

## **RESPUESTA DE POTENCIAL DE MEMBRANA INDUCIDA POR AGONISTAS COLINÉRGICOS EN CÉLULAS CROMAFINES DE LA RATA**

Luis A. Olivos y Diego Bustillo

Tutores: M<sup>a</sup> Victoria Barahona y Antonio R. Artalejo

Dpto. Toxicología y Farmacología. Facultad de Veterinaria. UCM.

### **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO**

La acetilcolina (ACh) liberada por las terminaciones del nervio esplácnico se combina con receptores nicotínicos (nAChRs) y muscarínicos de la membrana de las células cromafines. Clásicamente, se viene aceptando que la ACh 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 K<sup>+</sup> activada por el incremento del Ca<sup>2+</sup> citosólico 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 Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje activados durante la fase de despolarización (**Figura 1**). El hallazgo en las células cromafines de nAChRs con alta permeabilidad al Ca<sup>2+</sup> ( $\alpha_7$  y  $\alpha_9\alpha_{10}$ ) Fucile (2004) y Fucile *et al* (2006), ha añadido complejidad al mecanismo de señalización nicotínica al posibilitar un efecto dual – despolarizante e hiperpolarizante– sobre el potencial de membrana, cuyo estudio ha constituido el principal objetivo del presente trabajo.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

Hemos empleado la variante del parche perforado de la configuración de célula completa de la técnica de "patch-clamp" para el registro de las corrientes iónicas (nicotínica, de K<sup>+</sup> dependiente de Ca<sup>2+</sup>, etc.) y de los cambios en el potencial de membrana inducidos en las células cromafines de la rata por la administración de pulsos breves (500 ms) de ACh, muscarina (Musc), colina (Cho), un agonista selectivo de los nAChRs  $\alpha_7$  y  $\alpha_9\alpha_{10}$ , y oxtremorina-M (Oxo-M), un agonista muscarínico con elevada selectividad sobre los nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$ .

## RESULTADOS

La ACh, la Cho y la Oxo-M- indujeron corrientes de entrada a la célula (en la modalidad de fijación de voltaje de la técnica del “patch-clamp”) con cursos temporales característicos. Conviene notar que la cinética de activación de la corriente nicotínica varía para cada uno de los agentes utilizados, siendo más rápida en el caso de la Cho, algo menos rápida cuando se administra ACh y considerablemente más lenta en el caso de la Oxo-M. Ello probablemente refleja la distinta selectividad de estos agentes en relación con los diferentes tipos de nAChRs neuronales. Si bien la ACh es capaz de activar todos los tipos de nAChRs, la Cho se comportaría como un agonista selectivo de los  $\alpha_7$  y  $\alpha_9\alpha_{10}$ , mientras que la Oxo-M mostraría una elevada selectividad para activar los  $\alpha_9\alpha_{10}$ . La presencia de nAChRs  $\alpha_9\alpha_{10}$  fue confirmada mediante la utilización de la  $\alpha$ -conotoxina RgIA (100nM), Ellison *et al.* (2006) la cual inhibió un 63 y un 52% las corrientes inducidas respectivamente por Cho y Oxo-M, lo que implicó a los receptores nicotínicos  $\alpha_9\alpha_{10}$  en las respuestas generadas por estos agentes.

La administración de Musc, ACh y Oxo-M se asoció a la aparición de corrientes de salida a potenciales positivos a  $E_K$  que fueron abolidas por apamina, un bloqueante selectivo de los canales de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$  de pequeña conductancia iónica (SK). Si bien este tipo de corrientes rara vez pudo observarse tras la administración de Cho, su activación se aceleraba al aumentar la amplitud de las corrientes de entrada nicotínicas, lo que sugiere que la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los nAChRs coadyuva a la activación de los canales SK.

Los cambios observados en el potencial de membrana (modalidad de fijación de corriente de la técnica) fueron un fiel reflejo de las corrientes activadas por los distintos fármacos. Así, ACh, la Cho y la Oxo-M dieron lugar a una respuesta bifásica, consistente en una despolarización seguida de hiperpolarización. Por el contrario, la muscarina produjo una respuesta hiperpolarizante aislada. En virtud de la farmacología bien conocida de estos compuestos, cabría deducir que la respuesta despolarizante observada con ACh, Cho y Oxo-M se debe a la activación de receptores nicotínicos. Por otra parte, la respuesta hiperpolarizante diferida que aparece tras la administración de Musc, pero también de otros agentes con afinidad por los receptores muscarínicos como la ACh y la Oxo-M, resultaría de la activación de conductancias de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  debidas a la movilización de  $Ca^{2+}$  intracelular.

La fase despolarizante, que se observa exclusivamente con los agonistas nicotínicos, que puede adoptar en las distintas células uno de los tres modos siguientes. El primero de ellos, consiste en una despolarización transitoria. Los otros dos añaden a esta fase despolarizante la descarga, tónica o fásica, de potenciales de acción. La descarga tónica, consistente en un tren de potenciales de acción, se observa en células en la que la corriente nicotínica produce una despolarización estable en torno a los -40 mV, mientras que la descarga fásica, consistente en la aparición de uno o dos potenciales de acción, se observa en aquellas células en las que la despolarización excede dicho valor, produciendo un bloqueo por despolarización. Ambos patrones de descarga parecen depender tanto de diferencias en la resistencia de la membrana como en el potencial de reposo de las distintas células y tendrían importantes consecuencias en la respuesta secretora de catecolaminas.

Los experimentos que describimos a continuación están orientados a la identificación de las conductancias iónicas responsables de la fase de hiperpolarización. El potencial de reversión de la corrientes de salida, próximo a  $E_K$ , sugería que podía deberse a la activación de canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  y pequeña conductancia iónica (canales SK). La apamina, una toxina que bloquea específicamente estos canales, abolió las corrientes de salida activadas por los distintos agentes colinérgicos así como la hiperpolarización que suele observarse tras su administración. Este resultado indica que la fase de hiperpolarización es secundaria a la elevación de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular y subsiguiente activación de los canales SK.

Hemos investigado también los mecanismos implicados en dicha elevación de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular. En principio, cabe proponer tres mecanismos posibles: i) la entrada de  $Ca^{2+}$  a través del canal asociado al nAChR, ii) la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, activados por la despolarización, y iii) la movilización de  $Ca^{2+}$  desde depósitos intracelulares sensibles a inositol trifosfato, generado por la estimulación muscarínica. Una inspección cuidadosa de las respuestas hiperpolarizantes permite distinguir dos cursos temporales diferentes: Un curso temporal de inicio temprano o rápido, que se observa con los fármacos de acción mixta nicotínica y muscarínica, como la ACh o la Oxo-M, y un curso temporal lento que se observa exclusivamente con los agonistas muscarínicos, como la Musc, y que cabe atribuir a la movilización de  $Ca^{2+}$  desde depósitos intracelulares.

La utilización de fármacos inhibidores de la fosfolipasa C como el U73122 redujo selectivamente la hiperpolarización tardía desvelando la existencia de un componente rápido en la hiperpolarización, que resulta particularmente visible tras la administración de ACh. Estos resultados confirman la naturaleza muscarínica de la hiperpolarización lenta mientras que sugieren que la rápida es debida a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el exterior celular.

Al objeto de comprobar esta hipótesis, hemos recurrido al  $\text{Cd}^{2+}$  y al  $\text{Co}^{2+}$ , dos conocidos bloqueantes de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, que en nuestras manos también redujeron la magnitud de las corrientes a través del nAChR, Kidokoro y Ritchie (1980). Estos efectos farmacológicos se tradujeron en la inhibición de una fase temprana de la respuesta hiperpolarizante, que cabe atribuir a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el exterior celular, sin que se afectase el componente tardío relacionado con la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos intracelulares. Dicha entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , como ya ha sido mencionado, respondería a dos mecanismos: la entrada a través de nAChR, y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través canales dependientes de voltaje activados durante la despolarización.

## CONCLUSIONES

Las células cromafines muestran un comportamiento plural en respuesta a los agentes colinérgicos, dependiente tanto de su particular dotación de canales iónicos como de la intensidad del estímulo. Si bien corrientes nicotínicas con mínima amplitud son capaces despolarizar la membrana celular y eventualmente inducir la descarga de potenciales de acción, la fisonomía de la despolarización (amplitud y patrón de descarga, fásica o tónica) estará fundamentalmente condicionada por la resistencia de la membrana. En particular, en aquellas células con patrón de descarga fásica y bloqueo por despolarización, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales dependientes de voltaje será la principal responsable del componente rápido de la respuesta hiperpolarizante. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los nAChRs y, sobre todo, de los  $\alpha_9\alpha_{10}$  puede contribuir a la hiperpolarización rápida fundamentalmente en aquellas células con un patrón tónico de descarga de potenciales de acción en las que el potencial de membrana no se halle muy despolarizado (**Figura 1**). Finalmente, cabe señalar que la hiperpolarización que sigue a la estimulación muscarínica reducirá la amplitud y particularmente la duración de la respuesta despolarizante durante la estimulación nerviosa de alta frecuencia.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Ellison M, Haberlandt C, Gomez-Casati ME, Watkins M, Elgoyhen AB, McIntosh JM, Olivera BM. Alpha-RgIA: a novel conotoxin that specifically and potently blocks the alpha9alpha10 nAChR. *Biochemistry*. 2006, 45(5):1511-7.

Fucile S. Ca<sup>2+</sup> permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium*. 2004; 35: 1–8

Fucile S, Sucapane A, Eusebi F. Ca<sup>2+</sup> permeability through rat cloned alpha9-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium*. 2006; 39(4):349-55.

Kidokoro Y, Ritchie AK. Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. *J Physiol*. 1980, 307:199-216

Financiado mediante el Proyecto del MEC con N° Ref. BFU2005-06034. Diego Bustillo y Luis Olivos son becarios del Gobierno Vasco y de la Comunidad de Madrid, respectivamente.

