

## Caracterización farmacológica y análisis funcional de los receptores nicotínicos $\alpha 9\alpha 10$ en células cromafines aisladas de la médula adrenal de rata

Luis A. Olivios-Oré, M.<sup>a</sup> Victoria Barahona Gomariz, Diego Bustillo, Jesús Sánchez-Nogueiro, Antonio R. Artalejo\*

Departamento de Toxicología y Farmacología. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

Recibido el 15 de diciembre de 2010.

### RESUMEN

El descubrimiento de receptores nicotínicos (nAChRs) formados por las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  en las células de los epitelios sensitivos del sistema vestibular y auditivo ha motivado su búsqueda en estructuras del sistema nervioso autónomo, como las células cromafines de la médula adrenal, en las que podrían inducir la hiperpolarización de la membrana celular mediante la activación de canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  de baja conductancia iónica (canales SK). El objetivo fundamental de nuestro trabajo ha sido determinar la presencia y, en su caso, caracterizar funcionalmente el nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  en las células cromafines de la médula adrenal de la rata. Con ese propósito, hemos empleado cultivos primarios de células cromafines obtenidas de la glándula adrenal de rata y recurrido a la técnica electrofisiológica de *patch-clamp* para registrar las corrientes iónicas generadas por la activación de los nAChRs del conjunto de la membrana celular. Asimismo, hemos empleado la  $\alpha$ -conotoxina RgIA, un péptido capaz de bloquear de forma selectiva los nAChRs formados por las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$ . Los resultados obtenidos aportan evidencias farmacológicas que permiten concluir que las células cromafines de la rata expresan nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  funcionales que, además, des-

empeñarían un papel modulador comportamiento eléctrico de dichas células.

**Palabras clave:** Receptor nicotínico; célula cromafín; potencial de membrana; canales SK.

## ABSTRACT

### Pharmacological characterization and functional analysis of $\alpha 9\alpha 10$ acetylcholine nicotinic receptors in isolated chromaffin cells from the rat adrenal medulla

The identification of acetylcholine nicotinic receptors (nAChRs) formed by  $\alpha 9$  and  $\alpha 10$  subunits in the sensory cells of the vestibular and auditory systems, prompted us to investigate their presence in adrenomedullary chromaffin cells, in which they could mediate membrane hyperpolarization through the activation of small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channels (SK channels). The aim of the current study has been to pharmacologically identify  $\alpha 9\alpha 10$  nAChRs and initiate their functional characterization in isolated chromaffin cells from the rat adrenal medulla. We have employed the patch clamp technique to record either the ionic currents generated by the activation of nAChRs or the associated changes in membrane potential. We took advantage of the specificity of  $\alpha$ -conotoxin RgIA for the nAChRs formed by  $\alpha 9$  and  $\alpha 10$  subunits. Our pharmacological results suggest that the rat chromaffin cells express functional  $\alpha 9\alpha 10$  nAChRs that would influence the electrical behaviour of these cells.

**Keywords:** Acetylcholine nicotinic receptor; chromaffin cell; membrane potential; SK channels.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) son canales iónicos activados por ligando —el ligando endógeno es la acetilcolina— formados por la asociación de cinco subunidades con pesos moleculares comprendidos entre 40 y 58 kDa. En la actualidad se

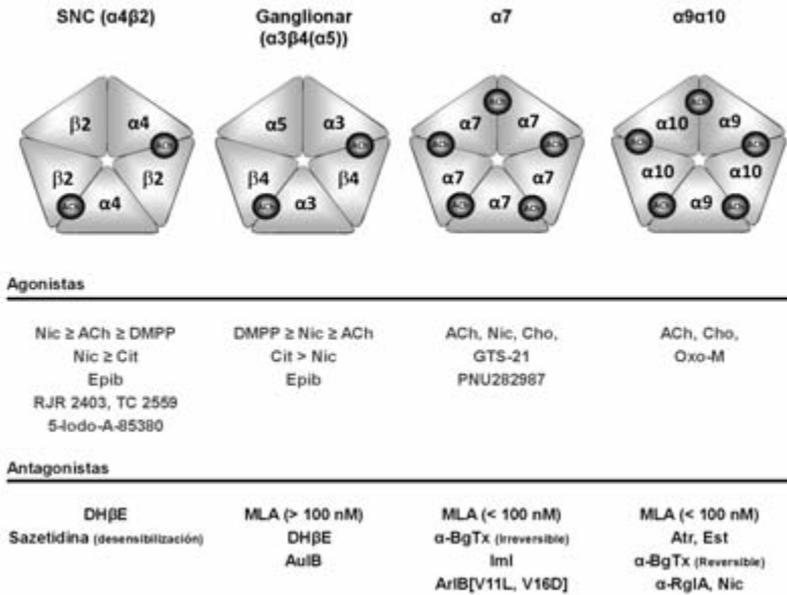
reconoce la existencia de diez subunidades  $\alpha$  diferentes ( $\alpha 1$ - $\alpha 10$ ), cuatro subunidades  $\beta$  ( $\beta 1$ - $\beta 4$ ), una subunidad  $\gamma$ , una subunidad  $\delta$  y una subunidad  $\epsilon$ .

Los nAChRs pueden clasificarse en tres tipos con propiedades farmacológicas y biofísicas bien diferenciadas y una distribución anatómica característica: el nAChR muscular, localizado en la placa motora, el nAChR neuronal periférico, presente en los ganglios vegetativos y en las células cromafines de la médula adrenal, y el nAChR neuronal central, localizado fundamentalmente en diversas zonas del sistema nervioso central (SNC).

### 1.1. Los receptores nicotínicos neuronales

Desde el punto de vista biofísico los nAChRs neuronales, tanto centrales como periféricos, se distinguen de los nAChRs musculares por presentar una mayor permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  y una marcada rectificación de entrada (1). En los mamíferos se han identificado once subunidades formadoras de nAChRs neuronales:  $\alpha 2$ - $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$  y  $\beta 2$ - $\beta 4$  (2). Las subunidades  $\alpha 7$  y  $\alpha 9$  son capaces de formar homómeros funcionales, mientras que el resto de las subunidades  $\alpha$  da lugar a nAChRs heteroméricos constituidos por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Aunque el número de nAChRs neuronales distintos que puede formarse con la combinación de las once subunidades mencionadas es muy elevado, es posible reconocer algunos nAChRs y con propiedades farmacológicas bien diferenciadas y localizaciones características (Figura 1):  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 4(\beta 2)$ ,  $\alpha 7$  y  $\alpha 9\alpha 10$ . El nAChR  $\alpha 4\beta 2$  es el tipo predominante en el SNC, donde mayoritariamente presenta la estequiometría  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ . Por su parte, el nAChR compuesto por las subunidades  $\alpha 3$  y  $\beta 4$  o  $\beta 2$  se localiza preferentemente en los ganglios vegetativos y en las células cromafines de la médula adrenal. Cuando la subunidad  $\alpha 5$  es incorporada a estos complejos, los nAChRs incrementan su sensibilidad a la acetilcolina y a la nicotina pero no se modifica su respuesta a la epibatidina (3). El nAChR homomérico  $\alpha 7$  se expresa tanto en el SNC como en el periférico, mientras que en diversas estructuras como la cóclea, los ganglios raquídeos, linfocitos, queratinocitos, etc., se han identificado nAChRs formados por las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$ . El aislamiento de la  $\alpha$ -conotoxina RgIA ( $\alpha$ -Rg IA) del veneno del caracol

*Conus regius* ha permitido disponer de una herramienta potente y selectiva para bloquear las respuestas mediadas por los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$ , posibilitando el estudio del papel funcional de este nAChR en algunos de los tejidos en los que ha sido identificado.



**Figura 1. Propiedades farmacológicas de los cuatro tipos principales de nAChRs neuronales.** En el panel superior se representa la estequiometría y la localización de los sitios de unión de la acetilcolina en los diferentes pentámeros. ACh: acetilcolina; DMPP: 1,1-dimetil-4-fenil-piperacino; Nic: nicotina; Cit: citisina; Epib: epibatidina; Cho: colina; Oxo-M: oxtremorina-M; DHE: dihidro- $\beta$ -eritroidina; MLA: metilcaconitina; AuIB:  $\alpha$ -conotoxina AuIB; IMI:  $\alpha$ -conotoxina IMI; RgIA:  $\alpha$ -conotoxina RgIA; ArIB [V11L, V16D]:  $\alpha$ -conotoxina ArIB [V11L, V16D];  $\alpha$ -BgTx:  $\alpha$ -bungarotoxina, Atr: atropina; Est: estricnina (Adaptado de 4).

### 1.2. Los receptores nicotínicos $\alpha 9\alpha 10$

Los nAChRs formados por la subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  han sido identificados en el epitelio sensitivo de la cóclea (células ciliadas —*hair cells*— internas y externas) y del laberinto, bulbo olfativo, ganglio del trigémino, ganglios raquídeos, corazón, placenta, linfocitos, queratinocitos, pulmón, adipocitos, espermatozoides, células endoteliales,

músculo liso vascular y músculo esquelético de la lengua (5-8); sin embargo, no han sido hallados en el SNC.

Al ser expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis* las subunidades  $\alpha 9$  pueden combinarse entre sí formando nAChRs homoméricos funcionales, capacidad ésta que no se ha evidenciado para la subunidad  $\alpha 10$  (6, 9). Sin embargo, la coinyección de ARNm de las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  se asocia a la aparición de corrientes de magnitud 1.000 veces superior a las observadas tras la expresión en solitario de la subunidad  $\alpha 9$ , lo que indica que los dos tipos de subunidades se combinan para constituir nAChRs heteroméricos funcionales que presentarían la estequiometría  $(\alpha 9)_2(\alpha 10)_3$ . Esta circunstancia también podría acontecer de manera fisiológica, ya que las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  se colocalizan en la mayoría de las estructuras donde han sido identificadas, considerándose que las subunidades  $\alpha 10$  actuarían como subunidades estructurales (10).

Los nAChRs homoméricos  $\alpha 9$  y los heteroméricos  $\alpha 9 \alpha 10$  presentan una farmacología peculiar entre los nAChRs, ya que, además de ser activados por el agonista muscarínico oxotremorina-M, son los únicos nAChRs inhibidos por la nicotina; asimismo, pueden ser bloqueados por sustancias tan diversas como la muscarina ( $CI_{50(\alpha 9)}$ : 75  $\mu M$ ;  $CI_{50(\alpha 9 \alpha 10)}$ : 41  $\mu M$ ), la estricnina ( $CI_{50(\alpha 9)}$ : 18 nM;  $CI_{50(\alpha 9 \alpha 10)}$ : 20 nM), la bicuculina ( $CI_{50(\alpha 9)}$ : 0,8  $\mu M$ ;  $CI_{50(\alpha 9 \alpha 10)}$ : 1  $\mu M$ ), el tropisetron ( $CI_{50(\alpha 9 \alpha 10)}$ : 70 nM), el ondansetrón ( $CI_{50(\alpha 9 \alpha 10)}$ : 0,6  $\mu M$ ), la atropina ( $CI_{50(\alpha 9 / \alpha 9 \alpha 10)}$ : 1  $\mu M$ ), la  $\alpha$ -bungarotoxina (de forma reversible;  $CI_{50(\alpha 9)}$ : 2,1 nM;  $CI_{50(\alpha 9 \alpha 10)}$ : 14 nM), la metilcaconitina (en el rango nanomolar bajo) (5, 6, 9, 11-13). Los nAChRs  $\alpha 9$  homoméricos y los heteroméricos  $\alpha 9 \alpha 10$  no presentan marcadas diferencias en sus perfiles farmacológicos, excepto una sensibilidad 10 veces superior del nAChR  $\alpha 9 \alpha 10$  al efecto bloqueante de la nicotina ( $CI_{50(\alpha 9)}$ : 31,5  $\mu M$ ;  $CI_{50(\alpha 9 \alpha 10)}$ : 3,9  $\mu M$ ) (6).

Ellison y col. (13, 14) han puesto de manifiesto la extraordinaria potencia y selectividad de la  $\alpha$ -RgIA, un péptido de 13 aminoácidos, para bloquear de forma competitiva las respuestas mediadas por los nAChRs  $\alpha 9 \alpha 10$  de rata, tanto recombinantes —expresados en ovocitos— como los nativos de las células del epitelio sensitivo de la cóclea. Así, la  $CI_{50}$  sobre los nAChRs  $\alpha 9 \alpha 10$  (5 nM) es tres órdenes de magnitud inferior que sobre los nAChRs  $\alpha 7$ . Además, la  $CI_{50}$  de la  $\alpha$ -RgIA sobre los nAChRs  $\alpha 3 \beta 2$  y  $\alpha 3 \beta 4$  es superior a 10  $\mu M$ .

Los nAChRs  $\alpha 9$  homoméricos y el heteromérico  $\alpha 9\alpha 10$  expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* son altamente permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \sim 9$ ; (15)). Por su parte, Gómez-Casati y col. (16) determinaron que la  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$  del receptor nativo de las células ciliadas de la cóclea de la rata es de 8.

### 1.3. Función del receptor nicotínico $\alpha 9\alpha 10$ en las células ciliadas de la cóclea

El significado funcional de los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  ha sido investigado fundamentalmente en las células ciliadas internas y externas de la cóclea de los vertebrados. La activación de estos nAChRs por la acetilcolina liberada por las terminaciones nerviosas de las fibras de la vía olivococlear da lugar a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que a su vez activa los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y pequeña conductancia iónica del tipo 2 (canales SK2; (17)). En este proceso puede participar también la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos intracelulares mediante el mecanismo de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR; (18)). La apertura de los canales SK2 induce la hiperpolarización de la membrana celular, lo que supone que los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  sean los únicos nAChRs conocidos que ejercen una función inhibitoria de la señalización eléctrica celular.

### 1.4. Las células cromafines de la médula adrenal de la rata

Las células cromafines de la médula adrenal comparten origen embriológico y características morfológicas y funcionales básicas con las neuronas simpáticas postganglionares. A igual que éstas, generan potenciales de acción dependientes de la actividad de canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al potencial de membrana y almacenan catecolaminas, ATP y neuropéptidos en vesículas de secreción denominadas gránulos cromafines. El contenido de los mismos es vertido al torrente sanguíneo en respuesta a la acetilcolina liberada por las terminaciones del nervio esplácnico. Las células cromafines constituyen un modelo ampliamente utilizado en estudios sobre neurotransmisión en virtud de su facilidad de cultivo y capacidad para expresar diversos tipos de receptores nicotínicos; además, la posibi-

lidad de realizar registros electrofisiológicos en rodajas de tejido adrenomedular (19) permite el análisis de la sinapsis esplanco-suprarrenal.

### **1.5. Los receptores nicotínicos de las células cromafines de la médula adrenal**

Existen evidencias de que en las células cromafines de la rata y del hombre podrían expresarse nAChRs formados por las subunidades  $\alpha 2$  (no en el hombre),  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 4$  (20, 21), mientras que en las células bovinas las subunidades constituyentes de los nAChRs serían la  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$  y  $\beta 4$  (22, 23).

En la actualidad se considera que el nAChR mayoritario de las células cromafines es el de tipo ganglionar, formado por las subunidades  $\alpha 3$  y  $\beta 4$ , a las que también podrían asociarse, para constituir heterómeros más complejos, las subunidades  $\alpha 5$  y/o  $\beta 2$  (21, 24-26).

### **1.6. Los receptores nicotínicos y el potencial de membrana de la célula cromafín**

La activación de los nAChRs induce cambios en el potencial de membrana así como modificaciones —tanto de forma directa como indirecta— en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (27). La acetilcolina liberada por las terminaciones del nervio esplácnico activa nAChRs y receptores muscarínicos de la membrana de las células cromafines. Clásicamente, se viene aceptando que la acetilcolina origina una respuesta despolarizante rápida dependiente de la activación de los nAChRs, con el consiguiente disparo de potenciales de acción, seguida de una fase de hiperpolarización relacionada con el aumento de la conductancia de  $\text{K}^+$  activada por el incremento citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  y dependiente tanto de la movilización de los depósitos intracelulares de este catión por la estimulación muscarínica como de su entrada a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (CCDV) activados durante la fase de despolarización (28). El hallazgo en las células cromafines de nAChRs con alta permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\alpha 7$  y  $\alpha 9\alpha 10$ ) (29) ha añadido complejidad al mecanismo de señalización nicotínica al

posibilitar un efecto dual rápido —despolarizante e hiperpolarizante— sobre el potencial de membrana. La activación de los nAChRs induce un aumento de la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  en la que participan distintos mecanismos: i) entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del nAChR; ii) entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de CCDV, y iii) movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos intracelulares. La señal citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por los nAChRs de tipo ganglionar ( $\alpha 3\beta 4$ ) es dependiente fundamentalmente de la despolarización y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de CCDV; sin embargo, los nAChRs de tipo  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$  posibilitarían la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  directamente a su través —independientemente de la activación de los CCDV— la cual, además, podría activar la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos intracelulares tanto sensibles a rianodina —mecanismo de tipo CICR— como sensibles a inositol trisfosfato (27).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de este trabajo se han utilizado cultivos primarios (2 a 4 días) de células cromafines de la médula adrenal de ratas Sprague Dawley macho, con edades comprendidas entre seis y ocho semanas (200-300 g) y procedentes del Animalario de la Universidad Complutense de Madrid (Número de Registro 28079-15ABC de la Dirección General de Agricultura y Alimentación de la Comunidad Autónoma de Madrid).

Los registros electrofisiológicos —de corriente y potencial de membrana— realizados para la caracterización farmacológica y funcional de las corrientes nicotínicas se obtuvieron mediante el empleo de la configuración de célula completa de la técnica de *patch-clamp* en las modalidades de fijación de voltaje ( $V_h = -70$  mV) y fijación de corriente ( $V_m \sim -60$  mV) con el concurso de un amplificador EPC9 controlado con el programa Pulse 9.7 (HEKA Elektronik, Alemania). Asimismo, en la modalidad de fijación de voltaje se monitorizó de forma continua la capacitancia de la membrana celular y las resistencias en serie, que nunca excedieron los 20 M $\Omega$ .

Las corrientes nicotínicas así como los registros de potencial de membrana fueron filtrados a 2 KHz y digitalizadas a 4 KHz para su posterior análisis y representación gráfica con el programa Igor Pro 5.05 (WaveMetrics, EEUU).

Las soluciones de registro variaron dependiendo del tipo de experimento. Así, la solución interna empleada en los experimentos de caracterización farmacológica de los nAChRs tuvo la siguiente composición (mM): glutamato de  $\text{Cs}^+$  145, NaCl 8, HEPES 10, EGTA 10,  $\text{MgCl}_2$  1, ATP. $\text{Na}_2$  2, GTP. $\text{Li}_2$  0,3 (pH ajustado a 7,2 con CsOH); en los experimentos en los que se llevaron a cabo registros del potencial de membrana, las micropipetas fueron rellenas con la siguiente solución (mM): glutamato de  $\text{K}^+$  145, KCl 10, HEPES 10,  $\text{MgCl}_2$  2, EGTA 0,1, ATP. $\text{Na}_2$  2 y GTP 0,3, (pH ajustado a 7,2 con KOH). En todos los casos la solución externa con la que se superfundieron las células durante los experimentos ( $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , a temperatura ambiente) estuvo compuesta por (mM): NaCl 145, KCl 2,8,  $\text{CaCl}_2$  1,  $\text{MgCl}_2$  1, HEPES 10, glucosa 10 (pH ajustado a 7,4 con HCl o NaOH).

La administración de fármacos se realizó directamente sobre la célula en estudio mediante un sistema de perfusión por gravedad (Figura 2A) que constaba de cinco vías dotadas de electroválvulas controladas con el programa PULSE 9.7. La salida del sistema se colocó aproximadamente a  $100 \mu\text{m}$  de la célula de forma que el recambio de la solución que rodea a la célula se produjera en  $\sim 30 \text{ ms}$  (Figura 2B).

La estimulación con los fármacos agonistas se realizó mediante pulsos breves (100 – 1000 ms) administrados tres veces consecutivas a intervalos de 45 s, calculándose posteriormente la media de las respuestas (pulsos 1°, 2° y 3°). El efecto de los fármacos antagonistas se evaluó también por triplicado en cada experimento, perfundiéndose en el baño durante 45 s antes de ser coaplicados localmente con el agonista (pulsos 4°, 5° y 6°). Finalmente, el agonista fue administrado tres veces más durante el período de lavado del antagonista con objeto de estudiar la reversibilidad del efecto de este último (pulsos 7°, 8° y 9°) (Figura 2C).

En la elaboración de curvas concentración-respuesta, las corrientes obtenidas en presencia de las diferentes concentraciones de antagonista fueron normalizadas respecto a la corriente control registrada en ausencia del mismo. Tanto las representaciones de barras como el ajuste de las curvas concentración-respuesta se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism V. 4.03 (GraphPad Software Inc., EEUU).

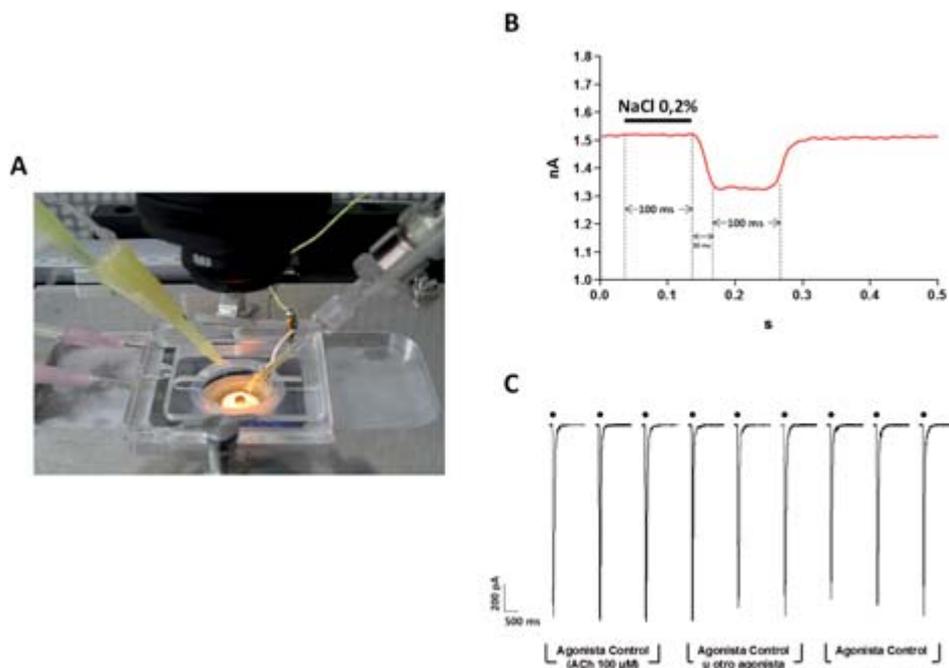
Los resultados aparecen expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM) para un determinado número (n) de experimentos. La comparación entre las medias correspondientes a distintos grupos de experimentos se realizó mediante el test de la *t* de Student. En todos los casos los niveles de significación establecidos fueron  $P < 0,001$  (\*\*\*) ;  $P < 0,01$  (\*\*) ó  $P < 0,05$  (\*). Los valores de *P* superiores a 0,05 se han considerado como no significativos (ns).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Reproducibilidad de las corrientes inducidas por acetilcolina en las células cromafines de la rata

La estimulación repetida o prolongada de los nAChRs ocasiona su desensibilización, en la que intervendrían factores como el tipo de receptor, la concentración y el tipo de agonista, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y diversas proteínas cinasas y fosfatasas intracelulares.

Con la finalidad de minimizar la desensibilización de los nAChRs empleamos un sistema de administración de fármacos y soluciones salinas diseñado en nuestro laboratorio, que constaba de cinco tubos de polietileno de 250  $\mu\text{m}$  de diámetro con una salida común (Figura 2A). Además, el flujo a través de cada uno de los tubos estaba regulado por electroválvulas, lo que permite realizar aplicaciones de fármacos durante tiempos muy cortos. En la Figura 2B, se muestra la corriente que fluye a través de una micropipeta de *patch-clamp* rellena con una solución salina fisiológica (NaCl al 0,9%) y bañada por una solución externa de idéntica composición cuando el  $V_h$  es de 2 mV. La administración local de un pulso de 100 ms de una solución salina diluida (NaCl al 0,2%) determina un cambio —reducción— de la corriente que se produce con una latencia de 100 ms respecto al comienzo de la aplicación y tarda 30 ms en completarse (tiempo de recambio). Como se muestra en la Figura 2C, la administración con este dispositivo de pulsos de acetilcolina (100  $\mu\text{M}$ ) de 100 ms de duración a intervalos de 45 s dio lugar a respuestas de corriente con magnitudes muy reproducibles.



**Figura 2. Sistema de administración de fármacos y reproducibilidad de las corrientes inducidas por acetilcolina (ACh).** **A.** Dispositivo de aplicación local de fármacos. **B.** Características cinéticas del sistema de aplicación de fármacos. **C.** Respuestas de corriente inducidas por la aplicación de nueve pulsos consecutivos de ACh.

### 3.2. Caracterización farmacológica de los receptores nicotínicos de la célula cromafín de la rata

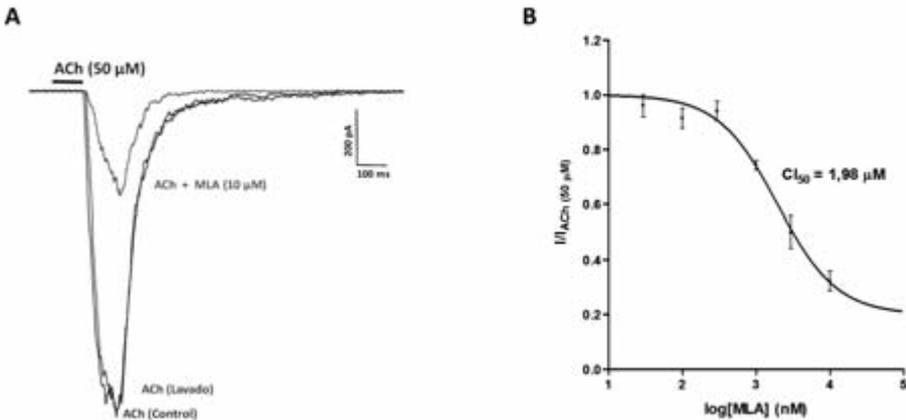
Estudios farmacológicos previos de nuestro grupo realizados en células cromafines de rata han permitido estimar la  $CE_{50}$  de la acetilcolina ( $63 \mu\text{M}$ ), la nicotina ( $24 \mu\text{M}$ ), la oxotremorina-M ( $507 \mu\text{M}$ ) y la colina ( $2393 \mu\text{M}$ ) para activar las corrientes nicotínicas. Estos resultados además de poner de manifiesto la heterogeneidad de los nAChRs funcionales presentes en las células cromafines de la rata sugerían también la presencia en dichas células de nAChRs de los tipos  $\alpha 7$  y/o  $\alpha 9\alpha 10$ .

Esta interpretación se vio reforzada mediante el empleo de metilcaconitina, un antagonista de los nAChRs formados por las subuni-

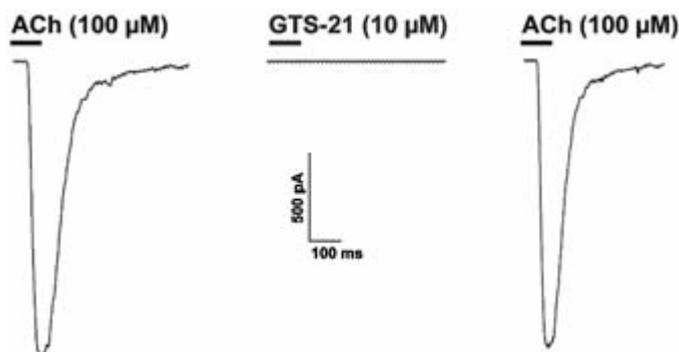
dades  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$ , que inhibió reversiblemente las corrientes ( $CI_{50}$  de  $1,98 \mu M$ ) inducidas por acetilcolina ( $50 \mu M$ ), (Figura 3).

Dado que la metilicaconitina ejerce sus efectos indistintamente sobre nAChRs  $\alpha 7$  y  $\alpha 9\alpha 10$  (30), decidimos investigar la presencia de los nAChRs  $\alpha 7$  en las células cromafines de la rata recurriendo al empleo de un agonista selectivo de los mismos, el GTS-21 (31). La administración de GTS-21 a la concentración de  $10 \mu M$ , que produce una activación máxima de los nAChRs  $\alpha 7$  en neuronas del hipocampo de rata (32), indujo una respuesta de corriente en sólo el 12% de las células estudiadas ( $n = 34$ ), cuya magnitud, además, fue inferior al 1% de la observada tras la administración de acetilcolina ( $100 \mu M$ ) (Figura 4).

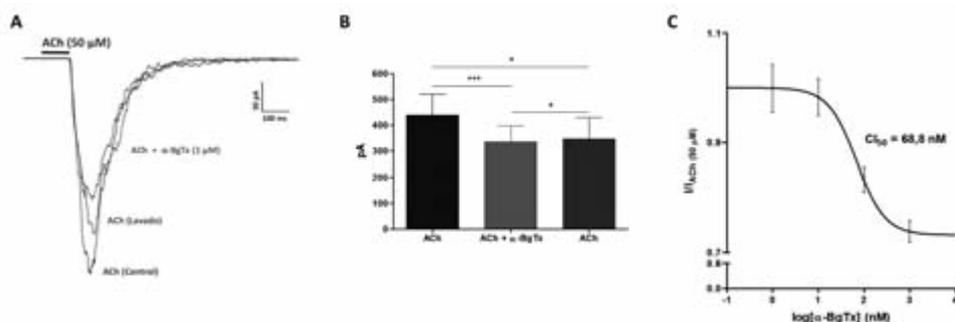
Una segunda estrategia farmacológica que cabe emplear para diferenciar los componentes de la respuesta dependientes de la activación de los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  y de los nAChRs  $\alpha 7$  se basa en el uso de la  $\alpha$ -bungarotoxina, una toxina que se une de forma reversible a los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  (9) e irreversible a los nAChRs  $\alpha 7$  homoméricos (33). La  $\alpha$ -bungarotoxina ( $1 \mu M$ ) inhibió de forma parcialmente reversible (Figura 5A y B) las corrientes inducidas por acetilcolina ( $50 \mu M$ ) con una  $CI_{50}$  de  $68,8 \text{ nM}$  y un efecto máximo del 30% (Figura 5C).



**Figura 3. Efecto de metilicaconitina (MLA) sobre las corrientes inducidas por acetilcolina (ACh) en las células cromafines de la rata. A.** Registros de corrientes representativos del bloqueo reversible observado con MLA. **B.** Curva concentración-respuesta para MLA ( $n = 4-7$  células).



**Figura 4.** Efecto de GTS-21 sobre las células cromafines de la rata. Registro de las corrientes obtenidas tras la administración consecutiva de acetilcolina (ACh) y GTS-21 a intervalos de 45 s en la misma célula.

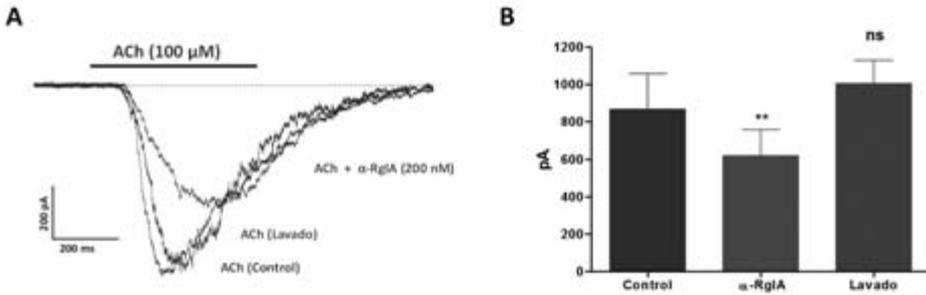


**Figura 5.** Efecto de  $\alpha$ -bungarotoxina ( $\alpha$ -BgTx) sobre las corrientes inducidas por acetilcolina (ACh). **A.** Registros representativos del efecto bloqueante de  $\alpha$ -BgTx y de su reversibilidad. **B.** Reversibilidad del efecto bloqueante de  $\alpha$ -BgTx sobre las respuestas inducidas por ACh. **C.** Curva concentración-respuesta para  $\alpha$ -BgTx ( $n = 5-14$  células). \*\*\* $P < 0,001$ ; \* $P < 0,05$ .

### 3.3. Identificación farmacológica del receptor nicotínico $\alpha 9\alpha 10$ de la célula cromafín de la rata

Los resultados obtenidos con metilcaconitina, GTS-21 y  $\alpha$ -bungarotoxina sugerían que en las células cromafines de la rata se ex-

presan los nAChRs  $\alpha 7$  y  $\alpha 9\alpha 10$ , si bien constituirían una pequeña fracción del conjunto de los nAChRs que pueden ser activados por la acetilcolina. Al objeto de llevar a cabo una adecuada caracterización farmacológica y funcional de los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  resulta conveniente trabajar con un fármaco antagonista que presente una elevada selectividad por los mismos. Por ello, recurrimos a la  $\alpha$ -RgIA. A la concentración de 200 nM, la  $\alpha$ -RgIA produjo un bloqueo del 30% sobre las corrientes inducidas por acetilcolina (100  $\mu$ M) tras un período de incubación de 4 minutos. Es de destacar también que el efecto bloqueante de esta toxina fue completamente reversible en el minuto siguiente a la retirada de la misma (Figura 6).



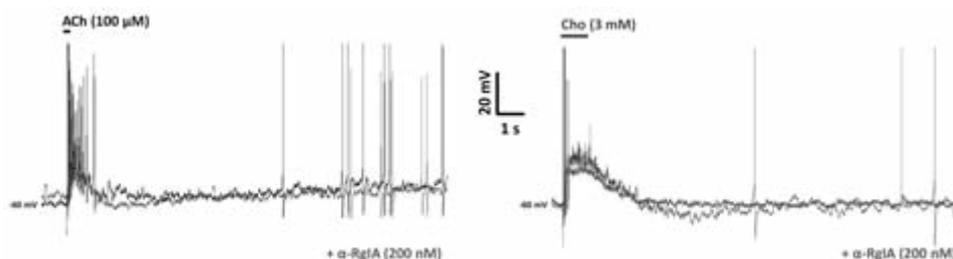
**Figura 6. Efecto de  $\alpha$ -conotoxina RgIA ( $\alpha$ -RgIA) sobre las corrientes nicotínicas. A.** Registro representativo del efecto bloqueante de la  $\alpha$ -RgIA. **B.** Diagramas de barras representativo de la reversibilidad del efecto de la  $\alpha$ -RgIA (n = 5-40 células). \*\*P < 0,01; ns: no significativo, respecto al control.

### 3.4. Participación del receptor nicotínico $\alpha 9\alpha 10$ en el control del potencial de membrana de las células cromafines

Aunque los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  constituyen una población minoritaria —la corriente inducida por acetilcolina es bloqueada en un 30% por la  $\alpha$ -conotoxina RgIA— entre los nAChRs de la célula cromafín de la rata, su elevada permeabilidad al  $Ca^{2+}$  sugiere que podrían desempeñar un papel singular en la regulación de la actividad eléctrica de la membrana plasmática a través de la activación de conductancias de

$K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$ . Estas conductancias de  $K^+$ , cuya presencia y propiedades han sido bien caracterizadas en las células cromafines (34, 35), son capaces de activarse en respuesta a la elevación de la concentración citosólica de  $Ca^{2+}$  favoreciendo la salida de  $K^+$  y, en consecuencia, un cambio —en sentido hiperpolarizante— del potencial de membrana. Los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  de pequeña conductancia iónica (canales SK) destacan entre este tipo de canales por su elevada sensibilidad al  $Ca^{2+}$  al potencial de reposo de la célula, lo que les permite contribuir a la posthiperpolarización de los potenciales de acción o ser responsables de la hiperpolarización que sigue a la activación de los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  en las células del epitelio sensitivo de la cóclea (6, 17).

Para analizar la contribución de los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  en la actividad eléctrica de las células cromafines de la rata se han valorado los efectos de la  $\alpha$ -RgIA (200 nM) sobre la respuesta de potencial inducida por la acetilcolina (100  $\mu$ M; 250 ms) y la colina (3 mM, 1 s). Esta toxina modificó de forma variable el perfil de la fase despolarizante de la respuesta, produciendo una reducción en la amplitud de la misma que resultó más notoria en el caso de la colina, probablemente por la mayor selectividad de este fármaco para activar los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$ . Asimismo, la  $\alpha$ -conotoxina RgIA bloqueó la hiperpolarización que sigue a la administración de colina y acortó la duración de la descarga de potenciales de acción inducida por la aplicación de acetilcolina (Figura 7).



**Figura 7.** Efecto de  $\alpha$ -conotoxina RgIA ( $\alpha$ -RgIA; 200 nM, 4 min) sobre los cambios del potencial de membrana inducidos por la administración de acetilcolina (ACh) o colina (Cho) en células cromafines de rata.

## 4. DISCUSIÓN

El presente trabajo se encuadra en una línea de investigación sobre la farmacología de los nAChRs neuronales que, en última instancia, aspira al desarrollo de fármacos selectivos para los distintos tipos de nAChRs y potencialmente útiles para el tratamiento de diversas entidades nosológicas (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, dolor, adicción tabáquica, etc.) con elevada prevalencia en las sociedades desarrolladas. Más concretamente, nuestro trabajo se suma al de otros laboratorios interesados en la caracterización molecular, farmacológica, biofísica e indagación del significado funcional de los nAChRs presentes en las células cromafines de la médula adrenal de los mamíferos. Las células cromafines constituyen un modelo ampliamente utilizado para el estudio de los nAChRs neuronales, dada la diversidad de los que expresan (20-22), y para la investigación de su relevancia fisiológica e implicaciones fisiopatológicas a tenor de las ventajas que ofrecen para el estudio de la respuesta neurosecretora (36) y de los mecanismos de la neuroprotección (37). En este trabajo se ha puesto énfasis en dos aspectos relacionados con los nAChRs: i) la caracterización farmacológica de los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  de las células cromafines de la rata; ii) el estudio de su significado funcional.

### 4.1. Caracterización farmacológica del receptor nicotínico $\alpha 9\alpha 10$ de las células cromafines de la rata

La caracterización de los nAChRs formados por las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  se ha visto favorecida por la peculiar farmacología de los mismos, que les lleva a compartir propiedades tanto con los nAChRs como con los muscarínicos. Así, agonistas nicotínicos típicos, como el dimetil-fenil-piperacinio y la colina, o el clásico agonista muscarínico oxotremorina-M se comportan como agonistas parciales de estos receptores. Análogamente, diversos antagonistas tanto nicotínicos (d-tubocurarina, metilcaconitina o la  $\alpha$ -bungarotoxina) como muscarínicos (atropina) son capaces de inhibir las respuestas mediadas por los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  (5, 6, 11, 12, 38).

El hecho de que diversos fármacos agonistas con diferente selectividad por los distintos tipos de nAChRs (acetilcolina, nicotina, colina,

oxotremorina-M) induzcan respuestas con potencias y magnitudes máximas notablemente dispares, resulta indicativo de la heterogeneidad de los nAChRs expresados por las células cromafines de la rata. Esta heterogeneidad de nAChRs, quedó confirmada por los resultados obtenidos con metilicacnitina, un antagonista de los nAChRs formados por las subunidades  $\alpha 7$  o  $\alpha 9\alpha 10$  a concentraciones inferiores a 100 nM, y de los constituidos por las subunidades  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$  a concentraciones superiores a la referida.

Nuestros resultados son congruentes con los publicados por otros cuatro grupos de investigación (20, 21, 24, 25, 39) que, basándose en evidencias tanto de tipo funcional como molecular han propuesto que los nAChRs predominantes en las células cromafines de la rata serían los de tipo ganglionar ( $\alpha 3\beta 4(\alpha 5)$  y  $\alpha 3\beta 2(\alpha 5)$ ) y el  $\alpha 7$ . Debemos señalar que los resultados funcionales que sugieren la expresión de nAChRs  $\alpha 7$  en las células cromafines de rata se han basado casi exclusivamente en la utilización de  $\alpha$ -bungarotoxina, una toxina que bloquea con elevada potencia tanto los nAChRs  $\alpha 7$  ( $CI_{50}$  de 1,9 nM; (38)) como los formados por las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  ( $CI_{50}$  de 6-64 nM; (5, 6, 9, 38)). Existe, no obstante, una particularidad del efecto bloqueante de esta toxina que puede ser de utilidad para identificar la diana sobre la que actúa: la  $\alpha$ -bungarotoxina se combina con el nAChR  $\alpha 7$  de manera esencialmente irreversible (40) mientras que su efecto sobre los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  es característicamente revertido en pocos minutos de lavado (5, 6, 9).

La  $\alpha$ -bungarotoxina bloqueó parcialmente (~ 30%) y con una  $CI_{50}$  de 68,8 nM las corrientes inducidas por acetilcolina en las células cromafines de la rata. Además, el efecto bloqueante fue parcialmente reversible. Por otro lado, el hecho de que el GTS-21, un agonista selectivo de los nAChRs  $\alpha 7$  (31), fuera ineficaz para inducir una respuesta de corriente en la práctica totalidad de las células estudiadas, permite descartar a los nAChRs  $\alpha 7$  como la principal diana de la acción de la metilicacnitina o de la  $\alpha$ -bungarotoxina en nuestra preparación.

La evidencia farmacológica definitiva de la presencia de los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  en las células cromafines de rata se obtuvo mediante el empleo de la  $\alpha$ -RgIA, una toxina que presenta una elevada potencia ( $CI_{50}$  ~ 5 nM) para bloquear los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  de la rata tanto na-

tivos (células ciliadas internas de la cóclea) como expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*. Conviene señalar también la extraordinaria selectividad de esta toxina respecto a los nAChRs  $\alpha 7$  ( $CI_{50}$  de 4,6  $\mu M$ ), lo y los nAChRs ganglionares ( $\alpha 3\beta 2$  o  $\alpha 3\beta 4$ ;  $CI_{50} > 10 \mu M$ ), lo que la convierte en una herramienta mucho más adecuada que la metilicacitina y la  $\alpha$ -bungarotoxina (no discriminan entre los nAChRs  $\alpha 7$  y nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$ ) o la  $\alpha$ -conotoxina PeIA (no distingue entre los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  — $CI_{50}$  de 6,9 nM— y los nAChRs  $\alpha 3\beta 2$  — $CI_{50}$  de 23 nM; (41), para identificar los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  en tejidos como la médula adrenal en los que se expresan las anteriores tres clases de nAChRs. La administración de dosis supramáximas de  $\alpha$ -conotoxina RgIA (200 nM) se asoció con un porcentaje de bloqueo del 30% de las corrientes inducidas por acetilcolina. Además, los efectos de esta toxina fueron completamente reversibles tras un periodo de lavado de un minuto, en consonancia con lo descrito sobre los efectos de la  $\alpha$ -RgIA sobre los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  en otras localizaciones (13, 14). En definitiva, el conjunto de las evidencias farmacológicas presentadas permite concluir que las células cromafines de la rata expresan nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  funcionales.

#### **4.2. Contribución de los receptores nicotínicos $\alpha 9\alpha 10$ a los cambios de potencial de membrana inducidos por la estimulación colinérgica de las células cromafines**

Las células ciliadas externas del epitelio sensitivo de la cóclea de los mamíferos (rata, ratón, cobaya, etc.) reciben aferencias colinérgicas inhibitorias dependientes de la activación de nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$ . La apertura del ionóforo asociado al nAChR  $\alpha 9\alpha 10$  posibilita no solo la entrada de  $Na^+$  sino también de  $Ca^{2+}$  a la célula y, subsiguientemente, la aparición de una corriente de salida de  $K^+$  a través de los canales SK. Ello determina que la respuesta eléctrica a la estimulación nicotínica sea bifásica, con una breve despolarización seguida de una hiperpolarización rápida y duradera (17).

En las células cromafines de la médula adrenal de la rata, la estimulación de los nAChRs por la acetilcolina induce una despolarización de la membrana celular con el consiguiente disparo de potenciales de acción y entrada de  $Ca^{2+}$  a través de CCDV, que se añadiría al

que pudiera entrar a través de los nAChRs (42). Cabe destacar también que las células cromafines están dotadas de receptores muscarínicos (28) y canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  de los tipos SK y BK (43). Los canales SK de las células cromafines, además de mediar respuestas hiperpolarizantes dependientes de la movilización de  $Ca^{2+}$  desde depósitos intracelulares, pueden también determinar la frecuencia de disparo de potenciales de acción durante una despolarización prolongada. Ello es así porque los canales SK son responsables de la posthiperpolarización lenta (*slow afterhyperpolarization*) que se observa en muy diversos tipos neuronales que descargan potenciales de acción dependientes de la entrada de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  (44, 45). Durante un tren de potenciales de acción de este tipo se produce la acumulación de  $Ca^{2+}$  en la vecindad de la membrana celular, lo que conduce a la activación progresiva de los canales SK y, consiguientemente, al aumento de la amplitud y duración de las posthiperpolarizaciones lentas. Ello determina un incremento paulatino del intervalo entre los potenciales de acción y, eventualmente, la abolición del disparo de los mismos (*frequency adaptation*). Por su parte, los canales BK de las células cromafines han sido implicados en la repolarización de los potenciales de acción y en la posthiperpolarización rápida (*fast afterhyperpolarization*) de los mismos.

En los experimentos encaminados a analizar la respuesta de voltaje a la estimulación nicotínica, se emplearon dos fármacos colinérgicos, la acetilcolina y la colina. En virtud de la farmacología de estos dos agentes, se puede concluir que la respuesta despolarizante observada con acetilcolina y colina se debe a la entrada de cationes ( $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ ) a través de los nAChRs; por otra parte, la respuesta hiperpolarizante obtenida tras la administración de colina puede ser atribuida a la apertura de canales SK como consecuencia de la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de CCDV, activados durante la fase de despolarización, y/o de los nAChRs. El hecho de que la respuesta hiperpolarizante sea suprimida por la  $\alpha$ -RgIA unido al escaso efecto de esta toxina sobre la descarga de potenciales de acción, permitiría atribuirla a la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$ . Por otra parte, los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  también estarían involucrados en el control de la frecuencia y duración de la descarga de potenciales de acción que ocurre durante la despolarización inducida por acetilcolina. A diferencia de la colina, que activaría predominantemente los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$ , el

agonista endógeno reclutaría la totalidad de los nAChRs de la célula cromafín. En consecuencia, la  $\alpha$ -conotoxina RgIA apenas modificaría la respuesta despolarizante inducida por la acetilcolina dependiente de la activación de nAChRs fundamentalmente de tipo ganglionar, aunque sí modificaría el patrón de descarga de potenciales de acción en razón a la particular capacidad de los nAChRs  $\alpha 9\alpha 10$  para posibilitar la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y, consiguientemente, contribuir a la posthiperpolarización asociada a la activación de los canales SK.

## 5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido desarrollado en el marco de los Proyectos de Investigación BFI2002-01093 del Ministerio de Ciencia y Tecnología, BFU2005-06034BFI del Ministerio de Educación y Ciencia de España, y S-SAL 0253 2006 de la Comunidad Autónoma de Madrid. Asimismo, agradecemos al Profesor William Kem de la Universidad de Florida, la donación del GTS-21, y al Profesor Michael McIntosh de la Universidad de Utah, el habernos facilitado la  $\alpha$ -conotoxina RgIA.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Castro, N. G. & Albuquerque, E. X. (1995).  $\alpha$ -Bungarotoxin-sensitive hippocampal nicotinic receptor channel has a high calcium permeability. *Biophysical Journal*. 68(2): 516-24.
2. Gotti, C., Zoli, M. & Clementi, F. (2006). Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends in Pharmacological Sciences*. 27(9): 482-91.
3. Wang, F., Gerzanich, V., Wells, G. B., Anand, R., Peng, X., Keyser, K. & Lindstrom, J. (1996). Assembly of human neuronal nicotinic receptor  $\alpha 5$  subunits with  $\alpha 3$ ,  $\beta 2$  and  $\beta 4$  subunits. *Journal of Biological Chemistry*. 271(30): 17656-65.
4. Wonnacott, S. & Barik, J. (2007). Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Tocris Co-oxson Publication*. 28: 1-20.
5. Elgoyhen, A. B., Johnson, D. S., Boulter, J., Vetter, D. E. & Heinemann, S. (1994)  $\alpha 9$ : an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Neuron*. 79: 705-15.
6. Elgoyhen, A. B., Vetter, D. E., Katz, E., Rothlin, C. V., Heinemann, S. & Boulter, J. (2001)  $\alpha 10$ : A determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory cells. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. 98: 3501-6.

7. Kumar, P. & Meizel, S. (2005). Nicotinic acetylcholine receptor subunits and associated proteins in human sperm. *Journal of Biological Chemistry*. 280(27): 25928-35.
8. Biallas, S., Wilker, S., Lips, K. S., Kummer, W., Grando, S. A., Padberg, W. & Grau, V. (2007). Immunohistochemical detection of nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha9 and alpha10 in rat lung isografts and allografts. *Life Sciences*. 80(24-25): 2286-9.
9. Sgard, F., Charpantier, E., Bertrand, S., Walker, N., Caput, D., Graham, D., et al. (2002). A novel human nicotinic receptor subunit, alpha10, that confers functionality to the alpha9-subunit. *Molecular Pharmacology*. 61: 150-9.
10. Plazas, P. V., Katz, E., Gomez-Casati, M. E., Bouzat, C. & Elgoyhen, A. B. (2005). Stoichiometry of the alpha9alpha10 nicotinic cholinergic receptor. *Journal of Neurosciences*. 25(47): 10905-12.
11. Verbitsky, M., Rothlin, C. V., Katz, E. & Elgoyhen, A. B. (2000). Mixed nicotinic-muscarinic properties of the alpha9 nicotinic cholinergic receptor. *Neuropharmacology*. 39(13): 2515-24.
12. Rothlin, C. V., Lioudyno, M. I., Silbering, A. F., Plazas, P. V., Casati, M. E., Katz, E., Guth, P. S. & Elgoyhen, A. B. (2003). Direct interaction of serotonin type 3 receptor ligands with recombinant and native alpha 9 alpha 10-containing nicotinic cholinergic receptors. *Molecular Pharmacology*. 63(5): 1067-74.
13. Ellison, M., Haberlandt, C., Gomez-Casati, M. E., Watkins, M., Elgoyhen, A. B., McIntosh, J. M. & Olivera, B. M. (2006). Alpha-RgIA: a novel conotoxin that specifically and potently blocks the alpha9alpha10 nAChR. *Biochemistry*. 45(5): 1511-7.
14. Ellison, M., Feng, Z. P., Park, A. J., Zhang, X., Olivera, B. M., McIntosh, J. M. & Norton, R. S. (2008). Alpha-RgIA, a novel conotoxin that blocks the alpha9alpha10 nAChR: structure and identification of key receptor-binding residues. *Journal of Molecular Biology*. 377(4): 1216-27.
15. Katz, E., Verbitsky, M., Rothlin, C. V., Vetter, D. E., Heinemann, S. F. & Elgoyhen, A. B. (2000). High calcium permeability and calcium block of the alpha9 nicotinic acetylcholine receptor. *Hear Research*. 141(1-2): 117-28.
16. Gomez-Casati, M. E., Fuchs, P. A., Elgoyhen, A. B. & Katz, E. (2005). Biophysical and pharmacological characterization of nicotinic cholinergic receptors in rat cochlear inner hair cells. *Journal of Physiology*. 566(Pt 1): 103-108.
17. Blanchet, C., ErosteGUI, C., Sugasawa, M. & Dulon, D. (1996). Acetylcholine-induced potassium current of guinea pig outer hair cells: its dependence on a calcium influx through nicotinic-like receptors. *Journal of Neurosciences*. 16(8): 2574-84.
18. Lioudyno, M., Hiel, H., Kong, J. H., Katz, E., Waldman, E., Parameshwaran-Iyer, S., Glowatzki, E. & Fuchs, P. A. (2004). A "synaptoplasmic cistern" mediates rapid inhibition of cochlear hair cells. *Journal of Neurosciences*. 24(49): 11160-4.
19. Moser, T. (1998). Low-conductance intercellular coupling between mouse chromaffin cells in situ. *Journal of Physiology*. 506 (Pt 1): 195-205.
20. Mousavi, M., Hellstrom-Lindahl, E., Guan, Z. Z., Bednar, I. & Nordberg, A. (2001). Expression of nicotinic acetylcholine receptors in human and rat adrenal medulla. *Life Sciences*. 70: 577-90.

21. Di Angelantonio, S., Matteoni, C., Fabbretti, E. & Nistri, A. (2003). Molecular biology and electrophysiology of neuronal nicotinic receptors of rat chromaffin cells. *European Journal of Neurosciences*. 17(11): 2313-22.
22. Criado, M., Dominguez del Toro, E., Carrasco-Serrano, C., Smillie, F. I., Juiz, J. M., Viniestra, S. & Ballesta, J. J. (1997). Differential expression of alpha-bungarotoxin-sensitive neuronal nicotinic receptors in adrenergic chromaffin cells: a role for transcription factor Egr-1. *Journal of Neurosciences*. 17(17): 6554-64.
23. Campos-Caro, A., Smillie, F. I., Domínguez del Toro, E., Rovira J. C., Vicente-Agullo, F., Chapuli, J., *et al.* (1997). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors on bovine chromaffin cells: cloning, expression, and genomic organization of receptor subunits. *Journal of Neurochemistry*. 68: 488-97.
24. Martín, A. O., Mathieu, M-N. & Guérineau, N. C. (2003). Evidence for long-lasting cholinergic control of gap junctional communication between adrenal chromaffin cells. *Journal of Neurosciences*. 23: 3669-3678.
25. Martín, A. O., Alonso, G. & Guérineau, N. C. (2005). Agrin mediates a rapid switch from electrical coupling to chemical neurotransmission during synaptogenesis. *Journal of Cell Biology*. 169(3): 503-14.
26. Free, R. B., McKay, S. B., Gottlieb, P. D., Boyd, T. & McKay, D. B. (2005) Expression of Native  $\alpha 3\beta 4^*$  Neuronal Nicotinic Receptors: Binding and Functional Studies Investigating Turnover of Surface and Intracellular Receptor Populations. *Molecular Pharmacology*. 67: 2040-48.
27. Dajas-Bailador, F. & Wonnacott, S. (2004) Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends in Pharmacological Sciences*. 25(6): 317-24.
28. Olivos, L. & Artalejo, A. R. (2008). Muscarinic excitation-secretion coupling in chromaffin cells. *Acta Physiologica (Oxf)*. 192(2): 213-20.
29. Fucile, S., Sucapane, A. & Eusebi, F. (2006)  $Ca^{2+}$  permeability through rat cloned alpha9-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium*. 39(4): 349-55.
30. Pereira, E. F., Hilmas, C., Santos, M. D., Alkondon, M., Maelicke, A. & Albuquerque, E. X. (2002). Unconventional ligands and modulators of nicotinic receptors. *Journal of Neurobiology*. 53(4): 479-500.
31. Stokes, C., Papke, J. K., Horenstein, N. A., Kem, W. R., McCormack, T. J. & Papke, R. L. (2004). The structural basis for GTS-21 selectivity between human and rat nicotinic alpha7 receptors. *Molecular Pharmacology*. 66(1): 14-24.
32. Séguela, P., Wadiche, J., Dineley-Miller, K., Dani, J. A. & Patrick, J. W. (1993). Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *Journal of Neurosciences*. 13(2): 596-604.
33. Couturier, S., Bertrand, D., Matter, J. M., Hernández, M. C., Bertrand, S., Millar, N., Valera, S., Barkas, T. & 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(6): 847-56.
34. Marty, A. (1981). Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature*. 291(5815): 497-500.

35. Artalejo, A. R., García, A. G. & Neher E. (1993). Small-conductance  $\text{Ca}(2^+)$ -activated  $\text{K}^+$  channels in bovine chromaffin cells. *European Journal of Physiology*. 423(1-2): 97-103.
36. Neher, E. & Marty, A. (1982). Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* 79(21): 6712-6.
37. Abad-Santos, F. (1997). In vitro models for the study of nerve lesions and potential neuroprotective drugs. *Revista de Neurología* 25: 2015-21.
38. Baker, E. R., Zwart, R., Sher, E. & Millar, N. S. (2004). Pharmacological properties of  $\alpha 9 \alpha 10$  nicotinic acetylcholine receptors revealed by heterologous expression of subunit chimeras. *Molecular Pharmacology*. 65: 453-460.
39. Yokotani, K., Okada, S. & Nakamura, K. (2002). Characterization of functional nicotinic acetylcholine receptors involved in catecholamine release from the isolated rat adrenal gland. *European Journal of Pharmacology*. 446(1-3): 83-7.
40. Colquhoun, L. M. & Patrick, J. W. (1997). Pharmacology of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Advances in Pharmacology*. 39: 191-220.
41. McIntosh, J. M., Plazas, P. V., Watkins, M., Gomez-Casati, M. E., Olivera, B. M. & Elgoyhen, A. B. (2005). A novel  $\alpha$ -conotoxin, PeIA, cloned from *Conus pergrandis*, discriminates between rat  $\alpha 9 \alpha 10$  and  $\alpha 7$  nicotinic cholinergic receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 280(34): 30107-12.
42. Brandt, B. L., Hagiwara, S., Kidokoro, Y. & Miyazaki, S. (1976). Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *Journal of Physiology*. 263(3): 417-39.
43. Lingle, C. J., Solaro, C. R., Prakriya, M. & Ding, J. P. (1996). Calcium-activated potassium channels in adrenal chromaffin cells. *Ion Channels*. 4: 261-301.
44. Nassar-Gentina, V., Pollard, H. B. & Rojas, E. (1988). Electrical activity in chromaffin cells of intact mouse adrenal gland. *American Journal of Physiology*. 254(5 Pt 1): C675-83.
45. Holman, M. E., Coleman, H. A., Tonta, M. A. & Parkington, H. C. (1994). Synaptic transmission from splanchnic nerves to the adrenal medulla of guinea pigs. *Journal of Physiology*. 478: 115-24.

**\*Información de Contacto:**

Dr. Antonio R. Artalejo.

Departamento de Toxicología y Farmacología. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

Avda. Puerta de Hierro, s/n. 28040, Madrid.

e-mail: antonio.artalejo@vet.ucm.es