M. McIntosh, y M. Quik. 2007. Nigrostriatal damage preferentially decreases a subpopulation of $\alpha 6\beta 2^*$ nAChRs in mouse, monkey, and Parkinson's disease striatum. *Mol.Pharmacol.* 72:52-61.
- 71-Borges, R., J.J. Ballesta, y A.G. Garcia. 1987. M2 muscarinoceptor-associated ionophore at the cat adrenal medulla. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 144:965-972.
- 72-Bormann, J., y D.E. Clapham. 1985. gamma-Aminobutyric acid receptor channels in adrenal chromaffin cells: a patch-clamp study. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 82:2168-2172.
- 73-Borovikova, L.V., S. Ivanova, M. Zhang, H. Yang, G.I. Botchkina, L.R. Watkins, H. Wang, N. Abumrad, J.W. Eaton, y K.J. Tracey. 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature.* 405:458-462.
- 74-Boulter, J., A. O'Shea-Greenfield, R.M. Duvoisin, J.G. Connolly, E. Wada, A. Jensen, P.D. Gardner, M. Ballivet, E.S. Deneris, y D. McKinnon. 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.* 265:4472-4482.
- 75-Bournaud, R., J. Hidalgo, H. Yu, E. Jaimovich, y T. Shimahara. 2001. Low threshold T-type calcium current in rat embryonic chromaffin cells. *J.Physiol.* 537:35-44.
- 76-Brandt, B.L., S. Hagiwara, Y. Kidokoro, y S. Miyazaki. 1976a. Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *J.Physiol.* 263:417-439.
- 77-Brandt, B.L., S. Hagiwara, Y. Kidokoro, y S. Miyazaki. 1976b. Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *J.Physiol.* 263:417-439.
- 78-Brejck, K., W.J. van Dijk, R.V. Klaassen, M. Schuurmans, J. van Der Oost, A.B. Smit, y T.K. Sixma. 2001. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature.* 411:269-276.
- 79-Briggs, C.A., D.G. McKenna, y M. Piattoni-Kaplan. 1995. Human alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor responses to novel ligands. *Neuropharmacology.* 34:583-590.
- 80-Broad, L.M., R. Zwart, K.H. Pearson, M. Lee, L. Wallace, G.I. McPhie, R. Emkey, S.P. Hollinshead, C.P. Dell, S.R. Baker, y E. Sher. 2006. Identification and pharmacological profile of a new class of selective nicotinic acetylcholine receptor potentiators. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 318:1108-1117.
- 81-Brodtkorb, E., y F. Picard. 2006. Tobacco habits modulate autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav.* 9:515-520.
- 82-Brookmeyer, R., E. Johnson, K. Ziegler-Graham, y H.M. Arrighi. 2007. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 3:186-191.
- 83-Brown, R.W., A.C. Collins, J.M. Lindstrom, y P. Whiteaker. 2007. Nicotinic alpha5 subunit deletion locally reduces high-affinity agonist activation without altering nicotinic receptor numbers. *J.Neurochem.* 103:204-215.
- 84-Broxton, N.M., J.G. Down, J. Gehrman, P.F. Alewood, D.G. Satchell, y B.G. Livett. 1999. Alpha-conotoxin Iml inhibits the alpha-bungarotoxin-resistant nicotinic response in bovine adrenal chromaffin cells. *J.Neurochem.* 72:1656-1662.
- 85-Butt, C.M., S.R. Hutton, M.J. Marks, y A.C. Collins. 2002. Bovine serum albumin enhances nicotinic acetylcholine receptor function in mouse thalamic synaptosomes. *J.Neurochem.* 83:48-56.
- 86-Buttigieg, J., S. Brown, A.C. Holloway, y C.A. Nurse. 2009. Chronic nicotine blunts hypoxic sensitivity in perinatal rat adrenal chromaffin cells via upregulation of KATP channels: role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor and hypoxia-inducible factor-2alpha. *J.Neurosci.* 29:7137-7147.

- 87-Callaghan, B., A. Haythornthwaite, G. Berecki, R.J. Clark, D.J. Craik, y D.J. Adams. 2008. Analgesic alpha-conotoxins Vc1.1 and Rg1A inhibit N-type calcium channels in rat sensory neurons via GABAB receptor activation. *J.Neurosci.* 28:10943-10951.
- 88-Campos-Caro, A., F.I. Smillie, E. Dominguez del Toro, J.C. Rovira, F. Vicente-Agullo, J. Chapuli, J.M. Juiz, S. Sala, F. Sala, J.J. Ballesta, y M. Criado. 1997. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors on bovine chromaffin cells: cloning, expression, and genomic organization of receptor subunits. *J.Neurochem.* 68:488-497.
- 89-Carabelli, V., I. Carra, y E. Carbone. 1998. Localized secretion of ATP and opioids revealed through single Ca²⁺ channel modulation in bovine chromaffin cells. *Neuron.* 20:1255-1268.
- 90-Carabelli, V., A. Giancippoli, P. Baldelli, E. Carbone, y A.R. Artalejo. 2003. Distinct potentiation of L-type currents and secretion by cAMP in rat chromaffin cells. *Biophys.J.* 85:1326-1337.
- 91-Carabelli, V., J.M. Hernandez-Guijo, P. Baldelli, y E. Carbone. 2001. Direct autocrine inhibition and cAMP-dependent potentiation of single L-type Ca²⁺ channels in bovine chromaffin cells. *J.Physiol.* 532:73-90.
- 92-Carabelli, V., A. Marcantoni, V. Comunanza, A. de Luca, J. Diaz, R. Borges, y E. Carbone. 2007. Chronic hypoxia up-regulates alpha1H T-type channels and low-threshold catecholamine secretion in rat chromaffin cells. *J.Physiol.* 584:149-165.
- 93-Carbone, A.L., M. Moroni, P.J. Groot-Kormelink, y I. Bermudez. 2009. Pentameric concatenated (alpha4)(2)(beta2)(3) and (alpha4)(3)(beta2)(2) nicotinic acetylcholine receptors: subunit arrangement determines functional expression. *Br.J.Pharmacol.* 156:970-981.
- 94-Cardoso, R.A., S.J. Brozowski, L.E. Chavez-Noriega, M. Harpold, C.F. Valenzuela, y R.A. Harris. 1999. Effects of ethanol on recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 289:774-780.
- 95-Carmichael, S.W. 1983. The adrenal chromaffin vesicle: an historical perspective. *J.Auton.Nerv.Syst.* 7:7-12.
- 96-Cartier, G.E., D. Yoshikami, W.R. Gray, S. Luo, B.M. Olivera, y J.M. McIntosh. 1996. A new alpha-conotoxin which targets alpha3beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *J.Biol.Chem.* 271:7522-7528.
- 97-Caulfield, M.P. 1993. Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol.Ther.* 58:319-379.
- 98-Caulfield, M.P., y N.J. Birdsall. 1998. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol.Rev.* 50:279-290.
- 99-Cavadas, C., A.P. Silva, F. Mosimann, M.D. Cotrim, C.A. Ribeiro, H.R. Brunner, y E. Grouzmann. 2001. NPY regulates catecholamine secretion from human adrenal chromaffin cells. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 86:5956-5963.
- 100-Cena, V., G.P. Nicolas, P. Sanchez-Garcia, S.M. Kirpekar, y A.G. Garcia. 1983. Pharmacological dissection of receptor-associated and voltage-sensitive ionic channels involved in catecholamine release. *Neuroscience.* 10:1455-1462.
- 101-Cesetti, T., J.M. Hernandez-Guijo, P. Baldelli, V. Carabelli, y E. Carbone. 2003. Opposite action of beta1- and beta2-adrenergic receptors on Ca(V)1 L-channel current in rat adrenal chromaffin cells. *J.Neurosci.* 23:73-83.
- 102-Chan, W.Y., D.L. McKinzie, S. Bose, S.N. Mitchell, J.M. Witkin, R.C. Thompson, A. Christopoulos, S. Lazareno, N.J. Birdsall, F.P. Bymaster, y C.C. Felder. 2008. Allosteric modulation of the muscarinic M4 receptor as an approach to treating schizophrenia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 105:10978-10983.

- 103-Chandy, K.G., y G.A. Gutman. 1993. Nomenclature for mammalian potassium channel genes. *Trends Pharmacol.Sci.* 14:434.
- 104-Chang, K.T., y D.K. Berg. 1999. Nicotinic acetylcholine receptors containing alpha7 subunits are required for reliable synaptic transmission in situ. *J.Neurosci.* 19:3701-3710.
- 105-Changeux, J.P., y S.J. Edelman. 1998. Allosteric receptors after 30 years. *Neuron.* 21:959-980.
- 106-Changeux, J.P., y S.J. Edelman. 2005. *Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Molecular Biology to Cognition.* Odile Jacob, New York.
- 107-Charpentier, E., A. Wiesner, K.H. Huh, R. Ogier, J.C. Hoda, G. Allaman, M. Raggenbass, D. Feuerbach, D. Bertrand, y C. Fuhrer. 2005. Alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptors are negatively regulated by tyrosine phosphorylation and Src-family kinases. *J.Neurosci.* 25:9836-9849.
- 108-Cheek, T.R., y R.D. Burgoyne. 1987. Cyclic AMP inhibits both nicotine-induced actin disassembly and catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells. *J.Biol.Chem.* 262:11663-11666.
- 109-Cheek, T.R., y R.D. Burgoyne. 1985. Effect of activation of muscarinic receptors on intracellular free calcium and secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Biochim.Biophys.Acta.* 846:167-173.
- 110-Cheek, T.R., A.J. O'Sullivan, R.B. Moreton, M.J. Berridge, y R.D. Burgoyne. 1989. Spatial localization of the stimulus-induced rise in cytosolic Ca²⁺ in bovine adrenal chromaffin cells. Distinct nicotinic and muscarinic patterns. *FEBS Lett.* 247:429-434.
- 111-Chimienti, F., R.C. Hogg, L. Plantard, C. Lehmann, N. Brakch, J. Fischer, M. Huber, D. Bertrand, y D. Hohl. 2003. Identification of SLURP-1 as an epidermal neuromodulator explains the clinical phenotype of Mal de Meleda. *Hum.Mol.Genet.* 12:3017-3024.
- 112-Cho, C.H., W. Song, K. Leitzell, E. Teo, A.D. Meleth, M.W. Quick, y R.A. Lester. 2005. Rapid upregulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors by tyrosine dephosphorylation. *J.Neurosci.* 25:3712-3723.
- 113-Chow, R.H., J. Klingauf, C. Heinemann, R.S. Zucker, y E. Neher. 1996. Mechanisms determining the time course of secretion in neuroendocrine cells. *Neuron.* 16:369-376.
- 114-Chow, R.H., J. Klingauf, y E. Neher. 1994. Time course of Ca²⁺ concentration triggering exocytosis in neuroendocrine cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91:12765-12769.
- 115-Chow, R.H., L. von Ruden, y E. Neher. 1992. Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature.* 356:60-63.
- 116-Chung, K.F., F. Sicard, V. Vukicevic, A. Hermann, A. Storch, W.B. Huttner, S.R. Bornstein, y M. Ehrhart-Bornstein. 2009. Isolation of neural crest derived chromaffin progenitors from adult adrenal medulla. *Stem Cells.* 27:2602-2613.
- 117-Clapham, D.E., y E. Neher. 1984. Substance P reduces acetylcholine-induced currents in isolated bovine chromaffin cells. *J.Physiol.* 347:255-277.
- 118-Clark, R.J., N.L. Daly, R. Halai, S.T. Nevin, D.J. Adams, y D.J. Craik. 2008. The three-dimensional structure of the analgesic alpha-conotoxin, RgIA. *FEBS Lett.* 582:597-602.
- 119-Clark, R.J., H. Fischer, S.T. Nevin, D.J. Adams, y D.J. Craik. 2006. The synthesis, structural characterization, and receptor specificity of the alpha-conotoxin Vc1.1. *J.Biol.Chem.* 281:23254-23263.
- 120-Cocchia, D., y F. Michetti. 1981. S-100 antigen in satellite cells of the adrenal medulla and the superior cervical ganglion of the rat. An immunochemical and immunocytochemical study. *Cell Tissue Res.* 215:103-112.

- 121-Codignola, A., J.M. McIntosh, M.G. Cattaneo, L.M. Vicentini, F. Clementi, y E. Sher. 1996. alpha-Conotoxin imperialis I inhibits nicotine-evoked hormone release and cell proliferation in human neuroendocrine carcinoma cells. *Neurosci.Lett.* 206:53-56.
- 122-Cohen, G., J.C. Roux, R. Grailhe, G. Malcolm, J.P. Changeux, y H. Lagercrantz. 2005. Perinatal exposure to nicotine causes deficits associated with a loss of nicotinic receptor function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 102:3817-3821.
- 123-Combi, R., L. Dalpra, M.L. Tenchini, y L. Ferini-Strambi. 2004. Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy--a critical overview. *J.Neurol.* 251:923-934.
- 124-Conroy, W.G., y D.K. Berg. 1999. Rapsyn variants in ciliary ganglia and their possible effects on clustering of nicotinic receptors. *J.Neurochem.* 73:1399-1408.
- 125-Conroy, W.G., y D.K. Berg. 1995. Neurons can maintain multiple classes of nicotinic acetylcholine receptors distinguished by different subunit compositions. *J.Biol.Chem.* 270:4424-4431.
- 126-Conroy, W.G., Q.S. Liu, Q. Nai, J.F. Margiotta, y D.K. Berg. 2003. Potentiation of alpha7-containing nicotinic acetylcholine receptors by select albumins. *Mol.Pharmacol.* 63:419-428.
- 127-Cooper, E., S. Couturier, y M. Ballivet. 1991. Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature.* 350:235-238.
- 128-Corringer, P.J., S. Bertrand, S. Bohler, S.J. Edelstein, J.P. Changeux, y D. Bertrand. 1998. Critical elements determining diversity in agonist binding and desensitization of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J.Neurosci.* 18:648-657.
- 129-Corringer, P.J., J.L. Galzi, J.L. Eisele, S. Bertrand, J.P. Changeux, y D. Bertrand. 1995. Identification of a new component of the agonist binding site of the nicotinic alpha 7 homooligomeric receptor. *J.Biol.Chem.* 270:11749-11752.
- 130-Corringer, P.J., N. Le Novere, y J.P. Changeux. 2000. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 40:431-458.
- 131-Coupland, R.E. 1989. The natural history of the chromaffin cell--twenty-five years on the beginning. *Arch.Histol.Cytol.* 52 Suppl:331-341.
- 132-Coupland, R.E. 1965. Electron microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla: II. Normal innervation. *J.Anat.* 99:255-272.
- 133-Coupland, R.E., y D. Hopwood. 1966. The mechanism of the differential staining reaction for adrenaline-and noreadrenaline-storing granules in tissues fixed in glutaraldehyde. *J.Anat.* 100:227-243.
- 134-Court, J.A., C. Martin-Ruiz, A. Graham, y E. Perry. 2000. Nicotinic receptors in human brain: topography and pathology. *J.Chem.Neuroanat.* 20:281-298.
- 135-Couturier, S., D. Bertrand, J.M. Matter, M.C. Hernandez, S. Bertrand, N. Millar, S. Valera, T. Barkas, y M. Ballivet. 1990. A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX. *Neuron.* 5:847-856.
- 136-Covernton, P.J., y J.G. Connolly. 1997. Differential modulation of rat neuronal nicotinic receptor subtypes by acute application of ethanol. *Br.J.Pharmacol.* 122:1661-1668.
- 137-Cox, M.E., C.M. Ely, A.D. Catling, M.J. Weber, y S.J. Parsons. 1996. Tyrosine kinases are required for catecholamine secretion and mitogen-activated protein kinase activation in bovine adrenal chromaffin cells. *J.Neurochem.* 66:1103-1112.
- 138-Criado, M., L. Alamo, y A. Navarro. 1992. Primary structure of an agonist binding subunit of the nicotinic acetylcholine receptor from bovine adrenal chromaffin cells. *Neurochem.Res.* 17:281-287.

- 139-Criado, M., E. Dominguez del Toro, C. Carrasco-Serrano, F.I. Smillie, J.M. Juiz, S. Viniegra, y J.J. Ballesta. 1997. Differential expression of alpha-bungarotoxin-sensitive neuronal nicotinic receptors in adrenergic chromaffin cells: a role for transcription factor Egr-1. *J.Neurosci.* 17:6554-6564.
- 140-Crowder, R.E. 1957. The development of the adrenal gland in man, with special reference to origin and ultimate location of cell types and evidence in favour of the 'cell migration' theory. *En Contributions to Embryology.* Carnegie Institution of Washington Publication 611. 193-210.
- 141-Cryer, P.E. 1980. Physiology and pathophysiology of the human sympathoadrenal neuroendocrine system. *N.Engl.J.Med.* 303:436-444.
- 142-Currie, K.P., y A.P. Fox. 2002. Differential facilitation of N- and P/Q-type calcium channels during trains of action potential-like waveforms. *J.Physiol.* 539:419-431.
- 143-Currie, K.P., y A.P. Fox. 1996. ATP serves as a negative feedback inhibitor of voltage-gated Ca²⁺ channel currents in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Neuron.* 16:1027-1036.
- 144-Curtis, C.A., M. Wheatley, S. Bansal, N.J. Birdsall, P. Eveleigh, E.K. Pedder, D. Poyner, y E.C. Hulme. 1989. Propylbenzilylcholine mustard labels an acidic residue in transmembrane helix 3 of the muscarinic receptor. *J.Biol.Chem.* 264:489-495.
- 145-Curtis, L., B. Buisson, S. Bertrand, y D. Bertrand. 2002. Potentiation of human alpha4beta2 neuronal nicotinic acetylcholine receptor by estradiol. *Mol.Pharmacol.* 61:127-135.
- 146-Damaj, M.I., E.M. Meyer, y B.R. Martin. 2000. The antinociceptive effects of alpha7 nicotinic agonists in an acute pain model. *Neuropharmacology.* 39:2785-2791.
- 147-Dani, J.A., y S. Heinemann. 1996. Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron.* 16:905-908.
- 148-Date, I., S.Y. Felten, y D.L. Felten. 1990. Cografts of adrenal medulla with peripheral nerve enhance the survivability of transplanted adrenal chromaffin cells and recovery of the host nigrostriatal dopaminergic system in MPTP-treated young adult mice. *Brain Res.* 537:33-39.
- 149-de Fiebre, C.M., E.M. Meyer, J.C. Henry, S.I. Muraskin, W.R. Kem, y R.L. Papke. 1995. Characterization of a series of anabaseine-derived compounds reveals that the 3-(4)-dimethylaminocinnamylidene derivative is a selective agonist at neuronal nicotinic alpha 7/125I-alpha-bungarotoxin receptor subtypes. *Mol.Pharmacol.* 47:164-171.
- 150-Decker, E.R., y J.A. Dani. 1990. Calcium permeability of the nicotinic acetylcholine receptor: the single-channel calcium influx is significant. *J.Neurosci.* 10:3413-3420.
- 151-Dellisanti, C.D., Y. Yao, J.C. Stroud, Z.Z. Wang, y L. Chen. 2007. Crystal structure of the extracellular domain of nAChR alpha1 bound to alpha-bungarotoxin at 1.94 Å resolution. *Nat.Neurosci.* 10:953-962.
- 152-Di Angelantonio, S., V. Costa, P. Carloni, L. Messori, y A. Nistri. 2002. A novel class of peptides with facilitating action on neuronal nicotinic receptors of rat chromaffin cells in vitro: functional and molecular dynamics studies. *Mol.Pharmacol.* 61:43-54.
- 153-Di Angelantonio, S., R. Giniatullin, V. Costa, E. Sokolova, y A. Nistri. 2003a. Modulation of neuronal nicotinic receptor function by the neuropeptides CGRP and substance P on autonomic nerve cells. *Br.J.Pharmacol.* 139:1061-1073.
- 154-Di Angelantonio, S., C. Matteoni, E. Fabbretti, y A. Nistri. 2003b. Molecular biology and electrophysiology of neuronal nicotinic receptors of rat chromaffin cells. *Eur.J.Neurosci.* 17:2313-2322.
- 155-Ding, Y.J., W.C. Zhang, S.S. Jiao, J.K. Cao, J.M. Meng, M.C. Ding, J.B. Sun, Z.M. Zhang, y M.T. Shi. 1988. Functional improvement by transplanting auto-adrenal medulla grafts into caudate in patients with parkinsonism. *Chin.Med.J.(Engl).* 101:631-636.

- 156-Diverse-Pierluissi, M., K. Dunlap, y E.W. Westhead. 1991. Multiple actions of extracellular ATP on calcium currents in cultured bovine chromaffin cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88:1261-1265.
- 157-Dolphin, A.C. 1999. L-type calcium channel modulation. *Adv.Second Messenger Phosphoprotein Res.* 33:153-177.
- 158-Dolphin, A.C. 1996. Facilitation of Ca²⁺ current in excitable cells. *Trends Neurosci.* 19:35-43.
- 159-Dolphin, A.C., y R.H. Scott. 1987. Calcium channel currents and their inhibition by (-)-baclofen in rat sensory neurones: modulation by guanine nucleotides. *J.Physiol.* 386:1-17.
- 160-Donnelly-Roberts, D.L., S.P. Arneric, y J.P. Sullivan. 1995. Functional modulation of human "ganglionic-like" neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) by L-type calcium channel antagonists. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 213:657-662.
- 161-Donnelly-Roberts, D.L., P.S. Puttfarcken, T.A. Kuntzweiler, C.A. Briggs, D.J. Anderson, J.E. Campbell, M. Piattoni-Kaplan, D.G. McKenna, J.T. Wasicak, M.W. Holladay, M. Williams, y S.P. Arneric. 1998. ABT-594 [(R)-5-(2-azetidinylmethoxy)-2-chloropyridine]: a novel, orally effective analgesic acting via neuronal nicotinic acetylcholine receptors: I. In vitro characterization. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 285:777-786.
- 162-Douglas, W.W. 1968. Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br.J.Pharmacol.* 34:451-474.
- 163-Douglas, W.W., T. Kanno, y S.R. Sampson. 1967. Influence of the ionic environment on the membrane potential of adrenal chromaffin cells and on the depolarizing effect of acetylcholine. *J.Physiol.* 191:107-121.
- 164-Douglas, W.W., y A.M. Poisner. 1965. Preferential release of adrenaline from the adrenal medulla by muscarine and pilocarpine. *Nature.* 208:1102-1103.
- 165-Douglas, W.W., y R.P. Rubin. 1963. The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling. *J.Physiol.* 167:288-310.
- 166-Douglas, W.W., y R.P. Rubin. 1961a. Mechanism of nicotinic action at the adrenal medulla: calcium as a link in stimulus-secretion coupling. *Nature.* 192:1087-1089.
- 167-Douglas, W.W., y R.P. Rubin. 1961b. The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J.Physiol.* 159:40-57.
- 168-Doupe, A.J., S.C. Landis, y P.H. Patterson. 1985a. Environmental influences in the development of neural crest derivatives: glucocorticoids, growth factors, and chromaffin cell plasticity. *J.Neurosci.* 5:2119-2142.
- 169-Doupe, A.J., P.H. Patterson, y S.C. Landis. 1985b. Small intensely fluorescent cells in culture: role of glucocorticoids and growth factors in their development and interconversions with other neural crest derivatives. *J.Neurosci.* 5:2143-2160.
- 170-Douppnik, C.A., y R.Y. Pun. 1994. G-protein activation mediates prepulse facilitation of Ca²⁺ channel currents in bovine chromaffin cells. *J.Membr.Biol.* 140:47-56.
- 171-Drachman, D.B. 1994. Myasthenia gravis. *N.Engl.J.Med.* 330:1797-1810.
- 172-Drenan, R.M., S.R. Grady, P. Whiteaker, T. McClure-Begley, S. McKinney, J.M. Miwa, S. Bupp, N. Heintz, J.M. McIntosh, M. Bencherif, M.J. Marks, y H.A. Lester. 2008. In vivo activation of midbrain dopamine neurons via sensitized, high-affinity alpha 6 nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron.* 60:123-136.
- 173-Drisdel, R.C., y W.N. Green. 2000. Neuronal alpha-bungarotoxin receptors are alpha7 subunit homomers. *J.Neurosci.* 20:133-139.
- 174-Drucker-Colin, R., I. Madrazo, F. Ostrosky-Solis, M. Shkurovich, R. Franco, y C. Torres. 1988. Adrenal medullary tissue transplants in the caudate nucleus of Parkinson's patients. *Prog.Brain Res.* 78:567-574.

- 175-Drucker-Colin, R., y L. Verdugo-Diaz. 2004. Cell transplantation for Parkinson's disease: present status. *Cell.Mol.Neurobiol.* 24:301-316.
- 176-Dunlap, K., y G.D. Fischbach. 1978. Neurotransmitters decrease the calcium component of sensory neurone action potentials. *Nature.* 276:837-839.
- 177-Duttaroy, A., J. Gomeza, J.W. Gan, N. Siddiqui, A.S. Basile, W.D. Harman, P.L. Smith, C.C. Felder, A.I. Levey, y J. Wess. 2002. Evaluation of muscarinic agonist-induced analgesia in muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Mol.Pharmacol.* 62:1084-1093.
- 178-Dziewczapolski, G., C.M. Glogowski, E. Masliah, y S.F. Heinemann. 2009. Deletion of the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor gene improves cognitive deficits and synaptic pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J.Neurosci.* 29:8805-8815.
- 179-Eaton, M.J., B.R. Frydel, T.L. Lopez, X.T. Nie, J. Huang, J. McKillop, y J. Sagen. 2000. Generation and initial characterization of conditionally immortalized chromaffin cells. *J.Cell.Biochem.* 79:38-57.
- 180-Eberhard, D.A., y R.W. Holz. 1987. Cholinergic stimulation of inositol phosphate formation in bovine adrenal chromaffin cells: distinct nicotinic and muscarinic mechanisms. *J.Neurochem.* 49:1634-1643.
- 181-Eglen, R.M. 2005. Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology. *Prog.Med.Chem.* 43:105-136.
- 182-Eglen, R.M., S.S. Hegde, y N. Watson. 1996. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacol.Rev.* 48:531-565.
- 183-Ehlert, F.J. 1988. Gallamine allosterically antagonizes muscarinic receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase activity in the rat myocardium. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 247:596-602.
- 184-Elgoyhen, A.B., D.S. Johnson, J. Boulter, D.E. Vetter, y S. Heinemann. 1994. Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell.* 79:705-715.
- 185-Elgoyhen, A.B., D.E. Vetter, E. Katz, C.V. Rothlin, S.F. Heinemann, y J. Boulter. 2001. Alpha10: a Determinant of Nicotinic Cholinergic Receptor Function in Mammalian Vestibular and Cochlear Mechanosensory Hair Cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 98:3501-3506.
- 186-El-Hajj, R.A., S.B. McKay, y D.B. McKay. 2007. Pharmacological and immunological identification of native alpha7 nicotinic receptors: evidence for homomeric and heteromeric alpha7 receptors. *Life Sci.* 81:1317-1322.
- 187-Elhamdani, A., C.H. Palfrey, y C.R. Artalejo. 2002. Ageing changes the cellular basis of the "fight-or-flight" response in human adrenal chromaffin cells. *Neurobiol.Aging.* 23:287-293.
- 188-Elhamdani, A., Z. Zhou, y C.R. Artalejo. 1998. Timing of dense-core vesicle exocytosis depends on the facilitation L-type Ca channel in adrenal chromaffin cells. *J.Neurosci.* 18:6230-6240.
- 189-Elhousseiny, A., y E. Hamel. 2000. Muscarinic--but not nicotinic--acetylcholine receptors mediate a nitric oxide-dependent dilation in brain cortical arterioles: a possible role for the M5 receptor subtype. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 20:298-305.
- 190-Ellison, M., Z.P. Feng, A.J. Park, X. Zhang, B.M. Olivera, J.M. McIntosh, y R.S. Norton. 2008. Alpha-RgIA, a novel conotoxin that blocks the alpha9alpha10 nAChR: structure and identification of key receptor-binding residues. *J.Mol.Biol.* 377:1216-1227.
- 191-Ellison, M., C. Haberlandt, M.E. Gomez-Casati, M. Watkins, A.B. Elgoyhen, J.M. McIntosh, y B.M. Olivera. 2006. Alpha-RgIA: a novel conotoxin that specifically and potently blocks the alpha9alpha10 nAChR. *Biochemistry.* 45:1511-1517.

- 192-Ely, C.M., W.M. Tomiak, C.M. Allen, L. Thomas, G. Thomas, y S.J. Parsons. 1994. Pp60c-*Src* Enhances the Acetylcholine Receptor-Dependent Catecholamine Release in Vaccinia Virus-Infected Bovine Adrenal Chromaffin Cells. *J.Neurochem.* 62:923-933.
- 193-Eranko, O. 1952. On the histochemistry of the adrenal medulla of the rat, with special reference to acid phosphatase. *Acta Anat.(Basel).* 3:3-60.
- 194-Ericksen, S.S., y A.J. Boileau. 2007. Tandem couture: Cys-loop receptor concatamer insights and caveats. *Mol.Neurobiol.* 35:113-128.
- 195-Espejo, E.F., M.C. Gonzalez-Albo, J.P. Moraes, F. El Banoua, J.A. Flores, y I. Caraballo. 2001. Functional regeneration in a rat Parkinson's model after intrastriatal grafts of glial cell line-derived neurotrophic factor and transforming growth factor beta1-expressing extra-adrenal chromaffin cells of the Zuckerkandl's organ. *J.Neurosci.* 21:9888-9895.
- 196-Espejo, E.F., R.J. Montoro, J.A. Armengol, y J. Lopez-Barneo. 1998. Cellular and functional recovery of Parkinsonian rats after intrastriatal transplantation of carotid body cell aggregates. *Neuron.* 20:197-206.
- 197-Feldberg, W., B. Minz, y H. Tsudzimura. 1934. The mechanism of the nervous discharge of adrenaline. *J.Physiol.* 81:286-304.
- 198-Felder, C.C., F.P. Bymaster, J. Ward, y N. DeLapp. 2000. Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. *J.Med.Chem.* 43:4333-4353.
- 199-Fenwick, E.M., A. Marty, y E. Neher. 1982a. A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J.Physiol.* 331:577-597.
- 200-Fenwick, E.M., A. Marty, y E. Neher. 1982b. Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J.Physiol.* 331:599-635.
- 201-Fernandez de Sevilla, D., A. Nunez, M. Borde, R. Malinow, y W. Buno. 2008. Cholinergic-mediated IP3-receptor activation induces long-lasting synaptic enhancement in CA1 pyramidal neurons. *J.Neurosci.* 28:1469-1478.
- 202-Fernandez, J.M., R. Granja, V. Izaguirre, C. Gonzalez-Garcia, y V. Cena. 1995. omega-Conotoxin GVIA blocks nicotine-induced catecholamine secretion by blocking the nicotinic receptor-activated inward currents in bovine chromaffin cells. *Neurosci.Lett.* 191:59-62.
- 203-Fernandez-Espejo, E., J.A. Armengol, J.A. Flores, B. Galan-Rodriguez, y S. Ramiro. 2005a. Cells of the sympathoadrenal lineage: biological properties as donor tissue for cell-replacement therapies for Parkinson's disease. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 49:343-354.
- 204-Fernandez-Espejo, E., J.A. Armengol, J.A. Flores, B. Galan-Rodriguez, y S. Ramiro. 2005b. Cells of the sympathoadrenal lineage: biological properties as donor tissue for cell-replacement therapies for Parkinson's disease. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 49:343-354.
- 205-Fernando, J.C., E.A. Abdallah, M. Evinger, C. Forray, y E.E. el-Fakahany. 1991. The presence of an M4 subtype muscarinic receptor in the bovine adrenal medulla revealed by mRNA and receptor binding analyses. *Eur.J.Pharmacol.* 207:297-303.
- 206-Finnegan, J.M., R. Borges, y R.M. Wightman. 1996. Comparison of cytosolic Ca²⁺ and exocytosis responses from single rat and bovine chromaffin cells. *Neuroscience.* 71:833-843.
- 207-Fisher, A., Z. Pittel, R. Haring, N. Bar-Ner, M. Kliger-Spatz, N. Natan, I. Egozi, H. Sonogo, I. Marcovitch, y R. Brandeis. 2003. M1 muscarinic agonists can modulate some of the hallmarks in Alzheimer's disease: implications in future therapy. *J.Mol.Neurosci.* 20:349-356.
- 208-Fisher, S.K., R.W. Holz, y B.W. Agranoff. 1981. Muscarinic receptors in chromaffin cell cultures mediate enhanced phospholipid labeling but not catecholamine secretion. *J.Neurochem.* 37:491-497.

- 209-Fleckenstein, A. 1983. History of calcium antagonists. *Circ.Res.* 52:13-16.
- 210-Fomina, A.F., y M.C. Nowycky. 1999. A current activated on depletion of intracellular Ca²⁺ stores can regulate exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J.Neurosci.* 19:3711-3722.
- 211-Forsberg, E.J., Q. Li, y Y. Xu. 1995. Cation channel activated by muscarinic agonists on porcine adrenal chromaffin cells. *Am.J.Physiol.* 269:E43-52.
- 212-Forsberg, E.J., E. Rojas, y H.B. Pollard. 1986. Muscarinic receptor enhancement of nicotine-induced catecholamine secretion may be mediated by phosphoinositide metabolism in bovine adrenal chromaffin cells. *J.Biol.Chem.* 261:4915-4920.
- 213-Fox, A.P., M.C. Nowycky, y R.W. Tsien. 1987a. Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J.Physiol.* 394:149-172.
- 214-Fox, A.P., M.C. Nowycky, y R.W. Tsien. 1987b. Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. *J.Physiol.* 394:173-200.
- 215-Fox, R.I., Y. Konttinen, y A. Fisher. 2001. Use of muscarinic agonists in the treatment of Sjogren's syndrome. *Clin.Immunol.* 101:249-263.
- 216-Francis, M.M., E.Y. Cheng, G.A. Weiland, y R.E. Oswald. 2001. Specific activation of the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor by a quaternary analog of cocaine. *Mol.Pharmacol.* 60:71-79.
- 217-Francis, M.M., R.W. Vazquez, R.L. Papke, y R.E. Oswald. 2000. Subtype-selective inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by cocaine is determined by the alpha4 and beta4 subunits. *Mol.Pharmacol.* 58:109-119.
- 218-Frazier, C.J., A.V. Buhler, J.L. Weiner, y T.V. Dunwiddie. 1998. Synaptic potentials mediated via alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal interneurons. *J.Neurosci.* 18:8228-8235.
- 219-Free, R.B., S.B. McKay, R.T. Boyd, y D.B. McKay. 2002. Evidence for constitutive expression of bovine adrenal $\alpha 3\beta 4^*$ nicotinic acetylcholine receptors. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 971:145-147.
- 220-Freed, W.J., J.M. Morihisa, E. Spoor, B.J. Hoffer, L. Olson, A. Seiger, y R.J. Wyatt. 1981. Transplanted adrenal chromaffin cells in rat brain reduce lesion-induced rotational behaviour. *Nature.* 292:351-352.
- 221-Freedman, R., H. Coon, M. Myles-Worsley, A. Orr-Urtreger, A. Olincy, A. Davis, M. Polymeropoulos, J. Holik, J. Hopkins, M. Hoff, J. Rosenthal, M.C. Waldo, F. Reimherr, P. Wender, J. Yaw, D.A. Young, C.R. Breese, C. Adams, D. Patterson, L.E. Adler, L. Kruglyak, S. Leonard, y W. Byerley. 1997. Linkage of a neurophysiological deficit in schizophrenia to a chromosome 15 locus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94:587-592.
- 222-Freedman, R., M. Hall, L.E. Adler, y S. Leonard. 1995. Evidence in postmortem brain tissue for decreased numbers of hippocampal nicotinic receptors in schizophrenia. *Biol.Psychiatry.* 38:22-33.
- 223-Fryer, J.D., y R.J. Lukas. 1999. Antidepressants noncompetitively inhibit nicotinic acetylcholine receptor function. *J.Neurochem.* 72:1117-1124.
- 224-Fucile, S. 2004. Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium.* 35:1-8.
- 225-Fucile, S., J.M. Matter, L. Erkman, D. Ragozzino, B. Barabino, F. Grassi, S. Alema, M. Ballivet, y F. Eusebi. 1998. The neuronal alpha6 subunit forms functional heteromeric acetylcholine receptors in human transfected cells. *Eur.J.Neurosci.* 10:172-178.
- 226-Fuentealba, J., R. Olivares, E. Ales, L. Tapia, J. Rojo, G. Arroyo, M. Aldea, M. Criado, L. Gandia, y A.G. Garcia. 2004. A choline-evoked [Ca²⁺]_i signal causes catecholamine release and hyperpolarization of chromaffin cells. *FASEB J.* 18:1468-1470.

- 227-Fujita, H., T. Kanno, y S. Kobayashi. 1988. Adrenal chromaffin cells. *En* The Paraneuron. Springer-Verlag, Tokio. 135-144.
- 228-Fujita, H., Y. Tanizawa, y H. Hiura. 1976. Ontogenesis of granule formation in adrenal chromaffin cells of the chick. *En* Chromaffin, Enterochromaffin and Related Cells. Elsevier, Amsterdam. 1-12.
- 229-Galvan, M., y P.R. Adams. 1982. Control of calcium current in rat sympathetic neurons by norepinephrine. *Brain Res.* 244:135-144.
- 230-Gandia, L., R. Borges, A. Albillos, y A.G. Garcia. 1995. Multiple calcium channel subtypes in isolated rat chromaffin cells. *Pflugers Arch.* 430:55-63.
- 231-Gandia, L., L.F. Casado, M.G. Lopez, y A.G. Garcia. 1991. Separation of two pathways for calcium entry into chromaffin cells. *Br.J.Pharmacol.* 103:1073-1078.
- 232-Gandia, L., A.G. Garcia, y M. Morad. 1993. ATP modulation of calcium channels in chromaffin cells. *J.Physiol.* 470:55-72.
- 233-Gandia, L., B. Lara, J.S. Imperial, M. Villarroya, A. Albillos, R. Maroto, A.G. Garcia, y B.M. Olivera. 1997. Analogies and differences between omega-conotoxins MVIIC and MVIID: binding sites and functions in bovine chromaffin cells. *Pflugers Arch.* 435:55-64.
- 234-Gandia, L., I. Mayorgas, P. Michelena, I. Cuchillo, R. de Pascual, F. Abad, J.M. Novalbos, E. Larranaga, y A.G. Garcia. 1998. Human adrenal chromaffin cell calcium channels: drastic current facilitation in cell clusters, but not in isolated cells. *Pflugers Arch.* 436:696-704.
- 235-Gandia, L., M. Villarroya, F. Sala, J.A. Reig, S. Viniegra, J.L. Quintanar, A.G. Garcia, y L.M. Gutierrez. 1996. Inhibition of nicotinic receptor-mediated responses in bovine chromaffin cells by diltiazem. *Br.J.Pharmacol.* 118:1301-1307.
- 236-Garcez-Do-Carmo, L., A. Albillos, A.R. Artalejo, M.T. de la Fuente, M.G. Lopez, L. Gandia, P. Michelena, y A.G. Garcia. 1993. R56865 inhibits catecholamine release from bovine chromaffin cells by blocking calcium channels. *Br.J.Pharmacol.* 110:1149-1155.
- 237-Garcia, A.G., A.M. Garcia-De-Diego, L. Gandia, R. Borges, y J. Garcia-Sancho. 2006. Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol.Rev.* 86:1093-1131.
- 238-Garcia, A.G., F. Sala, J.A. Reig, S. Viniegra, J. Frias, R. Fonteriz, y L. Gandia. 1984. Dihydropyridine BAY-K-8644 activates chromaffin cell calcium channels. *Nature.* 309:69-71.
- 239-Garcia, M.C., M.G. Lopez, A.G. Garcia, y M. Sanchez Crespo. 1992. Muscarinic acetylcholine receptor enhances phosphatidylcholine hydrolysis via phospholipase D in bovine chromaffin cells in culture. *J.Neurochem.* 59:2244-2250.
- 240-Garcia-Colunga, J., J.N. Awad, y R. Miledi. 1997. Blockage of muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors by fluoxetine (Prozac). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94:2041-2044.
- 241-Garcia-Guzman, M., F. Sala, S. Sala, A. Campos-Caro, W. Stuhmer, L.M. Gutierrez, y M. Criado. 1995. alpha-Bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors on bovine chromaffin cells: molecular cloning, functional expression and alternative splicing of the alpha 7 subunit. *Eur.J.Neurosci.* 7:647-655.
- 242-Garcia-Palomero, E., I. Cuchillo-Ibanez, A.G. Garcia, J. Renart, A. Albillos, y C. Montiel. 2000. Greater diversity than previously thought of chromaffin cell Ca²⁺ channels, derived from mRNA identification studies. *FEBS Lett.* 481:235-239.
- 243-Garcia-Palomero, E., J. Renart, E. Andres-Mateos, L.M. Solis-Garrido, C. Matute, C.J. Herrero, A.G. Garcia, y C. Montiel. 2001. Differential expression of calcium channel subtypes in the bovine adrenal medulla. *Neuroendocrinology.* 74:251-261.

- 244-Gasparini, S., A.M. Kasyanov, D. Pietrobon, L.L. Voronin, y E. Cherubini. 2001. Presynaptic R-type calcium channels contribute to fast excitatory synaptic transmission in the rat hippocampus. *J.Neurosci.* 21:8715-8721.
- 245-Gautam, D., T.S. Heard, Y. Cui, G. Miller, L. Bloodworth, y J. Wess. 2004. Cholinergic stimulation of salivary secretion studied with M1 and M3 muscarinic receptor single- and double-knockout mice. *Mol.Pharmacol.* 66:260-267.
- 246-Geppert, M., Y. Goda, R.E. Hammer, C. Li, T.W. Rosahl, C.F. Stevens, y T.C. Sudhof. 1994. Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell.* 79:717-727.
- 247-Gerzanich, V., R. Anand, y J. Lindstrom. 1994. Homomers of alpha 8 and alpha 7 subunits of nicotinic receptors exhibit similar channel but contrasting binding site properties. *Mol.Pharmacol.* 45:212-220.
- 248-Gerzanich, V., F. Wang, A. Kuryatov, y J. Lindstrom. 1998. alpha 5 Subunit alters desensitization, pharmacology, Ca⁺⁺ permeability and Ca⁺⁺ modulation of human neuronal alpha 3 nicotinic receptors. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 286:311-320.
- 249-Giancippoli, A., M. Novara, A. de Luca, P. Baldelli, A. Marcantoni, E. Carbone, y V. Carabelli. 2006. Low-threshold exocytosis induced by cAMP-recruited CaV3.2 (alpha1H) channels in rat chromaffin cells. *Biophys.J.* 90:1830-1841.
- 250-Gillis, K.D., R. Mossner, y E. Neher. 1996. Protein kinase C enhances exocytosis from chromaffin cells by increasing the size of the readily releasable pool of secretory granules. *Neuron.* 16:1209-1220.
- 251-Giniatullin, R., S. Di Angelantonio, C. Marchetti, E. Sokolova, L. Khiroug, y A. Nistri. 1999. Calcitonin gene-related peptide rapidly downregulates nicotinic receptor function and slowly raises intracellular Ca²⁺ in rat chromaffin cells in vitro. *J.Neurosci.* 19:2945-2953.
- 252-Giniatullin, R., A. Nistri, y J.L. Yakel. 2005. Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. *Trends Neurosci.* 28:371-378.
- 253-Glossmann, H., y J. Striessnig. 1990. Molecular properties of calcium channels. *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.* 114:1-105.
- 254-Goldner, F.M., K.T. Dineley, y J.W. Patrick. 1997. Immunohistochemical localization of the nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha6 to dopaminergic neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area. *Neuroreport.* 8:2739-2742.
- 255-Goldstein, D.S. 1983. Plasma catecholamines and essential hypertension. An analytical review. *Hypertension.* 5:86-99.
- 256-Gollasch, M., J. Hescheler, K. Spicher, F.J. Klinz, G. Schultz, y W. Rosenthal. 1991. Inhibition of Ca²⁺ channels via alpha 2-adrenergic and muscarinic receptors in pheochromocytoma (PC-12) cells. *Am.J.Physiol.* 260:C1282-9.
- 257-Gomora, J.C., A.N. Daud, M. Weiergraber, y E. Perez-Reyes. 2001. Block of cloned human T-type calcium channels by succinimide antiepileptic drugs. *Mol.Pharmacol.* 60:1121-1132.
- 258-Gonzalez-Rubio, J.M., J. Rojo, L. Tapia, V. Maneu, J. Mulet, L.M. Valor, M. Criado, F. Sala, A.G. Garcia, y L. Gandia. 2006. Activation and blockade by choline of bovine alpha7 and alpha3beta4 nicotinic receptors expressed in oocytes. *Eur.J.Pharmacol.* 535:53-60.
- 259-Gorgas, K., y P. Bock. 1976. Morphology and histochemistry of the adrenal medulla. I. Various types of primary catecholamine-storing cells in the mouse adrenal medulla. *Histochemistry.* 50:17-31.
- 260-Gotti, C., y F. Clementi. 2004. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog.Neurobiol.* 74:363-396.

- 261-Gotti, C., D. Fornasari, y F. Clementi. 1997a. Human neuronal nicotinic receptors. *Prog.Neurobiol.* 53:199-237.
- 262-Gotti, C., M. Moretti, R. Maggi, R. Longhi, W. Hanke, N. Klinke, y F. Clementi. 1997b. Alpha7 and alpha8 nicotinic receptor subtypes immunopurified from chick retina have different immunological, pharmacological and functional properties. *Eur.J.Neurosci.* 9:1201-1211.
- 263-Gotti, C., L. Riganti, S. Vailati, y F. Clementi. 2006a. Brain neuronal nicotinic receptors as new targets for drug discovery. *Curr.Pharm.Des.* 12:407-428.
- 264-Gotti, C., M. Zoli, y F. Clementi. 2006b. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol.Sci.* 27:482-491.
- 265-Grabner, C.P., S.D. Price, A. Lysakowski, y A.P. Fox. 2005. Mouse chromaffin cells have two populations of dense core vesicles. *J.Neurophysiol.* 94:2093-2104.
- 266-Grady, S.R., M. Moretti, M. Zoli, M.J. Marks, A. Zanardi, L. Pucci, F. Clementi, y C. Gotti. 2009. Rodent habenulo-interpeduncular pathway expresses a large variety of uncommon nAChR subtypes, but only the alpha3beta4* and alpha3beta3beta4* subtypes mediate acetylcholine release. *J.Neurosci.* 29:2272-2282.
- 267-Grando, S.A. 2008. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: biological and clinical significance of non-canonical ligands of epithelial nicotinic acetylcholine receptors. *J.Pharmacol.Sci.* 106:174-179.
- 268-Granja, R., J.M. Fernandez-Fernandez, V. Izaguirre, C. Gonzalez-Garcia, y V. Cena. 1995. omega-Agatoxin IVA blocks nicotinic receptor channels in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett.* 362:15-18.
- 269-Green, W.N., y N.S. Millar. 1995. Ion-channel assembly. *Trends Neurosci.* 18:280-287.
- 270-Greene, L.A., y A.S. Tischler. 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 73:2424-2428.
- 271-Greenfield, S.A., T. Day, E.O. Mann, y I. Bermudez. 2004. A novel peptide modulates alpha7 nicotinic receptor responses: implications for a possible trophic-toxic mechanism within the brain. *J.Neurochem.* 90:325-331.
- 272-Gronlien, J.H., M. Hakerud, H. Ween, K. Thorin-Hagene, C.A. Briggs, M. Gopalakrishnan, y J. Malysz. 2007. Distinct profiles of alpha7 nAChR positive allosteric modulation revealed by structurally diverse chemotypes. *Mol.Pharmacol.* 72:715-724.
- 273-Groot-Kormelink, P.J., S. Broadbent, M. Beato, y L.G. Sivilotti. 2006. Constraining the expression of nicotinic acetylcholine receptors by using pentameric constructs. *Mol.Pharmacol.* 69:558-563.
- 274-Groot-Kormelink, P.J., S.D. Broadbent, J.P. Boorman, y L.G. Sivilotti. 2004. Incomplete incorporation of tandem subunits in recombinant neuronal nicotinic receptors. *J.Gen.Physiol.* 123:697-708.
- 275-Groot-Kormelink, P.J., W.H. Luyten, D. Colquhoun, y L.G. Sivilotti. 1998. A reporter mutation approach shows incorporation of the "orphan" subunit beta3 into a functional nicotinic receptor. *J.Biol.Chem.* 273:15317-15320.
- 276-Grynszpan-Wynograd, O., y G. Nicolas. 1980. Intercellular junctions in the adrenal medulla: a comparative freeze-fracture study. *Tissue Cell.* 12:661-672.
- 277-Guan, Z.Z., A. Nordberg, M. Mousavi, J.O. Rinne, y E. Hellstrom-Lindahl. 2002. Selective changes in the levels of nicotinic acetylcholine receptor protein and of corresponding mRNA species in the brains of patients with Parkinson's disease. *Brain Res.* 956:358-366.
- 278-Gullo, F., E. Ales, B. Rosati, M. Lecchi, A. Masi, L. Guasti, M.F. Cano-Abad, A. Arcangeli, M.G. Lopez, y E. Wanke. 2003. ERG K+ channel blockade enhances firing and epinephrine secretion in rat chromaffin cells: the missing link to LQT2-related sudden death? *FASEB J.* 17:330-332.

- 279-Hajos, M., R.S. Hurst, W.E. Hoffmann, M. Krause, T.M. Wall, N.R. Higdon, y V.E. Groppi. 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.* 312:1213-1222.
- 280-Hama, A.T., y J. Sagen. 1994. Alleviation of neuropathic pain symptoms by xenogeneic chromaffin cell grafts in the spinal subarachnoid space. *Brain Res.* 651:183-193.
- 281-Hamurtekin, E., y M.S. Gurun. 2006. The antinociceptive effects of centrally administered CDP-choline on acute pain models in rats: the involvement of cholinergic system. *Brain Res.* 1117:92-100.
- 282-Han, Z.Y., N. Le Novere, M. Zoli, J.A. Hill Jr, N. Champiaux, y J.P. Changeux. 2000. Localization of nAChR subunit mRNAs in the brain of *Macaca mulatta*. *Eur.J.Neurosci.* 12:3664-3674.
- 283-Han, Z.Y., M. Zoli, A. Cardona, J.P. Bourgeois, J.P. Changeux, y N. Le Novere. 2003. Localization of [3H]nicotine, [3H]cytisine, [3H]epibatidine, and [125I]alpha-bungarotoxin binding sites in the brain of *Macaca mulatta*. *J.Comp.Neurol.* 461:49-60.
- 284-Hashimoto, K., M. Iyo, R. Freedman, y K.E. Stevens. 2005. Tropisetron improves deficient inhibitory auditory processing in DBA/2 mice: role of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors. *Psychopharmacology (Berl)*. 183:13-19.
- 285-Hatton, G.I., y Q.Z. Yang. 2002. Synaptic potentials mediated by alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors in supraoptic nucleus. *J.Neurosci.* 22:29-37.
- 286-Hauser, T.A., A. Kucinski, K.G. Jordan, G.J. Gatto, S.R. Wersinger, R.A. Hesse, E.K. Stachowiak, M.K. Stachowiak, R.L. Papke, P.M. Lippiello, y M. Bencherif. 2009. TC-5619: an alpha7 neuronal nicotinic receptor-selective agonist that demonstrates efficacy in animal models of the positive and negative symptoms and cognitive dysfunction of schizophrenia. *Biochem.Pharmacol.* 78:803-812.
- 287-Heinemann, C., L. von Ruden, R.H. Chow, y E. Neher. 1993. A two-step model of secretion control in neuroendocrine cells. *Pflugers Arch.* 424:105-112.
- 288-Henderson, R., J.M. Baldwin, T.A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann, y K.H. Downing. 1990. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J.Mol.Biol.* 213:899-929.
- 289-Hennings, E.C., J.P. Kiss, K. De Oliveira, P.T. Toth, y E.S. Vizi. 1999. Nicotinic acetylcholine receptor antagonistic activity of monoamine uptake blockers in rat hippocampal slices. *J.Neurochem.* 73:1043-1050.
- 290-Hernandez, S.C., S. Vicini, Y. Xiao, M.I. Davila-Garcia, R.P. Yasuda, B.B. Wolfe, y K.J. Kellar. 2004. The nicotinic receptor in the rat pineal gland is an alpha3beta4 subtype. *Mol.Pharmacol.* 66:978-987.
- 291-Hernandez-Guijo, J.M., V. Carabelli, L. Gandia, A.G. Garcia, y E. Carbone. 1999. Voltage-independent autocrine modulation of L-type channels mediated by ATP, opioids and catecholamines in rat chromaffin cells. *Eur.J.Neurosci.* 11:3574-3584.
- 292-Hernandez-Guijo, J.M., R. de Pascual, A.G. Garcia, y L. Gandia. 1998. Separation of calcium channel current components in mouse chromaffin cells superfused with low- and high-barium solutions. *Pflugers Arch.* 436:75-82.
- 293-Herrero, C.J., E. Ales, A.J. Pintado, M.G. Lopez, E. Garcia-Palomero, S.K. Mahata, D.T. O'Connor, A.G. Garcia, y C. Montiel. 2002. Modulatory mechanism of the endogenous peptide catestatin on neuronal nicotinic acetylcholine receptors and exocytosis. *J.Neurosci.* 22:377-388.
- 294-Hescheler, J., W. Rosenthal, W. Trautwein, y G. Schultz. 1987. The GTP-binding protein, Go, regulates neuronal calcium channels. *Nature.* 325:445-447.
- 295-Hevers, W., y H. Luddens. 1998. The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Mol.Neurobiol.* 18:35-86.

- 296-Hilf, R.J., y R. Dutzler. 2008. X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature*. 452:375-379.
- 297-Hillarp, N.A. 1946. Functional organization of the peripheral autonomic innervation. *Acta Anat.(Basel)*. 4:Suppl., 1.
- 298-Hillarp, N.A., y B. Hökfelt. 1953. Evidence of adrenaline and noradrenaline in separate adrenal medullary cells. *Acta Physiol.Scand.* 30:55-68.
- 299-Hillyard, D.R., V.D. Monje, I.M. Mintz, B.P. Bean, L. Nadasdi, J. Ramachandran, G. Miljanich, A. Azimi-Zoonooz, J.M. McIntosh, y L.J. Cruz. 1992. A new Conus peptide ligand for mammalian presynaptic Ca²⁺ channels. *Neuron*. 9:69-77.
- 300-Hockerman, G.H., B.Z. Peterson, B.D. Johnson, y W.A. Catterall. 1997. Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 37:361-396.
- 301-Hodel, A. 2001. Effects of glucocorticoids on adrenal chromaffin cells. *J.Neuroendocrinol.* 13:216-220.
- 302-Hofmann, F., L. Lacinova, y N. Klugbauer. 1999. Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.* 139:33-87.
- 303-Hollins, B., y S.R. Ikeda. 1996. Inward currents underlying action potentials in rat adrenal chromaffin cells. *J.Neurophysiol.* 76:1195-1211.
- 304-Holman, M.E., H.A. Coleman, M.A. Tonta, y H.C. Parkinson. 1994. Synaptic transmission from splanchnic nerves to the adrenal medulla of guinea-pigs. *J.Physiol.* 478 (Pt 1):115-124.
- 305-Holman, M.E., M.A. Tonta, H.A. Coleman, y H.C. Parkinson. 1998. Muscarinic receptor activation in guinea-pig chromaffin cells causes decreased membrane conductance and depolarization. *J.Auton.Nerv.Syst.* 68:140-144.
- 306-Holman, M.E., M.A. Tonta, H.A. Coleman, y H.C. Parkinson. 1995. Currents caused by the spontaneous release of quanta of acetylcholine onto chromaffin cells in guinea-pig adrenal medulla. *Neurosci.Lett.* 184:75-78.
- 307-Holz, G.G., 4th, S.G. Rane, y K. Dunlap. 1986. GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels. *Nature*. 319:670-672.
- 308-Hopfield, J.F., D.W. Tank, P. Greengard, y R.L. Huganir. 1988. Functional modulation of the nicotinic acetylcholine receptor by tyrosine phosphorylation. *Nature*. 336:677-680.
- 309-Horrigan, F.T., y R.J. Bookman. 1994. Releasable pools and the kinetics of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Neuron*. 13:1119-1129.
- 310-Hoshi, T., J. Rothlein, y S.J. Smith. 1984. Facilitation of Ca²⁺-channel currents in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 81:5871-5875.
- 311-Hoshi, T., y S.J. Smith. 1987. Large depolarization induces long openings of voltage-dependent calcium channels in adrenal chromaffin cells. *J.Neurosci.* 7:571-580.
- 312-Howell, G.A., M.G. Welch, y C.J. Frederickson. 1984. Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices. *Nature*. 308:736-738.
- 313-Hsiao, B., D. Dweck, y C.W. Luetje. 2001. Subunit-dependent modulation of neuronal nicotinic receptors by zinc. *J.Neurosci.* 21:1848-1856.
- 314-Hu, M., J.F. Waring, M. Gopalakrishnan, y J. Li. 2008. Role of GSK-3beta activation and alpha7 nAChRs in Abeta(1-42)-induced tau phosphorylation in PC12 cells. *J.Neurochem.* 106:1371-1377.

- 315-Huganir, R.L., y K. Miles. 1989. Protein phosphorylation of nicotinic acetylcholine receptors. *Crit.Rev.Biochem.Mol.Biol.* 24:183-215.
- 316-Huganir, R.L., K. Miles, y P. Greengard. 1984. Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor by an endogenous tyrosine-specific protein kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 81:6968-6972.
- 317-Hughes, J.R., D.K. Hatsukami, J.E. Mitchell, y L.A. Dahlgren. 1986. Prevalence of smoking among psychiatric outpatients. *Am.J.Psychiatry.* 143:993-997.
- 318-Huguenard, J.R. 1996. *En* Heterogeneity of LVA Ca^{2+} Currents in Thalamic Neurons and their Functional Role in Burst Firing. C. Tsien Nargeot, editor. Adis. 143-152.
- 319-Hurst, R.S., M. Hajos, M. Raggenbass, T.M. Wall, N.R. Higdon, J.A. Lawson, K.L. Rutherford-Root, M.B. Berkenpas, W.E. Hoffmann, D.W. Piotrowski, V.E. Groppi, G. Allaman, R. Ogier, S. Bertrand, D. Bertrand, y S.P. Arneric. 2005. A novel positive allosteric modulator of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor: in vitro and in vivo characterization. *J.Neurosci.* 25:4396-4405.
- 320-Ibanez-Tallon, I., J.M. Miwa, H.L. Wang, N.C. Adams, G.W. Crabtree, S.M. Sine, y N. Heintz. 2002. Novel modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by association with the endogenous prototoxin lynx1. *Neuron.* 33:893-903.
- 321-Iijima, T., G. Matsumoto, y Y. Kidokoro. 1992. Synaptic activation of rat adrenal medulla examined with a large photodiode array in combination with a voltage-sensitive dye. *Neuroscience.* 51:211-219.
- 322-Ikeda, K., Y. Saito, A. Nishiyama, y T. Takasaka. 1991. Effects of pH on intracellular calcium levels in isolated cochlear outer hair cells of guinea pigs. *Am.J.Physiol.* 261:C231-6.
- 323-Ikeda, S.R. 1991. Double-pulse calcium channel current facilitation in adult rat sympathetic neurones. *J.Physiol.* 439:181-214.
- 324-Imoto, K., C. Busch, B. Sakmann, M. Mishina, T. Konno, J. Nakai, H. Bujo, Y. Mori, K. Fukuda, y S. Numa. 1988. Rings of negatively charged amino acids determine the acetylcholine receptor channel conductance. *Nature.* 335:645-648.
- 325-Inoue, M., y I. Imanaga. 1993. G protein-mediated inhibition of inwardly rectifying K^{+} channels in guinea pig chromaffin cells. *Am.J.Physiol.* 265:C946-56.
- 326-Inoue, M., y H. Kuriyama. 1991. Muscarinic receptor is coupled with a cation channel through a GTP-binding protein in guinea-pig chromaffin cells. *J.Physiol.* 436:511-529.
- 327-Inoue, M., y H. Kuriyama. 1990. Muscarine induces two distinct current responses in adrenal chromaffin cells of the guinea-pig. *Jpn.J.Physiol.* 40:679-691.
- 328-Inoue, M., Y. Sakamoto, N. Fujishiro, I. Imanaga, S. Ozaki, G.D. Prestwich, y A. Warashina. 2003. Homogeneous Ca^{2+} stores in rat adrenal chromaffin cells. *Cell Calcium.* 33:19-26.
- 329-Itoh, H., T. Andoh, I. Watanabe, T. Sasaki, Y. Kamiya, y F. Okumura. 2000. Dynorphins directly inhibit neuronal nicotinic acetylcholine receptors in PC12 cells. *Eur.J.Neurosci.* 12:1253-1262.
- 330-Izaguirre, V., J.M. Fernandez-Fernandez, V. Cena, y C. Gonzalez-Garcia. 1997. Tricyclic antidepressants block cholinergic nicotinic receptors and ATP secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett.* 418:39-42.
- 331-Jackson, M.B. 1984. Spontaneous openings of the acetylcholine receptor channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 81:3901-3904.
- 332-Jahnsen, H., y R. Llinas. 1984. Electrophysiological properties of guinea-pig thalamic neurones: an in vitro study. *J.Physiol.* 349:205-226.

- 333-Jensen, A.A., B. Frolund, T. Liljefors, y P. Krogsgaard-Larsen. 2005. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *J.Med.Chem.* 48:4705-4745.
- 334-Jeyarasasingam, G., L. Tompkins, y M. Quik. 2002. Stimulation of non-alpha7 nicotinic receptors partially protects dopaminergic neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced toxicity in culture. *Neuroscience.* 109:275-285.
- 335-Jiao, S.S., W.C. Zhang, J.K. Cao, Z.M. Zhang, H. Wang, M.C. Ding, Z. Zhang, J.B. Sun, Y.C. Sun, y M.T. Shi. 1988. Study of adrenal medullary tissue transplantation to striatum in parkinsonism. *Prog.Brain Res.* 78:575-580.
- 336-Jozan, S., J. Aziza, S. Chatelin, C. Evra, M. Courtade-Saidi, O. Parant, J.C. Sol, H. Zhou, y Y. Lazorthes. 2007. Human fetal chromaffin cells: a potential tool for cell pain therapy. *Exp.Neurol.* 205:525-535.
- 337-Jun, K., E.S. Piedras-Renteria, S.M. Smith, D.B. Wheeler, S.B. Lee, T.G. Lee, H. Chin, M.E. Adams, R.H. Scheller, R.W. Tsien, y H.S. Shin. 1999. Ablation of P/Q-type Ca(2+) channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the alpha(1A)-subunit. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:15245-15250.
- 338-Kajiwara, R., O. Sand, Y. Kidokoro, M.E. Barish, y T. Iijima. 1997. Functional organization of chromaffin cells and cholinergic synaptic transmission in rat adrenal medulla. *Jpn.J.Physiol.* 47:449-464.
- 339-Kamp, T.J., y J.W. Hell. 2000. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ.Res.* 87:1095-1102.
- 340-Kanno, T. 1998. Intra- and intercellular Ca²⁺ signaling in paraneurons and other secretory cells. *Jpn.J.Physiol.* 48:219-227.
- 341-Kao, L.S., y A.S. Schneider. 1985. Muscarinic receptors on bovine chromaffin cells mediate a rise in cytosolic calcium that is independent of extracellular calcium. *J.Biol.Chem.* 260:2019-2022.
- 342-Karlin, A. 2002. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat.Rev.Neurosci.* 3:102-114.
- 343-Katz, B., y R. Miledi. 1977. Suppression of transmitter release at the neuromuscular junction. *Proc.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci.* 196:465-469.
- 344-Katz, B., y R. Miledi. 1973. The binding of acetylcholine to receptors and its removal from the synaptic cleft. *J.Physiol.* 231:549-574.
- 345-Katz, B., y R. Miledi. 1965. The Measurement of Synaptic Delay, and the Time Course of Acetylcholine Release at the Neuromuscular Junction. *Proc.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci.* 161:483-495.
- 346-Katz, E., A.B. Elgoyhen, M.E. Gomez-Casati, M. Knipper, D.E. Vetter, P.A. Fuchs, y E. Glowatzki. 2004. Developmental regulation of nicotinic synapses on cochlear inner hair cells. *J.Neurosci.* 24:7814-7820.
- 347-Ke, L., y R.J. Lukas. 1996. Effects of steroid exposure on ligand binding and functional activities of diverse nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *J.Neurochem.* 67:1100-1112.
- 348-Kem, W.R., V.M. Mahnir, L. Prokai, R.L. Papke, X. Cao, S. LeFrancois, K. Wildeboer, K. Prokai-Tatrai, J. Porter-Papke, y F. Soti. 2004. Hydroxy metabolites of the Alzheimer's drug candidate 3-[(2,4-dimethoxy)benzylidene]-anabaseine dihydrochloride (GTS-21): their molecular properties, interactions with brain nicotinic receptors, and brain penetration. *Mol.Pharmacol.* 65:56-67.
- 349-Keyser, K.T., L.R. Britto, R. Schoepfer, P. Whiting, J. Cooper, W. Conroy, A. Brozowska-Prechtel, H.J. Karten, y J. Lindstrom. 1993. Three subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors are expressed in chick retina. *J.Neurosci.* 13:442-454.

- 350-Keyser, K.T., M.A. MacNeil, N. Dmitrieva, F. Wang, R.H. Masland, y J.M. Lindstrom. 2000. Amacrine, ganglion, and displaced amacrine cells in the rabbit retina express nicotinic acetylcholine receptors. *Vis.Neurosci.* 17:743-752.
- 351-Khiroug, L., R. Giniatullin, E. Sokolova, M. Talantova, y A. Nistri. 1997. Imaging of intracellular calcium during desensitization of nicotinic acetylcholine receptors of rat chromaffin cells. *Br.J.Pharmacol.* 122:1323-1332.
- 352-Khiroug, L., E. Sokolova, R. Giniatullin, R. Afzalov, y A. Nistri. 1998. Recovery from desensitization of neuronal nicotinic acetylcholine receptors of rat chromaffin cells is modulated by intracellular calcium through distinct second messengers. *J.Neurosci.* 18:2458-2466.
- 353-Khiroug, S.S., P.C. Harkness, P.W. Lamb, S.N. Sudweeks, L. Khiroug, N.S. Millar, y J.L. Yakel. 2002. Rat nicotinic ACh receptor alpha7 and beta2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels. *J.Physiol.* 540:425-434.
- 354-Kidokoro, Y., S. Miyazaki, y S. Ozawa. 1982. Acetylcholine-induced membrane depolarization and potential fluctuations in the rat adrenal chromaffin cell. *J.Physiol.* 324:203-220.
- 355-Kidokoro, Y., y A.K. Ritchie. 1980. Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. *J.Physiol.* 307:199-216.
- 356-Kihara, T., S. Shimohama, H. Sawada, K. Honda, T. Nakamizo, H. Shibasaki, T. Kume, y A. Akaike. 2001. alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block A beta-amyloid-induced neurotoxicity. *J.Biol.Chem.* 276:13541-13546.
- 357-Kihara, T., S. Shimohama, H. Sawada, J. Kimura, T. Kume, H. Kochiyama, T. Maeda, y A. Akaike. 1997. Nicotinic receptor stimulation protects neurons against beta-amyloid toxicity. *Ann.Neurol.* 42:159-163.
- 358-Kim, C., K. Jun, T. Lee, S.S. Kim, M.W. McEnery, H. Chin, H.L. Kim, J.M. Park, D.K. Kim, S.J. Jung, J. Kim, y H.S. Shin. 2001. Altered nociceptive response in mice deficient in the alpha(1B) subunit of the voltage-dependent calcium channel. *Mol.Cell.Neurosci.* 18:235-245.
- 359-Kiss, J.P., K. Windisch, A. Balla, H. Sershen, y A. Lajtha. 1997. Dual effect of DMPP on the resting release of noradrenaline from rat hippocampal slices. *Brain Res.Bull.* 43:257-262.
- 360-Kitamura, N., T. Ohta, S. Ito, y Y. Nakazato. 1997. Calcium channel subtypes in porcine adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch.* 434:179-187.
- 361-Kleppisch, T., G. Ahnert-Hilger, M. Gollasch, K. Spicher, J. Hescheler, G. Schultz, y W. Rosenthal. 1992. Inhibition of voltage-dependent Ca²⁺ channels via alpha 2-adrenergic and opioid receptors in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch.* 421:131-137.
- 362-Klingauf, J., y E. Neher. 1997. Modeling buffered Ca²⁺ diffusion near the membrane: implications for secretion in neuroendocrine cells. *Biophys.J.* 72:674-690.
- 363-Klink, R., A. de Kerchove d'Exaerde, M. Zoli, y J.P. Changeux. 2001. Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *J.Neurosci.* 21:1452-1463.
- 364-Knight, D.E., y P.F. Baker. 1986. Observations on the muscarinic activation of catecholamine secretion in the chicken adrenal. *Neuroscience.* 19:357-366.
- 365-Koike, K., K. Hashimoto, N. Takai, E. Shimizu, N. Komatsu, H. Watanabe, M. Nakazato, N. Okamura, K.E. Stevens, R. Freedman, y M. Iyo. 2005. Tropisetron improves deficits in auditory P50 suppression in schizophrenia. *Schizophr.Res.* 76:67-72.
- 366-Krause, R.M., B. Buisson, S. Bertrand, P.J. Corringer, J.L. Galzi, J.P. Changeux, y D. Bertrand. 1998. Ivermectin: a positive allosteric effector of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Mol.Pharmacol.* 53:283-294.

- 367-Kriegstein, K., F. Deimling, C. Suter-Crazzolara, y K. Unsicker. 1996. Expression and localization of GDNF in developing and adult adrenal chromaffin cells. *Cell Tissue Res.* 286:263-268.
- 368-Kubo, T., K. Fukuda, A. Mikami, A. Maeda, H. Takahashi, M. Mishina, T. Haga, K. Haga, A. Ichiyama, y K. Kangawa. 1986. Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature.* 323:411-416.
- 369-Kuffler, S.W., y D. Yoshikami. 1975. The number of transmitter molecules in a quantum: an estimate from iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse. *J.Physiol.* 251:465-482.
- 370-Kuramoto, H., H. Kondo, y T. Fujita. 1987. Calcitonin gene-related peptide (CGRP)-like immunoreactivity in scattered chromaffin cells and nerve fibers in the adrenal gland of rats. *Cell Tissue Res.* 247:309-315.
- 371-Lape, R., D. Colquhoun, y L.G. Sivilotti. 2008. On the nature of partial agonism in the nicotinic receptor superfamily. *Nature.* 454:722-727.
- 372-Lara, B., L. Gandia, A. Torres, R. Olivares, R. Martinez-Sierra, A.G. Garcia, y M.G. Lopez. 1997. 'Wide-spectrum Ca²⁺ channel antagonists': lipophilicity, inhibition, and recovery of secretion in chromaffin cells. *Eur.J.Pharmacol.* 325:109-119.
- 373-Lax, P., S. Fucile, y F. Eusebi. 2002. Ca(2+) permeability of human heteromeric nAChRs expressed by transfection in human cells. *Cell Calcium.* 32:53-58.
- 374-Lazareno, S., V. Dolezal, A. Popham, y N.J. Birdsall. 2004. Thiochrome enhances acetylcholine affinity at muscarinic M4 receptors: receptor subtype selectivity via cooperativity rather than affinity. *Mol.Pharmacol.* 65:257-266.
- 375-Le Novere, N., P.J. Corringer, y J.P. Changeux. 2002. The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J.Neurobiol.* 53:447-456.
- 376-Le Novere, N., M. Zoli, y J.P. Changeux. 1996. Neuronal nicotinic receptor alpha 6 subunit mRNA is selectively concentrated in catecholaminergic nuclei of the rat brain. *Eur.J.Neurosci.* 8:2428-2439.
- 377-Leonard, S., C. Adams, C.R. Breese, L.E. Adler, P. Bickford, W. Byerley, H. Coon, J.M. Griffith, C. Miller, M. Myles-Worsley, H.T. Nagamoto, Y. Rollins, K.E. Stevens, M. Waldo, y R. Freedman. 1996. Nicotinic receptor function in schizophrenia. *Schizophr.Bull.* 22:431-445.
- 378-Lester, H.A., C. Xiao, R. Srinivasan, C.D. Son, J. Miwa, R. Pantoja, M.R. Banghart, D.A. Dougherty, A.M. Goate, y J.C. Wang. 2009. Nicotine is a selective pharmacological chaperone of acetylcholine receptor number and stoichiometry. Implications for drug discovery. *AAPS J.* 11:167-177.
- 379-Levandoski, M.M., B. Piket, y J. Chang. 2003. The anthelmintic levamisole is an allosteric modulator of human neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Eur.J.Pharmacol.* 471:9-20.
- 380-Levi-Montalcini, R., y L. Aloe. 1980. Tropic, trophic, and transforming effects of nerve growth factor. *Adv.Biochem.Psychopharmacol.* 25:3-15.
- 381-Lievano, A., C.M. Santi, C.J. Serrano, C.L. Trevino, A.R. Bellve, A. Hernandez-Cruz, y A. Darszon. 1996. T-type Ca²⁺ channels and alpha1E expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett.* 388:150-154.
- 382-Light, G.A., y D.L. Braff. 1999. Human and animal studies of schizophrenia-related gating deficits. *Curr.Psychiatry Rep.* 1:31-40.
- 383-Ligon, B., A.E. Boyd 3rd, y K. Dunlap. 1998. Class A calcium channel variants in pancreatic islets and their role in insulin secretion. *J.Biol.Chem.* 273:13905-13911.
- 384-Lim, W., S.J. Kim, H.D. Yan, y J. Kim. 1997. Ca²⁺-channel-dependent and -independent inhibition of exocytosis by extracellular ATP in voltage-clamped rat adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch.* 435:34-42.

- 385-Lin, L.F., D.H. Doherty, J.D. Lile, S. Bektesh, y F. Collins. 1993. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*. 260:1130-1132.
- 386-Lindvall, O., E.O. Backlund, L. Farde, G. Sedvall, R. Freedman, B. Hoffer, A. Nobin, A. Seiger, y L. Olson. 1987. Transplantation in Parkinson's disease: two cases of adrenal medullary grafts to the putamen. *Ann.Neurol*. 22:457-468.
- 387-Linnoila, R.I., R.P. Diaugustine, A. Hervonen, y R.J. Miller. 1980. Distribution of [Met5]- and [Leu5]-enkephalin-, vasoactive intestinal polypeptide- and substance P-like immunoreactivities in human adrenal glands. *Neuroscience*. 5:2247-2259.
- 388-Lioudyno, M.I., M. Verbitsky, E. Glowatzki, J.C. Holt, J. Boulter, J.E. Zadina, A.B. Elgoyhen, y P.S. Guth. 2002. The alpha9/alpha10-containing nicotinic ACh receptor is directly modulated by opioid peptides, endomorphin-1, and dynorphin B, proposed efferent cotransmitters in the inner ear. *Mol.Cell.Neurosci*. 20:695-711.
- 389-Lippiello, P.M., J.S. Beaver, G.J. Gatto, J.W. James, K.G. Jordan, V.M. Traina, J. Xie, y M. Bencherif. 2008. TC-5214 (S-(+)-mecamylamine): a neuronal nicotinic receptor modulator with antidepressant activity. *CNS Neurosci.Ther*. 14:266-277.
- 390-Lipscombe, D., S. Kongsamut, y R.W. Tsien. 1989. Alpha-adrenergic inhibition of sympathetic neurotransmitter release mediated by modulation of N-type calcium-channel gating. *Nature*. 340:639-642.
- 391-Liu, J., B.R. Conklin, N. Blin, J. Yun, y J. Wess. 1995. Identification of a receptor/G-protein contact site critical for signaling specificity and G-protein activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 92:11642-11646.
- 392-Liu, L., P.K. Gonzalez, C.F. Barrett, y A.R. Rittenhouse. 2003. The calcium channel ligand FPL 64176 enhances L-type but inhibits N-type neuronal calcium currents. *Neuropharmacology*. 45:281-292.
- 393-Liu, Q., Y. Huang, F. Xue, A. Simard, J. DeChon, G. Li, J. Zhang, L. Lucero, M. Wang, M. Sierks, G. Hu, Y. Chang, R.J. Lukas, y J. Wu. 2009. A novel nicotinic acetylcholine receptor subtype in basal forebrain cholinergic neurons with high sensitivity to amyloid peptides. *J.Neurosci*. 29:918-929.
- 394-Liu, Q., H. Kawai, y D.K. Berg. 2001. beta -Amyloid peptide blocks the response of alpha 7-containing nicotinic receptors on hippocampal neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 98:4734-4739.
- 395-Livett, B.G. 1984. Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol.Rev*. 64:1103-1161.
- 396-Livett, B.G., R. Day, R.P. Elde, y P.R. Howe. 1982. Co-storage of enkephalins and adrenaline in the bovine adrenal medulla. *Neuroscience*. 7:1323-1332.
- 397-Livett, B.G., D.M. Dean, L.G. Whelan, S. Udenfriend, y J. Rossier. 1981. Co-release of enkephalin and catecholamines from cultured adrenal chromaffin cells. *Nature*. 289:317-319.
- 398-Livett, B.G., V. Kozousek, F. Mizobe, y D.M. Dean. 1979. Substance P inhibits nicotinic activation of chromaffin cells. *Nature*. 278:256-257.
- 399-Llinas, R., M. Sugimori, J.W. Lin, y B. Cherksey. 1989a. Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 86:1689-1693.
- 400-Llinas, R.R., M. Sugimori, y B. Cherksey. 1989b. Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons. The P channel. *Ann.N.Y.Acad.Sci*. 560:103-111.
- 401-Lloyd, R.V., J.C. Sisson, B. Shapiro, y A.A. Verhofstad. 1986. Immunohistochemical localization of epinephrine, norepinephrine, catecholamine-synthesizing enzymes, and chromogranin in neuroendocrine cells and tumors. *Am.J.Pathol*. 125:45-54.
- 402-Longo, F.M., y S.M. Massa. 2005. Neurotrophin receptor-based strategies for Alzheimer's disease. *Curr.Alzheimer Res*. 2:167-169.

- 403-Lopez, M.G., R.I. Fonteriz, L. Gandia, M. de la Fuente, M. Villarroya, J. Garcia-Sancho, y A.G. Garcia. 1993. The nicotinic acetylcholine receptor of the bovine chromaffin cell, a new target for dihydropyridines. *Eur.J.Pharmacol.* 247:199-207.
- 404-Lopez, M.G., C. Montiel, C.J. Herrero, E. Garcia-Palomero, I. Mayorgas, J.M. Hernandez-Guijo, M. Villarroya, R. Olivares, L. Gandia, J.M. McIntosh, B.M. Olivera, y A.G. Garcia. 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.* 95:14184-14189.
- 405-Lopez-Hernandez, G., A.N. Placzek, J.S. Thinschmidt, P. Lestage, C. Trocme-Thibierge, P. Morain, y R.L. Papke. 2007. Partial agonist and neuromodulatory activity of S 24795 for alpha7 nAChR responses of hippocampal interneurons. *Neuropharmacology.* 53:134-144.
- 406-Lopez-Lozano, J.J., G. Bravo, J. Abascal, B. Brera, y I. Millan. 1999. Clinical outcome of cotransplantation of peripheral nerve and adrenal medulla in patients with Parkinson's disease. Clinica Puerta de Hierro Neural Transplantation Group. *J.Neurosurg.* 90:875-882.
- 407-Lopez-Lozano, J.J., G. Bravo, J. Abascal, B. Brera, M.L. Pascual, R. Martinez, C. de la Torre, y R. Moreno. 1996. Clinical experience with cotransplantation of peripheral nerve and adrenal medulla in patients with Parkinson's disease. *Transpl.Int.* 9 Suppl 1:S485-91.
- 408-Lopez-Lozano, J.J., G. Bravo, B. Brera, J. Dargallo, J. Salmean, J. Uria, J. Insausti, R. Martinez, P. Sanchez, C. de la Torre, y R. Moreno. 1997a. Regression of parkinsonian fetal ventral mesencephalon grafts upon withdrawal of cyclosporine A immunosuppression. The CPH Neural Transplantation Group. *Transplant.Proc.* 29:977-980.
- 409-Lopez-Lozano, J.J., G. Bravo, B. Brera, I. Millan, J. Dargallo, J. Salmean, J. Uria, y J. Insausti. 1997b. Long-term improvement in patients with severe Parkinson's disease after implantation of fetal ventral mesencephalic tissue in a cavity of the caudate nucleus: 5-year follow up in 10 patients. Clinica Puerta de Hierro Neural Transplantation Group. *J.Neurosurg.* 86:931-942.
- 410-Lopez-Lozano, J.J., B. Brera, J. Abascal, y G. Bravo. 1989. Preparation of adrenal medullary tissue for transplantation in Parkinson's disease: a new procedure. Technical note. *J.Neurosurg.* 71:452-454.
- 411-Lopez-Lozano, J.J., M. Mata, y G. Bravo. 2000. Neural transplants en Parkinson disease: clinical results of 10 years of experience. Group of Neural Transplants of the CPH. *Rev.Neurol.* 30:1077-1083.
- 412-Lu, Z.L., C.A. Curtis, P.G. Jones, J. Pavia, y E.C. Hulme. 1997. The role of the aspartate-arginine-tyrosine triad in the m1 muscarinic receptor: mutations of aspartate 122 and tyrosine 124 decrease receptor expression but do not abolish signaling. *Mol.Pharmacol.* 51:234-241.
- 413-Lu, Z.L., J.W. Saldanha, y E.C. Hulme. 2002. Seven-transmembrane receptors: crystals clarify. *Trends Pharmacol.Sci.* 23:140-146.
- 414-Luebke, J.I., K. Dunlap, y T.J. Turner. 1993. Multiple calcium channel types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuron.* 11:895-902.
- 415-Luetje, C.W. 2004. Getting past the asterisk: the subunit composition of presynaptic nicotinic receptors that modulate striatal dopamine release. *Mol.Pharmacol.* 65:1333-1335.
- 416-Luetje, C.W., y J. Patrick. 1991. Both alpha- and beta-subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J.Neurosci.* 11:837-845.
- 417-Lukas, R.J., J.P. Changeux, N. Le Novere, E.X. Albuquerque, D.J. Balfour, D.K. Berg, D. Bertrand, V.A. Chiappinelli, P.B. Clarke, A.C. Collins, J.A. Dani, S.R. Grady, K.J. Kellar, J.M. Lindstrom, M.J. Marks, M. Quik, P.W. Taylor, y S. Wonnacott. 1999. International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol.Rev.* 51:397-401.

- 418-Luo, S., J.M. Kulak, G.E. Cartier, R.B. Jacobsen, D. Yoshikami, B.M. Olivera, y J.M. McIntosh. 1998. alpha-conotoxin AulB selectively blocks alpha3 beta4 nicotinic acetylcholine receptors and nicotine-evoked norepinephrine release. *J.Neurosci.* 18:8571-8579.
- 419-Ma, L., M.A. Seager, M. Wittmann, M. Jacobson, D. Bickel, M. Burno, K. Jones, V.K. Graufelds, G. Xu, M. Pearson, A. McCampbell, R. Gaspar, P. Shughrue, A. Danziger, C. Regan, R. Flick, D. Pascarella, S. Garson, S. Doran, C. Kreatsoulas, L. Veng, C.W. Lindsley, W. Shipe, S. Kuduk, C. Sur, G. Kinney, G.R. Seabrook, y W.J. Ray. 2009. Selective activation of the M1 muscarinic acetylcholine receptor achieved by allosteric potentiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 106:15950-15955.
- 420-Machold, J., C. Weise, Y. Utkin, V. Tsetlin, y F. Hucho. 1995. The handedness of the subunit arrangement of the nicotinic acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *Eur.J.Biochem.* 234:427-430.
- 421-Macor, J.E., D. Gurley, T. Lanthorn, J. Loch, R.A. Mack, G. Mullen, O. Tran, N. Wright, y J.C. Gordon. 2001. The 5-HT3 antagonist tropisetron (ICS 205-930) is a potent and selective alpha7 nicotinic receptor partial agonist. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 11:319-321.
- 422-Madrado, I., R. Drucker-Colin, V. Diaz, J. Martinez-Mata, C. Torres, y J.J. Becerril. 1987. Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. *N.Engl.J.Med.* 316:831-834.
- 423-Maelicke, A., T. Coban, A. Storch, A. Schrattenholz, E.F. Pereira, y E.X. Albuquerque. 1997. Allosteric modulation of *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptor ion channel activity by noncompetitive agonists. *J.Recept.Signal Transduct.Res.* 17:11-28.
- 424-Maggi, L., E. Palma, R. Miledi, y F. Eusebi. 1998. Effects of fluoxetine on wild and mutant neuronal alpha 7 nicotinic receptors. *Mol.Psychiatry.* 3:350-355.
- 425-Mahata, M., S.K. Mahata, R.J. Parmer, y D.T. O'Connor. 1998. Proadrenomedullin N-terminal 20 peptide: minimal active region to regulate nicotinic receptors. *Hypertension.* 32:907-916.
- 426-Mahata, S.K., M. Mahata, M.M. Fung, y D.T. O'Connor. 2010a. Catestatin: A multifunctional peptide from chromogranin A. *Regul.Pept.*
- 427-Mahata, S.K., M. Mahata, M.M. Fung, y D.T. O'Connor. 2010b. Catestatin: A multifunctional peptide from chromogranin A. *Regul.Pept.*
- 428-Mahata, S.K., D.T. O'Connor, M. Mahata, S.H. Yoo, L. Taupenot, H. Wu, B.M. Gill, y R.J. Parmer. 1997. Novel autocrine feedback control of catecholamine release. A discrete chromogranin A fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist. *J.Clin.Invest.* 100:1623-1633.
- 429-Malhotra, R.K., y A.R. Wakade. 1987. Vasoactive intestinal polypeptide stimulates the secretion of catecholamines from the rat adrenal gland. *J.Physiol.* 388:285-294.
- 430-Malhotra, R.K., T.D. Wakade, y A.R. Wakade. 1989. Cross-communication between acetylcholine and VIP in controlling catecholamine secretion by affecting cAMP, inositol triphosphate, protein kinase C, and calcium in rat adrenal medulla. *J.Neurosci.* 9:4150-4157.
- 431-Malhotra, R.K., T.D. Wakade, y A.R. Wakade. 1988. Comparison of secretion of catecholamines from the rat adrenal medulla during continuous exposure to nicotine, muscarine or excess K. *Neuroscience.* 26:313-320.
- 432-Mandelzys, A., P. De Koninck, y E. Cooper. 1995. Agonist and toxin sensitivities of ACh-evoked currents on neurons expressing multiple nicotinic ACh receptor subunits. *J.Neurophysiol.* 74:1212-1221.
- 433-Maneu, V., J. Rojo, J. Mulet, L.M. Valor, F. Sala, M. Criado, A.G. Garcia, y L. Gandia. 2002. A single neuronal nicotinic receptor alpha3alpha7beta4* is present in the bovine chromaffin cell. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 971:165-167.

- 434-Mao, D., R.P. Yasuda, H. Fan, B.B. Wolfe, y K.J. Kellar. 2006. Heterogeneity of nicotinic cholinergic receptors in rat superior cervical and nodose Ganglia. *Mol.Pharmacol.* 70:1693-1699.
- 435-Marley, P.D., S.J. Bunn, D.C. Wan, A.M. Allen, y F.A. Mendelsohn. 1989. Localization of angiotensin II binding sites in the bovine adrenal medulla using a labelled specific antagonist. *Neuroscience.* 28:777-787.
- 436-Marritt, A.M., B.C. Cox, R.P. Yasuda, J.M. McIntosh, Y. Xiao, B.B. Wolfe, y K.J. Kellar. 2005. Nicotinic cholinergic receptors in the rat retina: simple and mixed heteromeric subtypes. *Mol.Pharmacol.* 68:1656-1668.
- 437-Martin, A.O., M.N. Mathieu, C. Chevillard, y N.C. Guerineau. 2001. Gap junctions mediate electrical signaling and ensuing cytosolic Ca²⁺ increases between chromaffin cells in adrenal slices: A role in catecholamine release. *J.Neurosci.* 21:5397-5405.
- 438-Martin, A.O., M.N. Mathieu, y N.C. Guerineau. 2003. Evidence for long-lasting cholinergic control of gap junctional communication between adrenal chromaffin cells. *J.Neurosci.* 23:3669-3678.
- 439-Martin, L.F., W.R. Kem, y R. Freedman. 2004. Alpha-7 nicotinic receptor agonists: potential new candidates for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl).* 174:54-64.
- 440-Marubio, L.M., M. del Mar Arroyo-Jimenez, M. Cordero-Erausquin, C. Lena, N. Le Novere, A. de Kerchove d'Exaerde, M. Huchet, M.I. Damaj, y J.P. Changeux. 1999. Reduced antinociception in mice lacking neuronal nicotinic receptor subunits. *Nature.* 398:805-810.
- 441-Matsui, M., D. Motomura, H. Karasawa, T. Fujikawa, J. Jiang, Y. Komiya, S. Takahashi, y M.M. Taketo. 2000. Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97:9579-9584.
- 442-Matsumura, C., H. Kuwashima, S. Soma, y T. Kimura. 2007. Effects of genistein and herbimycin, tyrosine kinase inhibitors, on catecholamine release in bovine adrenal chromaffin cells. *Auton.Autacoid Pharmacol.* 27:181-187.
- 443-Mavragani, C.P., N.M. Moutsopoulos, y H.M. Moutsopoulos. 2006. The management of Sjogren's syndrome. *Nat.Clin.Pract.Rheumatol.* 2:252-261.
- 444-McGehee, D.S., M.J. Heath, S. Gelber, P. Devay, y L.W. Role. 1995. Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science.* 269:1692-1696.
- 445-McGivern, J.G. 2006. Targeting N-type and T-type calcium channels for the treatment of pain. *Drug Discov.Today.* 11:245-253.
- 446-McIntosh, J.M., L. Azam, S. Staheli, C. Dowell, J.M. Lindstrom, A. Kuryatov, J.E. Garrett, M.J. Marks, y P. Whiteaker. 2004. Analogs of alpha-conotoxin MII are selective for alpha6-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Mol.Pharmacol.* 65:944-952.
- 447-McIntosh, J.M., P.V. Plazas, M. Watkins, M.E. Gomez-Casati, B.M. Olivera, y A.B. Elgoyhen. 2005. A novel alpha-conotoxin, PeIA, cloned from *Conus pergrandis*, discriminates between rat alpha9alpha10 and alpha7 nicotinic cholinergic receptors. *J.Biol.Chem.* 280:30107-30112.
- 448-McKay, D.B., I. Lopez, P.A. Sanchez, J.L. English, y L.J. Wallace. 1991. Characterization of muscarinic receptors of bovine adrenal chromaffin cells: binding, secretion and anti-microtubule drug effects. *Gen.Pharmacol.* 22:1185-1189.
- 449-Meda, P., M.S. Pepper, O. Traub, K. Willecke, D. Gros, E. Beyer, B. Nicholson, D. Paul, y L. Orci. 1993. Differential expression of gap junction connexins in endocrine and exocrine glands. *Endocrinology.* 133:2371-2378.
- 450-Meyer, E.M., A. Kuryatov, V. Gerzanich, J. Lindstrom, y R.L. Papke. 1998. Analysis of 3-(4-hydroxy, 2-Methoxybenzylidene)anabaseine selectivity and activity at human and rat alpha-7 nicotinic receptors. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 287:918-925.

- 451-Michel, A.D., y R.L. Whiting. 1987. Direct binding studies on ileal and cardiac muscarinic receptors. *Br.J.Pharmacol.* 92:755-767.
- 452-Michel-Béchet, M., G. COTTE, D. PICARD, y A.M. HAON. 1963. Ultrastructural Cytology of the Adrenal Medulla of the Golden Hamster (*Cricetus Auratus*). *Ann.Endocrinol.(Paris)*. 24:1044-1048.
- 453-Michelena, P., M.A. Moro, C.J. Castillo, y A.G. Garcia. 1991. Muscarinic receptors in separate populations of noradrenaline- and adrenaline-containing chromaffin cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 177:913-919.
- 454-Mihalak, K.B., F.I. Carroll, y C.W. Luetje. 2006. Varenicline is a partial agonist at alpha4beta2 and a full agonist at alpha7 neuronal nicotinic receptors. *Mol.Pharmacol.* 70:801-805.
- 455-Miljanich, G.P., y J. Ramachandran. 1995. Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function, and therapeutic implications. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 35:707-734.
- 456-Millar, N.S., y C. Gotti. 2009. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology.* 56:237-246.
- 457-Millar, N.S., y P.C. Harkness. 2008. Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholine receptors (Review). *Mol.Membr.Biol.* 25:279-292.
- 458-Mintz, I.M., M.E. Adams, y B.P. Bean. 1992a. P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron.* 9:85-95.
- 459-Mintz, I.M., V.J. Venema, K.M. Swiderek, T.D. Lee, B.P. Bean, y M.E. Adams. 1992b. P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Nature.* 355:827-829.
- 460-Mishra, S.K., y K. Hermsmeyer. 1994. Selective inhibition of T-type Ca²⁺ channels by Ro 40-5967. *Circ.Res.* 75:144-148.
- 461-Miwa, J.M., I. Ibanez-Tallon, G.W. Crabtree, R. Sanchez, A. Sali, L.W. Role, y N. Heintz. 1999. lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS. *Neuron.* 23:105-114.
- 462-Miwa, J.M., T.R. Stevens, S.L. King, B.J. Caldarone, I. Ibanez-Tallon, C. Xiao, R.M. Fitzsimonds, C. Pavlides, H.A. Lester, M.R. Picciotto, y N. Heintz. 2006. The prototoxin lynx1 acts on nicotinic acetylcholine receptors to balance neuronal activity and survival in vivo. *Neuron.* 51:587-600.
- 463-Mogg, A.J., P. Whiteaker, J.M. McIntosh, M. Marks, A.C. Collins, y S. Wonnacott. 2002. Methyllycaconitine is a potent antagonist of alpha-conotoxin-MII-sensitive presynaptic nicotinic acetylcholine receptors in rat striatum. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 302:197-204.
- 464-Mollard, P., E.P. Seward, y M.C. Nowycky. 1995. Activation of nicotinic receptors triggers exocytosis from bovine chromaffin cells in the absence of membrane depolarization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92:3065-3069.
- 465-Monje, V.D., J.A. Haack, S.R. Naisbitt, G. Miljanich, J. Ramachandran, L. Nasdasdi, B.M. Olivera, D.R. Hillyard, y W.R. Gray. 1993. A new Conus peptide ligand for Ca channel subtypes. *Neuropharmacology.* 32:1141-1149.
- 466-Monod, J., J. Wyman, y J.P. Changeux. 1965. On the Nature of Allosteric Transitions: a Plausible Model. *J.Mol.Biol.* 12:88-118.
- 467-Montiel, C., M.G. Lopez, P. Sanchez-Garcia, R. Maroto, P. Zapater, y A.G. Garcia. 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):427-437.

- 468-Moretti, M., S. Vailati, M. Zoli, G. Lippi, L. Riganti, R. Longhi, A. Viegi, F. Clementi, y C. Gotti. 2004. Nicotinic acetylcholine receptor subtypes expression during rat retina development and their regulation by visual experience. *Mol.Pharmacol.* 66:85-96.
- 469-Moroni, M., R. Zwart, E. Sher, B.K. Cassels, y I. Bermudez. 2006. Alpha4beta2 Nicotinic Receptors with High and Low Acetylcholine Sensitivity: Pharmacology, Stoichiometry, and Sensitivity to Long-Term Exposure to Nicotine. *Mol.Pharmacol.* 70:755-768.
- 470-Morrison, S.F., y W.H. Cao. 2000. Different adrenal sympathetic preganglionic neurons regulate epinephrine and norepinephrine secretion. *Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol.* 279:R1763-75.
- 471-Moser, T. 1998. Low-conductance intercellular coupling between mouse chromaffin cells in situ. *J.Physiol.* 506 (Pt 1):195-205.
- 472-Moser, T., y E. Neher. 1997a. Estimation of mean exocytic vesicle capacitance in mouse adrenal chromaffin cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94:6735-6740.
- 473-Moser, T., y E. Neher. 1997b. Rapid exocytosis in single chromaffin cells recorded from mouse adrenal slices. *J.Neurosci.* 17:2314-2323.
- 474-Mousavi, M., E. Hellstrom-Lindhahl, Z.Z. Guan, I. Bednar, y A. Nordberg. 2001. Expression of nicotinic acetylcholine receptors in human and rat adrenal medulla. *Life Sci.* 70:577-590.
- 475-Mulle, C., C. Lena, y J.P. Changeux. 1992. Potentiation of nicotinic receptor response by external calcium in rat central neurons. *Neuron.* 8:937-945.
- 476-Mullen, G., J. Napier, M. Balestra, T. DeCory, G. Hale, J. Macor, R. Mack, J. Loch 3rd, E. Wu, A. Kover, P. Verhoest, A. Sampognaro, E. Phillips, Y. Zhu, R. Murray, R. Griffith, J. Blosser, D. Gurley, A. Machulskis, J. Zongrone, A. Rosen, y J. Gordon. 2000. (-)-Spiro[1-azabicyclo[2.2.2]octane-3,5'-oxazolidin-2'-one], a conformationally restricted analogue of acetylcholine, is a highly selective full agonist at the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor. *J.Med.Chem.* 43:4045-4050.
- 477-Murata, T., N. Koide, M. Tsuboi, S. Kohno, K. Hikita, y N. Kaneda. 2008a. Autocrine TGF-beta signaling is required for the GDNF/CNTF-induced neuronal differentiation of adrenal chromaffin tsAM5D cells expressing temperature-sensitive SV40 T-antigen. *Neurosci.Lett.* 438:42-47.
- 478-Murata, T., M. Tsuboi, N. Koide, K. Hikita, S. Kohno, y N. Kaneda. 2008b. Neuronal differentiation elicited by glial cell line-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor in adrenal chromaffin cell line tsAM5D immortalized with temperature-sensitive SV40 T-antigen. *J.Neurosci.Res.* 86:1694-1710.
- 479-Nachmansohn, D., y A.L. Machado. 1943. The formation of acetylcholine. A new enzyme "choline acetylase". *J Neurophysiol.* 6:397-404.
- 480-Nagele, R.G., M.R. D'Andrea, W.J. Anderson, y H.Y. Wang. 2002. Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 110:199-211.
- 481-Nakamura, T., M. Matsui, K. Uchida, A. Futatsugi, S. Kusakawa, N. Matsumoto, K. Nakamura, T. Manabe, M.M. Taketo, y K. Mikoshiba. 2004. M(3) muscarinic acetylcholine receptor plays a critical role in parasympathetic control of salivation in mice. *J.Physiol.* 558:561-575.
- 482-Nakazato, Y., Y. Tani, H. Teraoka, T. Sugawara, T. Asano, T. Ohta, y S. Ito. 1994. Inhibitory effects of caffeine on secretagogue-induced catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells of the guinea-pig. *Br.J.Pharmacol.* 111:935-941.
- 483-Nassar-Gentina, V., L. Catalan, y M. Luxoro. 1997. Nicotinic and muscarinic components in acetylcholine stimulation of porcine adrenal medullary cells. *Mol.Cell.Biochem.* 169:107-113.
- 484-Nassar-Gentina, V., H.B. Pollard, y E. Rojas. 1988. Electrical activity in chromaffin cells of intact mouse adrenal gland. *Am.J.Physiol.* 254:C675-83.

- 485-Neher, E. 1998. Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron*. 20:389-399.
- 486-Nelson, M.E., A. Kuryatov, C.H. Choi, Y. Zhou, y J. Lindstrom. 2003. Alternate stoichiometries of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol.Pharmacol.* 63:332-341.
- 487-Neubig, R.R., y J.B. Cohen. 1979. Equilibrium binding of [3H]tubocurarine and [3H]acetylcholine by Torpedo postsynaptic membranes: stoichiometry and ligand interactions. *Biochemistry*. 18:5464-5475.
- 488-Nevin, S.T., R.J. Clark, H. Klimis, M.J. Christie, D.J. Craik, y D.J. Adams. 2007. Are alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptors a pain target for alpha-conotoxins? *Mol.Pharmacol.* 72:1406-1410.
- 489-Newcomb, R., B. Szoke, A. Palma, G. Wang, X. Chen, W. Hopkins, R. Cong, J. Miller, L. Urge, K. Tarczy-Hornoch, J.A. Loo, D.J. Dooley, L. Nadasdi, R.W. Tsien, J. Lemos, y G. Miljanich. 1998. Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry*. 37:15353-15362.
- 490-Ng, H.J., E.R. Whittemore, M.B. Tran, D.J. Hogenkamp, R.S. Broide, T.B. Johnstone, L. Zheng, K.E. Stevens, y K.W. Gee. 2007. Nootropic alpha7 nicotinic receptor allosteric modulator derived from GABAA receptor modulators. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 104:8059-8064.
- 491-Nguyen, V.T., A. Ndoye, L.L. Hall, S. Zia, J. Arredondo, A.I. Chernyavsky, D.A. Kist, B.D. Zelickson, M.A. Lawry, y S.A. Grando. 2001. Programmed cell death of keratinocytes culminates in apoptotic secretion of a humectant upon secretagogue action of acetylcholine. *J.Cell.Sci.* 114:1189-1204.
- 492-Noda, M., H. Takahashi, T. Tanabe, M. Toyosato, Y. Furutani, T. Hirose, M. Asai, S. Inayama, T. Miyata, y S. Numa. 1982. Primary structure of alpha-subunit precursor of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence. *Nature*. 299:793-797.
- 493-Novara, M., P. Baldelli, D. Cavallari, V. Carabelli, A. Giaccipoli, y E. Carbone. 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.* 558:433-449.
- 494-Nunez, L., M.T. De La Fuente, A.G. Garcia, y J. Garcia-Sancho. 1995. Differential Ca²⁺ responses of adrenergic and noradrenergic chromaffin cells to various secretagogues. *Am.J.Physiol.* 269:C1540-6.
- 495-O'Connor, D.T., G. Zhu, F. Rao, L. Taupenot, M.M. Fung, M. Das, S.K. Mahata, M. Mahata, L. Wang, K. Zhang, T.A. Greenwood, P.A. Shih, M.G. Cockburn, M.G. Ziegler, M. Stridsberg, N.G. Martin, y J.B. Whitfield. 2008. Heritability and genome-wide linkage in US and australian twins identify novel genomic regions controlling chromogranin a: implications for secretion and blood pressure. *Circulation*. 118:247-257.
- 496-Ohta, T., T. Asano, S. Ito, N. Kitamura, y Y. Nakazato. 1996. Characteristics of cytosolic Ca²⁺ elevation induced by muscarinic receptor activation in single adrenal chromaffin cells of the guinea pig. *Cell Calcium*. 20:303-314.
- 497-Ohta, T., A.R. Wakade, Y. Nakazato, y S. Ito. 2001. Ca(2+)-dependent K(+) current and exocytosis in responses to caffeine and muscarine in voltage-clamped guinea-pig adrenal chromaffin cells. *J.Neurochem.* 78:1243-1255.
- 498-Ohtsuki, H., K. Morita, N. Minami, T. Suemitsu, A. Tsujimoto, y T. Dohi. 1992. Involvement of Ca²⁺ entry and inositol trisphosphate-induced internal Ca²⁺ mobilization in muscarinic receptor-mediated catecholamine release in dog adrenal chromaffin cells. *Neurochem.Int.* 21:259-267.
- 499-Oka, K., T. Andoh, I. Watanabe, Y. Kamiya, y H. Ito. 1998. Inhibition of the neuronal nicotinic receptor-mediated current by kappa opioid receptor agonists in PC12 cells. *Pflugers Arch.* 436:887-893.
- 500-Oki, T., Y. Takagi, S. Inagaki, M.M. Taketo, T. Manabe, M. Matsui, y S. Yamada. 2005. Quantitative analysis of binding parameters of [3H]N-methylscopolamine in central nervous system of muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 133:6-11.

- 501-Olincy, A., y K.E. Stevens. 2007. Treating schizophrenia symptoms with an alpha7 nicotinic agonist, from mice to men. *Biochem.Pharmacol.* 74:1192-1201.
- 502-Olivera, B.M., J.M. McIntosh, L.J. Cruz, F.A. Luque, y W.R. Gray. 1984. Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *Conus geographus* venom. *Biochemistry.* 23:5087-5090.
- 503-Olivos, L., y A.R. Artalejo. 2008a. Muscarinic excitation-secretion coupling in chromaffin cells. *Acta Physiol.(Oxf).* 192:213-220.
- 504-Olivos, L., y A.R. Artalejo. 2008b. Muscarinic excitation-secretion coupling in chromaffin cells. *Acta Physiol.(Oxf).* 192:213-220.
- 505-Olson, L. 1970. Fluorescence histochemical evidence for axonal growth and secretion from transplanted adrenal medullary tissue. *Histochemie.* 22:1-7.
- 506-Olson, L., E.O. Backlund, T. Ebendal, R. Freedman, B. Hamberger, P. Hansson, B. Hoffer, U. Lindblom, B. Meyerson, y I. Stromberg. 1991. Intraputamina infusion of nerve growth factor to support adrenal medullary autografts in Parkinson's disease. One-year follow-up of first clinical trial. *Arch.Neurol.* 48:373-381.
- 507-O'Neill, M.J., T.K. Murray, V. Lakics, N.P. Visanji, y S. Duty. 2002. The role of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in acute and chronic neurodegeneration. *Curr.Drug Targets CNS Neurol.Disord.* 1:399-411.
- 508-O'Sullivan, A.J., y R.D. Burgoyne. 1989. A comparison of bradykinin, angiotensin II and muscarinic stimulation of cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Biosci.Rep.* 9:243-252.
- 509-O'Sullivan, A.J., T.R. Cheek, R.B. Moreton, M.J. Berridge, y R.D. Burgoyne. 1989a. Localization and heterogeneity of agonist-induced changes in cytosolic calcium concentration in single bovine adrenal chromaffin cells from video imaging of fura-2. *EMBO J.* 8:401-411.
- 510-O'Sullivan, A.J., T.R. Cheek, R.B. Moreton, M.J. Berridge, y R.D. Burgoyne. 1989b. Localization and heterogeneity of agonist-induced changes in cytosolic calcium concentration in single bovine adrenal chromaffin cells from video imaging of fura-2. *EMBO J.* 8:401-411.
- 511-Palma, E., L. Maggi, R. Miledi, y F. Eusebi. 1998. Effects of Zn²⁺ on wild and mutant neuronal alpha7 nicotinic receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95:10246-10250.
- 512-Papke, R.L., M. Bencherif, y P. Lippiello. 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.* 213:201-204.
- 513-Papke, R.L., J.K. Porter Papke, y G.M. Rose. 2004. Activity of alpha7-selective agonists at nicotinic and serotonin 5HT3 receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 14:1849-1853.
- 514-Papke, R.L., J.C. Webster, P.M. Lippiello, M. Bencherif, y M.M. Francis. 2000. The activation and inhibition of human nicotinic acetylcholine receptor by RJR-2403 indicate a selectivity for the alpha4beta2 receptor subtype. *J.Neurochem.* 75:204-216.
- 515-Paradiso, K.G., y J.H. Steinbach. 2003. Nicotine is highly effective at producing desensitization of rat alpha4beta2 neuronal nicotinic receptors. *J.Physiol.* 553:857-871.
- 516-Pascual, A., M. Hidalgo-Figueroa, J.I. Piruat, C.O. Pintado, R. Gomez-Diaz, y J. Lopez-Barneo. 2008. Absolute requirement of GDNF for adult catecholaminergic neuron survival. *Nat.Neurosci.* 11:755-761.
- 517-Paterson, D., y A. Nordberg. 2000. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog.Neurobiol.* 61:75-111.
- 518-Pelto-Huikko, M., T. Salminen, y A. Hervonen. 1985. Localization of enkephalins in adrenaline cells and the nerves innervating adrenaline cells in rat adrenal medulla. *Histochemistry.* 82:377-383.

- 519-Pereira, E.F., C. Hilmas, M.D. Santos, M. Alkondon, A. Maelicke, y E.X. Albuquerque. 2002. Unconventional ligands and modulators of nicotinic receptors. *J.Neurobiol.* 53:479-500.
- 520-Pereverzev, A., M. Mikhna, R. Vajna, C. Gissel, M. Henry, M. Weiergraber, J. Hescheler, N. Smyth, y T. Schneider. 2002. Disturbances in glucose-tolerance, insulin-release, and stress-induced hyperglycemia upon disruption of the Ca(v)2.3 (alpha 1E) subunit of voltage-gated Ca(2+) channels. *Mol.Endocrinol.* 16:884-895.
- 521-Perez-Alvarez, A., y A. Albillos. 2007. Key role of the nicotinic receptor in neurotransmitter exocytosis in human chromaffin cells. *J.Neurochem.* 103:2281-2290.
- 522-Perez-Reyes, E. 2003. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol.Rev.* 83:117-161.
- 523-Perez-Reyes, E. 1999. Three for T: molecular analysis of the low voltage-activated calcium channel family. *Cell Mol.Life Sci.* 56:660-669.
- 524-Perez-Reyes, E., L.L. Cribbs, A. Daud, A.E. Lacerda, J. Barclay, M.P. Williamson, M. Fox, M. Rees, y J.H. Lee. 1998. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature.* 391:896-900.
- 525-Perlow, M.J., W.J. Freed, B.J. Hoffer, A. Seiger, L. Olson, y R.J. Wyatt. 1979. Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science.* 204:643-647.
- 526-Pettit, D.L., Z. Shao, y J.L. Yakel. 2001. beta-Amyloid(1-42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. *J.Neurosci.* 21:RC120.
- 527-Picciotto, M.R., M. Zoli, R. Rimondini, C. Lena, L.M. Marubio, E.M. Pich, K. Fuxe, y J.P. Changeux. 1998. Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature.* 391:173-177.
- 528-Pietrobon, D. 2005. Function and dysfunction of synaptic calcium channels: insights from mouse models. *Curr.Opin.Neurobiol.* 15:257-265.
- 529-Plazas, P.V., E. Katz, M.E. Gomez-Casati, C. Bouzat, y A.B. Elgoyhen. 2005. Stoichiometry of the alpha9alpha10 nicotinic cholinergic receptor. *J.Neurosci.* 25:10905-10912.
- 530-Pollo, A., M. Lovallo, E. Sher, y E. Carbone. 1992. Voltage-dependent noradrenergic modulation of omega-conotoxin-sensitive Ca2+ channels in human neuroblastoma IMR32 cells. *Pflugers Arch.* 422:75-83.
- 531-Pons, S., L. Fattore, G. Cossu, S. Tolu, E. Porcu, J.M. McIntosh, J.P. Changeux, U. Maskos, y W. Fratta. 2008. Crucial role of alpha4 and alpha6 nicotinic acetylcholine receptor subunits from ventral tegmental area in systemic nicotine self-administration. *J.Neurosci.* 28:12318-12327.
- 532-Popot, J.L., y J.P. Changeux. 1984. Nicotinic receptor of acetylcholine: structure of an oligomeric integral membrane protein. *Physiol.Rev.* 64:1162-1239.
- 533-Powers, J.F., K.L. Picard, y A.S. Tischler. 2009. RET expression and neuron-like differentiation of pheochromocytoma and normal chromaffin cells. *Horm.Metab.Res.* 41:710-714.
- 534-Prakriya, M., C.R. Solaro, y C.J. Lingle. 1996. Ca2+ elevations detected by BK channels during Ca2+ influx and muscarine-mediated release of Ca2+ from intracellular stores in rat chromaffin cells. *J.Neurosci.* 16:4344-4359.
- 535-Qian, J., y J.L. Noebels. 2001. Presynaptic Ca2+ channels and neurotransmitter release at the terminal of a mouse cortical neuron. *J.Neurosci.* 21:3721-3728.
- 536-Quik, M. 2004. Smoking, nicotine and Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 27:561-568.

- 537-Quik, M., y J.M. Kulak. 2002. Nicotine and nicotinic receptors; relevance to Parkinson's disease. *Neurotoxicology*. 23:581-594.
- 538-Quik, M., y J.M. McIntosh. 2006. Striatal $\alpha 6^*$ nicotinic acetylcholine receptors: potential targets for Parkinson's disease therapy. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 316:481-489.
- 539-Quik, M., S. Vailati, T. Bordia, J.M. Kulak, H. Fan, J.M. McIntosh, F. Clementi, y C. Gotti. 2005. Subunit composition of nicotinic receptors in monkey striatum: effect of treatments with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine or L-DOPA. *Mol.Pharmacol.* 67:32-41.
- 540-Raino, J., A.J. Castiglioni, y D. Lipscombe. 2007. Alternative splicing controls G protein-dependent inhibition of N-type calcium channels in nociceptors. *Nat.Neurosci.* 10:285-292.
- 541-Ramirez-Latorre, J., C.R. Yu, X. Qu, F. Perin, A. Karlin, y L. Role. 1996. Functional contributions of $\alpha 5$ subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature*. 380:347-351.
- 542-Randall, A., y R.W. Tsien. 1995a. Pharmacological dissection of multiple types of Ca^{2+} channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J.Neurosci.* 15:2995-3012.
- 543-Randall, A., y R.W. Tsien. 1995b. Pharmacological dissection of multiple types of Ca^{2+} channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J.Neurosci.* 15:2995-3012.
- 544-Randall, A.D., y R.W. Tsien. 1997. Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacology*. 36:879-893.
- 545-Revah, F., D. Bertrand, J.L. Galzi, A. Devillers-Thiery, C. Mulle, N. Hussy, S. Bertrand, M. Ballivet, y J.P. Changeux. 1991. Mutations in the channel domain alter desensitization of a neuronal nicotinic receptor. *Nature*. 353:846-849.
- 546-Richman, R.W., J. Strock, M.D. Hains, N.J. Cabanilla, K.K. Lau, D.P. Siderovski, y M. Diverse-Pierluissi. 2005. RGS12 interacts with the SNARE-binding region of the Cav2.2 calcium channel. *J.Biol.Chem.* 280:1521-1528.
- 547-Rockman, H.A., W.J. Koch, y R.J. Lefkowitz. 2002. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*. 415:206-212.
- 548-Role, L.W., S.E. Leeman, y R.L. Perlman. 1981. Somatostatin and substance P inhibit catecholamine secretion from isolated cells of guinea-pig adrenal medulla. *Neuroscience*. 6:1813-1821.
- 549-Rollema, H., J.W. Coe, L.K. Chambers, R.S. Hurst, S.M. Stahl, y K.E. Williams. 2007. Rationale, pharmacology and clinical efficacy of partial agonists of $\alpha 4\beta 2$ nACh receptors for smoking cessation. *Trends Pharmacol.Sci.* 28:316-325.
- 550-Sala, F., A. Nistri, y M. Criado. 2008. Nicotinic acetylcholine receptors of adrenal chromaffin cells. *Acta Physiol.(Oxf)*. 192:203-212.
- 551-Salminen, O., J.A. Drapeau, J.M. McIntosh, A.C. Collins, M.J. Marks, y S.R. Grady. 2007. Pharmacology of α -conotoxin MII-sensitive subtypes of nicotinic acetylcholine receptors isolated by breeding of null mutant mice. *Mol.Pharmacol.* 71:1563-1571.
- 552-Samochocki, M., A. HOFFLE, A. Fehrenbacher, R. Jostock, J. Ludwig, C. Christner, M. Radina, M. Zerlin, C. Ullmer, E.F. Pereira, H. Lubbert, E.X. Albuquerque, y A. Maelicke. 2003. Galantamine is an allosterically potentiating ligand of neuronal nicotinic but not of muscarinic acetylcholine receptors. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 305:1024-1036.
- 553-Sandall, D.W., N. Satkunathan, D.A. Keays, M.A. Polidano, X. Liping, V. Pham, J.G. Down, Z. Khalil, B.G. Livett, y K.R. Gayler. 2003. A novel α -conotoxin identified by gene sequencing is active in suppressing the vascular response to selective stimulation of sensory nerves in vivo. *Biochemistry*. 42:6904-6911.

- 554-Sather, W.A., T. Tanabe, J.F. Zhang, Y. Mori, M.E. Adams, y R.W. Tsien. 1993. Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel alpha 1 subunits. *Neuron*. 11:291-303.
- 555-Schneider, A.S., R. Herz, y K. Rosenheck. 1977. Stimulus-secretion coupling in chromaffin cells isolated from bovine adrenal medulla. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 74:5036-5040.
- 556-Schuller, H.M. 2009. Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? *Nat.Rev.Cancer*. 9:195-205.
- 557-Seguella, P., J. Wadiche, K. Dineley-Miller, J.A. Dani, y J.W. Patrick. 1993. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J.Neurosci*. 13:596-604.
- 558-Sgard, F., E. Charpantier, S. Bertrand, N. Walker, D. Caput, D. Graham, D. Bertrand, y F. Besnard. 2002. A novel human nicotinic receptor subunit, alpha10, that confers functionality to the alpha9-subunit. *Mol.Pharmacol*. 61:150-159.
- 559-Sharma, G., y S. Vijayaraghavan. 2002. Nicotinic receptor signaling in nonexcitable cells. *J.Neurobiol*. 53:524-534.
- 560-Sher, E., Y. Chen, T.J. Sharples, L.M. Broad, G. Benedetti, R. Zwart, G.I. McPhie, K.H. Pearson, T. Baldwinson, y G. De Filippi. 2004. Physiological roles of neuronal nicotinic receptor subtypes: new insights on the nicotinic modulation of neurotransmitter release, synaptic transmission and plasticity. *Curr.Top.Med.Chem*. 4:283-297.
- 561-Shiraishi, M., K. Minami, Y. Uezono, N. Yanagihara, A. Shigematsu, y I. Shibuya. 2002. Inhibitory effects of tramadol on nicotinic acetylcholine receptors in adrenal chromaffin cells and in *Xenopus* oocytes expressing alpha 7 receptors. *Br.J.Pharmacol*. 136:207-216.
- 562-Shirey, J.K., Z. Xiang, D. Orton, A.E. Brady, K.A. Johnson, R. Williams, J.E. Ayala, A.L. Rodriguez, J. Wess, D. Weaver, C.M. Niswender, y P.J. Conn. 2008. An allosteric potentiator of M4 mAChR modulates hippocampal synaptic transmission. *Nat.Chem.Biol*. 4:42-50.
- 563-Shukla, R., y A.R. Wakade. 1991. Functional aspects of calcium channels of splanchnic neurons and chromaffin cells of the rat adrenal medulla. *J.Neurochem*. 56:753-758.
- 564-Sine, S.M. 2002. The nicotinic receptor ligand binding domain. *J.Neurobiol*. 53:431-446.
- 565-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.* 90:9436-9440.
- 566-Sine, S.M., y A.G. Engel. 2006. Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature*. 440:448-455.
- 567-Singhal, S.K., L. Zhang, M. Morales, y M. Oz. 2007. Antipsychotic clozapine inhibits the function of alpha7-nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*. 52:387-394.
- 568-Skok, M.V., L.P. Voitenko, S.V. Voitenko, E.Y. Lykhmus, E.N. Kalashnik, T.I. Litvin, S.J. Tzartos, y V.I. Skok. 1999. Alpha subunit composition of nicotinic acetylcholine receptors in the rat autonomic ganglia neurons as determined with subunit-specific anti-alpha(181-192) peptide antibodies. *Neuroscience*. 93:1427-1436.
- 569-Slotkin, T.A., S.E. Lappi, E.C. McCook, B.A. Lorber, y F.J. Seidler. 1995. Loss of neonatal hypoxia tolerance after prenatal nicotine exposure: implications for sudden infant death syndrome. *Brain Res.Bull*. 38:69-75.
- 570-Solaro, C.R., M. Prakriya, J.P. Ding, y C.J. Lingle. 1995. Inactivating and noninactivating Ca(2+)- and voltage-dependent K⁺ current in rat adrenal chromaffin cells. *J.Neurosci*. 15:6110-6123.

- 571-Son, C.D., F.J. Moss, B.N. Cohen, y H.A. Lester. 2009. Nicotine normalizes intracellular subunit stoichiometry of nicotinic receptors carrying mutations linked to autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Mol.Pharmacol.* 75:1137-1148.
- 572-Sorensen, J.B. 2004. Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflugers Arch.* 448:347-362.
- 573-Sortwell, C.E., G.D. Pappas, y J. Sagen. 1995. Chromaffin cell xenografts in the rat neocortex can produce antidepressive activity in the forced swimming test. *Exp.Brain Res.* 103:59-69.
- 574-Spalding, T.A., N.J. Birdsall, C.A. Curtis, y E.C. Hulme. 1994. Acetylcholine mustard labels the binding site aspartate in muscarinic acetylcholine receptors. *J.Biol.Chem.* 269:4092-4097.
- 575-Spedding, M. 1985. Activators and inactivators of Ca⁺⁺ channels: new perspectives. *J.Pharmacol.* 16:319-343.
- 576-Steinlein, O.K., y D. Bertrand. 2009. Nicotinic receptor channelopathies and epilepsy. *Pflugers Arch.*
- 577-Stevens, K.E., W.R. Kem, y R. Freedman. 1999. Selective alpha 7 nicotinic receptor stimulation normalizes chronic cocaine-induced loss of hippocampal sensory inhibition in C3H mice. *Biol.Psychiatry.* 46:1443-1450.
- 578-Stevens, K.E., W.R. Kem, V.M. Mahnir, y R. Freedman. 1998. Selective alpha7-nicotinic agonists normalize inhibition of auditory response in DBA mice. *Psychopharmacology (Berl).* 136:320-327.
- 579-Stockton, J.M., N.J. Birdsall, A.S. Burgen, y E.C. Hulme. 1983. Modification of the binding properties of muscarinic receptors by gallamine. *Mol.Pharmacol.* 23:551-557.
- 580-Striessnig, J. 1999. Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca(2+) channels. *Cell.Physiol.Biochem.* 9:242-269.
- 581-Striessnig, J., y A. Koschak. 2008. Exploring the function and pharmacotherapeutic potential of voltage-gated Ca²⁺ channels with gene knockout models. *Channels (Austin).* 2:233-251.
- 582-Sudhof, T.C. 1995. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature.* 375:645-653.
- 583-Sumikawa, K., M. Houghton, J.C. Smith, L. Bell, B.M. Richards, y E.A. Barnard. 1982. The molecular cloning and characterisation of cDNA coding for the alpha subunit of the acetylcholine receptor. *Nucleic Acids Res.* 10:5809-5822.
- 584-Suzuki, T., y T. Kachi. 1996. Similarities and differences in supporting and chromaffin cells in the mammalian adrenal medullae: an immunohistochemical study. *Anat.Rec.* 244:358-365.
- 585-Swope, S.L., Z. Qu, y R.L. Huganir. 1995. Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor by protein tyrosine kinases. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 757:197-214.
- 586-Takahashi, T., y A. Momiyama. 1993. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature.* 366:156-158.
- 587-Takeuchi, J., J. Fulton, Z.P. Jia, W. Abramov-Newerly, L. Jamot, M. Sud, D. Coward, M. Ralph, J. Roder, y J. Yeomans. 2002. Increased drinking in mutant mice with truncated M5 muscarinic receptor genes. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 72:117-123.
- 588-Takiyyuddin, M.A., M.R. Brown, T.Q. Dinh, J.H. Cervenka, S.D. Braun, R.J. Parmer, B. Kennedy, y D.T. O'Connor. 1994. Sympatho-adrenal secretion in humans: factors governing catecholamine and storage vesicle peptide co-release. *J.Auton.Pharmacol.* 14:187-200.

- 589-Takiyyuddin, M.A., J.H. Cervenka, P.A. Sullivan, M.R. Pandian, R.J. Parmer, J.A. Barbosa, y D.T. O'Connor. 1990. Is physiologic sympathoadrenal catecholamine release exocytotic in humans? *Circulation*. 81:185-195.
- 590-Tapia, L., A. Kuryatov, y J. Lindstrom. 2007. Ca²⁺ permeability of the (alpha4)3(beta2)2 stoichiometry greatly exceeds that of (alpha4)2(beta2)3 human acetylcholine receptors. *Mol.Pharmacol.* 71:769-776.
- 591-TerBush, D.R., M.A. Bittner, y R.W. Holz. 1988. Ca²⁺ influx causes rapid translocation of protein kinase C to membranes. Studies of the effects of secretagogues in adrenal chromaffin cells. *J.Biol.Chem.* 263:18873-18879.
- 592-Timmermann, D.B., J.H. Gronlien, K.L. Kohlhaas, E.O. Nielsen, E. Dam, T.D. Jorgensen, P.K. Ahring, D. Peters, D. Holst, J.K. Christensen, J. Malysz, C.A. Briggs, M. Gopalakrishnan, y G.M. Olsen. 2007. An allosteric modulator of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor possessing cognition-enhancing properties in vivo. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 323:294-307.
- 593-Tischler, A.S. 2002. Chromaffin cells as models of endocrine cells and neurons. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 971:366-370.
- 594-Tischler, A.S., R.A. DeLellis, B. Biales, G. Nunnemacher, V. Carabba, y H.J. Wolfe. 1980. Nerve growth factor-induced neurite outgrowth from normal human chromaffin cells. *Lab.Invest.* 43:399-409.
- 595-Tischler, A.S., J.F. Powers, M. Shahsavari, J. Ziar, P. Tsokas, J. Downing, y R.M. McClain. 1997. Comparative studies of chromaffin cell proliferation in the adrenal medulla of rats and mice. *Fundam.Appl.Toxicol.* 35:216-220.
- 596-Tkaczuk, J., J.C. Bes, H. de Bouet du Portal, M. Tafani, H. Duplan, M. Abbal, Y. Lazorthes, y E. Ohayon. 1997. Intrathecal allograft of chromaffin cells for intractable pain treatment: a model for understanding CNS tolerance mechanisms in humans. *Transplant.Proc.* 29:2356-2357.
- 597-Todorovic, S.M., y V. Jevtovic-Todorovic. 2007. Regulation of T-type calcium channels in the peripheral pain pathway. *Channels (Austin)*. 1:238-245.
- 598-Toledo-Aral, J.J., S. Mendez-Ferrer, R. Pardal, M. Echevarria, y J. Lopez-Barneo. 2003. Trophic restoration of the nigrostriatal dopaminergic pathway in long-term carotid body-grafted parkinsonian rats. *J.Neurosci.* 23:141-148.
- 599-Tomac, A., E. Lindqvist, L.F. Lin, S.O. Ogren, D. Young, B.J. Hoffer, y L. Olson. 1995. Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature*. 373:335-339.
- 600-Trifaro, J.M. 2002. Molecular biology of the chromaffin cell. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 971:11-18.
- 601-Tsujimoto, A., y T. Nishikawa. 1975. Further evidence for nicotinic and muscarinic receptors and their interaction in dog adrenal medulla. *Eur.J.Pharmacol.* 34:337-344.
- 602-Uceda, G., A.R. Artalejo, M.T. de la Fuente, M.G. Lopez, A. Albillos, P. Michelena, A.G. Garcia, y C. Montiel. 1994. Modulation by L-type Ca²⁺ channels and apamin-sensitive K⁺ channels of muscarinic responses in cat chromaffin cells. *Am.J.Physiol.* 266:C1432-9.
- 603-Uceda, G., A.R. Artalejo, M.G. Lopez, F. Abad, E. Neher, y A.G. Garcia. 1992. Ca(2+)-activated K⁺ channels modulate muscarinic secretion in cat chromaffin cells. *J.Physiol.* 454:213-230.
- 604-Ullian, E.M., J.M. McIntosh, y P.B. Sargent. 1997. Rapid synaptic transmission in the avian ciliary ganglion is mediated by two distinct classes of nicotinic receptors. *J.Neurosci.* 17:7210-7219.
- 605-Ulloa, L. 2005. The vagus nerve and the nicotinic anti-inflammatory pathway. *Nat.Rev Drug Discov.* 4:673-684.
- 606-Unsicker, K., y K. Kriegstein. 1996. Growth factors in chromaffin cells. *Prog.Neurobiol.* 48:307-324.

- 607-Unsicker, K., B. Krisch, U. Otten, y H. Thoenen. 1978. Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells: impairment by glucocorticoids. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 75:3498-3502.
- 608-Unsicker, K., B. Rieffert, y W. Ziegler. 1980. Effects of cell culture conditions, nerve growth factor, dexamethasone, and cyclic AMP on adrenal chromaffin cells in vitro. *Adv.Biochem.Psychopharmacol.* 25:51-59.
- 609-Unwin, N. 2005. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J.Mol.Biol.* 346:967-989.
- 610-Unwin, N. 1996. Projection structure of the nicotinic acetylcholine receptor: distinct conformations of the alpha subunits. *J.Mol.Biol.* 257:586-596.
- 611-Vailati, S., W. Hanke, A. Bejan, B. Barabino, R. Longhi, B. Balestra, M. Moretti, F. Clementi, y C. Gotti. 1999. Functional alpha6-containing nicotinic receptors are present in chick retina. *Mol.Pharmacol.* 56:11-19.
- 612-Valentino, K., R. Newcomb, T. Gadbois, T. Singh, S. Bowersox, S. Bitner, A. Justice, D. Yamashiro, B.B. Hoffman, y R. Ciaranello. 1993. A selective N-type calcium channel antagonist protects against neuronal loss after global cerebral ischemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90:7894-7897.
- 613-van Hoek, M.L., C.S. Allen, y S.J. Parsons. 1997. Phosphotyrosine phosphatase activity associated with c-Src in large multimeric complexes isolated from adrenal medullary chromaffin cells. *Biochem.J.* 326 (Pt 1):271-277.
- 614-Vega, T., R. De Pascual, O. Bulbena, y A.G. Garcia. 1995. Effects of omega-toxins on noradrenergic neurotransmission in beating guinea pig atria. *Eur.J.Pharmacol.* 276:231-238.
- 615-Verbitsky, M., C.V. Rothlin, E. Katz, y A.B. Elgoyhen. 2000. Mixed nicotinic-muscarinic properties of the alpha9 nicotinic cholinergic receptor. *Neuropharmacology.* 39:2515-2524.
- 616-Vernallis, A.B., W.G. Conroy, y D.K. Berg. 1993. Neurons assemble acetylcholine receptors with as many as three kinds of subunits while maintaining subunit segregation among receptor subtypes. *Neuron.* 10:451-464.
- 617-Vernino, S., M. Amador, C.W. Luetje, J. Patrick, y J.A. Dani. 1992. Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron.* 8:127-134.
- 618-Vernino, S., S. Hopkins, y Z. Wang. 2009. Autonomic ganglia, acetylcholine receptor antibodies, and autoimmune ganglionopathy. *Auton.Neurosci.* 146:3-7.
- 619-Vernino, S., P.A. Low, R.D. Fealey, J.D. Stewart, G. Farrugia, y V.A. Lennon. 2000. Autoantibodies to ganglionic acetylcholine receptors in autoimmune autonomic neuropathies. *N.Engl.J.Med.* 343:847-855.
- 620-Vernino, S., M. Rogers, K.A. Radcliffe, y J.A. Dani. 1994. Quantitative measurement of calcium flux through muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J.Neurosci.* 14:5514-5524.
- 621-Vernino, S., P. Sandroni, W. Singer, y P.A. Low. 2008. Invited Article: Autonomic ganglia: target and novel therapeutic tool. *Neurology.* 70:1926-1932.
- 622-Vetter, D.E., E. Katz, S.F. Maison, J. Taranda, S. Turcan, J. Ballester, M.C. Liberman, A.B. Elgoyhen, y J. Boulter. 2007. The alpha10 nicotinic acetylcholine receptor subunit is required for normal synaptic function and integrity of the olivocochlear system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 104:20594-20599.
- 623-Vijayaraghavan, S., H.A. Schmid, y K.S. Mapp. 1993. Serotonin modulates nicotinic responses of adrenal chromaffin cells. *J.Neurochem.* 61:324-331.
- 624-Vilaro, M.T., J.M. Palacios, y G. Mengod. 1990. Localization of m5 muscarinic receptor mRNA in rat brain examined by in situ hybridization histochemistry. *Neurosci.Lett.* 114:154-159.

- 625-Villadiego, J., S. Mendez-Ferrer, T. Valdes-Sanchez, I. Silos-Santiago, I. Farinas, J. Lopez-Barneo, y J.J. Toledo-Aral. 2005. Selective glial cell line-derived neurotrophic factor production in adult dopaminergic carotid body cells in situ and after intrastriatal transplantation. *J.Neurosci.* 25:4091-4098.
- 626-Villarroya, M., L. Gandia, B. Lara, A. Albillos, M.G. Lopez, y A.G. Garcia. 1995. Dotarizine versus flunarizine as calcium antagonists in chromaffin cells. *Br.J.Pharmacol.* 114:369-376.
- 627-Villarroya, M., R. Olivares, A. Ruiz, M.F. Cano-Abad, R. de Pascual, R.B. Lomax, M.G. Lopez, I. Mayorgas, L. Gandia, y A.G. Garcia. 1999. Voltage inactivation of Ca²⁺ entry and secretion associated with N- and P/Q-type but not L-type Ca²⁺ channels of bovine chromaffin cells. *J.Physiol.* 516 (Pt 2):421-432.
- 628-Vincler, M., y J.M. McIntosh. 2007. Targeting the alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptor to treat severe pain. *Expert Opin.Ther.Targets.* 11:891-897.
- 629-Vincler, M., S. Wittenauer, R. Parker, M. Ellison, B.M. Olivera, y J.M. McIntosh. 2006. Molecular mechanism for analgesia involving specific antagonism of alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 103:17880-17884.
- 630-Vitale, M.L., E.P. Seward, y J.M. Trifaro. 1995. Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron.* 14:353-363.
- 631-Vogt, K., J. Mellor, G. Tong, y R. Nicoll. 2000. The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron.* 26:187-196.
- 632-von Ruden, L., y E. Neher. 1993. A Ca-dependent early step in the release of catecholamines from adrenal chromaffin cells. *Science.* 262:1061-1065.
- 633-Wakade, A.R. 1998. Multiple transmitter control of catecholamine secretion in rat adrenal medulla. *Adv.Pharmacol.* 42:595-598.
- 634-Wakade, A.R. 1988. Noncholinergic transmitter(s) maintains secretion of catecholamines from rat adrenal medulla for several hours of continuous stimulation of splanchnic neurons. *J.Neurochem.* 50:1302-1308.
- 635-Wallace, D.J., C. Chen, y P.D. Marley. 2002. Histamine promotes excitability in bovine adrenal chromaffin cells by inhibiting an M-current. *J.Physiol.* 540:921-939.
- 636-Wang, F., V. Gerzanich, G.B. Wells, R. Anand, X. Peng, K. Keyser, y J. Lindstrom. 1996. Assembly of human neuronal nicotinic receptor alpha5 subunits with alpha3, beta2, and beta4 subunits. *J.Biol.Chem.* 271:17656-17665.
- 637-Wang, H., M. Yu, M. Ochani, C.A. Amella, M. Tanovic, S. Susarla, J.H. Li, H. Wang, H. Yang, L. Ulloa, Y. Al-Abed, C.J. Czura, y K.J. Tracey. 2003. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature.* 421:384-388.
- 638-Wang, H.Y., K. Bakshi, C. Shen, M. Frankfurt, C. Trocme-Thibierge, y P. Morain. 2010. S 24795 limits beta-amyloid-alpha7 nicotinic receptor interaction and reduces Alzheimer's disease-like pathologies. *Biol.Psychiatry.* 67:522-530.
- 639-Wang, H.Y., D.H. Lee, M.R. D'Andrea, P.A. Peterson, R.P. Shank, y A.B. Reitz. 2000. beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J.Biol.Chem.* 275:5626-5632.
- 640-Wang, H.Y., W. Li, N.J. Benedetti, y D.H. Lee. 2003. Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors mediate beta-amyloid peptide-induced tau protein phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 278:31547-31553.
- 641-Wang, H.Y., A. Stucky, J. Liu, C. Shen, C. Trocme-Thibierge, y P. Morain. 2009. Dissociating beta-amyloid from alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor by a novel therapeutic agent, S 24795, normalizes alpha 7 nicotinic acetylcholine and NMDA receptor function in Alzheimer's disease brain. *J.Neurosci.* 29:10961-10973.

- 642-Wang, K., J.T. Hackett, M.E. Cox, M. Van Hoek, J.M. Lindstrom, y S.J. Parsons. 2004. Regulation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor by SRC family tyrosine kinases. *J.Biol.Chem.* 279:8779-8786.
- 643-Weiergraber, M., A. Pereverzev, R. Vajna, M. Henry, M. Schramm, W. Nastainczyk, H. Grabsch, y T. Schneider. 2000. Immunodetection of alpha1E voltage-gated Ca(2+) channel in chromogranin-positive muscle cells of rat heart, and in distal tubules of human kidney. *J.Histochem.Cytochem.* 48:807-819.
- 644-Weill, C.L., M.G. McNamee, y A. Karlin. 1974. Affinity-labeling of purified acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 61:997-1003.
- 645-Weiner, D.M., A.I. Levey, y M.R. Brann. 1990. Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87:7050-7054.
- 646-Wess, J. 2004. Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 44:423-450.
- 647-Wess, J. 1996. Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit.Rev.Neurobiol.* 10:69-99.
- 648-Wess, J., A. Duttaroy, W. Zhang, J. Gomeza, Y. Cui, T. Miyakawa, F.P. Bymaster, L. McKinzie, C.C. Felder, K.G. Lamping, F.M. Faraci, C. Deng, y M. Yamada. 2003. M1-M5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to study the physiological roles of the muscarinic cholinergic system. *Receptors Channels.* 9:279-290.
- 649-Wessler, I., y C.J. Kirkpatrick. 2008. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br.J.Pharmacol.* 154:1558-1571.
- 650-Westenbroek, R.E., L. Hoskins, y W.A. Catterall. 1998. Localization of Ca2+ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J.Neurosci.* 18:6319-6330.
- 651-Wheeler, D.B., A. Randall, y R.W. Tsien. 1994. Roles of N-type and Q-type Ca2+ channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science.* 264:107-111.
- 652-Whiteaker, P., S. Christensen, D. Yoshikami, C. Dowell, M. Watkins, J. Gulyas, J. Rivier, B.M. Olivera, y J.M. McIntosh. 2007. Discovery, synthesis, and structure activity of a highly selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor antagonist. *Biochemistry.* 46:6628-6638.
- 653-Whiteaker, P., C.G. Peterson, W. Xu, J.M. McIntosh, R. Paylor, A.L. Beaudet, A.C. Collins, y M.J. Marks. 2002. Involvement of the alpha3 subunit in central nicotinic binding populations. *J.Neurosci.* 22:2522-2529.
- 654-Wiesner, A., y C. Fuhrer. 2006. Regulation of nicotinic acetylcholine receptors by tyrosine kinases in the peripheral and central nervous system: same players, different roles. *Cell Mol.Life Sci.* 63:2818-2828.
- 655-Wilens, T.E., M.H. Verlinden, L.A. Adler, P.J. Wozniak, y S.A. West. 2006. ABT-089, a neuronal nicotinic receptor partial agonist, for the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in adults: results of a pilot study. *Biol.Psychiatry.* 59:1065-1070.
- 656-Wilson, S.P., y N. Kirshner. 1977. The acetylcholine receptor of the adrenal medulla. *J.Neurochem.* 28:687-695.
- 657-Winkler, H., y E. Westhead. 1980. The molecular organization of adrenal chromaffin granules. *Neuroscience.* 5:1803-1823.
- 658-Wishka, D.G., D.P. Walker, K.M. Yates, S.C. Reitz, S. Jia, J.K. Myers, K.L. Olson, E.J. Jacobsen, M.L. Wolfe, V.E. Groppi, A.J. Hanchar, B.A. Thornburgh, L.A. Cortes-Burgos, E.H. Wong, B.A. Staton, T.J. Raub, N.R. Higdon, T.M. Wall, R.S. Hurst, R.R. Walters, W.E. Hoffmann, M. Hajos, S. Franklin, G. Carey, L.H. Gold, K.K. Cook, S.B. Sands, S.X. Zhao, J.R. Soglia, A.S. Kalgutkar, S.P. Arneric, y B.N. Rogers. 2006. Discovery of N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]furo[2,3-c]pyridine-5-carboxamide, an agonist of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor, for the potential treatment of cognitive deficits in schizophrenia: synthesis and structure--activity relationship. *J.Med.Chem.* 49:4425-4436.

- 659-Wu, M.M., A. Llobet, y L. Lagnado. 2009. Loose coupling between calcium channels and sites of exocytosis in chromaffin cells. *J.Physiol.* 587:5377-5391.
- 660-Wu, P.C., M.J. Fann, y L.S. Kao. 2010. Characterization of Ca²⁺ signaling pathways in mouse adrenal medullary chromaffin cells. *J.Neurochem.* 112:1210-1222.
- 661-Wu, T.Y., C.M. Smith, S.M. Sine, y M.M. Levandoski. 2008. Morantel allosterically enhances channel gating of neuronal nicotinic acetylcholine alpha 3 beta 2 receptors. *Mol.Pharmacol.* 74:466-475.
- 662-Wurtman, R.J., y J. Axelrod. 1966. Control of enzymatic synthesis of adrenaline in the adrenal medulla by adrenal cortical steroids. *J.Biol.Chem.* 241:2301-2305.
- 663-Wurtman, R.J., y J. Axelrod. 1965. Adrenaline synthesis: control by the pituitary gland and adrenal glucocorticoids. *Science.* 150:1464-1465.
- 664-Wykes, R.C., C.S. Bauer, S.U. Khan, J.L. Weiss, y E.P. Seward. 2007. Differential regulation of endogenous N- and P/Q-type Ca²⁺ channel inactivation by Ca²⁺/calmodulin impacts on their ability to support exocytosis in chromaffin cells. *J.Neurosci.* 27:5236-5248.
- 665-Xiao, C., R. Nashmi, S. McKinney, H. Cai, J.M. McIntosh, y H.A. Lester. 2009. Chronic nicotine selectively enhances alpha4beta2* nicotinic acetylcholine receptors in the nigrostriatal dopamine pathway. *J.Neurosci.* 29:12428-12439.
- 666-Xu, W., S. Gelber, A. Orr-Urtreger, D. Armstrong, R.A. Lewis, C.N. Ou, J. Patrick, L. Role, M. De Biasi, y A.L. Beaudet. 1999. Megacystis, mydriasis, and ion channel defect in mice lacking the alpha3 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:5746-5751.
- 667-Xu, Y., E.P. Duarte, y E.J. Forsberg. 1992. Role of thapsigargin-sensitive intracellular Ca²⁺ pools in secretion induced by muscarinic agonists in porcine adrenal chromaffin cells. *J.Neurochem.* 59:2224-2229.
- 668-Xu, Y., y E.J. Forsberg. 1993. Effects of caffeine on cholinergic agonist- and K(+)-induced cytosolic Ca⁺⁺ signals and secretion in porcine adrenal chromaffin cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 264:770-775.
- 669-Xu, Y.P., E.P. Duarte, y E.J. Forsberg. 1991. Calcium dependency of muscarinic and nicotinic agonist-induced ATP and catecholamine secretion from porcine adrenal chromaffin cells. *J.Neurochem.* 56:1889-1896.
- 670-Yamada, M., K.G. Lamping, A. Duttaroy, W. Zhang, Y. Cui, F.P. Bymaster, D.L. McKinzie, C.C. Felder, C.X. Deng, F.M. Faraci, y J. Wess. 2001a. Cholinergic dilation of cerebral blood vessels is abolished in M(5) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 98:14096-14101.
- 671-Yamada, M., T. Miyakawa, A. Duttaroy, A. Yamanaka, T. Moriguchi, R. Makita, M. Ogawa, C.J. Chou, B. Xia, J.N. Crawley, C.C. Felder, C.X. Deng, y J. Wess. 2001b. Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. *Nature.* 410:207-212.
- 672-Yamagami, K., S. Nishimura, y M. Sorimachi. 1991. Internal Ca²⁺ mobilization by muscarinic stimulation increases secretion from adrenal chromaffin cells only in the presence of Ca²⁺ influx. *J.Neurochem.* 57:1681-1689.
- 673-Yamanaka, K., S. Kigoshi, y I. Muramatsu. 1986. Muscarinic receptor subtypes in bovine adrenal medulla. *Biochem.Pharmacol.* 35:3151-3157.
- 674-Yokotani, K., S. Okada, y K. Nakamura. 2002. Characterization of functional nicotinic acetylcholine receptors involved in catecholamine release from the isolated rat adrenal gland. *Eur.J.Pharmacol.* 446:83-87.
- 675-Yokoyama, C.T., R.E. Westenbroek, J.W. Hell, T.W. Soong, T.P. Snutch, y W.A. Catterall. 1995. Biochemical properties and subcellular distribution of the neuronal class E calcium channel alpha 1 subunit. *J.Neurosci.* 15:6419-6432.

- 676-Yu, D., L. Zhang, J.L. Eisele, D. Bertrand, J.P. Changeux, y F.F. Weight. 1996. Ethanol inhibition of nicotinic acetylcholine type alpha 7 receptors involves the amino-terminal domain of the receptor. *Mol.Pharmacol.* 50:1010-1016.
- 677-Zaika, O.L., O.M. Pochynyuk, P.G. Kostyuk, E.N. Yavorskaya, y E.A. Lukyanetz. 2004. Acetylcholine-induced calcium signalling in adrenaline- and noradrenaline-containing adrenal chromaffin cells. *Arch.Biochem.Biophys.* 424:23-32.
- 678-Zbarsky, V., J. Thomas, y S. Greenfield. 2004. Bioactivity of a peptide derived from acetylcholinesterase: involvement of an ivermectin-sensitive site on the alpha 7 nicotinic receptor. *Neurobiol.Dis.* 16:283-289.
- 679-Zhang, H.M., D.P. Li, S.R. Chen, y H.L. Pan. 2005. M2, M3, and M4 receptor subtypes contribute to muscarinic potentiation of GABAergic inputs to spinal dorsal horn neurons. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 313:697-704.
- 680-Zhang, W., M. Yamada, J. Gomeza, A.S. Basile, y J. Wess. 2002. Multiple muscarinic acetylcholine receptor subtypes modulate striatal dopamine release, as studied with M1-M5 muscarinic receptor knock-out mice. *J.Neurosci.* 22:6347-6352.
- 681-Zhang, Z.W., J.S. Coggan, y D.K. Berg. 1996. Synaptic currents generated by neuronal acetylcholine receptors sensitive to alpha-bungarotoxin. *Neuron.* 17:1231-1240.
- 682-Zhou, X.F., y B.G. Livett. 1990. Substance P has biphasic effects on catecholamine secretion evoked by electrical stimulation of perfused rat adrenal glands in vitro. *J.Auton.Nerv.Syst.* 31:31-39.
- 683-Zhou, Y., M.E. Nelson, A. Kuryatov, C. Choi, J. Cooper, y J. Lindstrom. 2003. Human alpha4beta2 acetylcholine receptors formed from linked subunits. *J.Neurosci.* 23:9004-9015.
- 684-Zhou, Z., y S. Misler. 1995. Action potential-induced quantal secretion of catecholamines from rat adrenal chromaffin cells. *J.Biol.Chem.* 270:3498-3505.
- 685-Zhou, Z., y E. Neher. 1993. Calcium permeability of nicotinic acetylcholine receptor channels in bovine adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch.* 425:511-517.
- 686-Zia, S., A. Ndoye, T.X. Lee, R.J. Webber, y S.A. Grando. 2000. Receptor-mediated inhibition of keratinocyte migration by nicotine involves modulations of calcium influx and intracellular concentration. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 293:973-981.
- 687-Zoli, M., A. Jansson, E. Sykova, L.F. Agnati, y K. Fuxe. 1999. Volume transmission in the CNS and its relevance for neuropsychopharmacology. *Trends Pharmacol.Sci.* 20:142-150.
- 688-Zoli, M., M. Moretti, A. Zanardi, J.M. McIntosh, F. Clementi, y C. Gotti. 2002. Identification of the nicotinic receptor subtypes expressed on dopaminergic terminals in the rat striatum. *J.Neurosci.* 22:8785-8789.
- 689-Zwart, R., G. De Filippi, L.M. Broad, G.I. McPhie, K.H. Pearson, T. Baldwinson, y E. Sher. 2002. 5-Hydroxyindole potentiates human alpha 7 nicotinic receptor-mediated responses and enhances acetylcholine-induced glutamate release in cerebellar slices. *Neuropharmacology.* 43:374-384.
- 690-Zwart, R., y H.P. Vijverberg. 1998. Four pharmacologically distinct subtypes of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol.Pharmacol.* 54:1124-1131.