

**Universidad Complutense de Madrid**  
**Facultad de Ciencias Químicas**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



\* 5 3 0 9 8 2 6 0 6 7 \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**Modulación de la secreción de catecolaminas por  
la vía del óxido nítrico/ GMP cíclico en células  
cromafines bovinas**

**Tesis Doctoral**

**Fernando Rodríguez Pascual**

**Madrid, 1997**

**El presente trabajo de investigación se ha desarrollado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de las Dras. D<sup>a</sup> Magdalena Torres y D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal.**



A mi familia y amigos,

En primer lugar quiero expresar todo mi agradecimiento a la Dra. Magdalena Torres por haber guiado mis pasos científicos desde el principio hasta el final de este trabajo de investigación. También quiero expresar mi total gratitud a la Dra. M<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal por haber permitido mi incorporación al grupo de neurocientíficos del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria de Madrid.

Me gustaría también agradecer muy especialmente al Dr. Enrique Castro por su paciencia a la hora de hacer más fácil nuestra (siempre difícil) relación con los ordenadores. No cabe duda que a todos los que pertenecemos al grupo nos enseña algo nuevo cada día. También le doy mis más sinceras gracias a la Dra. Esmerilda García Delicado, de la que he aprendido, sobre todo, importantes lecciones sobre solidaridad, bondad y todos aquellos rasgos que definen lo positivo del ser humano. También quiero expresar mi agradecimiento al Dr. José Sánchez Prieto. Creo que tendré pocas ocasiones de trabajar codo con codo con personas de tan alto valor científico como él. No puedo olvidar tampoco a la Dra. M<sup>a</sup> Dolores Fideu, a la que deseo todo lo mejor.

También quiero transmitir mi agradecimiento más afectivo y cordial al resto de doctores, becarios, pre(be)carios y demás estudiantes que pertenecen o han pertenecido al Departamento. Muy especialmente a Elena, Jesús, Inma, Sandra, Raquel, Tere, Susana, Javier y Suso. A todos doy gracias por haber aguantado mi mal humor y mis manías durante todos estos años, y por hacer algo más agradable nuestros ratos de tertulia frente a una taza de té/café; o durante la comida en la biblioteca del Departamento. Tampoco puedo olvidar aquí a las recientes incorporaciones, Ana, Marta, Rut y Miguel.

Quiero agradecer también toda la ayuda prestada por los miembros del personal administrativo o de limpieza de la Facultad de Veterinaria: M<sup>a</sup> Carmen, Marta, M<sup>a</sup> Jesús. Aunque ya no estén trabajando en el Departamento también recuerdo muy especialmente a Mariano y M<sup>a</sup> Jesús.

De igual modo quiero expresar mi agradecimiento al Profesor Dr. Ulrich Förstermann y a la Dra. Petra Schwartz del Departamento de Farmacología de la Universidad Johannes Gutenberg de Mainz (Alemania) por haberme permitido colaborar con ellos.

No voy a olvidar nunca aquellos días de Octubre y Diciembre de 1995 en los que tuve la oportunidad de trabajar en su departamento.

Por su inestimable ayuda a la hora de medir el potencial de membrana en las células, así como su disponibilidad para la discusión científica, quiero agradecer también a las Dras. M<sup>a</sup> Pilar González y M<sup>a</sup> Jesús Oset Gasque y a todo su grupo de investigación del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. Agradezco también al Dr. Lisardo Boscá del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid su ayuda en la cuantificación de autorradiogramas mediante densitometría.

También quiero agradecer a la Dra. Rosario de Miguel del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, su ayuda en la determinación de catecolaminas por HPLC.

No puedo omitir en esta lista a los responsables del (ya desaparecido) matadero municipal de Legazpi y del matadero Cofrimasa de Villaviciosa de Odón, por haber suministrado las glándulas adrenales bovinas sin las cuales todos los experimentos de este trabajo de investigación nunca se hubieran podido realizar.

A todos, muchas gracias.

## INDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
EL ÓXIDO NÍTRICO COMO MENSAJERO BIOLÓGICO.....	5
Química del óxido nítrico.....	5
Reactividad del NO.....	6
Biosíntesis del NO: Oxido nítrico sintasas.....	7
Estructura y mecanismo catalítico de las óxido nítrico sintasas.....	9
Regulación de la actividad NOS: Isoformas de NOS.....	11
NOS I.....	12
NOS II.....	20
NOS III .....	21
Mecanismos de acción de NO: Dependencia o independencia de GMPc .....	25
GMPc como señal intracelular.....	25
Síntesis de GMPc.....	27
Guanilato ciclasa soluble.....	28
Guanilato ciclasa particulada .....	30
Hidrólisis de GMPc: Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos.....	33
Mecanismos de acción de GMPc.....	37
Canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos .....	37
Fosfodiesterasas reguladas por GMPc.....	39
Proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG).....	40
Distribución de la PKG e implicaciones fisiológicas.....	42
Relajación del músculo liso vascular.....	43
Inhibición de la agregación plaquetaria .....	44
Papel de la proteína quinasa dependiente de GMPc en el sistema nervioso.....	44
Activación cruzada de PKG y PKA.....	45
LAS CELULAS CROMAFINES DE LA MEDULA ADRENAL.....	47
La médula adrenal como tejido neurosecretor.....	47
Características de las células cromafines.....	50
Propiedades electrofisiológicas de las células cromafines.....	55
Respuesta de las células cromafines a compuestos secretagogos.....	58
Acoplamiento estímulo-secreción.....	60
Rutas de 2° mensajeros en células cromafines.....	63
OBJETIVOS.....	69
MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
1.MATERIALES.....	75
Productos .....	75
Instrumental general.....	77
2.MÉTODOS .....	80
Obtención de células adrenomedulares .....	80
Purificación de células cromafines mediante gradientes discontinuos de urografina...	82
Estimación del número de células. Integridad y pureza del cultivo.....	85

Mantenimiento en cultivo .....	86
Mantenimiento en suspensión .....	87
Obtención de ácido ribonucleico total a partir de células cromafines bovinas .....	89
Detección del RNA mensajero de NOS I mediante transcripción reversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) .....	90
Estudios inmunocitoquímicos .....	90
Determinación de los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos GMPc y AMPc ..	92
Determinación de actividad óxido nítrico sintasa .....	94
Detección de la proteína quinasa dependiente de GMPc mediante inmunotransferencia .....	96
.....	96
Determinación de actividad de proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG) .....	97
Inmunoprecipitación de tirosina hidroxilasa .....	99
Determinación de secreción de catecolaminas de células cromafines .....	101
Determinación de la concentración de calcio citosólico .....	105
Determinación del potencial de membrana .....	107
Análisis de datos .....	109
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>111</b>
<b>1. LAS CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS EN CULTIVO: UN MODELO NEUROSECRETOR .....</b>	<b>113</b>
El proceso de obtención y purificación .....	113
Composición del cultivo .....	117
Actividad fisiológica de las células cromafines en cultivo .....	118
<b>2. PRESENCIA DE LA RUTA NO:GMPc EN CELULAS CROMAFINES BOVINAS .....</b>	<b>123</b>
.....	123
Caracterización inmunocitoquímica de óxido nítrico sintasa (NOS) y guanilato ciclasa soluble (GCS) .....	123
Colocalización de NOS I y GCS con las enzimas de síntesis de catecolaminas TH y PNMT .....	123
Caracterización del RNA mensajero de NOS I en células cromafines bovinas .....	131
Caracterización bioquímica de NOS: Producción de óxido nítrico .....	132
Caracterización bioquímica de GCS: Producción de GMPc .....	134
Efecto de secretagogos sobre los niveles intracelulares de GMPc .....	137
Activación independiente de Ca <sup>2+</sup> de los niveles de GMPc intracelular: Efecto del donador de NO, nitroprusiato sódico (SNP), y del péptido natriurético de tipo C (CNP) .....	139
Efecto de SNP y CNP en ausencia de IBMX. Evaluación de un posible efecto sobre los niveles de AMPc .....	141
Estudio comparativo de la producción de GMPc por NO endógeno y exógeno .....	142
Regulación por calcio de la señal de GMPc .....	147
<b>3. PROTEINA QUINASA DEPENDIENTE DE GMPc EN CELULAS CROMAFINES BOVINAS .....</b>	<b>150</b>
Caracterización inmunológica de proteína quinasa dependiente de GMPc en células cromafines bovinas .....	150

Actividad enzimática de proteína quinasa dependiente de GMPc en células cromafines bovinas.....	152
Fosforilación de tirosina hidroxilasa por proteína quinasa dependiente de GMPc en células cromafines bovinas en cultivo.....	154
<b>4. MODULACION DE LA SECRECION DE CATECOLAMINAS POR NO:GMPc</b> .....	<b>161</b>
Efecto de los activadores de guanilato ciclasas, nitroprusiato sódico (SNP) y péptido natriurético de tipo C (CNP) sobre la secreción de catecolaminas y el calcio libre citosólico .....	161
Confirmación del papel del GMPc en la modulación de la secreción de catecolaminas y el calcio citosólico por SNP y CNP.....	166
Modulación de la respuesta secretora por inhibición de la degradación de GMPc....	170
Mecanismo de acción del GMPc: Estudio del efecto del análogo permeable de GMPc, 8-bromo-GMPc.....	172
Estudio del tipo de canal de calcio voltaje-dependiente responsable del efecto inhibitorio mediado por GMPc.....	176
Modulación de la respuesta secretora por NO/GMPc: NO endógeno frente a NO exógeno .....	182
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	<b>189</b>
NOS y GCS en la médula adrenal.....	191
Regulación de la señal NO:GMPc en células cromafines bovinas.....	194
Péptidos natriuréticos y sus receptores en la médula adrenal.....	197
Modulación de la respuesta secretora por NO:GMPc .....	198
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>205</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>209</b>

## Abreviaturas

- A:** adrenalina.  
**Ach:** acetilcolina.  
**ADP:** adenosina 5'-difosfato.  
**AMPA:** amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol propionato.  
**AMPc:** adenosina 3':5'-monofosfato cíclico.  
**ANP:** péptido natriurético auricular o de tipo A.  
**ATP:** adenosina 5'-trifosfato.  
**BH<sub>4</sub>:** tetrahidrobiopterina.  
**BNP:** péptido natriurético de tipo B.  
**8Br-GMPc:** 8-bromo-GMPc.  
**CA(s):** catecolamina(s).  
**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>:** concentración intracelular de calcio.  
**CaM:** calmodulina.  
**CaM PK:** proteína quinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina.  
**CMZ:** calmidazolium.  
**CNP:** péptido natriurético de tipo C.  
**Cy3:** indocarbocianina.  
**DAB:** 3,3'-diamidinobencidina.  
**DAPI:** 4',6'-diamidino-2-fenilindol.  
**dbAMPc:** dibutiril-AMPc.  
**dbGMPc:** dibutiril-GMPc.  
**DBH:** dopamina β-hidroxilasa.  
**DDC:** L-DOPA descarboxilasa.  
**DEAE:** dietilaminoetil.  
**DEPC:** dietilpirocarbonato.  
**DHBA:** 3,4-dihidroxibenzilamina.  
**DMEM:** Dulbecco's modified Eagle's medium.  
**DMPP:** 1,1-dimetil-4-fenil piperazinio.  
**DNA:** ácido desoxirribonucleico.  
**EC<sub>50</sub>:** concentración de agente estimulador que produce la mitad del efecto máximo.  
**EDTA:** ácido etilendiamino tetracético.  
**EGTA:** ácido etilenbis(oxietileno nitrilo) tetracético.  
**FAD:** dinucleótido de flavina y adenina.  
**FDU:** fluorodeoxiuridina.  
**FITC:** isotiocianato de fluoresceína.  
**FMN:** mononucleótido de flavina.  
**GABA:** ácido γ-amino butírico.  
**GCS:** guanilato ciclasa soluble.  
**GDP:** guanosina 5'-difosfato.  
**GITC:** isotiocianato de guanidinio.  
**GMPc:** guanosina 3':5'-monofosfato cíclico.  
**GTP:** guanosina 5'-trifosfato.  
**H-8:** N-[2-(metilamino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida.  
**H-89:** N-[2-((p-bromocinamil) amino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida.  
**HEPES:** N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etano sulfonato.  
**HPLC:** cromatografía líquida de alta presión.  
**IBMX:** 3-isobutil-1-metilxantina.  
**IC<sub>50</sub>:** concentración de inhibidor que produce la mitad del efecto máximo.  
**IP<sub>3</sub>:** inositol trifosfato.  
**Kd:** constante de disociación.  
**Ki:** constante de inhibición.  
**Km:** constante de Michaelis-Menten.  
**L-DOPA:** 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina.  
**L-NAME:** N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil éster.  
**L-NNA:** N<sup>G</sup>-L-nitroarginina.  
**LPS:** lipopolisacárido.  
**LTD:** depresión a largo plazo.  
**LTP:** potenciación a largo plazo.  
**NA:** noradrenalina.  
**NADPH:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.  
**NMDA:** N-metil-D-aspartato.  
**NOS:** óxido nítrico sintasa.  
**ODQ:** 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona.  
**PBS:** medio salino tamponado con fosfato.  
**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa.  
**PKA:** proteína quinasa dependiente de AMPc.  
**PKC:** proteína quinasa C.  
**PKG:** proteína quinasa dependiente de GMPc.  
**PMSF:** fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

**PNMT:** feniletanolamina N-metiltransferasa.

**PP1:** proteín-fosfatasa 1.

**PTx:** toxina pertúsica.

**RIA:** radioinmunoensayo.

**RNA:** ácido ribonucleico.

**Rp-8pCPT-GMPcS:** 8-para-clorofeniltioguanosina 3':5'-monofosforotioato cíclico, isómero Rp.

**RT-PCR:** transcripción reversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa.

**SDS:** dodecilsulfato sódico.

**SDS-PAGE:** electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico.

**SNP:** nitroprusiato sódico.

**TCA:** ácido tricloroacético.

**TEA:** trietanolamina hidrocloreuro.

**TH:** tirosina hidroxilasa.

**TRITC:** isotiocianato de tetrametilrodamina.

**VASP:** fosfoproteína estimulada por vasodilatadores.

**VIP:** péptido intestinal vasoactivo.

**Vmax:** velocidad de reacción enzimática a concentraciones saturantes de sustrato.

# **I. INTRODUCCIÓN**



Pocas veces la comunidad científica ha tenido la oportunidad de enfrentarse ante un reto tan apasionante como el de dilucidar el papel biológico del óxido nítrico. También son pocas las veces que una molécula tan pequeña, tan simple en su estructura, ha resultado de tanta importancia en una amplia variedad de procesos fisiológicos.

No hay duda, el óxido nítrico es la molécula de moda en nuestro tiempo. Sin embargo, su relación con la farmacología se remonta tiempo atrás, muchos años antes que el mecanismo de su acción vasodilatadora llegase siquiera a intuirse. Así, aprovechando la capacidad de la nitroglicerina de liberar óxido nítrico, la humanidad lleva un siglo empleando, con éxito, este fármaco en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.

Desde el descubrimiento del llamado factor relajante derivado del endotelio y su identificación molecular como óxido nítrico, mucho se ha avanzado en el conocimiento de las funciones de esta molécula. Hoy día sabemos que el óxido nítrico confiere a los leucocitos la capacidad de matar células tumorales y bacterias, también se ha demostrado su importante papel en la dilatación de los vasos sanguíneos y en los fenómenos relacionados con la neurotransmisión, todo esto sin mencionar la enorme lista de tejidos en los que su papel biológico se está estudiando con resultados muy prometedores. Sin lugar a dudas, estas investigaciones pasan obligatoriamente por el análisis de la función del óxido nítrico en modelos biológicos sencillos.

Las células cromafines de la médula adrenal desempeñan un importante papel en el organismo al ser responsables de la respuesta fisiológica a situaciones de miedo o estrés. Desde el punto de vista de la experimentación biológica, las células cromafines tienen además características muy interesantes. En primer lugar, presentan muchas propiedades en común con las neuronas, por ejemplo, su origen en la cresta neural del embrión, o su capacidad para liberar sustancias contenidas en vesículas en respuesta a estímulos específicos, como la estimulación eléctrica o determinados compuestos neurotransmisores. El hecho de que estas células se puedan aislar como una población celular homogénea en un número suficiente para realizar cualquier tipo de estudio hace de ellas un modelo muy adecuado para investigar la modulación de la neurosecreción por rutas de segundos mensajeros como el óxido nítrico.

El presente trabajo de investigación se gestó con el propósito de estudiar el papel del *óxido nítrico* y su mensajero intracelular, el *GMPc*, en el proceso de la neurosecreción. En tanto en cuanto este proceso presente semejanzas con el fenómeno general de la transmisión nerviosa, estos estudios contribuirán al conocimiento de este fenómeno, entendido como el modo en el que las neuronas intercambian información entre sí y con otros tejidos.



## EL ÓXIDO NÍTRICO COMO MENSAJERO BIOLÓGICO

Dependiendo de las cantidades que se consideren, el óxido nítrico puede cumplir, desde el punto de vista biológico, dos principales funciones. Por un lado, a concentraciones en torno al  $\mu\text{M}$  alto, el NO producido por determinadas células del sistema inmune es capaz de matar bacterias u otras células, cumpliendo, por tanto, una función citotóxica. A concentraciones menores,  $\mu\text{M}$  bajo o aún menores, el NO sirve de mensajero biológico intra- e intercelular en múltiples procesos, entre los cuales los más importantes son la vasodilatación y la neurotransmisión.

Los neurotransmisores tradicionales son pequeñas moléculas hidrofílicas que se almacenan y liberan a partir de vesículas sinápticas. Su mensaje biológico se restringe a la hendidura sináptica donde se unen a receptores de membrana y son inactivados por enzimas degradativas o sistemas de transporte. El NO, sin embargo, no se puede almacenar y liberar a partir de vesículas, sino que debe ser generado cuando se necesite. Además, su mensaje biológico no se limita a la sinapsis sino que difunde rápidamente a través de membranas celulares para unirse a proteínas y modificar su actividad biológica. Los mecanismos convencionales de inactivación tampoco sirven y, aunque no se conocen con exactitud, se piensa que la señal de NO termina rápidamente por simple reacción química con otras moléculas.

### Química del óxido nítrico<sup>1</sup>

El conocimiento de las propiedades químicas y reactivas del NO es un requisito esencial para la comprensión de sus funciones biológicas, de tal manera que éstas no son más que una consecuencia de las interacciones del NO con los sistemas biológicos.

La combinación de un átomo de nitrógeno con un átomo de oxígeno resulta en una especie química con un electrón desapareado, por tanto, el NO es, por definición, un radical. Aunque gran parte de la química del NO se explica en gran medida por el carácter paramagnético de la molécula, el NO no posee el tipo de reactividad normalmente asociada con otros radicales. Así, no tiene tendencia a dimerizar o polimerizar y, a temperatura y presión ambiente, el NO es un gas incoloro que se mantiene en su forma monomérica.

Su solubilidad en agua es similar a la del oxígeno (máximo 2-3 mM). No obstante, como ya se ha comentado anteriormente, las concentraciones de importancia biológica son muchísimo menores. Una propiedad muy importante del NO es el carácter claramente apolar de la molécula. Desde el punto de vista biológico, esta característica le confiere la capacidad de difundir libremente a través de membranas e incluso de establecer gradientes de concentración en una célula (mayor cantidad en el entorno de la membrana que en el citoplasma o en el medio extracelular) (Malinski *et al.*, 1993).

---

<sup>1</sup> Aunque la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) recomienda encarecidamente el uso de la nomenclatura sistemática: monóxido de nitrógeno; a lo largo de este trabajo, por su amplia aceptación, se prefirió utilizar el término tradicional: óxido nítrico.

## Reactividad del NO

A pesar de su naturaleza radical y de ser comúnmente aceptada como una especie química altamente reactiva, en la práctica, el NO reacciona con un rango pequeño de compuestos. A continuación se enumeran las reacciones biológicamente más importantes:

### *Reacción con oxígeno*

En fase gaseosa el NO reacciona con O<sub>2</sub> para dar dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>). Sin embargo, en fase acuosa NO<sub>2</sub> no es el producto final de la reacción, sino que la oxidación continua hasta la formación de nitritos y nitratos estables.

Aunque la reacción de NO con O<sub>2</sub> molecular ocurre muy rápidamente en fase gas, en fase acuosa transcurre lentamente con una vida media para el NO de varias horas. En sistemas biológicos la vida media del NO es de segundos. Por tanto, aunque fisiológicamente importante, esta reacción no explicaría la extraordinaria corta vida de la molécula en solución.

### *Reacción con superóxido*

Debido a su naturaleza radical, el NO tiene tendencia a reaccionar con otros radicales. El superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) es también un radical ubicuo en los sistemas biológicos y, por tanto, esta reacción, que ocurre a una velocidad muy alta (casi controlada por la difusión de ambas moléculas), tiene gran importancia biológica.

El producto de reacción de la combinación radical-radical de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO es el peroxinitrito:



Tanto el peroxinitrito como su forma protonada, el ácido peroxinitroso, son potentes citotóxicos. Ambos son capaces de iniciar el proceso de peroxidación lipídica y pueden reaccionar directamente con grupos sulfhidrilo de proteínas. Además, el peroxinitrito reacciona con metales de transición para formar poderosos agentes nitrantes (Radi *et al.*, 1991).

En neuronas las concentraciones de superóxido se mantienen a niveles muy bajos (10-100 pM) debido a la actividad de la enzima superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1). No obstante, muchos procesos patofisiológicos incluyen episodios de isquemia cerebral con producción simultánea de NO y superóxido. En estas condiciones, la enzima superóxido dismutasa puede no ser capaz de metabolizar todo el O<sub>2</sub><sup>-</sup> generado y, por tanto, una producción significativa de peroxinitrito podría ser responsable de los efectos neurotóxicos de la isquemia (Varner y Beckman, 1995).

### *Reacción con tioles*

Otro aspecto importante del metabolismo del NO *in vivo* es la formación de nitrosotioles (R-SNO). Aunque el mecanismo de reacción que conduce a su síntesis no se conoce con exactitud, al parecer, estas especies químicas resultan de la oxidación del

NO al ión nitrosonio  $\text{NO}^+$  seguido de la reacción con el grupo tiol de una proteína, de un aminoácido o del glutatión. Bajo determinadas condiciones, estas moléculas se descomponen liberando de nuevo el NO.

Los nitrosotioles se encuentran en condiciones normales en el plasma, principalmente en forma de S-nitrosoalbúmina o S-nitrosohemoglobina (Keaney *et al.*, 1993; Lia *et al.*, 1996). Según se ha descrito, la concentración plasmática de nitrosotioles (básicamente S-nitrosoalbúmina) es de 1  $\mu\text{M}$ , mientras que la de NO libre está en el nM bajo. Es interesante destacar que los nitrosotioles presentan una vida media considerablemente mayor que el NO. A partir de estas observaciones, algunos autores han propuesto que la S-nitrosoalbúmina sirve como un reservorio plasmático de NO. Recientemente, se ha postulado que la S-nitrosohemoglobina juega un papel muy importante en el control de la actividad vascular. En este mecanismo la hemoglobina es S-nitrosilada en los pulmones cuando los eritrocitos captan  $\text{O}_2$ , y el grupo NO es liberado durante el tránsito por la microvasculatura donde contribuye a un efecto vasodilatador (Lia *et al.*, 1996).

Estrechamente relacionado con este papel de la hemoglobina, merece la pena destacar otro tipo de reacciones químicas del NO con oxihemoglobina y oximioglobina. El NO interacciona con el ligando  $\text{O}_2$  de ambas proteínas para producir la forma férrica, es decir, metahemoglobina y metamioglobina, y nitrato.

La consecuencia primaria de ambos mecanismos es que los eritrocitos rápidamente inactivan el NO *in vivo*. Debido a que la hemoglobina está confinada en el interior de los eritrocitos, la difusión libre del NO está limitada a áreas no vascularizadas.

#### *Reacción con grupos hemo de proteínas y metales*

Uno de los aspectos biológicamente más relevantes de la química del NO es su capacidad de unirse y/o interaccionar con metales o proteínas que contienen metales. De hecho, la principal proteína receptora de NO en la mayoría de los tejidos, la guanilato ciclasa soluble, presenta un grupo hemo y el mecanismo de activación de la enzima por NO es producto de una interacción entre el átomo de hierro del grupo hemo y el NO.

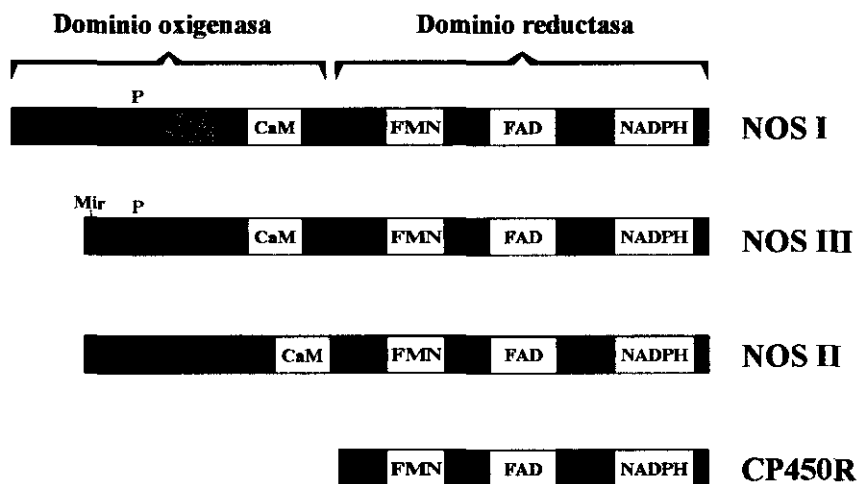
#### **Biosíntesis del NO: Oxido nítrico sintasas**

Ya que el NO no puede ser almacenado, liberado e inactivado después de su liberación sináptica mediante mecanismos convencionales, sus niveles deben regularse a nivel de la biosíntesis.

La síntesis de NO la llevan a cabo una familia de enzimas conocidas con el nombre de óxido nítrico sintasas (L-arginina, NADPH:  $\text{O}_2$ , oxidorreductasa; EC 1.14.13.39). Estas enzimas catalizan la oxidación de uno de los grupos amidino equivalentes de L-arginina para formar NO y L-citrulina en una reacción que implica 5 electrones. La estequiometría impar de la transferencia de electrones es bastante inusual y permite la generación de un radical libre, el NO (Schmidt *et al.*, 1993; Förstermann *et al.*, 1994).

## Propiedades de las isoformas de NOS

Isoformas	I	II	III
Tejido modelo	Cerebro	Macrófagos	Endotelio
V <sub>max</sub> (μmol/mg por min)	0.3-3.4	0.9-1.6	0.015
Estructura nativa	Dímero	Dímero	Dímero
CaM activa requerida para activación	Sí	No	Sí
Dependencia calcio EC <sub>50</sub> (Ca <sup>2+</sup> , μM)	0.2-0.4	No dependiente	0.3
K <sub>m</sub> para L-arginina (μM)	2-4.3	2.3-2.8	2.9
Expresión constitutiva	Sí	No	Si
Compartimentalización subcelular	Soluble	Soluble	Particulada



**Figura 1-I. Dominios y sitios de unión de las isoformas de NOS.** Las tres isoformas presentan en el dominio reductasa sitios de unión conocidos para los cofactores FMN, FAD y NADPH, que presentan una gran homología con los presentes en la NADPH-citocromo P450 reductasa. El dominio oxigenasa posee el sitio putativo de unión de calmodulina. En las isoformas I y III, este dominio presenta secuencias consenso de fosforilación (P). Como características particulares de estas isoformas, la NOS I presenta en el dominio oxigenasa secuencias de "splicing" alternativo (en gris); mientras que la NOS III tiene secuencias consenso de miristoilación (Mir) que explican su localización en estructuras de membrana.

### Estructura y mecanismo catalítico de las óxido nítrico sintasas

La purificación de las enzimas NOS en los diferentes tejidos ha permitido su clasificación en 3 isoformas (NOS I, II y III). Aunque cada isoforma posee características peculiares, todas presentan el mismo mecanismo catalítico y similar estructura (Figura 1).

Las enzimas NOS son dímeros que contienen 2 subunidades idénticas de peso molecular 130-150 kDa. La porción N-terminal de cada subunidad contiene secuencias de unión para los cofactores enzimáticos nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), dinucleótido de flavina y adenina (FAD) y mononucleótido de flavina (FMN). Las secuencias de unión para el cofactor tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ) y el sustrato L-arginina, de igual modo que el grupo hemo y la proteína moduladora calmodulina son escasamente conocidas (Bredt *et al.*, 1991b).

Cada subunidad está dividida en un dominio reductasa y otro oxigenasa. NADPH, FAD y FMN se unen al dominio reductasa, el cual presenta gran homología con la NADPH-citocromo P450 reductasa, otra proteína que contiene sitios de unión para estos cofactores y que es responsable de reacciones de detoxificación en el hígado. Esta homología sugiere que la función de las flavinas en la NOS, como en la NADPH-citocromo P450 reductasa, es probablemente almacenar electrones derivados del NADPH y transferirlos al centro catalítico en el dominio oxigenasa (Bredt *et al.*, 1991b). Este dominio oxigenasa no presenta homología de secuencia con ninguna proteína conocida. Se ha propuesto que a este dominio se unen el grupo hemo,  $BH_4$  y L-arginina. Desde el punto de vista evolutivo, la enzima NOS se considera el producto de la fusión de diferentes genes que darían lugar a los distintos módulos funcionales que conforman la proteína (reductasa, oxigenasa, ligante de calmodulina y otros) (Masters *et al.*, 1996).

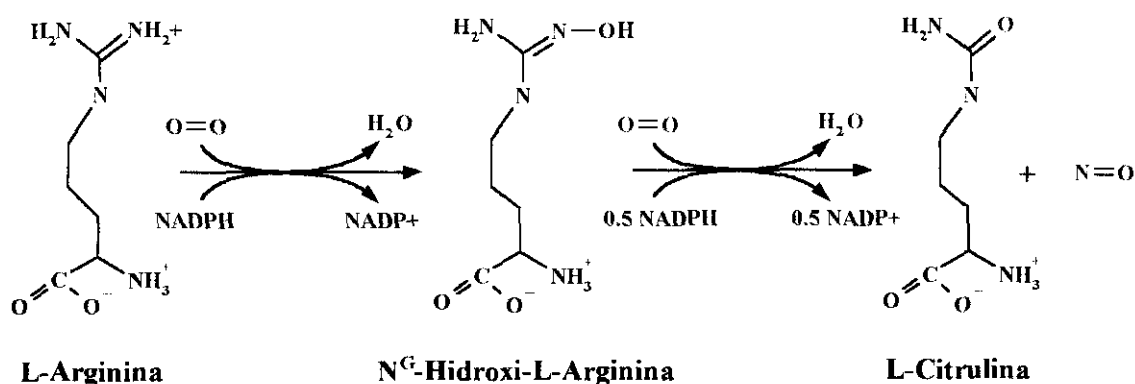
Como se ha comentado anteriormente, la oxidación de un nitrógeno terminal de la L-arginina se acepta como mecanismo catalítico de la NOS. 4 cofactores (hemo, FMN, FAD y  $BH_4$ ) y 2 cosustratos ( $O_2$  y NADPH) participan en la reacción (Figura 2).

El mecanismo de oxidación de la L-arginina se ha dividido en 2 fases. La primera fase, similar a la reacción catalizada por la citocromo P450 reductasa, es una hidroxilación que produce  $N^G$ -hidroxi-L-arginina como intermedio unido a la enzima con un consumo de 1 mol de NADPH (por mol de L-arginina inicial o mol de NO final). En la 2ª etapa, la  $N^G$ -hidroxi-L-arginina es posteriormente oxidada a NO y L-citrulina en un proceso que implica 3 electrones con consumo de 0.5 mol de NADPH (Marletta, 1993).

Tal y como se muestra en el esquema, los átomos de oxígeno incorporados al NO y a la L-citrulina derivan de diferentes moléculas de  $O_2$ , lo que significa que la enzima une y utiliza 2 moléculas de  $O_2$  durante el proceso catalítico de generación de NO.

La actividad reductasa de la enzima NOS también afecta a otros sustratos. Un aceptor artificial de electrones es el colorante nitrotetrazolio. Este colorante es convertido en

un depósito azul de diformazán en una reacción dependiente de NADPH catalizada por la enzima NOS (Dawson *et al.*, 1991). Esta actividad de NOS, conocida con el nombre de NADPH-diaforasa, es considerablemente resistente a los tratamientos de fijación usualmente empleados en histoquímica, por lo que ha sido muy útil para llevar a cabo una localización histoquímica de NOS, especialmente en el sistema nervioso central. Curiosamente, la existencia de neuronas NADPH-diaforasa positivas se conocía desde mucho tiempo antes de la caracterización de la enzima NOS y, por tanto, de su identificación con esta actividad NADPH-diaforasa (Levine *et al.*, 1960). No obstante, conviene tener en cuenta que la enzima NOS no es la única actividad enzimática que puede producir una reacción NADPH-diaforásica, sino que se puede producir a partir de otras deshidrogenasas. Además, según se ha descrito, el método de fijación empleado en estos estudios histoquímicos resultó vital para la interpretación de los resultados. Así, comparando la tinción NADPH-diaforasa con estudios de inmunorreactividad de NOS se pudo determinar que cuando el tratamiento de fijación no incluyó formaldehído, estas actividades deshidrogenasas dieron cuenta de tinción de NADPH-diaforasa que en realidad no provenía de una enzima NOS (Matsumoto *et al.*, 1993).



**Figura 2-I. Mecanismo de la reacción catalizada por la enzima NOS.** La conversión del aminoácido L-arginina en L-citrulina catalizada por la NOS es una oxidación que implica 5 electrones de uno de los nitrógenos guanidinio de la L-arginina. Se ha propuesto que la reacción pasa por una 1ª etapa de hidroxilación a  $N^G$ -hidroxi-L-arginina y una 2ª de transformación de este producto intermediario en L-citrulina y NO. Los colores representan el origen y el destino final de los átomos de oxígeno y nitrógeno que participan en la reacción (adaptado de *The surprising life of nitric oxide* (1993) Feldman *et al.*, C&EN Dec 20, 26-38).

En la experimentación biológica, ciertos análogos de L-arginina son empleados por su capacidad para inhibir la enzima NOS. Estas moléculas, la mayoría análogos  $N^G$ -monosustituidos como la  $N^G$ -nitro-L-arginina (L-NNA) o el derivado de éste,  $N^G$ -nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME), se comportan como antagonistas competitivos para la unión L-arginina/L-citrulina. Dada la dificultad para detectar NO en sistemas

biológicos, los inhibidores de NOS son herramientas farmacológicas de gran valor para poner de manifiesto acciones dependientes de NO (Marletta, 1994).

### Regulación de la actividad NOS: Isoformas de NOS

La caracterización de las enzimas NOS en los diferentes tejidos permite su clasificación en 3 isoformas (NOS I, II y III)<sup>1</sup>. El criterio de clasificación se basa en propiedades físicas y bioquímicas de las enzimas purificadas, principalmente en sus características de regulación de la actividad por  $\text{Ca}^{2+}$  libre y localización subcelular y tisular. Esta clasificación ha sido confirmada recientemente mediante técnicas de clonaje molecular y estudios de expresión de los correspondientes genes (Schmidt *et al.*, 1993).

Todas las formas de NOS unen calmodulina en un proceso dependiente (NOS I y III) o independiente (NOS II) de  $\text{Ca}^{2+}$ . En el caso de NOS I y III, a la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en reposo (normalmente  $< 100 \text{ nM}$ ), estas isoformas no unen calmodulina y son inactivas. Su activación se produce mediante unión de la calmodulina cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se incrementa ( $>500 \text{ nM}$ ). Los antagonistas de calmodulina, por ejemplo, calmidazolium o trifluoroperazina, bloquean la unión de calmodulina y, por tanto, son potentes inhibidores de la formación de NO. En los tejidos en los que están presentes, estas isoformas se expresan constitutivamente, aunque esto no significa que no pueda existir una modulación de la expresión (Förstermann *et al.*, 1990; Bredt y Snyder, 1990).

A diferencia de las isoformas I y III, la NOS II no se expresa constitutivamente sino que su expresión se induce por determinados estímulos inflamatorios. La isoforma NOS II une calmodulina independientemente de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y, una vez que se ha expresado, presenta una actividad máxima. De hecho, la calmodulina y la enzima copurifican, sugiriendo este hecho una estructura heterotetramérica (NOS<sub>2</sub>/calmodulina<sub>2</sub>) para esta isoforma.

*A priori*, la disponibilidad de L-arginina debiera ser también un importante mecanismo de regulación. Sin embargo, sólomente se debe tener en cuenta en el caso de la NOS II. El sustrato L-arginina es obtenido por las células a partir del medio extracelular mediante un sistema de transporte específico para aminoácidos catiónicos. Este sistema de transporte, denominado  $\gamma^+$  y basado en una difusión facilitada, consiste en, al menos, 2 proteínas de membrana: CAT-1 y CAT-2B (White, 1985). En el caso de la NOS II, los mismos estímulos inflamatorios que inducen la expresión de la enzima NOS, también inducen la expresión del sistema  $\gamma^+$  (Bogle *et al.*, 1992). En las células que poseen esta isoforma de NOS, como, por ejemplo, macrófagos, la disponibilidad

---

<sup>1</sup> En la literatura, las isoenzimas se encuentran normalmente con los nombres de los tejidos en los que fueron originalmente purificadas o con nombres que refieren a su mecanismo de activación: bNOS (de "brain NOS", de cerebro), nNOS (de neuronal) o cNOS (de constitutiva) para NOS I; macNOS (de macrófagos) o iNOS (de inducible) para NOS II; eNOS (de endotelial) o cNOS (de constitutiva) para NOS III. Para evitar la ambigüedad de esta nomenclatura, especialmente teniendo en cuenta que las isoformas pueden encontrarse en tejidos distintos a sus tejidos modelo, en este trabajo de investigación se escogió la nomenclatura en números romanos, basada simplemente en el orden de purificación.

de L-arginina es la etapa limitante para la producción de NO. Esto es debido a que tras la inducción de la enzima NOS II por el estímulo inflamatorio, existen tantas copias de la proteína que la única limitación para la síntesis de NO es la cantidad de sustrato. La coinducción del sistema de transporte  $y^+$  permite el suministro adecuado de la L-arginina necesaria para la reacción. En las células que poseen enzimas de tipo constitutivo (NOS I y III), el NO es generado a un nivel muy inferior que no afecta en absoluto los niveles intracelulares de L-arginina. Teniendo en cuenta que la  $K_m$  para la L-arginina de estas isoformas (2-4  $\mu M$ ) está muy por debajo de la [L-arginina] intracelular (usualmente en el rango 100-800  $\mu M$ ), estas enzimas trabajan a concentraciones saturantes de un modo totalmente independiente de la concentración de sustrato (Förstermann *et al.*, 1994).

No es un capricho de la naturaleza que las isoformas de NOS que sintetizan NO-mensajero biológico (NOS I y III) presenten un mecanismo de activación diferente a la isoforma que genera NO-citotóxico (NOS II). Los siguientes capítulos de este trabajo de investigación pretenden destacar las características más importantes de cada isoforma y sus implicaciones fisiológicas.

## NOS I

La isoforma I es una enzima soluble con una masa molecular de 150-160 kDa que se purificó por primera vez a partir de cerebelo de rata y de cerdo (Bredt y Snyder, 1990; Mayer *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 1991).

Mediante tres diferentes técnicas: inmunorreactividad de NOS I, NADPH diaforasa y estudios de hibridación *in situ* del mRNA; la isoforma I de NOS se ha detectado en numerosas regiones del sistema nervioso central. La proteína es abundante en el bulbo olfatorio accesorio, en el núcleo tegmental pedunculopontino y en el cerebelo. Menor cantidad se encuentra en el giro dentado del hipocampo, el bulbo olfatorio principal, los colículos superior e inferior y el núcleo supraóptico. También se han encontrado numerosas neuronas NOS-positivas repartidas por la corteza cerebral, el caudado putamen, y en otras innumerables regiones (Bredt *et al.*, 1990; 1991a; Dawson *et al.*, 1991).

De acuerdo con estos estudios, la NOS I se localiza preferentemente en neuronas dentro del sistema nervioso central, por lo que desde las primeras investigaciones se propuso que el NO podría jugar un importante papel en el fenómeno de la transmisión nerviosa.

Desde estos primeros estudios hasta hoy, el volumen de información existente acerca de la función del NO en el sistema nervioso central es muy amplio, y, aunque no del todo claro, se acepta que el NO participa como mensajero biológico en múltiples procesos dentro del sistema nervioso. El modelo de la figura 3 muestra cómo se produce la activación de la NOS en neuronas y cuál es el mecanismo de acción del NO.

Como se ha comentado anteriormente, la NOS I es una isoforma constitutiva cuya actividad se regula por las variaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Tal y como se muestra en el

modelo, dentro de un esquema general de la actividad sináptica, un neurotransmisor liberado a partir de la neurona presináptica activa receptores ionotrópicos en la neurona postsináptica. La activación de este tipo de receptores se acompaña de una entrada masiva de iones, entre ellos  $\text{Ca}^{2+}$ , al interior de la neurona postsináptica a través de un canal iónico asociado al receptor. El incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  activa la calmodulina, la cual, en su forma activa, es capaz de unirse a la enzima NOS. La formación del complejo NOS/ $\text{Ca}^{2+}$ -CaM dispara la actividad catalítica de la enzima. En la mayor parte de los casos en los que el NO funciona como mensajero biológico, éste actúa mediante activación de otra enzima, la guanilato ciclasa soluble. La activación de esta enzima, cuyas características se explicarán posteriormente con detalle, conduce a un incremento en los niveles de GMPc intracelular que es el mensajero que interacciona finalmente con los sistemas efectores: proteínas quinasas, canales, fosfodiesterasas, etc.

Diversos estudios bioquímicos han mostrado que, además de su regulación por calcio a través de calmodulina, la actividad de NOS I es regulada mediante fosforilación y también por su propio producto de reacción, el NO. La enzima es fosforilada por la proteína quinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM, por la proteína quinasa C (PKC) y por las proteínas quinasas dependientes de AMPc (PKA) y de GMPc (PKG). La fosforilación resulta en una marcada disminución de la capacidad catalítica. Por otra parte, otros estudios indican que la NOS es inhibida por NO, probablemente mediante unión al grupo hemo de la enzima. Este mecanismo, si se llegara a demostrar *in vivo*, representaría un importante mecanismo de regulación por producto o retrocontrol de la señal de NO. No obstante, ambas observaciones, la fosforilación y la inhibición por NO, necesitan ser confirmadas en experimentos con células intactas (Nakane *et al.*, 1991; Rogers e Ignarro, 1992).

En el contexto de la función del NO como mensajero biológico, se ha propuesto su participación en mecanismos de plasticidad sináptica, entendido este fenómeno como el modo en el que las neuronas modulan su eficacia sináptica durante un largo período de tiempo en respuesta a determinados estímulos. Debido a la persistencia de los efectos moduladores, los fenómenos de plasticidad sináptica parecen ser responsables de los procesos de aprendizaje y memoria.

La potenciación a largo plazo (LTP, del inglés "long-term potentiation") en el hipocampo y la depresión a largo plazo (LTD, "long-term depression") en el cerebelo son los mecanismos de plasticidad sináptica más estudiados. Según se ha descrito, el NO participa en ambos procesos.

En la LTP, las neuronas piramidales del hipocampo incrementan su eficacia sináptica cuando se dan al mismo tiempo 2 circunstancias: despolarización y actividad presináptica. El neurotransmisor liberado en estas sinapsis, el glutamato, se une a receptores de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) de la membrana de las neuronas piramidales. En términos moleculares, la activación de los receptores NMDA cumple los requisitos de la LTP; la despolarización que libera el bloqueo del canal por  $\text{Mg}^{2+}$ , y la actividad presináptica que aporta el glutamato que se une al receptor. Como en el

ejemplo del modelo de la figura 3, la activación del receptor ionotrópico de NMDA conduce a un incremento notable de la  $[Ca^{2+}]_i$ , que podría activar diferentes enzimas dependientes de  $Ca^{2+}$ , como la NOS.

Diversos estudios han demostrado que la LTP implica la participación tanto de mecanismos postsinápticos como presinápticos. Ya que los receptores NMDA están en la neurona postsináptica, para que exista un componente presináptico debe existir algún tipo de mecanismo que transmita la señal en sentido retrógrado hasta la presinapsis. Como también se muestra en el modelo, a pesar de haber sido sintetizado en la célula postsináptica, la singularidad del NO como mensajero es su capacidad para difundir a la neurona presináptica donde puede dar lugar también a efectos biológicos. Esta propiedad del NO permite su inclusión en el reducido grupo de moléculas difusibles conocidas como mensajeros retrógrados al que pertenecen, por ejemplo, el ácido araquidónico, el factor activante de las plaquetas o el CO; y cuya participación en procesos de plasticidad sináptica se ha propuesto en numerosos estudios (O'Dell *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 1993).

La bibliografía es abundante en trabajos que implican al NO en el proceso de la LTP. Así, por ejemplo, análogos de L-arginina que se comportan como inhibidores de la NOS bloquean la LTP. Se ha descrito que el NO podría actuar como mensajero retrógrado ya que la aplicación de hemoglobina, una molécula que inactiva rápidamente el NO extracelular, resultó en un bloqueo del proceso de la LTP (Böhme *et al.*, 1991; O'Dell *et al.*, 1991; Schuman y Madison, 1991; Arancio *et al.*, 1996).

En el caso de la depresión a largo plazo en el cerebelo, la modificación en la eficacia sináptica tiene lugar en la sinapsis establecida por las fibras paralelas (los axones de las células granulares) y las células de Purkinje. La modificación sináptica se explica por una reducción en la sensibilidad de receptores de glutamato de tipo amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA) mediada, al parecer, por una activación de la proteína quinasa C (Linden *et al.*, 1991).

**Figura 3-I. Mecanismo de activación de la isoforma I de NOS.** La producción neuronal de NO se inicia cuando una terminal nerviosa activada (neurona presináptica) libera un mensajero químico que difunde hasta la neurona postsináptica. El mensajero químico, en este caso glutamato, interacciona con receptores de la célula postsináptica (receptores de tipo NMDA) activando la entrada de calcio extracelular en la neurona. El incremento en la concentración de calcio intracelular activa la calmodulina que, a su vez, activa la enzima NOS. El NO generado estimula la enzima guanilato ciclasa soluble a producir GMPc en la neurona postsináptica. Además, el NO también puede difundir a la terminal presináptica donde podría participar en procesos de plasticidad sináptica (adaptado de *The surprising life of nitric oxide* (1993) Feldman *et al.*, C&EN Dec 20, 26-38).

**GTP:** guanosina trifosfato, **GMPc:** guanosina 3':5'-monofosfato cíclico, **PPi:** pirofosfato, **NADPH:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

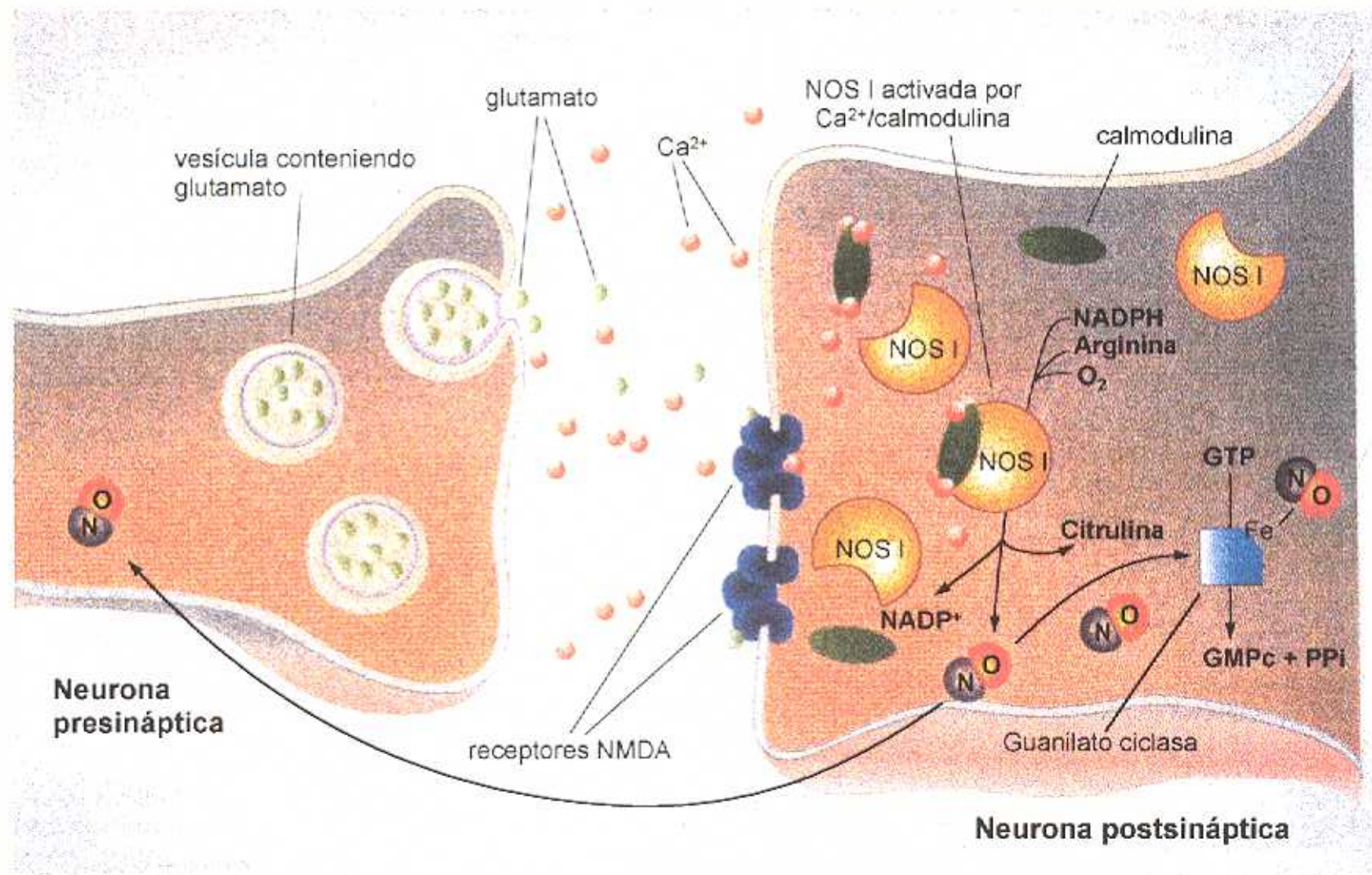


Figura 3-I. Mecanismo de activación de la isoforma I de NOS

Aunque el papel del NO en el proceso de la LTD se ha estudiado en profundidad, su papel exacto no está claro. Se ha demostrado que inhibidores de la NOS son capaces de bloquear la LTD, y, en un mecanismo opuesto, compuestos donadores de NO promueven el proceso. La NOS I no ha sido detectada en células de Purkinje. No obstante, se ha descrito su presencia en células granulares, por lo que, como en el caso de la LTP en el hipocampo, el NO podría producirse en un tipo de célula, y, mediante difusión, ejercer su acción biológica en las células vecinas (Crepel y Jaillard, 1990; Daniel *et al.*, 1993).

Además de su participación en procesos de plasticidad sináptica, debido a su capacidad de difundir y formar gradientes de concentración desde sus lugares de síntesis, el NO representa un candidato ideal para regular el desarrollo neural. Dentro de este papel, determinados trabajos realizados en modelos de neuronas en regeneración han mostrado que el NO modula la extensión de neuritas (Hess *et al.*, 1993). Además, ciertos estudios indican que la enzima NOS es transitoriamente expresada en poblaciones de neuronas durante la neurogénesis. En la rata, el cambio más sorprendente ocurre en la corteza cerebral, en la cual la NOS I es enriquecida en ciertos estadios embrionarios para casi desaparecer por completo en el período postnatal (Bredt y Snyder, 1994). También se ha descrito que la expresión de NOS se induce en células PC12 (células procedentes de un feocromocitoma de rata) mediante un tratamiento con factor de crecimiento nervioso, sugiriendo este hecho que la expresión de esta isoforma podría estar estrechamente regulada por factores neurogénicos (Hirsch *et al.*, 1993).

En todas estas acciones, el NO juega un importante papel como mensajero biológico dentro del fenómeno general de la transmisión nerviosa. Sin embargo, en determinadas circunstancias y debido a la reactividad de la molécula, el NO puede convertirse en un arma biológica y ser responsable de efectos tóxicos.

El estímulo primario para la síntesis del NO en neuronas centrales es la activación de receptores de glutamato de tipo NMDA. Una hiperactividad de estos receptores está implicada en numerosos procesos degenerativos como la enfermedad de Alzheimer o la corea de Huntington. Una relación causa-efecto entre el NO y la neurotoxicidad se ha puesto de manifiesto en determinados estudios que muestran efectos neuroprotectores de inhibidores de la NOS en modelos de toxicidad neuronal.

Como se ha explicado en el capítulo de reactividad del NO, el mecanismo de neurotoxicidad del NO parece implicar una interacción química entre el NO y el radical superóxido ( $O_2^-$ ) para formar peroxinitrito. Según se ha descrito, la activación de receptores NMDA produce NO y  $O_2^-$  en células granulares en cultivo (Lafon-Cazal *et al.*, 1993). Además, en ausencia de concentraciones saturantes de L-arginina, la NOS purificada cataliza una reducción del oxígeno molecular produciendo  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ . De hecho, en neuronas vaciadas de arginina, la activación de receptores de glutamato resulta en una producción, a niveles neurotóxicos, de superóxido *via* activación de NOS (Pou *et al.*, 1992).

Mediante el empleo de anticuerpos específicos para el isoforma I de NOS se pudo comprobar que su presencia no se limitaba exclusivamente al sistema nervioso central. En el sistema nervioso periférico, esta isoforma se ha detectado en ciertas áreas de la medula espinal, ganglios simpáticos y en glándulas adrenales (Dun *et al.*, 1992; 1993). También se encontró en poblaciones neuronales que interaccionan con músculo liso. Así, dentro del plexo gastrointestinal, el NO parece participar en procesos de relajación (Desai *et al.*, 1991). También se ha detectado en neuronas que rodean los vasos sanguíneos, especialmente los de mayor calibre, donde, al parecer, contribuye a la vasodilatación. NOS I también está presente en las arterias de los cuerpos cavernosos del pene, donde se ha demostrado su papel como transmisor en el proceso de la erección en mamíferos (Burnett *et al.*, 1992). En algunos de estos sistemas neuronales, la NOS aparece en neuronas que presentan la particularidad de que utilizan el NO como único neurotransmisor conocido, por lo que los axones de estas neuronas han sido denominados "nervios nitrérgicos" (Bredt *et al.*, 1990; Bult *et al.*, 1990).

Curiosamente, la isoforma I ha sido encontrada en tejidos no neuronales como células epiteliales del pulmón, útero, estómago e incluso en islotes pancreáticos. También está presente en células de la mácula densa del riñón donde, al parecer, el NO modula la reabsorción de fluidos. Además, en otros estudios, se ha detectado su presencia en el músculo esquelético humano asociada a la membrana de fibras de tipo I (de contracción rápida) (Schmidt *et al.*, 1992a; 1992b; Kobzik *et al.*, 1994).

Volviendo al sistema nervioso central, merece la pena destacar las investigaciones realizadas en células gliales. Los primeros estudios encaminados a determinar la localización de la isoforma I en células de la glía fueron negativos. Sin embargo, cuando se realizaron estudios inmunohistoquímicos con una mayor resolución o se emplearon técnicas adicionales (medidas de formación de L-citrulina, localización de mRNA e incluso NADPH-diaforasa), se pudo comprobar que los astrocitos también tienen NOS I, aunque a un nivel inferior de expresión que en neuronas (Murphy *et al.*, 1993).

El aislamiento y purificación de la enzima en diferentes tejidos ha permitido su clonaje molecular. El gen humano de NOS I es un locus bastante complejo que contiene 29 exones y 28 intrones, abarcando una región mayor de 200 Kb. Estudios realizados han puesto de manifiesto la existencia de una relativa diversidad de mRNAs en tejidos humanos y en líneas celulares, lo que indica que la expresión de una variante determinada de la enzima debe estar sujeta a procesos específicos de tejido (Marsden *et al.*, 1994).

El dominio N-terminal de la NOS I contiene motivos proteicos conocidos con el nombre de PDZ<sup>1</sup> encontrados en un grupo de proteínas y enzimas asociadas al citoesqueleto. Según se ha descrito recientemente, la isoenzima NOS I se concentra en

---

<sup>1</sup> Las siglas PDZ hacen referencia a las proteínas en las cuales se encontraron por primera vez dichos dominios: PSD-95 (proteína de densidad postsináptica, 95 kDa); Dlg (proteína *disc-large*) y ZO-1 (zonula occludens-1).

uniones sinápticas mediante interacción a través de los dominios PDZ con la proteína de densidad postsináptica-95 (PSD-95). Las acciones sinápticas de NO podrían ser facilitadas mediante dicho "anclaje" a este tipo de estructuras especializadas de membrana (Brenman *et al.*, 1996).

Con objeto de clarificar las funciones de la NOS I, Huang *et al.* desarrollaron mediante recombinación homóloga, cepas de ratones con una alteración en el gen de la NOS I. La modificación del gen resultó en una pérdida de la proteína y del mRNA en el sistema nervioso y tejidos periféricos de los ratones mutantes (Huang *et al.*, 1993). Estos autores mostraron que los ratones NOS I (-/-) sufren ciertas disfunciones relacionadas con la pérdida de la NOS neuronal, como hipertrofia muscular de la región pilórica, donde el NO actúa como relajante del músculo liso; o una significativa resistencia a lesiones producidas por episodios de isquemia cerebral. Sin embargo, a pesar de la diversidad de funciones vitales en las que el NO ha sido implicado, los ratones fueron viables, fértiles y no mostraban ninguna anomalía histopatológica en el sistema nervioso central. Si acaso, y es todavía una materia de discusión, los ratones mutantes mostraron un carácter agresivo y un comportamiento sexual irregular (Nelson *et al.*, 1995; Morris y Nosten-Bertrand, 1996). Mediante técnicas de detección más sensibles, recientes investigaciones han demostrado la existencia de NOS I residual en el sistema nervioso central y periférico de los ratones NOS I (-/-). Esta enzima residual parece provenir de la expresión de una variante de NOS I producto de un "splicing" alternativo que tiene lugar en los ratones mutantes (Brenman *et al.*, 1996). Este hecho explicaría la sorprendente ausencia de efectos importantes en los ratones genéticamente modificados, aunque también habría que tener en cuenta, como se discutirá a continuación, que en el sistema nervioso central existen isoformas distintas a la NOS I que podrían explicar la aparente normalidad de dichos ratones.

**Figura 4-I. Mecanismo de activación de la isoforma II de NOS.** En respuesta a determinados estímulos inflamatorios, como lipopolisacárido bacteriano o determinadas citoquinas, las células macrofágicas producen copias de la isoforma II de NOS en un proceso que implica la inducción de la transcripción del mRNA y posterior síntesis de la proteína. La enzima sintetizada comienza inmediatamente a producir NO que difunde en todas direcciones. En el ejemplo de la figura, la estrecha proximidad con una célula tumoral asegura que gran parte del NO producido entra en la célula tumoral e interfiere en el metabolismo de procesos como el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, la cadena de transporte electrónico o la síntesis de precursores del DNA (adaptado de *The surprising life of nitric oxide* (1993) Feldman *et al.*, C&EN Dec 20, 26-38).

**NADH:** nicotinamida adenina dinucleótido, **ATP:** adenosina trifosfato, **ADP:** adenosina difosfato, **Pi:** ortofosfato, **IL:** interleuquinas, **LPS:** lipolisacárido, **TGF- $\beta$ :** factor de crecimiento de tejidos  $\beta$ , **MDF:** factor desactivante de macrófagos, **IFN- $\gamma$ :** interferon- $\gamma$ .

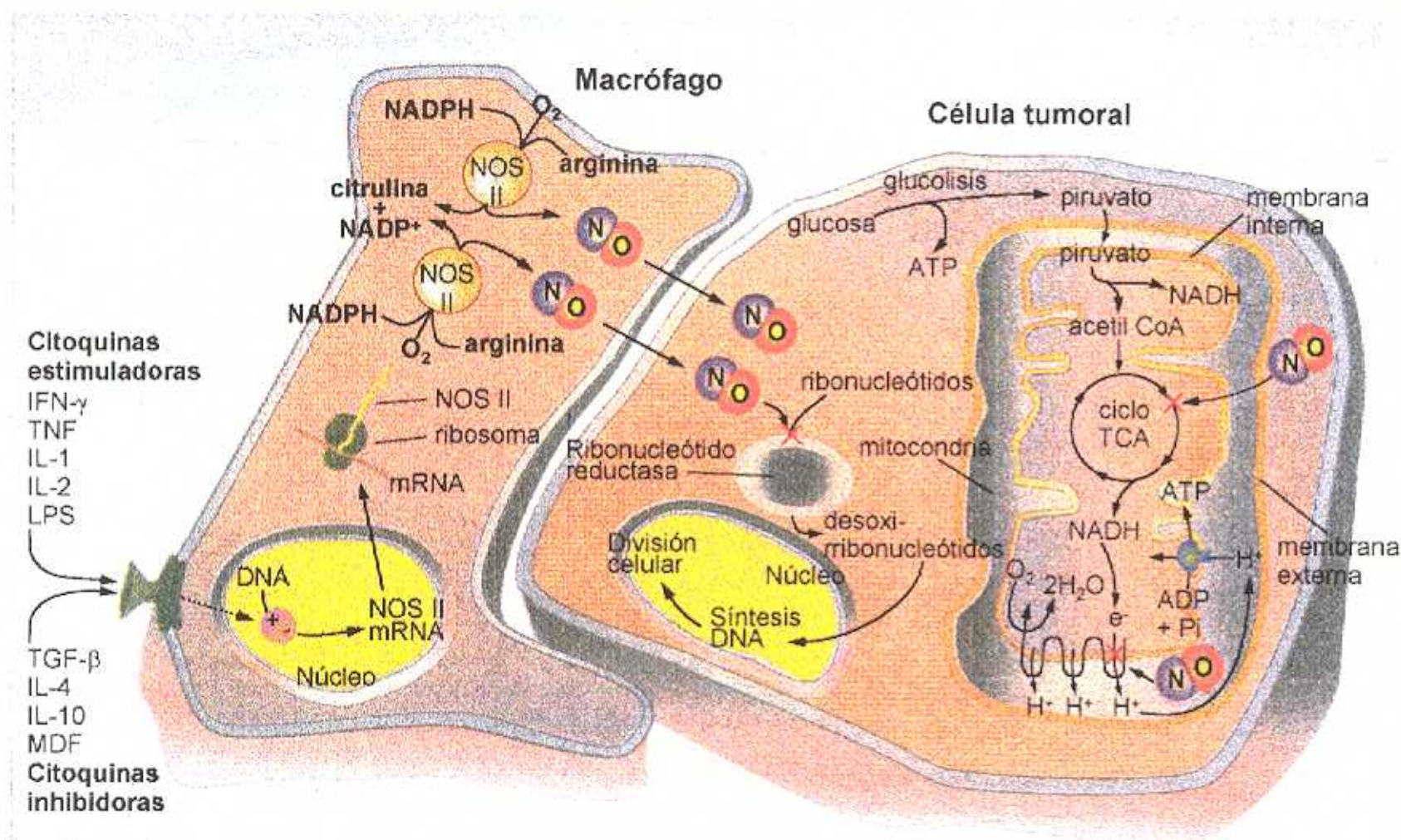


Figura 4-1. Mecanismo de activación de la isoforma II de NOS

## NOS II

Durante episodios de sepsis o inflamación aguda, profundos cambios fisiológicos tienen lugar en el organismo. Estos cambios, que incluyen el desarrollo de vasodilatación sistémica, fiebre o activación del sistema inmune, son inducidos por una serie de mediadores celulares como endotoxinas, citoquinas o eicosanoides. Desde los primeros estudios resultó evidente que, además de sus conocidas funciones en la comunicación célula-célula y en la neurotransmisión, el NO participaba activamente en los procesos de inflamación del organismo (Stuehr y Marletta, 1985; Stuehr y Nathan, 1989). Como producto generado por determinadas células del sistema inmune, el NO juega un papel citotóxico en procesos de defensa inespecífica frente a agentes patógenos como una invasión bacteriana o viral, e incluso frente a células tumorales. Las particulares características de esta isoforma posibilitan esta importante función biológica.

La isoforma NOS II es una proteína predominantemente soluble, de peso molecular entre 125-135 kDa que fue purificada a partir de macrófagos, su tejido modelo (Stuehr *et al.*, 1991a). Como se ha comentado anteriormente, a diferencia de las otras 2 isoformas, la actividad de NOS II es totalmente independiente de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Una vez que se ha expresado, la enzima es totalmente activa para producir NO, y, aunque, su capacidad catalítica no es mayor que la de las otras isoformas, su expresión alcanza tal grado que la célula en cuestión produce enormes cantidades de NO.

El modelo de la figura 4 ilustra el modo de activación. En reposo, el macrófago produce cantidades nulas o indetectables de NO. Sin embargo, cuando interacciona con lipopolisacárido (LPS), un componente de la pared bacteriana, la célula desencadena un proceso encaminado a producir muchas copias de la enzima NOS II (entre otras muchas proteínas). Como se muestra en el modelo, ciertas citoquinas pueden también iniciar el proceso, aunque en mucho menor grado que el LPS. Resulta interesante destacar que el LPS y estas citoquinas estimuladoras tienen un efecto sinérgico sobre la inducción de la enzima. Por otro lado, otras citoquinas tienen la capacidad de inhibir la inducción de la expresión de NOS II iniciada por otros estímulos (Geller *et al.*, 1993).

La figura 4 también ilustra el efecto del NO, en este caso, sobre una célula tumoral. Las altas cantidades de NO inhiben el metabolismo de las células tumorales por interferencia con ciertas enzimas vitales que contienen hierro. Estas incluyen la *cis*-aconitasa, que participa en el ciclo de los ácidos tricarbónicos; los complejos I y II, implicados en el transporte electrónico mitocondrial; la ribonucleótido reductasa, enzima que convierte los ribonucleótidos en desoxirribonucleótidos necesarios para la síntesis de DNA. La combinación de todos estos efectos es probablemente la causa de los efectos citotóxicos y citoestáticos del NO sobre microorganismos parásitos o células tumorales (Nathan y Hibbs, 1991).

Obviamente, los efectos nocivos del NO también dañan las propias células que lo producen. Se ha observado que macrófagos productores de NO presentan un patrón apoptótico de DNA como consecuencia de la inducción de la enzima NOS II. No

obstante, por razones desconocidas, las células macrofágicas presentan una cierta resistencia a la toxicidad del NO (Sarih *et al.*, 1993).

Las secuencias de DNA que codifican la NOS II han sido clonadas por varios grupos a partir de células de diferentes tejidos. El gen humano de la NOS II ha sido estudiado con detalle. El sitio de iniciación del mRNA está precedido por numerosos sitios de unión para factores de transcripción, muchos de ellos asociados con estímulos que inducen la expresión de NOS II. Según se ha descrito, el grado de expresión depende de 2 regiones reguladoras, una que responde a LPS y otra que está implicada en la modulación por otras citoquinas de la inducción mediada por LPS (Lowenstein *et al.*, 1993).

Macrófagos aparte, la isoforma NOS II ha sido detectada también en otros tipos de células, entre ellas están otros componentes del sistema inmune (linfocitos, neutrófilos), hepatocitos y células mesangiales. De gran importancia fisiológica es su presencia en células endoteliales y musculares de los lechos vasculares donde contribuye a la hipotensión generalizada asociada a episodios de choque séptico (Buttery *et al.*, 1993).

En el sistema nervioso central también se ha descrito la existencia de NOS II. La enzima se encuentra, siempre tras inducción de su expresión, en células de la microglía y también en astrocitos. El LPS y las citoquinas no están presentes en el cerebro normal en cantidades suficientes para inducir la enzima en estas células; sin embargo, dichos niveles sí pueden encontrarse en determinados estados patológicos, como en una infección viral o en situaciones de isquemia (Simmons y Murphy, 1992).

### NOS III

La isoforma III se purificó por primera vez a partir de células endoteliales de aorta bovina. Aunque comparte muchas características con la isoforma I, como su mecanismo de activación o su expresión constitutiva, se ha descrito que son proteínas distintas con sólo un 50 % de homología en su secuencia (Pollock *et al.*, 1991; Lamas *et al.*, 1992).

NOS III es una proteína predominantemente particulada. Procesos de acilación post-translacionales (miristoilación y palmitoilación) permiten a la proteína interactuar con estructuras de membrana. Se ha descrito que la enzima puede ser fosforilada en serina, y, aunque el papel de dicha fosforilación está por determinar, produce su traslocación de la membrana al citosol (Förstermann *et al.*, 1991; Michel *et al.*, 1993).

La producción de NO catalizada por la isoforma III es responsable de un importante mecanismo fisiológico en la homeostasis vascular. La disposición anatómica de las células endoteliales, en estrecho contacto con las células del músculo liso, es la clave de este mecanismo que se basa en la generación de NO en el endotelio y su difusión hasta el músculo liso donde ejerce de mensajero biológico de la vasodilatación (Palmer *et al.*, 1987; Ignarro *et al.*, 1987). Curiosamente, Furchgott y Zawadzki describieron este mecanismo años antes de que se llegara a conocer que el NO era lo que estos

autores denominaron factor relajante derivado del endotelio (Furchgott y Zawadzki, 1980). La figura 5 ilustra el mecanismo.

La cadena de sucesos que conducen a la vasodilatación y, por tanto, a una disminución de la presión sanguínea, se inicia cuando ciertos agonistas como la bradiquinina o la acetilcolina se unen a receptores específicos de la membrana de las células endoteliales. La activación de dichos receptores conduce a un incremento considerable de la  $[Ca^{2+}]_i$  que normalmente es producto tanto de la liberación de calcio almacenado en orgánulos intracelulares como de la entrada de calcio extracelular a través de canales. Los iones calcio se unen a la calmodulina activándola, la cual, a su vez, activa la NOS a producir NO.

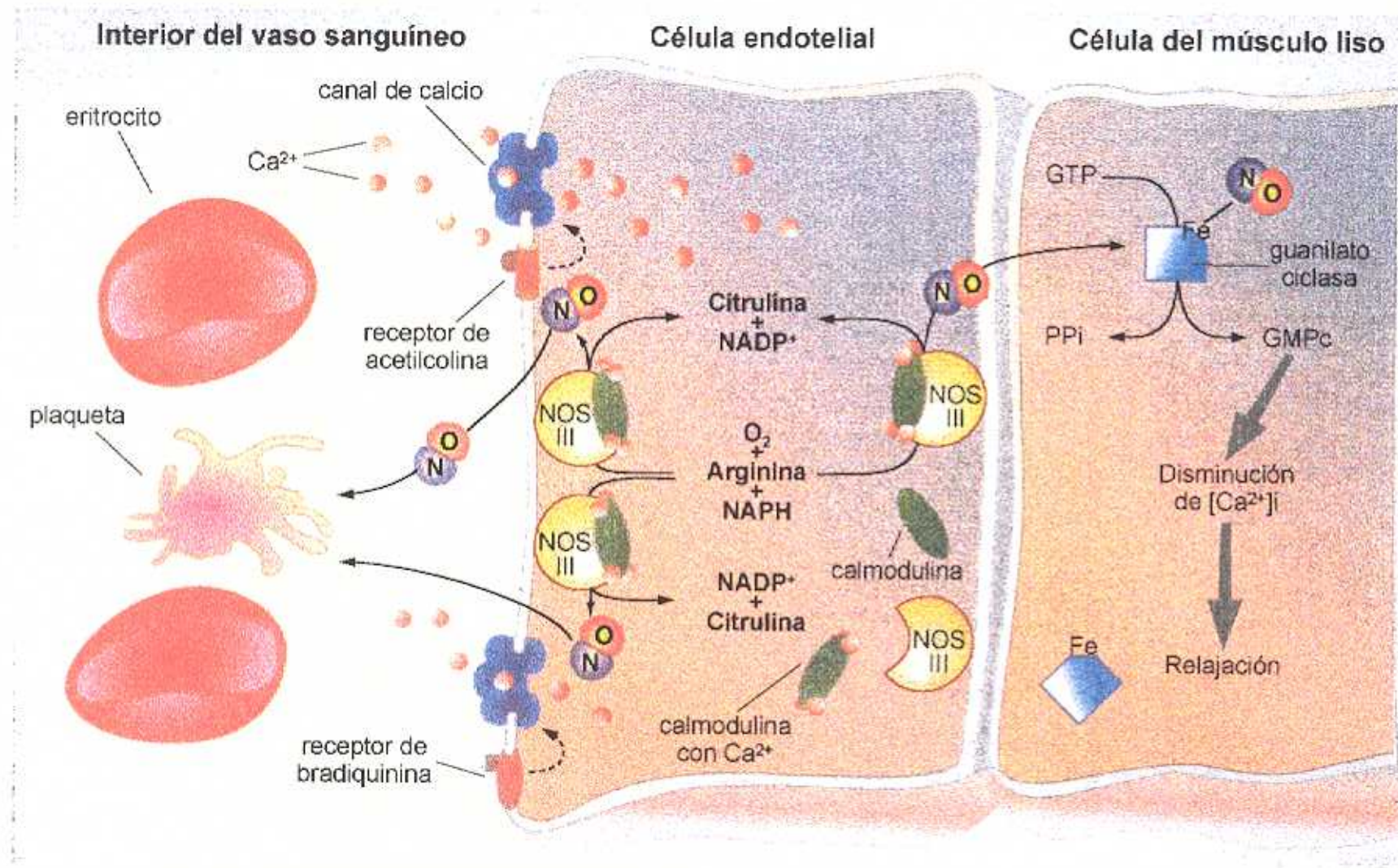
Merced a su capacidad de difusión, el NO alcanza la capa adyacente de células musculares donde activa la enzima guanilato ciclasa soluble. El incremento en el GMPc intracelular activa la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG). La fosforilación por PKG de ciertos sustratos proteicos (transportadores de  $Ca^{2+}$ , etc.) resulta en una disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Debido a que el proceso de contracción muscular es absolutamente dependiente de calcio, la menor disponibilidad del catión produce la relajación de los sistemas contráctiles (Rapoport y Murad, 1983).

Otros agonistas capaces de desencadenar el proceso son el ATP, ADP, histamina, trombina, etc., e incluso estímulos que no implican la unión física de una molécula a un receptor, como el incremento en el flujo sanguíneo (Inagami *et al.*, 1995).

La difusión del NO en dirección opuesta, es decir, hacia el lumen del vaso sanguíneo, también es interesante. Aunque es inactivado en su mayor parte por la hemoglobina de los eritrocitos, el NO puede interactuar con las plaquetas donde disminuye su adherencia a la pared del lecho vascular y también su capacidad de agregación. Según se ha descrito, las plaquetas también tienen NOS III, por lo que no sólo son células receptoras de NO sino que también son capaces de producirlo (Radomski *et al.*, 1991).

**Figura 5-I. Mecanismo de activación de la isoforma III de NOS.** Diferentes mensajeros químicos como la acetilcolina o la bradiquinina pueden estimular la producción endotelial de NO. La interacción de estos mensajeros con receptores de membrana de las células endoteliales conduce a un incremento en la concentración de calcio intracelular. Este incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  activa la calmodulina que, a su vez, activa la NOS a producir NO. El NO generado difunde rápidamente a la capa adyacente de células musculares lisas donde activa la enzima guanilato ciclasa soluble. El GMPc producido, a través de una disminución en la  $[Ca^{2+}]_i$  en la célula muscular, es el mensajero intracelular de la relajación muscular (adaptado de *The surprising life of nitric oxide* (1993) Feldman *et al.*, C&EN Dec 20, 26-38).

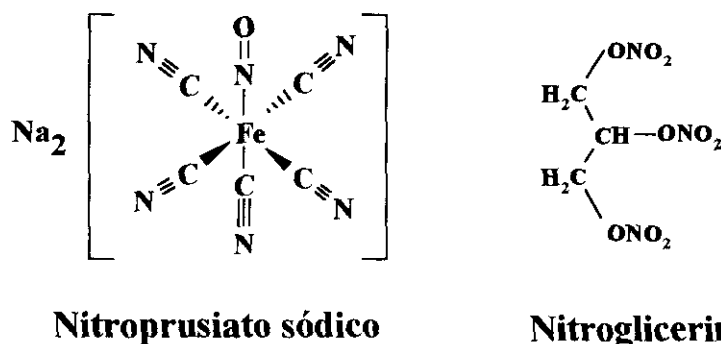
**GTP:** guanosina trifosfato, **GMPc:** guanosina 3':5'-monofosfato cíclico, **PPi:** pirofosfato, **NADPH:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.



**Figura 5-1. Mecanismo de activación de la isoforma III de NOS**

El mantenimiento de una presión sanguínea normal requiere la producción constante de NO a partir de las células endoteliales. Cuando este nivel de producción disminuye, bien porque se bloquee mediante administración de inhibidores de la NOS, o bien como consecuencia de estados patológicos como la aterosclerosis, la relajación de los vasos sanguíneos se dificulta (Förstermann *et al.*, 1988). Desde siempre, la medicina ha buscado fármacos con propiedades vasodilatadoras. Entre éstos, un papel preponderante lo ocupan los donadores de NO. Estos compuestos, que liberan NO bajo determinadas condiciones experimentales, han sido ampliamente usados para mejorar el pronóstico de las enfermedades cardiovasculares.

Los donadores de NO pueden ser de muy diferente naturaleza química; ésteres de nitrato como la nitroglicerina, cuyo uso terapéutico se remonta al siglo pasado; complejos NO-metal como el nitroprusiato sódico, frecuentemente empleado en experimentación, etc. (estructuras en Figura 6) (Murell, 1879; Bates *et al.*, 1991).



**Figura 6-I. Donadores de óxido nítrico.** La figura muestra la estructura química de los donadores de NO, nitroprusiato sódico y nitroglicerina.

La purificación de la isoforma III de NOS ha permitido su estudio a nivel del gen mediante técnicas de biología molecular. El gen presenta una secuencia consenso de miristoilación que explica su localización subcelular en estructuras de membrana (Lamas *et al.*, 1992; Sessa *et al.*, 1992).

Los estudios de distribución tisular indican que la isoforma está presente en células endoteliales tanto arteriales como venosas, así como en plaquetas, miocitos cardíacos, células intersticiales de colon, células epiteliales tubulares del riñón o sincitiotrofoblastos de placenta (Pollock *et al.*, 1993).

Dentro del sistema nervioso central, su presencia se ha detectado en poblaciones neuronales mediante estudios inmunohistoquímicos. Según se ha descrito, se localiza preferentemente en neuronas piramidales de hipocampo. El NO producido a partir de una isoforma III presente en estas neuronas podría participar como mensajero retrógrado en el proceso de la LTP (Dinerman *et al.*, 1994; Son *et al.*, 1996)

### **Mecanismos de acción de NO: Dependencia o independencia de GMPc**

El modo en el que el NO interacciona con los sistemas biológicos depende en gran medida de la concentración de NO que se considere, y ésta, a su vez, normalmente depende del tipo de isoforma.

Las isoformas constitutivas (NOS I y III) producen concentraciones bajas de NO que se comporta como mensajero biológico de la vasodilatación y la neurotransmisión. La isoforma II de NOS genera elevadas cantidades de NO que tienen un efecto citotóxico o, al menos, citoestático. El factor que determina que el NO tenga un destino u otro es la afinidad de la molécula por los sistemas con los que interacciona. Así, se necesitan dosis relativamente elevadas de NO para que pueda afectar a enzimas claves del metabolismo que contienen hierro, como por ejemplo, la *cis*-aconitasa, la ribonucleótido reductasa o los complejos mitocondriales I y II. También se necesitan cantidades elevadas de NO para su reacción directa con el DNA, o para reacciones de S-nitrosilación que pueden afectar, por ejemplo, al receptor NMDA de glutamato o a la enzima gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (Brüne y Lapetina, 1989; Lipton *et al.*, 1993). Aunque la reacción con el anión superóxido es termodinámica y cinéticamente muy favorable, también son requeridas relativamente altas cantidades de NO para formar suficiente peroxinitrito tóxico.

En condiciones normales, el NO producido a partir de isoformas constitutivas con fines de mensajero intra- o intercelular lleva a cabo su acción biológica por estimulación de la enzima guanilato ciclasa soluble e incremento de los niveles de GMPc intracelular pues interacciona a concentraciones muy bajas (nM) con el grupo hemo de la enzima. Mediante la interacción con proteínas como quinasas, canales iónicos o fosfodiesterasas; el GMPc es el transductor intracelular de la señal biológica del NO.

### **GMPc como señal intracelular**

A pesar de que el AMPc y el GMPc (adenosina y guanosina 3':5'-monofosfato cíclicos, respectivamente) fueron descubiertos prácticamente al mismo tiempo (Sutherland y Rall, 1958; Ashman *et al.*, 1963), el estudio de la función del AMPc como mensajero intracelular atrajo la mayor parte de los primeros estudios científicos. Fruto de estos trabajos, que sentaron las bases de lo que hoy conocemos como mecanismos de acción hormonal, fueron los estudios del grupo de Sutherland en los cuales se dilucidó el importantísimo papel del AMPc en el mecanismo a través del cual la adrenalina estimula la liberación de glucosa a partir del glucógeno almacenado en los tejidos hepático y muscular (Sutherland y Rall, 1958; Robison *et al.*, 1968). Así, mientras estos trabajos y otros muchos que vinieron después elevaron al AMPc a la categoría de 2° mensajero ubicuo responsable de multitud de procesos biológicos; el GMPc permaneció en un segundo plano, básicamente debido al desconocimiento de las señales hormonales que estimulaban su síntesis.

Las concentraciones intracelulares de AMPc en un tejido en ausencia de estímulos suelen ser unas 5-6 veces mayores que las de GMPc. Por ejemplo, en plaquetas

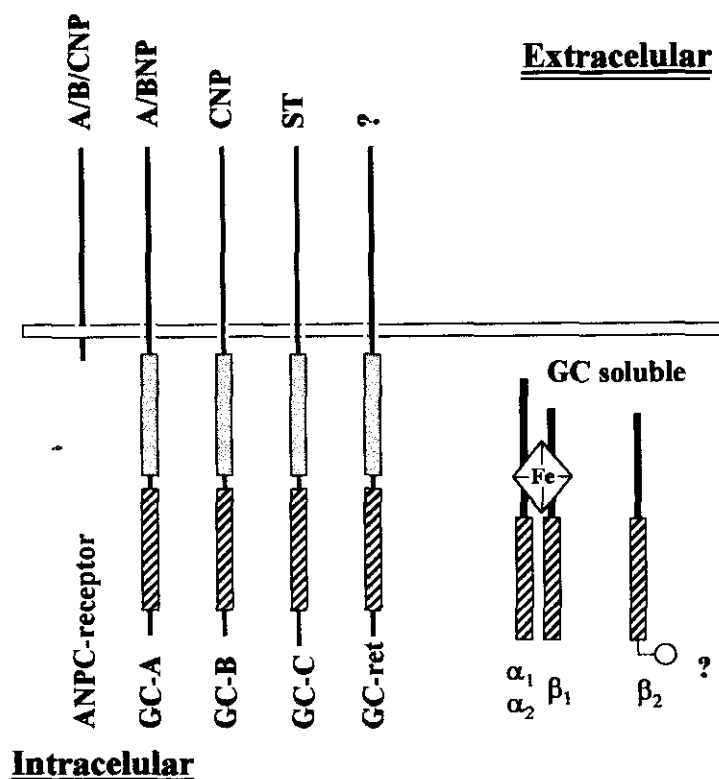
humanas, la concentración intracelular de AMPc es 4-5  $\mu\text{M}$ , mientras que la de GMPc está por debajo de 0.4  $\mu\text{M}$  (Walter *et al.*, 1993). Los niveles intracelulares de ambos mensajeros son el resultado del balance entre las actividades enzimáticas encargadas de su síntesis y aquellas responsables de su degradación. Tras un estímulo extracelular adecuado, las enzimas biosintéticas (adenilato y guanilato ciclasas) aumentan considerablemente su capacidad de síntesis de nucleótidos cíclicos mediante mecanismos específicos para cada enzima (y para cada isoforma). Las enzimas degradativas (fosfodiesterasas), la mayoría de las cuales hidrolizan indistintamente AMPc y GMPc, no son simples enzimas que destruyen el nucleótido cíclico sintetizado por las ciclasas sino que también son objeto de modulación por rutas de 2° mensajeros. Aunque es todavía un tema de controversia, el transporte de AMPc y GMPc al medio extracelular se ha propuesto como un tercer mecanismo de regulación de los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos. Este mecanismo, presente, por ejemplo, en células epiteliales, fibroblastos o eritrocitos, constituye un sistema dependiente de energía y sensible a la temperatura que, mediante la expulsión de los nucleótidos cíclicos al medio extracelular, contribuye a la recuperación de los niveles basales de AMPc y/o GMPc después de un estímulo (Patel *et al.*, 1995).

En el contexto de la neurotransmisión, las señales nerviosas se transmiten mediante neurotransmisores producidos por las células presinápticas que interaccionan con receptores presentes en la célula postsináptica. La activación de estos receptores conduce a la apertura de canales iónicos que transducen la señal química en señal eléctrica. En una escala de tiempo, este proceso se lleva a cabo en cuestión de milisegundos. Los neurotransmisores también activan receptores metabotrópicos cuyo efecto es la generación de un 2° mensajero, por ejemplo, un nucleótido cíclico. En la mayoría de los casos, este 2° mensajero activa una proteína quinasa que, mediante fosforilación, modifica la actividad de un canal iónico o de alguna proteína implicada en el proceso secretor. Debido a que este proceso requiere la participación sucesiva de diferentes sistemas celulares, comparado con el fenómeno de la transmisión sináptica, necesita un tiempo mucho más largo para completarse (segundos-minutos). Esto significa que las señales extracelulares que conducen a un incremento en los niveles de AMPc o GMPc, en la mayor parte de los casos, no generan una respuesta sináptica rápida sino que llevan a cabo una función moduladora de la transmisión nerviosa (para revisión ver Nicholls, 1994).

El descubrimiento de la producción de NO por determinadas células y de la capacidad de esta molécula de activar la isoforma soluble de guanilato ciclasa ha dado sentido fisiológico al GMPc como mensajero intracelular (Ignarro *et al.*, 1986; Palmer *et al.*, 1987). No obstante, conviene tener en cuenta la existencia de otras rutas de síntesis de este nucleótido cíclico. Los siguientes capítulos de esta Introducción tienen el propósito de destacar las características más importantes de las enzimas encargadas de la síntesis de GMPc.

### Síntesis de GMPc

La guanilato ciclasa, la actividad enzimática encargada de la síntesis de GMPc a partir de GTP (GTP-pirofosfato-liasa ciclasa, EC 4.6.1.2), fue descrita por primera vez en 1969 (Hardman y Sutherland, 1969; Ishikawa *et al.*, 1969; White y Aurbach, 1969). Desde los primeros estudios resultó claro que se trataba de una proteína diferente de la encargada de la síntesis de AMPc. Mientras la adenilato ciclasa se encontró solamente en la fracción particulada de homogenados obtenidos a partir de una gran variedad de tejidos, la guanilato ciclasa apareció repartida en la fracción soluble y en la particulada, con una distribución variable dependiendo del tejido (Kimura y Murad, 1974).



**Figura 7-1. Esquema de las isoformas de guanilato ciclasas y proteínas relacionadas.** Todas las proteínas con actividad guanilato ciclasa presentan gran homología en la región del dominio catalítico (área rayada). Las isoformas particuladas tienen en el lado intracelular un dominio tipo proteína quinasa (área gris). El dominio extracelular de las formas de membrana y de la forma trunca ANPC-receptor (sin actividad catalítica) constituye el sitio de unión de ligandos. La guanilato ciclasa soluble es un heterodímero de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . El dímero activo está formado por subunidades  $\alpha_1/\alpha_2$  y  $\beta_1$ . Existe una subunidad  $\beta_2$  que no forma una enzima activa con ninguna subunidad  $\alpha$  y que presenta una secuencia consenso de isoprenilación, aunque su anclaje a la membrana no ha sido demostrado.

A mediados de los años 70 se descubrió la capacidad de ciertos agentes farmacológicos, azida sódica, nitroprusiato sódico e incluso óxido nítrico, de activar la forma soluble de la guanilato ciclasa (Kimura *et al.*, 1975). Posteriormente, Gerzer *et al.* descubrieron que la enzima purificada a partir de tejido pulmonar bovino contenía

un grupo hemo (Gerzer *et al.*, 1981). Aunque el papel del NO estaba aún por dilucidar, estos resultados apuntaban en cierta forma hacia el mecanismo de activación de la enzima soluble.

A la vista de estos hallazgos resultó evidente que ambas formas de la enzima, soluble y particulada, representan proteínas totalmente diferentes con mecanismos de activación específicos para cada una de ellas (Figura 7).

De forma similar, el mecanismo de activación de la forma particulada de guanilato ciclasa no se estableció hasta el descubrimiento en 1978 de la acción de pequeños péptidos obtenidos a partir de *Escherichia coli* (Field *et al.*, 1978). Posteriormente, otros péptidos obtenidos a partir de esperma de equinodermo y, lo que es más interesante, a partir de tejido cardíaco de mamífero; también fueron capaces de estimular la guanilato ciclasa particulada tanto en células intactas como en preparaciones más o menos elaboradas que contenían la fracción de membrana (Suzuki *et al.*, 1981).

### Guanilato ciclasa soluble

La guanilato ciclasa soluble fue purificada a partir de tejido pulmonar bovino como un heterodímero de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  con pesos moleculares, de acuerdo a su movilidad en SDS-PAGE, de 73 y 70 kDa (Humbert *et al.*, 1990). La enzima purificada contiene un grupo hemo como grupo prostético y este coenzima es el elemento clave de la activación de la proteína por NO (Gerzer *et al.*, 1981).

Recientemente, el mecanismo de activación ha sido estudiado con cierto detalle (Deinum *et al.*, 1996; Stone y Marletta, 1996). En ausencia de NO, el átomo de Fe del grupo hemo está pentacoordinado con una histidina como único ligando axial. En estrecha homología con el mecanismo de unión de  $O_2$  a hemoglobina y mioglobina, este residuo de histidina (His 105 de la subunidad  $\beta$ ) representa la "histidina proximal" de la guanilato ciclasa soluble. Mediante estudios de espectroscopia Raman de resonancia se ha podido determinar que la interacción del NO con la guanilato ciclasa soluble requiere su unión al grupo hemo por la cara distal, en el extremo opuesto al residuo de His, generándose como intermedio un complejo hexacoordinado. A continuación, debido a la labilidad del enlace Fe-His, éste se rompe provocando en la enzima un cambio conformacional que incrementa su  $V_{max}$  hasta 400 veces. A pesar de la extraordinaria similitud con el mecanismo de unión de  $O_2$  a hemoglobina y mioglobina, resulta sorprendente que la guanilato ciclasa soluble no interaccione con el  $O_2$ . Según se ha descrito, este hecho se explica por las características particulares del "bolsillo distal" al que se une el ligando. La polaridad negativa de los residuos de aminoácidos presentes en este sitio de unión determina la bajísima afinidad del  $O_2$  por la guanilato ciclasa soluble.

Las propiedades de este sitio de unión también explican que el CO se comporte como un activador peor que el NO (Deinum *et al.*, 1996). La unión del CO a la guanilato ciclasa soluble no es tan fuerte como la del NO, por tanto, el enlace Fe-His no llega a

romperse sino sólo a debilitarse, lo que impide una completa activación de la enzima. Existe una actividad enzimática que produce CO en el proceso de degradación del grupo hemo a biliverdina. Esta enzima, la hemo oxigenasa-2 (EC 1.14.99.3) está presente en el cerebro y colocaliza bastante bien con la NOS. A pesar de comportarse como un débil activador de la guanilato ciclasa soluble, estos argumentos han servido a algunos autores para proponer al CO, compartiendo totalmente sus mecanismos de acción con NO, como mensajero intra- e intercelular en el sistema nervioso central (Verma *et al.*, 1993).

Entre las distintas especies de monóxido de nitrógeno ( $\text{NO}^-$ ,  $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{NO}^+$ ), sólo la especie radical ( $\text{NO}^\bullet$ ) es capaz de activar la guanilato ciclasa soluble. Otras moléculas afines, como el peroxinitrito, el nitrito sódico o S-nitrosotioles incrementan la actividad de la enzima *via* liberación de NO (Mayer *et al.*, 1995; Dierks y Burstyn, 1996).

Por otro lado, aunque el mecanismo es todavía desconocido, se ha descrito que concentraciones micromolares de ácidos grasos como el ácido araquidónico pueden también activar la isoforma soluble de guanilato ciclasa (Gerzer *et al.*, 1986).

Los parámetros cinéticos de la unión del NO a la enzima ofrecen una constante de disociación (Kd) de  $\approx 250$  nM, con una saturación a concentraciones  $\geq 500$  nM (Stone y Marletta, 1996). Estos valores tienen sentido fisiológico ya que la concentración estimada de NO cuando se comporta como mensajero biológico es de 100-500 nM (Malinski y Taha, 1992). No obstante, como bien sugieren Stone y Marletta, la Kd podría ser aún menor como consecuencia de la inevitable descomposición del NO disuelto, circunstancia que reduciría sus concentraciones efectivas en un ensayo de activación de guanilato ciclasa soluble purificada.

Utilizando secuencias de péptidos obtenidos a partir de la proteína de pulmón bovino, ambas subunidades ( $\alpha_1$  y  $\beta_1$ ) han sido clonadas y secuenciadas (Koesling *et al.*, 1988; Nakane *et al.*, 1988; Koesling *et al.*, 1990; Nakane *et al.*, 1990). Mediante la reacción en cadena de la polimerasa, otras dos isoformas han sido identificadas. Una de estas subunidades presentó más homología con la subunidad  $\alpha_1$ , mientras la otra mostró una mayor similitud con la  $\beta_1$ , por lo que fueron denominadas  $\alpha_2$  y  $\beta_2$ , respectivamente (Yuen *et al.*, 1990; Harteneck *et al.*, 1991). A partir de tejido humano se han clonado otras 2 isoformas,  $\alpha_3$  y  $\beta_3$ , las cuales no son más que variantes de  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  específicas de especie (Giuli *et al.*, 1992).

En todas las subunidades se ha encontrado una región C-terminal de unos 250 aminoácidos que además está relativamente bien conservada en las isoformas particuladas y presenta ciertas homologías con la adenilato ciclasa. Se ha propuesto que esta región constituye el dominio catalítico.

Experimentos de expresión de la proteína han puesto de manifiesto la absoluta necesidad de co-expresión de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  para obtener una enzima con actividad catalítica. No obstante, se desconoce si el hecho de que exista un dominio catalítico en cada subunidad se debe a la existencia de 2 centros catalíticos o a que ambos dominios

se combinan para formar un único centro con actividad enzimática (Harteneck *et al.*, 1991).

Fisiológicamente,  $\alpha_1\beta_1$  es el heterodímero mayoritario. La subunidad  $\alpha_2$ , clonada a partir de cerebro fetal humano, se ha encontrado en células del músculo liso de rata y en ciertos tejidos neurales, siempre coexpresada con la subunidad  $\beta_1$  (Harteneck *et al.*, 1991; Kummer *et al.*, 1996).

La subunidad  $\beta_2$  no forma una enzima catalíticamente activa con ninguna de las subunidades  $\alpha$ . Comparada con las otras subunidades, la subunidad  $\beta_2$  presenta importantes diferencias en su secuencia. La más notable es que en su extremo C-terminal presenta 86 aminoácidos más que la subunidad  $\beta_1$ . Este fragmento extra contiene una secuencia consenso de isoprenilación y aunque dicha modificación no ha sido demostrada, se ha sugerido que la subunidad  $\beta_2$  se ancla a la membrana a través de un grupo isoprenoide. Esta subunidad sólo se ha encontrado en tejido renal de rata y su función fisiológica se desconoce totalmente; si bien se ha postulado que podría participar en un mecanismo fisiológico de inactivación de la actividad guanilato ciclasa al dimerizar con subunidades  $\alpha_1$ , o también que podría formar un complejo activo con otra subunidad no identificada hasta el momento (Yuen *et al.*, 1990).

Respecto a su localización tisular, la enzima ( $\alpha_1\beta_1$ ) es ubicuamente expresada. Su presencia ha sido confirmada, entre otros tejidos, en pulmón, hígado, corazón, riñón, cerebro y cerebelo (Nakane *et al.*, 1990). En el sistema nervioso central, mediante técnicas inmunohistoquímicas se encontró tanto en neuronas como en glía (Zwiller *et al.*, 1981). Empleando técnicas de hibridación *in situ*, ambas subunidades se han encontrado en numerosas regiones que incluyen el estriado, el tubérculo olfatorio, células piramidales del hipocampo, la corteza cerebral, células granulares del cerebelo, etc.; aunque ciertas regiones son más ricas en una subunidad que en otra. Así, por ejemplo, en la glándula pineal existe una alta expresión de la subunidad  $\alpha_1$  mientras que la  $\beta_1$  se encuentra en niveles mucho más bajos (Matsuoka *et al.*, 1992; Furuyama *et al.*, 1993).

También es interesante destacar que no existe una colocación perfecta de las enzimas NOS y guanilato ciclasa soluble. Como ejemplo, la habenula no contiene NOS pero sí una alta expresión de ambas subunidades de guanilato ciclasa soluble (Matsuoka *et al.*, 1992; Vincent y Kimura, 1992; Furuyama *et al.*, 1993). Las propiedades de difusión del NO podrían explicar la aparente contradicción de estos resultados, aunque no se descarta que otros factores, CO o ácido araquidónico; pudieran regular la actividad enzimática en regiones donde no exista producción de NO.

### **Guanilato ciclasa particulada**

El estudio de la guanilato ciclasa de membrana constituye un complejo campo de investigación (todavía hoy en expansión) debido a la existencia de múltiples formas de la enzima y también de múltiples ligandos.

A diferencia de la forma soluble y su inusual mecanismo de activación por un gas como el NO, las formas de membrana son receptores para ligandos extracelulares que contienen un dominio intracelular con actividad ciclasa.

En mamíferos, los ligandos para las formas particuladas de guanilato ciclasas se pueden clasificar en 2 familias diferentes (Chinkers y Garbers, 1989).

La primera familia incluye ciertos péptidos con propiedades natriuréticas (péptidos natriuréticos de tipo A, B y C) que contienen un puente disulfuro que cubre 17 aminoácidos cuya secuencia se ha conservado prácticamente invariable durante la evolución, y que difieren en los residuos situados a ambos lados de esta secuencia.

El péptido natriurético de tipo A (ANP), presente en gránulos de secreción del tejido auricular cardíaco, se libera como respuesta al estiramiento auricular (Rosenzweig y Seidman, 1991). Este péptido también se libera a partir de ciertas neuronas del cerebro tras una estimulación de los barorreceptores periféricos (Antunes-Rodrigues *et al.*, 1992). El péptido natriurético de tipo B (BNP) fue inicialmente aislado a partir de cerebro pero parece predominar también en el tejido cardíaco (Song *et al.*, 1988). Por otro lado, el péptido natriurético de tipo C (CNP) se aisló de cerebro y aunque se pensó en principio que era específico de sistema nervioso, recientemente se ha demostrado su producción a partir de, por ejemplo, células endoteliales (Suga *et al.*, 1993).

La segunda familia de péptidos incluye ciertas enterotoxinas bacterianas estables al calor ("heat stable" ST) las cuales causan diarrea secretora aguda. Guanilina, un péptido perteneciente a esta familia, ha sido detectado en ciertos tejidos de rata como riñón, intestino y glándula adrenal (Reinecke *et al.*, 1996).

Mediante técnicas de biología molecular se han identificado diferentes tipos de guanilato ciclasas de membrana. El primer clon se obtuvo a partir de espermatozoides de equinodermos marinos y sirvió para definir las características generales de este tipo de enzimas (Thorpe y Garbers, 1989). El análisis de su secuencia reveló la existencia de diferentes regiones en la proteína. La región intracelular, que representa la mitad de la proteína, contiene un dominio tipo proteína quinasa y un dominio ciclasa en el extremo C-terminal. Los estudios hidropáticos llevados a cabo sugieren que un sólo segmento de la proteína atraviesa la membrana. Obviamente, el dominio extracelular presenta el sitio de reconocimiento del ligando.

El clonaje de este primer receptor-guanilato ciclasa sirvió también para definir secuencias nucleotídicas que han servido como sondas de hibridación para la obtención de clones de proteínas similares a partir de bibliotecas genómicas de tejido de rata y humano. El primer clon que se aisló mediante esta aproximación experimental fue el GC-A (ANPRA) cuya expresión resultó en una proteína con actividad guanilato ciclasa y capacidad de unir ANP y BNP, por lo que se propuso que podría ser el receptor fisiológico para estos péptidos. Estudios posteriores permitieron la identificación de un segundo clon (GC-B o ANPRB) que codifica para una guanilato ciclasa que une también ANP y BNP pero que reconoce con mayor afinidad el péptido natriurético de

tipo C (Garbers, 1989; Schulz *et al.*, 1989; Koller *et al.*, 1991). Un tercer clon (GC-C o STR) detectado en mucosa intestinal de rata parecer ser el receptor para enterotoxinas bacterianas. Este resultado sugiere la existencia de un mecanismo de regulación del transporte de iones en células epiteliales del intestino mediado por péptidos endógenos tipo guanilina a través del receptor GC-C (Schulz *et al.*, 1990). Recientemente una guanilato ciclasa particulada de retina (GC-ret) ha sido clonada y secuenciada (Shyjan *et al.*, 1992). Aunque se desconoce el ligando fisiológico para esta enzima, se ha propuesto que GC-ret está implicada en la resíntesis de GMPc requerida para la recuperación en oscuridad después de una señal fototransdutora. A nivel de proteína, la isoforma clonada GC-ret presente en células fotorreceptoras representa un buen candidato para la guanilato ciclasa dependiente de recoverina, un activador sensible a  $Ca^{2+}$  (Koch, 1992).

Otro miembro de esta familia de proteínas es un receptor que une los 3 péptidos natriuréticos pero que no tiene actividad guanilato ciclasa intracelular. Este receptor (ANPC-receptor, de "clearance") ha sido propuesto como responsable de la unión e internalización de los péptidos natriuréticos circulantes para su posterior degradación. No obstante, existen evidencias de que pudiera estar acoplado a un sistema de señalización intracelular (proteínas G, AMPc) (Lowe *et al.*, 1990; Levin, 1993).

El mecanismo de activación de las guanilato ciclasas de membrana pasa por la unión del ligando a su dominio de unión en el lado extracelular. Esta unión induce un cambio conformacional en la enzima que se transmite al dominio intracelular catalítico aumentando su capacidad de sintetizar GMPc. El dominio tipo proteína quinasa presenta homologías con los receptores tirosina quinasas, por lo que se ha sugerido que, del mismo modo que en estos receptores, la guanilato ciclasa particulada sufre dimerización (o polimerización) tras la unión del ligando. Aunque la actividad quinasa de este dominio nunca había sido demostrada, recientemente se ha observado una actividad de autofosforilación en la guanilato ciclasa particulada de células fotorreceptoras (Aparicio y Applebury, 1996).

Un importante mecanismo de regulación de estas enzimas es una desensibilización inducida por el ligando y mediada por defosforilación de la proteína. Así, se ha descrito que la isoforma GC-A, una proteína fosforilada en estado basal, después de la adición de ANP, sufre una disminución en el contenido de fosfato así como una reducción de la actividad ciclasa en respuesta a posteriores estimulaciones con ANP (Potter y Garbers, 1994).

Respecto a la distribución tisular de los receptores para péptidos natriuréticos, resulta interesante destacar que la expresión del receptor GC-A se ha documentado, entre otros tejidos, en los glomérulos del riñón, la corteza adrenal y en las células endoteliales del endocardio. Estos resultados confirman que ANP y BNP, descritos como hormonas cardíacas, participan en la regulación de la diuresis y la natriuresis (Wilcox *et al.*, 1991).

Por otro lado, la isoforma GC-B ha sido mayoritariamente encontrada en cerebelo, médula adrenal y pituitaria; sugiriendo este hecho que CNP, el ligando específico de este receptor, podría participar en mecanismos específicos de regulación de las funciones del sistema nervioso (Wilcox *et al.*, 1991).

### **Hidrólisis de GMPc: Fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (EC 3.1.4.17)**

Aunque el factor desencadenante de una señal de GMPc es la activación de sus rutas biosintéticas, las respuestas de GMPc intracelular dependen en gran medida del tipo y de la cantidad de isoformas de fosfodiesterasas presentes en un tejido. Las propiedades de estas isoformas determinan tanto la duración como la magnitud de la señal de GMPc, así como su posible interacción con otras rutas de 2° mensajeros como el  $\text{Ca}^{2+}$  o el AMPc.

Las enzimas encargadas de romper el enlace 3'-ribosa-fosfato de los nucleótidos cíclicos fueron descubiertas en el laboratorio de Sutherland en 1962 y desde los primeros estudios se puso de manifiesto la existencia de múltiples isoformas capaces de hidrolizar indistintamente (aunque con diferentes afinidades) AMPc y GMPc (Butcher y Sutherland, 1962). Exceptuando la isoforma específica de GMPc que se encuentra en las células fotorreceptoras, presente en concentraciones muy altas en estas células (15-30  $\mu\text{M}$ ), las fosfodiesterasas se encuentran en cantidades trazas en los tejidos y, normalmente, un tipo celular determinado contiene distintas isoformas. Estos dos factores, junto con el hecho de que algunas de estas isoformas jueguen un papel de pivote entre el AMPc y el GMPc, han dificultado grandemente la investigación en este tipo de enzimas. Afortunadamente, gracias al desarrollo de las técnicas de biología molecular, se ha podido avanzar en el conocimiento de sus propiedades (Beavo y Reifsnnyder, 1990).

Las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos se han clasificado en 7 familias de acuerdo a un criterio de carácter bioquímico-farmacológico, que posteriormente, en su mayor parte, se ha visto confirmado mediante estudios de biología molecular. Estas familias son: isoformas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (tipo I), estimuladas por GMPc (II), inhibidas por GMPc (III), específica de AMPc (IV), específicas de GMPc (V), de células fotorreceptoras (VI) e isoforma HPC1 que hidroliza AMPc con alta afinidad y que se encuentra en levaduras (VII).

Aunque son productos de diferentes genes, muchas de ellas comparten ciertas características comunes. Desde su descubrimiento por Butcher y Sutherland, muchos investigadores han descrito la capacidad de ciertas metilxantinas como teofilina y cafeína de inhibir, en mayor o menor grado, prácticamente todas las isoformas de fosfodiesterasas. El carácter inhibitorio no selectivo de estos compuestos, especialmente del congénere 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), se utiliza de manera rutinaria para incrementar la sensibilidad de los ensayos de GMPc y AMPc (Butcher y Sutherland, 1962; Beavo y Reifsnnyder, 1990).

## Fosfodiesterasas de GMPc presentes en mamíferos

Tipo	Hidroliza	Sitio GMPc no catalítico	Regulación actividad	Regulación fosforilación
I, Ca <sup>2+</sup> /Calmodulina dependiente	GMPc ≥ AMPc	No	Ca <sup>2+</sup> /CaM	Inhibe
II, estimulada por GMPc	GMPc ≈ AMPc	Sí	GMPc	?
III, inhibida por GMPc	GMPc ≈ AMPc	?	GMPc	Activa
V, específica GMPc	GMPc	Sí	?	Activa
VI, células fotorreceptoras	GMPc	Sí	transducina	?

Las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos se encuentran generalmente como dímeros de subunidades idénticas, aunque en algunos casos otras pequeñas subunidades de carácter regulador pueden asociarse al homodímero.

Un análisis detallado de su secuencia de aminoácidos muestra que presentan una región muy conservada de aproximadamente 270 residuos en el extremo carboxilo terminal. Se ha postulado que esta región constituye el dominio catalítico. El resto de la proteína, que supone en algunos casos 2/3 de la secuencia aminoacídica, debe contener dominios proteicos importantes para la regulación de la actividad enzimática, la interacción entre subunidades o la localización subcelular (Charbonneau *et al.*, 1986). En particular, algunas de estas isoenzimas presentan en la región amino terminal un dominio no catalítico de unión de GMPc que desempeña una importante función reguladora de la actividad enzimática (Charbonneau *et al.*, 1990).

Otra característica común de varias de estas familias de fosfodiesterasas es su posibilidad de regulación mediante fosforilación por diferentes proteínas quinasas. Este es el caso de las isoformas Ca<sup>2+</sup>/calmodulina-dependientes, de las específicas de AMPc y GMPc, y de las formas inhibibles por GMPc (Beltman *et al.*, 1993).

Entre las isoformas presentes en mamíferos, aunque fisiológicamente importante, la isoforma específica de AMPc (IV) queda fuera del objeto de estudio de esta Introducción. A continuación se describen las características más importantes de las fosfodiesterasas capaces de hidrolizar GMPc.

#### *Isoformas dependientes de calcio y calmodulina (tipo I)*

Esta familia de isoenzimas se caracteriza por una potenciación de la actividad enzimática por calcio/calmodulina. La interacción con esta proteína sensible a calcio, que puede considerarse una subunidad reguladora de la enzima, produce un aumento de 5-10 veces de la V<sub>max</sub> de hidrólisis (Sharma y Wang, 1986).

De acuerdo con su diferente movilidad electroforética en SDS-PAGE, se han descrito, al menos, 6 isoformas diferentes susceptibles de activación por Ca<sup>2+</sup>/calmodulina.

Todas hidrolizan tanto GMPc como AMPc, pero existen variaciones significativas en las afinidades por uno u otro nucleótido. Así, las isoformas de pesos moleculares 61, 67, 59 y 58 kDa no muestran una especial preferencia por uno de los dos nucleótidos cíclicos. La isoforma de 63 kDa hidroliza GMPc con una afinidad 10 veces mayor que cuando utiliza AMPc como sustrato, y la isoforma de 75 kDa parece específica de GMPc (Sharma y Wang, 1986; Beavo y Reifsnyder, 1990).

En cuanto a la distribución tisular, esta familia de isoenzimas se ha encontrado en numerosos tejidos como cerebro, corazón, pulmón, testículos, etc. (Charbonneau *et al.*, 1991). En el contexto del sistema nervioso central, las isoformas de 63 y 61 kDa se concentran en el cerebro, donde, al parecer, se expresan específicamente en neuronas. También se ha detectado en la médula adrenal, aunque en este caso no se conoce con exactitud el tipo de isoforma presente en el tejido (Sonnenburg *et al.*, 1993; Uzunov *et al.*, 1976).

Resulta interesante destacar que las isoformas identificadas en el cerebro son enzimas que hidrolizan preferentemente GMPc. Este hecho sugiere que la función fisiológica de estas enzimas en neuronas podría ser la de atenuar la acumulación de GMPc mediada por un incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , activación de NOS y producción de GMPc *via* guanilato ciclasa soluble sensible a NO (Mayer *et al.*, 1993).

#### *Isoformas estimuladas por GMPc (tipo II)*

Esta familia de enzimas está constituida por múltiples isoformas tanto citosólicas como asociadas a membranas cuya característica principal es una considerable potenciación de la actividad catalítica por GMPc (Yamamoto *et al.*, 1983).

Estas enzimas hidrolizan de un modo cooperativo tanto AMPc como GMPc, y presentan en su secuencia un dominio no catalítico de unión de GMPc. La interacción del nucleótido con este sitio produce una disminución de la  $K_m$  aparente para la hidrólisis del AMPc, sin modificación apreciable de la  $V_{max}$ . Este hecho, que tiene lugar con una constante de activación de 0.3  $\mu M$ , es decir, a concentraciones de GMPc que se pueden alcanzar fisiológicamente, se traduce en un aumento de 13-30 veces de la capacidad catalítica de la enzima (Yamamoto *et al.*, 1983).

Estas isoformas se han detectado en tejidos como el corazón o en la región glomerulosa de la corteza adrenal, en los cuales se han observado variaciones opuestas en los niveles de GMPc y AMPc (Simmons y Hartzell, 1988; MacFarland *et al.*, 1991).

#### *Isoformas inhibidas por GMPc (tipo III)*

Esta familia de isoenzimas, capaces de hidrolizar tanto GMPc como AMPc, se caracteriza por una inhibición por GMPc de la capacidad de hidrólisis de AMPc (Harrison *et al.*, 1988).

La investigación sobre este tipo de fosfodiesterasas se ha visto dificultada por el hecho de que estas proteínas son muy susceptibles a proteólisis durante los procesos de purificación. No obstante, se ha descrito la secuencia de aminoácidos para uno de los

miembros de esta familia. El análisis de dicha secuencia permitió la identificación del dominio catalítico común a todas las isoformas; sin embargo, el resto de la proteína presenta poca homología con otras fosfodiesterasas (Meacci *et al.*, 1991).

Puesto que se desconoce la existencia de un sitio regulador de unión de GMPc, se ha propuesto que dicho nucleótido actúa mediante competición directa con el AMPc por el sitio catalítico. El hecho de que las afinidades del GMP como inhibidor y como sustrato sean muy parecidas ( $K_m \approx IC_{50} \approx 0.1 \mu M$ ), así como que la  $V_{max}$  para el GMPc sea 10 veces más baja que para el AMPc, refuerza dicha hipótesis (Harrison *et al.*, 1988).

Esta familia de enzimas se encuentra en tejidos en los que se han descrito similares efectos para el GMPc y para el AMPc, por ejemplo, en plaquetas, adipocitos, músculo liso traqueal, etc. (Harrison *et al.*, 1988).

Tanto las isoformas estimuladas como las inhibidas pueden ser consideradas importantes receptores intracelulares del GMPc. Esta función, que será discutida en detalle posteriormente, permite una interacción entre los sistemas de 2° mensajeros del AMPc y del GMPc, incrementando, por tanto, la complejidad de los sistemas de señalización intracelular basados en nucleótidos cíclicos.

#### *Isoformas específicas para GMPc (tipo V)*

Las fosfodiesterasas de este grupo hidrolizan el GMPc con una afinidad 100 veces mayor que la descrita para el AMPc, por lo que representan en muchos tejidos el principal regulador de los niveles basales de GMPc intracelular (Saeki y Saito, 1993, Coste y Grondin, 1995).

Entre sus características más importantes están su capacidad de ser selectivamente inhibidas por dipiridamol y zaprinast (Beavo y Reifsnnyder, 1990; Merkel, 1993), así como la presencia en su secuencia de un dominio de unión de GMPc de alta afinidad distinto del sitio catalítico. Hasta el momento no se conoce que la ocupación de este sitio por GMPc produzca algún cambio en la actividad o la función de la enzima, aunque sí se ha descrito que inhibidores del sitio catalítico potencian la unión del GMPc al dominio no catalítico (Charbonneau *et al.*, 1990).

Miembros de esta familia se han detectado en pulmón, plaquetas o músculo liso vascular, tejidos en los que juegan un importante papel en la regulación de distintos procesos como el control por NO de la presión sanguínea o de la agregación plaquetaria (Rapoport *et al.*, 1989; Radomski *et al.*, 1991).

#### *Fosfodiesterasas de células fotorreceptoras (tipo VI)*

Hasta la dilucidación de las secuencias nucleotídicas de las fosfodiesterasas presentes en las células fotorreceptoras, estas isoformas se incluían en el grupo de enzimas que hidrolizan específicamente GMPc (tipo V). Hoy día, sabemos que representan proteínas totalmente diferentes y, aún más, que existen diferentes formas dentro de este

grupo: dos isoformas en bastones, una soluble y otra asociada a la membrana; y otra presente en los conos (Beavo y Reifsnyder, 1990).

La mejor estudiada es la enzima presente en el segmento externo de los bastones y que tiene un papel protagonista en el proceso de fototransducción. Esta isoforma existe como un heterotrímero de aproximadamente 190 kDa de peso molecular, formado por un dímero activo  $\alpha\beta$  y una subunidad reguladora inhibitoria de 15 kDa ( $\gamma$ ) (Baehr *et al.*, 1991).

Durante el proceso de fototransducción, el complejo inactivo  $\alpha\beta\gamma$  se escinde para dar el dímero activo capaz de hidrolizar GMPc. Esta transformación se produce como consecuencia de su interacción con la transducina, un miembro de la familia de las proteínas G, que, a su vez, porta el mensaje bioquímico de la rodopsina, el receptor de los fotones en la retina. La activa hidrólisis de GMPc por parte de esta isoforma reduce drásticamente los niveles del nucleótido cíclico de la célula fotorreceptora. Como se explicará con más detalle posteriormente en esta Introducción, la activación por GMPc de ciertos canales iónicos presentes en la membrana plasmática determina la actividad eléctrica de las células fotorreceptoras y, en definitiva, la señal sináptica que depende de ella (Stryer, 1986).

### **Mecanismos de acción de GMPc**

Los efectos fisiológicos del GMPc están mediados por diferentes tipos de proteínas receptoras de GMPc. Estas incluyen proteínas quinasas dependientes de GMPc (PKG), quizás el grupo más estudiado; canales iónicos regulados por GMPc (en general, por nucleótidos cíclicos); y fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos que unen GMPc.

Si se compara con la señalización intracelular del AMPc, cuyos efectos intracelulares están mediados por la proteína quinasa A y por algunos (pocos) canales iónicos susceptibles de modulación por AMPc; la ruta del GMPc constituye globalmente un sistema de muchísima mayor complejidad debido a la existencia de múltiples proteínas efectoras. Como se describirá a continuación, cada proteína efectora es responsable de algunas de las acciones fisiológicas del GMPc en tipos celulares específicos. No obstante, conviene tener en cuenta que en una determinada célula pueden coexistir simultáneamente diferentes proteínas efectoras, por lo que la señal mediada por el nucleótido cíclico es el resultado de diversos procesos. Además, dada la similitud entre el AMPc y el GMPc, existen sistemas efectores que responden a ambas moléculas, aumentando, si cabe, la complejidad de la señalización intracelular basada en nucleótidos cíclicos.

### **Canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos**

La primera evidencia de corrientes iónicas reguladas por GMPc fue obtenida por Miller y Nicol (1979). Estos autores, trabajando con membranas del segmento externo de bastones fotorreceptores, demostraron que el GMPc producía despolarizaciones mediante interacción directa con un canal iónico presente en la membrana de estas

células. Desde este trabajo, el número de canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos ha aumentado considerablemente, así como el número de acciones fisiológicas en las que están implicados (para revisión ver Finn *et al.*, 1996).

En una primera aproximación, podríamos clasificar estos canales en 2 grupos. Por un lado, aquellos canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos, representados por los presentes en los bastones de la retina o en neuronas receptoras olfativas; y por otro lado, aquéllos cuya actividad iónica no se controla directamente sino que es modulada por nucleótidos cíclicos, siendo el más estudiado el canal de cationes inhibido por GMPc presente en la membrana apical del tubo colector del riñón.

El funcionamiento de los canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos es similar al de los canales activados por ligandos que se encuentran en las sinapsis químicas a lo largo del sistema nervioso. La diferencia fundamental radica en que el sitio de unión del ligando, en este caso, un nucleótido cíclico, reside en el lado citoplásmico de la proteína.

La purificación y posterior clonaje del canal activado por GMPc de los bastones de la retina ha permitido el estudio de este tipo de proteínas a nivel molecular. Tanto el canal presente en bastones como el de neuronas olfativas son proteínas heteroméricas, probablemente tetrámeros con 2 tipos de subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , que responden a la misma estructura: un extremo amino terminal citoplásmico seguido de 6 segmentos transmembranales con una región responsable de formar el poro del canal; y un dominio C-terminal intracelular que contiene el sitio de unión del nucleótido cíclico. Mientras que la región que atraviesa la membrana presenta importantes homologías con canales activados por voltaje, como el canal de  $K^+$  *shaker*; el extremo carboxilo terminal recuerda en gran medida los sitios de unión de GMPc presentes en otras proteínas receptoras de GMPc como quinasas o fosfodiesterasas (Zagotta, 1996).

Los canales activados por GMPc presentes en bastones de la retina juegan un papel fundamental en el proceso de la transducción visual. En la oscuridad, una alta concentración de GMPc en el segmento externo de los bastones mantiene los canales en su estado abierto. Una característica interesante de estos canales es que, a diferencia de los canales activados por ligandos extracelulares responsables de la transmisión sináptica, los canales fotorreceptores no experimentan desensibilización en presencia continuada del GMPc. Esta propiedad permite a estos canales permanecer permanentemente abiertos en la oscuridad. Los iones  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$  que permean por el canal abierto mantienen a la célula en un estado despolarizado responsable de la liberación sostenida del neurotransmisor glutamato en la terminal sináptica de la célula. La interacción del GMPc con su sitio de unión es de carácter alostérico positivo. Esta cooperatividad permite que estos canales sean altamente sensibles a pequeñas variaciones de los niveles de GMPc (Stryer, 1986; Kaupp y Koch, 1992).

Tras un estímulo visual, la rodopsina experimenta un cambio conformacional que cataliza el intercambio de GDP por GTP en la proteína transducina. Con GTP unido, la transducina estimula la fosfodiesterasa encargada de la hidrólisis de GMPc. La

disminución en la concentración intracelular de GMPc conduce a un cierre de los canales y, como consecuencia, a una hiperpolarización que reduce la liberación de glutamato en la sinapsis bastón-neurona visual (Stryer, 1986).

El canal iónico de los cilios de neuronas olfativas está implicado en el proceso de transducción de la señal olfativa. En este proceso, ciertas moléculas (odorantes) activan receptores de membrana acoplados a la cascada de señalización de proteínas G, con activación, entre otros sistemas, de la adenilato ciclasa y producción intracelular de AMPc. Este nucleótido cíclico abre el canal iónico presente en estas células que, a diferencia del canal fotorreceptor, es sensible tanto a GMPc como a AMPc. La apertura del canal produce, en último término, una despolarización de la célula con transducción de la señal olfativa a otras neuronas mediante la liberación de neurotransmisores (Finn *et al.*, 1996).

Mediante técnicas de biología molecular se ha detectado la presencia de canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos en numerosos tejidos, como corazón, riñón, aorta, colon, etc. (Distler *et al.*, 1994).

Entre los canales modulados por nucleótidos cíclicos merece la pena destacar el canal catiónico inhibido por GMPc presente en las células epiteliales del tubo colector renal y responsable de la excreción de  $\text{Na}^+$  que se observa tras incubación de estas células con el péptido natriurético auricular. Este canal iónico se caracteriza por una disminución de la probabilidad de apertura en presencia de GMPc. Este efecto se produce, al parecer, mediante unión directa del GMPc y también mediante acción de la proteína quinasa dependiente de GMPc. Esta acción dual del GMPc permite una modulación rápida mediante la interacción directa y una lenta mediante la participación de la proteína quinasa (Light *et al.*, 1990).

Otros ejemplos de canales modulados por nucleótidos cíclicos son el canal catiónico modulado por AMPc de células del nodo sinoauricular del corazón o el canal catiónico activado por  $\text{Ca}^{2+}$  y modulado por AMPc descrito en una línea de células pancreáticas (Finn *et al.*, 1996).

### **Fosfodiesterasas reguladas por GMPc**

En un capítulo anterior se discutieron las características de estas proteínas claves en el metabolismo de los nucleótidos cíclicos. La importancia de estas enzimas radica no sólo en el hecho de hidrolizar los nucleótidos cíclicos sino también en su capacidad de regulación de la actividad enzimática por GMPc.

La fosfodiesterasa estimulada por GMPc (tipo II) es la más estudiada y de la que se conocen mejor sus implicaciones fisiológicas. Esta isoforma de fosfodiesterasa, mediante una atenuación de la respuesta a AMPc, participa en distintos procesos mediados por GMPc como la regulación de la contracción cardíaca o la secreción de hormonas esteroideas.

La fosfodiesterasa de tipo II se encuentra en la fracción soluble de numerosos tejidos. La concentración más alta de la enzima se encuentra en la capa glomerulosa de la corteza adrenal. En este tejido, los compuestos que incrementan el AMPc intracelular producen una estimulación de la secreción de aldosterona. Según MacFarland *et al.*, el ANP produce una inhibición de la secreción de aldosterona mediante reducción de los niveles de AMPc (MacFarland *et al.*, 1991).

Del mismo modo, Hartzell y Fischmeister describieron en cardiomiocitos que el GMPc inhibe la corriente de  $Ca^{2+}$   $\beta$ -adrenérgica regulada por AMPc mediante estimulación de la hidrólisis de este nucleótido cíclico. La consecuencia fisiológica de esta inhibición es una disminución de la fuerza contráctil del músculo cardíaco (Hartzell y Fischmeister, 1986).

En ambos mecanismos, el GMPc actúa mediante estimulación de una hidrólisis más activa de AMPc. Estos ejemplos ilustran de manera adecuada el importante papel de interconexión que este tipo de fosfodiesterasas juegan en los procesos de señalización intracelular del AMPc y del GMPc.

### **Proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG, EC 2.7.1.37)**

Una actividad enzimática de proteína quinasa dependiente de GMPc fue descrita por primera vez en artrópodos por Kuo y Greengard en 1970, 7 años después del descubrimiento de la proteína quinasa dependiente de AMPc (Friedman y Lerner, 1963; Kuo y Greengard, 1970). En el contexto de la investigación en el campo del GMPc, la PKG constituye la proteína receptora de GMPc mejor caracterizada en la mayoría de los tejidos.

El término PKG engloba a una serie de proteínas con actividad quinasa dependiente de GMPc que pertenecen a la gran familia de proteínas quinasas. Los miembros de esta amplia familia catalizan la transferencia del fosfato y del ATP a residuos de serina y treonina de una gran variedad de proteínas y péptidos (Butt *et al.*, 1993; Francis y Corbin, 1994b).

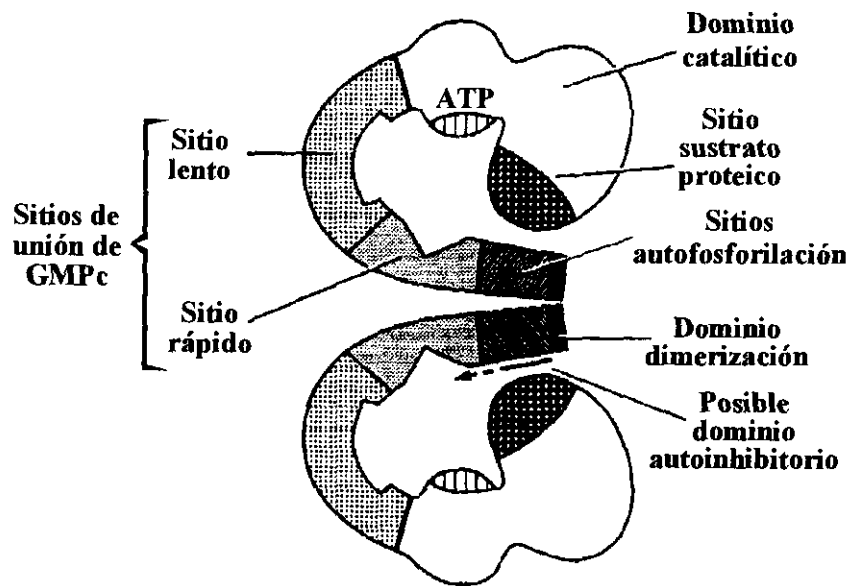
En mamíferos se han descrito 2 isoformas de PKG, I y II. Las características de la PKG I se han estudiado más profundamente que las de la PKG II. La PKG I es una forma principalmente soluble descrita originalmente en tejido pulmonar bovino. Se han descrito 2 isoenzimas de PKG I, I $\alpha$  y I $\beta$ , productos de un "splicing" alternativo en el extremo amino terminal. Ambas isoenzimas son homodímeros de subunidades de 76 kDa. La PKG II es una forma asociada a la membrana descrita originalmente de células epiteliales del intestino y que se encuentra también como un homodímero de subunidades de 86 kDa (Gill *et al.*, 1976; Lincoln *et al.*, 1977; DeJonge, 1981; Gamm *et al.*, 1995).

Ambas proteínas han sido purificadas a partir de sus tejidos modelo (pulmón e intestino), clonadas sus secuencias nucleotídicas e incluso se han llevado a cabo estudios de expresión en células eucarióticas de los cDNAs clonados. Estos estudios

han permitido, al menos para la PKG I, un análisis detallado de su estructura general (Figura 8) (Takio *et al.*, 1984; Wernet *et al.*, 1989; Ruth *et al.*, 1991).

Cada monómero de PKG I contiene 4 tipos de dominios funcionales responsables de las características del dímero activo. En el extremo amino terminal se localiza el dominio de interacción entre subunidades. La secuencia exacta que se requiere para la dimerización no se conoce, pero se ha postulado la existencia de un motivo proteico del tipo cremallera de leucinas (o isoleucinas) que podría permitir una alineación de las 2 subunidades por medio de esta región de la proteína. Este alineamiento permitiría además que la Cys-42 de cada monómero estuviese suficientemente cerca para formar un puente disulfuro, aunque este aspecto no está del todo claro puesto que la isoforma I $\beta$  carece del residuo de cisteína (Atkinson *et al.*, 1991).

En ausencia de sus respectivos nucleótidos cíclicos, las proteínas quinasas A y G se mantienen en un estado inactivo mediante la interacción de un dominio autoinhibitorio con el sitio catalítico. En la PKG este dominio autoinhibitorio presenta una secuencia pseudosustrato que compite con los verdaderos sustratos proteicos. El extremo N-terminal de la PKG contiene este dominio autoinhibitorio. A diferencia de la PKA, en la cual la subunidad reguladora contiene este dominio proteico, así como el dominio de unión del nucleótido cíclico; la PKG contiene los elementos reguladores y los catalíticos en la misma cadena polipeptídica (Francis y Corbin, 1994b).



**Figura 8-I. Modelo propuesto para el homodímero activo de proteína quinasa dependiente de GMPc.** La figura muestra la interacción entre los dominios autoinhibitorio y catalítico dentro de la misma cadena polipeptídica. Según este modelo, el alineamiento paralelo de los monómeros permitiría la interacción entre los dominios de dimerización mediante una estructura del tipo cremallera de leucinas/isoleucinas (adaptado de Francis y Corbin, 1994a).

En la isoforma I de PKG, además de la mencionada interacción entre la secuencia pseudosustrato y el sitio catalítico, determinados residuos de Thr y Ser fuera de la secuencia pseudosustrato del dominio autoinhibitorio son autofosforilados por la actividad catalítica de la enzima (Francis *et al.*, 1996).

La PKG contiene también un dominio de interacción con nucleótidos cíclicos que contiene 2 sitios de unión denominados rápido y lento. Cada uno de ellos tiene distintos parámetros cinéticos. El sitio lento o de alta afinidad se denomina así por la lenta disociación del GMPc de este sitio, mientras que el ligando disocia más rápidamente del sitio de baja afinidad o rápido. La unión de GMPc presenta cooperatividad positiva. Cuando el GMPc se une al sitio rápido, la disociación del sitio lento ocurre mucho más lentamente. La ocupación de ambos sitios se requiere para una activación completa de la enzima. No obstante, una activación parcial puede conseguirse cuando el GMPc se une solamente al sitio lento (Corbin y Doskeland, 1983).

Ciertos estudios de unión de análogos de GMPc sustituidos en la posición 8 han demostrado que los sitios de reconocimiento tienen una alta afinidad para grupos hidrofóbicos y voluminosos, como por ejemplo el 8-bromo-GMPc (8Br-GMPc) o el *p*-clorofeniltio-GMPc (8-*p*CPT-GMPc) (Corbin *et al.*, 1986).

El dominio catalítico de la PKG está localizado en el segmento carboxilo terminal de la enzima. Su secuencia es extraordinariamente homóloga a la subunidad catalítica de la PKA. Ambas enzimas catalizan la transferencia de un grupo fosfato y desde el ATP a residuos de Ser y Thr de proteínas que en la mayor parte de los casos responden a la secuencia consenso RRXSX. El residuo de Asp-482 de PKG se ha propuesto como la base catalítica para la transferencia de fosfato y, hasta el momento, no existen evidencias de que se forme un intermedio fosfoenzima (Francis y Corbin, 1994a).

### **Distribución de la PKG e implicaciones fisiológicas**

La distribución tisular de PKG es mucho más restringida que la ubicua presencia de PKA en los tejidos. Concentraciones significativas de la proteína se han encontrado en pulmón, cerebelo, plaquetas y músculo liso, para la isoforma I; o en epitelio intestinal, cerebro y riñón, para la II, entre otros (Walter, 1981; Keilbach *et al.*, 1992; Jarchau *et al.*, 1994).

El idéntico requerimiento de secuencia de fosforilación por PKA y PKG ha dificultado durante largo tiempo la identificación de posibles sustratos específicos para la proteína quinasa dependiente de GMPc. En condiciones *in vitro*, PKA y PKG fosforilan las mismas proteínas y, muy probablemente, en células o tejidos intactos tenga lugar el mismo comportamiento. En la práctica, el hecho de que existan sustratos preferente o específicamente fosforilados por PKG depende, en gran medida, de la localización tisular y celular de ambos, sustrato y enzima.

Excepto en los tejidos anteriormente mencionados, la actividad de PKG es extremadamente baja. Sin embargo, la presencia de bajos niveles de la enzima en una determinada célula no necesariamente excluye la posibilidad de llevar a cabo

importantes funciones. La asociación o "targeting" de la PKG I a ciertas estructuras del citoesqueleto permitiría, en primer lugar, una eficiente fosforilación de sustratos asociados a estas estructuras en respuesta a elevaciones en el GMPc intracelular; y en segundo lugar, explicaría el significativo porcentaje de la enzima que aparece en fracciones particuladas (MacMillan-Crow y Lincoln, 1994).

Quizás el mejor ejemplo es la fosforilación de vimentina por PKG. La vimentina es una proteína de filamentos intermedios del citoesqueleto que es fosforilada por la PKG (y también por la PKA) a pesar de que no contiene la secuencia consenso de fosforilación. MacMillan-Crow y Lincoln demostraron que la PKG y la vimentina se unen con alta afinidad en células del músculo liso. Esta interacción permitiría al dominio catalítico de la quinasa alinearse con un sitio de vimentina susceptible de fosforilación. De hecho, después de la activación de la quinasa se observa una rápida fosforilación de vimentina y, aún más, cuando la interacción entre las 2 proteínas se dificulta, mediante la eliminación en la quinasa de la secuencia implicada en la unión, la enzima cataliza muy lentamente la fosforilación de la vimentina (MacMillan-Crow y Lincoln, 1994).

En muchas de las acciones del GMPc se sabe positivamente que la PKG está implicada. Estas incluyen la relajación del músculo liso vascular o la inhibición de la agregación plaquetaria. En el contexto del sistema nervioso, el papel de la PKG no está tan claro. A continuación se describen las principales implicaciones fisiológicas de la activación de la proteína quinasa dependiente de GMPc.

### **Relajación del músculo liso vascular**

La elevación de los niveles intracelulares de GMPc en el músculo liso vascular por compuestos como ANP, NO o nitrovasodilatadores provoca una relajación de la tensión en el músculo liso. Ciertos análogos de GMPc que activan la PKG purificada causan también relajación vascular. La potencia de estos análogos para inducir la relajación es similar a la que se observa para activar la isoforma I $\alpha$  de PKG, por lo que, desde un principio, se sugirió la participación de la quinasa en este efecto (Sekhar *et al.*, 1992).

La mayoría de las investigaciones encaminadas a dilucidar las bases moleculares del efecto vasorrelajante se han centrado en estudiar proteínas relacionadas con la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> ya que la acción del GMPc en este tejido se acompaña de una reducción de los niveles de calcio libre intracelular (Collins *et al.*, 1986). Las primeras proteínas que se identificaron como posibles sustratos de PKG, denominadas G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, fueron encontradas en la fracción particulada de membranas del músculo liso (Casnellie *et al.*, 1980). Resulta interesante destacar que la proteína G<sub>0</sub> está implicada en una activación de la bomba ATPasa de Ca<sup>2+</sup> (Yoshida *et al.*, 1991). Por otro lado, se ha descrito tanto *in vitro* como en células intactas, la fosforilación por PKG de fosfolambano, una proteína también asociada a la bomba de Ca<sup>2+</sup> (Cornwell *et al.*, 1991). Otra proteína implicada en el metabolismo del Ca<sup>2+</sup> intracelular es el receptor de IP<sub>3</sub> del retículo sarcoplásmico. Este receptor es fosforilado por PKG en aorta de rata,

aunque el papel de esta fosforilación no se conoce con exactitud (Komalavilas y Lincoln, 1996).

Estos mecanismos y otros muchos implicados en la regulación del calcio podrían contribuir a la reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por GMPc responsable del efecto vasodilatador del NO. En este contexto, la importancia fisiológica de la PKG es incuestionable como lo demuestra el hecho de que las células musculares lisas pierden su respuesta vasodilatadora a 8Br-GMPc al mismo tiempo que la PKG deja de expresarse, un fenómeno observado después de sucesivos pases en células en cultivo (Cornwell y Lincoln, 1989).

### **Inhibición de la agregación plaquetaria**

La agregación plaquetaria es inhibida por compuestos que incrementan el GMPc, como el NO o nitrovasodilatadores; o el AMPc, como prostaglandinas. Si se compara con otros tejidos, las plaquetas contienen concentraciones particularmente altas de PKG y PKA. La activación de PKA resulta en fosforilación de numerosas bandas proteicas, una de las cuales es también fosforilada por la PKG. Este sustrato de PKG es una proteína asociada a la membrana de 46/50 kDa (VASP, del inglés "vasodilator-stimulated phosphoprotein") (Walter *et al.*, 1993).

Desde el punto de vista experimental, la investigación del papel fisiológico de VASP no ha estado exenta de resultados afortunados. La fosforilación de VASP por PKA o PKG produce un cambio del peso molecular aparente de la proteína de 46 a 50 kDa en SDS-PAGE. Este resultado hace de esta proteína un marcador muy útil para la acción de nitrovasodilatadores, prostaglandinas, etc. VASP es una proteína del citoesqueleto asociada con filamentos de actina o puntos de adhesión focal. La fosforilación de esta proteína podría ser un importante punto de interconexión entre las rutas de transducción de señales y la formación de filamentos de actina durante el proceso de agregación plaquetaria.

### **Papel de la proteína quinasa dependiente de GMPc en el sistema nervioso**

La proteína quinasa dependiente de GMPc también se ha descrito en diversas estructuras del sistema nervioso. Las concentraciones más altas de PKG I se han encontrado en el cerebelo donde, al parecer, se localiza en las células de Purkinje (Lohmann *et al.*, 1981; DeCamilli *et al.*, 1984).

Los estudios de fosforilación de posibles sustratos en el cerebelo dieron como resultado la identificación de una proteína específicamente fosforilada por PKG, denominada sustrato G (Schlichter *et al.*, 1978). Una observación interesante es que el sustrato G y la PKG I colocalizan en las células de Purkinje sugiriendo este hecho que la fosforilación podría tener importancia fisiológica (Schlichter *et al.*, 1980). La secuencia aminoacídica del sustrato G se ha determinado y parece ser que pertenece a una clase de proteínas inhibidores de proteína-fosfatasa 1 (PP1) (Aitken *et al.*, 1981).

Otro sustrato de PKG es una proteína de neuronas dopaminérgicas, DARPP-32<sup>1</sup>, que también responde a elevaciones del AMPc intracelular. Una vez fosforilada, DARPP-32 se convierte también en un potente inhibidor de PP1 (Tsou *et al.*, 1993). Estos resultados indican que la PKG podría incrementar el grado de fosforilación de proteínas específicas no sólo mediante una fosforilación directa sino también a través de una inhibición de la defosforilación de proteínas que no necesariamente tienen que ser sustratos de PKG.

Aunque originalmente descrita en el epitelio intestinal, donde probablemente participa en la regulación de la secreción transepitelial de iones Cl<sup>-</sup>, la PKG II también se ha detectado en el sistema nervioso central. Mediante técnicas de hibridación *in situ*, se ha descrito la presencia de esta isoforma en estructuras como el tálamo, la corteza, el septum, etc.; estructuras que curiosamente no destacan precisamente por poseer altos niveles de expresión de PKG I (DeJonge, 1981; Jarchau *et al.*, 1994; El-Husseini *et al.*, 1995).

Se ha postulado la participación del GMPc y de la PKG en la modulación de numerosos procesos neuronales como la LTP en el hipocampo o la LTD en el cerebelo. El hecho de que las células de Purkinje del cerebelo sean muy ricas en PKG I sugiere esta hipótesis. Sin embargo, hasta el momento no se han encontrado evidencias moleculares de la fosforilación por PKG de proteínas implicadas en estos procesos. En otras células excitables, como los cardiomiocitos, se ha descrito que la PKG inhibe corrientes de Ca<sup>2+</sup> de tipo L, probablemente mediante fosforilación del canal o de alguna proteína asociada (Mery *et al.*, 1991; Sumii y Sperelakis, 1995). Muchas de las incógnitas acerca del papel del GMPc en la neurotransmisión podrían resolverse si mecanismos similares llegaran a demostrarse en el sistema nervioso. Indudablemente, éste es un campo de investigación en constante crecimiento (revisado en Wang y Robinson, 1997).

### Activación cruzada de PKG y PKA

El hecho de que PKA y PKG catalicen la fosforilación de los mismo sustratos proteicos plantea obviamente dificultades metodológicas a la hora de investigar el fenómeno a nivel molecular. No obstante, un grado mayor de complejidad debe asumirse en tanto en cuanto ambas quinasas pueden activarse indistintamente (aunque con diferentes afinidades) por GMPc y AMPc.

La homología estructural de los dominios funcionales de ambas quinasas permite que la PKG pueda ser activada por AMPc, aunque con una afinidad 50-200 veces más baja que el GMPc; o que la PKA se active por GMPc a concentraciones 80 veces más grandes que las requeridas para la activación por AMPc (Corbin y Lincoln, 1978; Ogreid *et al.*, 1985). Fisiológicamente, la primera opción tiene más sentido, especialmente teniendo en cuenta que la concentración basal de AMPc es 5-10 veces

---

1 La denominación de DARPP-32 proviene del inglés "dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein", fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc de peso molecular 32 kDa.

más alta que la de GMPc en la mayoría de los tejidos. Así, por ejemplo, la elevación de los niveles de AMPc en el músculo liso también produce relajación. Dicha relajación no correlaciona con una activación de la PKA sino más bien con una activación cruzada de la PKG por AMPc (Francis y Corbin, 1994a).

Recientemente se ha identificado otro posible mediador biológico que responde a las características de nucleótido cíclico. Esta molécula, la ADP-ribosa cíclica (ADPRc), se sintetiza a partir del NAD y, según se ha descrito, activa la liberación de  $Ca^{2+}$  a partir de ciertos reservorios intracelulares. Merece la pena destacar que la actividad enzimática responsable de la síntesis de ADPRc, la ADP-ribosil ciclasa, se activa por GMPc en un proceso mediado por fosforilación de proteínas. Este resultado no es más que otro ejemplo de la complejidad que caracteriza la señalización intracelular basada en nucleótidos cíclicos (Lee *et al.*, 1994).

## **LAS CELULAS CROMAFINES DE LA MEDULA ADRENAL**

Las células cromafines de la médula adrenal son responsables de la síntesis, el almacenamiento y la secreción de catecolaminas al torrente sanguíneo durante la estimulación del sistema nervioso simpático. Debido a que liberan las hormonas adrenalina y noradrenalina directamente a la sangre, estas células son normalmente objeto de estudio de la Endocrinología. No obstante, por sus similitudes con neuronas adrenérgicas, también se estudian desde el punto de vista de las Neurociencias.

La médula adrenal constituye la parte interna de la glándula adrenal. Aunque desde principios de este siglo se conoce la capacidad de la médula adrenal de secretar sustancias que influyen notablemente en el resto del organismo, quizás el primer estudio serio fue realizado por Feldberg *et al.* en 1934 (Feldberg *et al.*, 1934). Estos autores describieron que las células cromafines están invadidas por terminales nerviosos colinérgicos y que la acetilcolina liberada por estos nervios es el estímulo primario de la liberación de adrenalina y noradrenalina por la médula adrenal. En los años 60, Coupland *et al.* llevaron a cabo la primera descripción exhaustiva de las características morfológicas (y también bioquímicas) de la médula adrenal (Coupland *et al.*, 1964; Coupland, 1965). En 1967, Douglas *et al.* retomaron los trabajos del grupo de Feldberg y, en el primer estudio realizado en células adrenales aisladas, describieron la importancia de las propiedades electrofisiológicas de las células en la repuesta secretora (Douglas *et al.*, 1967a; 1967b). Con el transcurso de los años, a medida que los métodos de aislamiento, purificación y mantenimiento en cultivo de las células se fueron perfeccionando, las propiedades más importantes de las células se fueron también conociendo (Livett *et al.*, 1979; Kilpatrick *et al.*, 1980; Livett, 1984; Wilson, 1987; Moro *et al.*, 1990). Durante estos años, el cultivo de células cromafines se ha convertido en un modelo experimental muy útil que ha contribuido enormemente al conocimiento de las bases iónicas y moleculares de la secreción de hormonas y neurotransmisores.

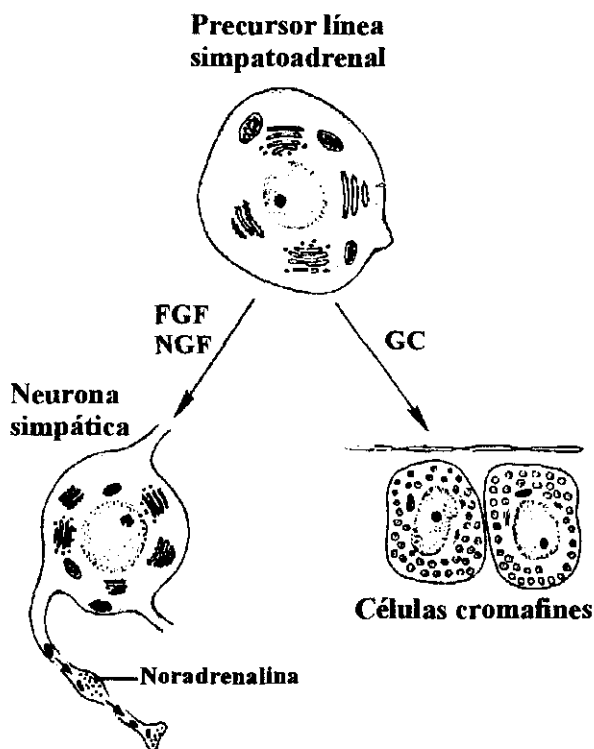
### **La médula adrenal como tejido neurosecretor**

La glándula adrenal es un órgano atípico. Está formado por 2 regiones bien diferenciadas, una región interna, la médula adrenal, responsable de la respuesta simpática de liberación de catecolaminas; y una región externa, la corteza adrenal, cuya función es la secreción de hormonas esteroídicas al torrente sanguíneo.

Ambos tejidos, corteza y médula, tienen un origen embriológico completamente distinto. Mientras la corteza procede del mesodermo que cubre la cavidad celómica, cerca del sitio de origen de las crestas genitales, las células progenitoras del tejido cromafín de la médula adrenal migran, durante el desarrollo embrionario, desde la cresta neural del ectodermo hasta la parte interna de la glándula adrenal en desarrollo. Resulta sorprendente que dos tejidos con funciones totalmente diferentes se asocien tan estrechamente para formar una única glándula endocrina. Un proceso extraordinariamente regulado basado muy probablemente en señales químicas permite

que estos 2 tejidos se reconozcan y respondan a este reconocimiento creciendo juntos en la glándula adrenal. No cabe duda que la producción de corticosterona por las células corticales suministra un entorno químico favorable para el desarrollo de las células cromafines (Hildebrand, 1974).

La cresta neural constituye un grupo de células de desarrollo transitorio que surgen de la región dorsal del tubo neural y que rápidamente migran y se dispersan en diferentes rutas para dar nervios simpáticos postganglionares o células cromafines de la médula adrenal, así como células de Schwann e incluso melanocitos. Este linaje de células recibe el nombre de línea simpatoadrenal. Ciertos factores humorales que estas células encuentran durante su migración determinan de manera específica el destino final de su fenotipo. Los glucocorticoides producidos por la corteza adrenal resultan esenciales para la consecución de dos efectos; 1) la prevención de la diferenciación de las células cromafines en neuronas simpáticas postganglionares; y 2) la expresión en un alto porcentaje de células de la enzima feniletanolamina-N-metil transferasa (PNMT), responsable de la transformación de noradrenalina en adrenalina (Unsicker, 1993).



**Figura 9-I. Desarrollo de la línea celular simpatoadrenal derivada de la cresta neural.** Determinados factores humorales como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento nervioso (NGF) o los glucocorticoides (GC) determinan el fenotipo definitivo de los precursores no diferenciados de la línea simpatoadrenal. En presencia de FGF o NGF, las células precursoras diferencian a neuronas simpáticas, mientras que los GC inducen la expresión del fenotipo cromafin (adaptado de *Principles of neural science* (1991), Kandel *et al.*, Elsevier Publishing Co.)

Su origen embriológico común hace que las neuronas postganglionares y las células cromafines presenten notables similitudes. Una de ellas, común a la mayoría de células nerviosas, es que tras la diferenciación celular pierden su capacidad de multiplicarse. No obstante, estudios realizados en células postnatales en cultivo han demostrado que en determinadas especies (rata) y bajo determinadas circunstancias (presencia de factor de crecimiento nervioso y ausencia de glucocorticoides), las células cromafines experimentan procesos de proliferación. Este no es el caso de células cromafines de tejido bovino adulto (Tischler *et al.*, 1993).

Durante el período final del desarrollo embrionario, terminales nerviosos de neuronas preganglionares alcanzan la médula y establecen contactos sinápticos con las células cromafines como si de neuronas postganglionares adrenérgicas se tratase. De hecho, la médula adrenal es un componente adicional del sistema nervioso simpático. Con frecuencia se habla de la médula adrenal como un ganglio simpático modificado en el que las células postganglionares no emiten axones hacia los órganos diana, sino que vierten los neurotransmisores (neurohormonas) directamente al torrente sanguíneo.

La inervación de la médula adrenal es similar a la de los ganglios simpáticos, aunque, como se explicará posteriormente, ambos sistemas pueden funcionar de forma independiente. El hipotálamo es el principal centro regulador de la respuesta simpática, en general de la respuesta del sistema nervioso autónomo. Esta estructura integra la información que recibe de estructuras superiores y produce un patrón de funcionamiento para la respuesta autónoma. El hipotálamo proyecta a núcleos del tallo cerebral o de la médula espinal que actúan sobre los cuerpos de las neuronas preganglionares. La mayoría de las fibras preganglionares que inervan las células cromafines entran en la glándula por el nervio esplácnico torácico superior. Estudios anatómicos realizados en tejido de rata indican que cada médula es inervada por 500-800 fibras preganglionares. Puesto que una médula adrenal de rata se estima que contiene unas 600.000 células, cada neurona preganglionar debe controlar al menos 750 células cromafines en lo que se ha venido a llamar una "unidad secretora" (Marley y Prout, 1965; Tomlinson y Coupland, 1990).

Los terminales de las neuronas preganglionares de los ganglios simpáticos y de la médula adrenal son colinérgicos y tras una estimulación liberan acetilcolina en sus respectivas hendiduras sinápticas. Esta liberación de acetilcolina es el estímulo fisiológico que induce la secreción de catecolaminas. El papel biológico de la liberación de catecolaminas a partir de la médula adrenal y de neuronas simpáticas en situaciones de emergencia del organismo es incuestionable. Las catecolaminas tienen un efecto estimulador sobre el corazón; producen vasoconstricción, dilatación de los vasos del músculo esquelético, inmovilización del intestino, relajación del músculo bronquiolar, dilatación de las pupilas, piloerección, así como movilización del glucógeno y de los ácidos grasos del hígado, entre otras funciones. Todas ellas contribuyen a lo que se ha denominado reacciones de "lucha o huida" mediadas por el componente simpático del sistema nervioso autónomo (Guyton, 1988).

Diferentes tipos de situaciones de emergencia pueden dar lugar a respuestas de liberación de catecolaminas. Según se ha descrito en animales y también en sujetos experimentales humanos, el estrés emocional produce una estimulación general del componente simpático que se ha podido estudiar mediante, por ejemplo, la excreción de catecolaminas. Otros estímulos son el frío o calor extremos, la asfixia o la anoxia, situaciones de acidosis o alcalosis metabólicas o de hipotensión, hipoglucemia, etc (Lewis, 1975).

En la mayor parte de los casos, las catecolaminas son liberadas por la médula adrenal al mismo tiempo que los diversos órganos son estimulados directamente por los nervios simpáticos. La diferencia principal radica en que las catecolaminas plasmáticas permanecen más tiempo en el torrente sanguíneo y, por tanto, su efecto tiene una mayor duración. Así pues, los órganos reciben dos estimulaciones simultáneas; una directa a través de los nervios, y otra, indirecta, por las hormonas liberadas a la sangre. No obstante, los dos sistemas parecen tener también mecanismos de control separados de tal manera que pueden actuar independientemente. Varios autores han descrito que el patrón de activación depende de la naturaleza del estímulo. Por ejemplo, una hemorragia causa una importante descarga adrenal, mientras que la estimulación del nervio simpático renal no sólo no se incrementa sino que disminuye (Vollmer, 1996).

Los dos medios de estimulación, nervios simpáticos y médula adrenal, se complementan y pueden llegar a sustituirse mutuamente. La destrucción de las vías simpáticas directas no suprime la excitación de los órganos diana puesto que existe liberación de adrenalina y noradrenalina a partir de la médula adrenal. En forma análoga, la pérdida total de las dos médulas adrenales no suele tener un gran efecto porque las vías directas pueden cubrir la mayor parte de las necesidades. Otro hecho importante a tener en cuenta es que sólo una pequeña proporción de células del organismo están inervadas por fibras simpáticas por lo que la liberación de adrenalina y noradrenalina a partir de la médula adrenal permite una estimulación indirecta de estas células no inervadas directamente (Guyton, 1988).

### **Características de las células cromafines**

En la glándula intacta, las células cromafines se encuentran organizadas en pequeños grupos separados entre sí por numerosos vasos sanguíneos, fibras nerviosas y elementos de tejido conectivo. Aunque mayoritarias, las células cromafines no son el único tipo celular de la médula adrenal. Esta contiene además cuerpos neuronales (células ganglionares), células de soporte (de Schwann para fibras nerviosas y las llamadas sustentaculares rodeando células cromafines), así como fibroblastos, mastocitos, linfocitos; todo ésto sin contar las células endoteliales de los vasos o las propias fibras nerviosas preganglionares (Coupland, 1965; Kobayashi y Coupland, 1993).

En términos generales, la morfología de las células cromafines es homogénea, con una apariencia poligonal. Los orgánulos subcelulares que contienen son comunes al resto de las células excepto unas vesículas especializadas en almacenar las catecolaminas que se han denominado gránulos cromafines. Normalmente el núcleo está desplazado hacia un polo de la célula mientras que el polo opuesto contiene la mayor parte de estas vesículas.

Las células cromafines son heterogéneas por naturaleza. Eränko fue el primero en demostrar que las catecolaminas, adrenalina y noradrenalina, están contenidas en diferentes tipos celulares dentro de la médula adrenal (Eränko, 1952; 1955). Así, las células cromafines pueden ser adrenérgicas cuando producen, almacenan y secretan

adrenalina; o noradrenérgicas, cuando es la noradrenalina la catecolamina que las caracteriza. La diferencia fundamental entre ambos tipos celulares es la presencia o ausencia de la enzima feniletanolamina-N-metil transferasa (PNMT). No obstante, existen diferencias adicionales en cuanto, por ejemplo, al tamaño, células noradrenérgicas son más pequeñas; o al número o tipo de receptores presentes en ambos grupos celulares (Vollmer, 1996).

Durante el período perinatal, la noradrenalina es la amina predominante en las células cromafines en desarrollo. La influencia cortical determina que un porcentaje de células se diferencie al fenotipo adrenérgico mientras que otras retienen la capacidad de sintetizar noradrenalina como producto final en la síntesis de catecolaminas. Los glucocorticoides controlan la transcripción y la síntesis proteica de la enzima PNMT. En este proceso resultan de capital importancia las características de la circulación adrenal. En la médula adrenal intacta, las células adrenérgicas y noradrenérgicas no se distribuyen homogéneamente sino que existen agrupaciones bien definidas de células de un tipo u otro. Este hecho se ha correlacionado con el aporte de altas concentraciones de glucocorticoides a áreas ricas en células adrenérgicas merced a una conexión directa basada en las arterias medulares (para más detalles sobre la circulación adrenal, ver sección Materiales y Métodos: Obtención de células adrenomedulares) (Einer-Jansen y Carter, 1995).

La circulación adrenal, debido a sus propiedades, merecería un capítulo entero en cualquier descripción de la glándula adrenal. A su función de aporte de las hormonas esteroídicas desde la corteza a la médula, habría que añadir el importante papel que juega durante la respuesta secretora de la glándula. En primer lugar, la glándula adrenal recibe altos niveles de flujo sanguíneo comparado con otros órganos de similar tamaño; y, por otro lado, el flujo a la médula se incrementa extraordinariamente durante la estimulación nerviosa contribuyendo este efecto a una rápida difusión de las catecolaminas por todo el organismo (Vinson *et al.*, 1985).

Se ha descrito la existencia de un control neural diferente para las células adrenérgicas y noradrenérgicas. Aplicando electrodos en el hipotálamo para estimular la secreción de catecolaminas, Folkow y von Euler describieron que la *ratio* adrenalina/noradrenalina varía dependiendo de la posición de los electrodos en diferentes áreas hipotalámicas, resultado que sugiere una diferente inervación de las células adrenérgicas y noradrenérgicas (Folkow y von Euler, 1954). Adrenalina y noradrenalina tienen efectos sistémicos diferentes debido a la existencia de receptores adrenérgicos con distintas afinidades para una u otra amina. Fisiológicamente, diferentes estímulos promueven una secreción diferencial de adrenalina y noradrenalina. Por ejemplo, la hipoglucemia produce una liberación masiva de adrenalina, mientras que situaciones de frío extremo resultan en un aporte mayor de noradrenalina. Además, como se ha comentado anteriormente, las células adrenérgicas y noradrenérgicas presentan diferentes receptores para sustancias que estimulan la médula por vía sanguínea. Ejemplos de este tipo son la angiotensina II y la histamina, que estimulan preferentemente las células adrenérgicas (Núñez *et al.*, 1995; Vollmer, 1996).

Una célula cromafin puede contener 30.000 gránulos cromafines. Estas vesículas especializadas son relativamente fáciles de aislar y purificar del resto de orgánulos subcelulares y constituyen, por tanto, una preparación biológica de gran utilidad para la realización de estudios bioquímicos. Bajo microscopía electrónica, los gránulos cromafines poseen una alta densidad electrónica debido al depósito de metales pesados durante la preparación de las muestras para este tipo de análisis. Desde los primeros estudios se pudo constatar la existencia de 2 tipos de gránulos: en las células adrenérgicas los gránulos tienen una densidad electrónica baja o moderada, mientras que los gránulos de las células noradrenérgicas tienen una alta densidad electrónica. Los gránulos cromafines son responsables de la denominada reacción cromafinica (con sales de cromo) que ha dado nombre a las células (Grynszpan-Winograd, 1975; Winkler y Carmichael, 1982).

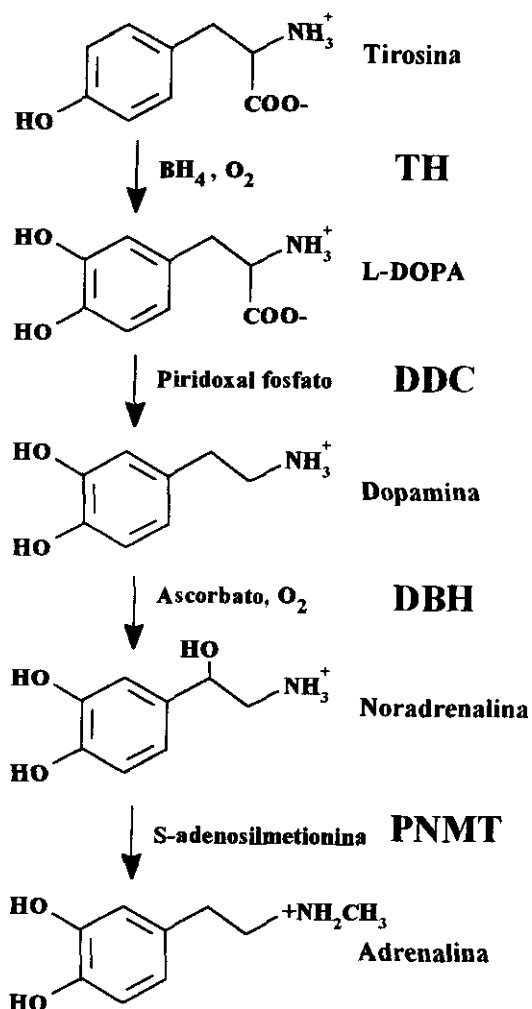
La composición química de los gránulos cromafines se conoce bastante bien. Sus constituyentes principales son las catecolaminas, nucleótidos como ATP, ADP o diadenosina polifosfatos, proteínas y péptidos, lípidos, calcio, etc. (Winkler, 1976; Miras-Portugal *et al.*, 1994). En particular, la concentración de catecolaminas y ATP es extraordinariamente alta (0.6 M y 0.15 M, respectivamente). Con objeto de mantener la osmolaridad intragranular estable ( $\approx 0.3$  M), no cabe duda debe existir algún tipo de interacción entre ambas moléculas, aunque el mecanismo molecular exacto de dicha interacción no se conoce todavía. El gránulo cromafin contiene diferentes péptidos: sustancia P, péptido intestinal vasoactivo (VIP), somatostatina, encefalina, péptidos natriuréticos, etc. Además, el gránulo contiene proteínas tanto solubles como de membrana. Entre las proteínas solubles destaca la alta concentración de unas proteínas denominadas cromograninas; así como la presencia en forma soluble, y por tanto, secretable, de una de las enzimas encargadas de la síntesis de catecolaminas: la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa. Entre las proteínas de membrana son importantes los transportadores de catecolaminas y nucleótidos, una ATPasa que bombea protones al interior del gránulo y que aporta la energía necesaria para el transporte de catecolaminas y ATP, además de una forma de membrana de dopamina  $\beta$ -hidroxilasa, entre otras (Winkler y Carmichael, 1982; Henry *et al.*, 1994; Gualix *et al.*, 1996).

La extraordinariamente alta concentración de catecolaminas en el interior del gránulo cromafin es el resultado de una síntesis muy efectiva en estas células. La síntesis de catecolaminas constituye una compleja secuencia de reacciones químicas catalizadas por diferentes enzimas que se inicia en el aminoácido tirosina y termina en la producción de noradrenalina y adrenalina (Figura 10).

La primera etapa es catalizada por la enzima tirosina hidroxilasa (TH, EC 1.14.16.2) y constituye la etapa limitante de la ruta biosintética. La TH es una monooxigenasa de función mixta que emplea tirosina, oxígeno molecular y tetrahidrobiopterina como sustratos para dar, mediante la adición de un grupo hidroxilo a la posición meta de la tirosina, 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA), dihidrobiopterina y H<sub>2</sub>O. La enzima se encuentra soluble como un homotetrámero de subunidades de 60-61 kDa en el citosol

de las células que sintetizan catecolaminas (neuronas simpáticas, neuronas del locus coeruleus, células cromafines, etc.) (Kumer y Vrana, 1996).

La siguiente etapa enzimática está catalizada por la enzima L-DOPA descarboxilasa (DDC, EC 4.1.1.28). Esta proteína es una enzima dependiente de piridoxal fosfato que cataliza la eliminación del grupo carboxilo de la L-DOPA para formar dopamina. Presenta una baja  $K_m$  y una alta  $V_{max}$  para su sustrato, de tal manera que la L-DOPA endógena es convertida muy eficientemente en dopamina. La DDC descarboxila diferentes aminoácidos aromáticos por lo que también se denomina aminoácido aromático descarboxilasa (AAADC).



**Figura 10-1. Biosíntesis de catecolaminas.**

Las catecolaminas se sintetizan mediante una compleja secuencia de reacciones enzimáticas. La primera etapa es catalizada por la enzima tirosina hidroxilasa (TH) y resulta en la formación de L-DOPA a partir del aminoácido precursor tirosina. La transformación de L-DOPA en dopamina es catalizada por la enzima L-DOPA descarboxilasa (DDC). La siguiente etapa implica la adición de un grupo hidroxilo al carbono  $\beta$  de la cadena lateral de dopamina para dar noradrenalina y es catalizada por la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (DBH). En las células cromafines adrenérgicas, la cadena de reacciones enzimáticas termina con la metilación de la noradrenalina para dar adrenalina en una reacción catalizada por la feniletanolamina N-metil transferasa (PNMT). Merece la pena destacar que la reacción catalizada por la DBH tiene lugar en el interior de las vesículas de secreción, mientras que el resto de las reacciones enzimáticas ocurren en el citosol de las células. Este hecho implica, en primer lugar, que la dopamina debe ser transportada al interior de los gránulos para su transformación en noradrenalina, y, en segundo lugar, que la noradrenalina, en células adrenérgicas, debe ser transportada al citosol donde se transforma en adrenalina que se reintroduce de nuevo en el gránulo de secreción (adaptado de *Basic Neurochemistry* (1989), Siegel *et al.*, Raven Press.).

La dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (DBH, EC 1.14.17.1) es otra monooxigenasa de función mixta que emplea el  $\text{O}_2$  molecular para añadir un grupo hidroxilo al carbono  $\beta$  de la cadena lateral de la dopamina produciendo noradrenalina. La enzima utiliza ascorbato

como dador de electrones durante la reacción. Como se ha comentado anteriormente, la enzima se concentra en los gránulos de secreción en los cuales se localiza tanto en la fracción soluble como en la particulada.

En las células cromafines adrenérgicas, la enzima feniletanolamina-N-metil transferasa (PNMT, EC 2.1.1.28) cataliza la transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosilmetionina hasta el nitrógeno de la noradrenalina produciendo la amina secundaria adrenalina. El control principal de esta enzima se basa en la regulación de su transcripción génica por glucocorticoides. Este resultado es compatible con la identificación de un elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) en la secuencia promotora/reguladora del gen de PNMT (Evinger *et al.*, 1992).

La regulación de esta compleja secuencia de reacciones enzimáticas recae en la primera de las enzimas de la ruta, la TH. Desde el punto de vista cinético, la TH tiene una Km para la tirosina en el rango micromolar. Debido a que la concentración de tirosina en los tejidos catecolaminérgicos es relativamente alta, la enzima se encuentra prácticamente saturada en condiciones fisiológicas. Este hecho sugiere la existencia de mecanismos reguladores distintos a la disponibilidad de sustrato que determinan la actividad de esta enzima. De hecho, la TH es regulada por múltiples mecanismos que implican desde inhibición "feedback" y modificación covalente hasta regulación transcripcional e incluso translacional (Kumer y Vrana, 1996).

Cualquier catecolamina (noradrenalina, adrenalina, dopamina o L-DOPA) es capaz de unirse a la TH en el sitio activo e inhibir la actividad de la enzima. Esta interacción es reversible y permite que la enzima funcione como un sensor de las concentraciones locales de catecolaminas. (Ribeiro *et al.*, 1992)

Otro mecanismo de regulación a corto plazo es la modificación covalente por fosforilación de la proteína (Zigmond *et al.*, 1989). La TH es fosforilada *in vitro* por, al menos, 7 proteínas quinasas diferentes. La mayoría de estos procesos de fosforilación están asociados con incrementos en la actividad enzimática. Se ha demostrado que la enzima es sustrato de la proteína quinasa A (PKA); la proteína quinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina de tipo II (CaM PKII); la proteína quinasa C (PKC); la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG); la proteína quinasa dependiente del ciclo celular (cdc2/cyclinA); las proteínas quinasas asociadas a microtúbulos, también conocidas como proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas) y proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs); y las proteínas quinasas activadas por MAP quinasas (MAPKAP quinasas) (Edelman *et al.*, 1981; Vulliet *et al.*, 1985; Roskoski *et al.*, 1987; Hall *et al.*, 1992; Haycock *et al.*, 1992; Sutherland *et al.*, 1993).

Los sitios de fosforilación de TH han sido identificados e incluyen Ser<sup>8</sup>, Ser<sup>19</sup>, Ser<sup>31</sup> y Ser<sup>40</sup> de la secuencia aminoacídica (Haycock, 1990). Se ha postulado que la fosforilación de la enzima produce una reducción de la Km para su sustrato pteridina y un incremento de la constante de inhibición (Ki) para las catecolaminas en su modo de regulación "feedback". El resultado de estos cambios cinéticos es que la enzima fosforilada utiliza más eficientemente el cosustrato y es menos susceptible a la

inhibición por retroalimentación. Debido a la capacidad de este mecanismo de responder a señales extracelulares, la regulación de la enzima por fosforilación es probablemente el sistema mediante el cual se regula la actividad catalítica en condiciones fisiológicas. No obstante, conviene tener en cuenta que para algunas de las quinasas mencionadas todavía no se ha demostrado una fosforilación de TH *in vivo* (Haycock, 1993; Kumer y Vrana, 1996).

Los mecanismos a largo plazo se basan principalmente en la regulación de las concentraciones de mRNA de la enzima TH. Desde el punto de vista fisiológico, se ha descrito que el frío prolongado induce la TH en células cromafines de la médula adrenal. La acetilcolina liberada a partir de las fibras preganglionares parece estar implicada en este efecto. En el promotor del gen de TH se han identificado varios elementos de respuesta a señales extracelulares que podrían ser responsables de esta regulación (Craviso *et al.*, 1995).

La importancia de la TH, en general, de las catecolaminas, se pone de manifiesto con toda su crudeza en los experimentos realizados por Zhou *et al.* Estos autores, mediante inactivación del gen de TH en una cepa de ratones, observaron que los ratones TH (-/-) no eran viables y morían a los 10-15 días de gestación. Estos resultados demuestran que la TH (y también la DBH, según otro estudio reciente con idéntico resultado) son absolutamente esenciales para la vida (Thomas *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1995).

### **Propiedades electrofisiológicas de las células cromafines**

Desde las primeras investigaciones pareció evidente que la acetilcolina modificaba de algún modo las propiedades eléctricas de la membrana de las células cromafines y esta modificación inducía la liberación de catecolaminas. Los primeros estudios decisivos fueron realizados por Douglas *et al.* Estos autores demostraron en los años 60 que, en primer lugar, los iones calcio tenían bastante que decir en el proceso secretor; y en segundo lugar, que la acetilcolina despolariza la membrana de las células cromafines como paso esencial para la secreción de catecolaminas (Douglas y Rubin, 1961; Douglas *et al.*, 1967a; 1967b). Diez años después de los trabajos del grupo de Douglas, dos laboratorios, de forma independiente, registraron potenciales de acción en células cromafines despolarizadas con acetilcolina o con una solución de alto K<sup>+</sup>, un fenómeno que hasta entonces parecía exclusivo de neuronas (Biales *et al.*, 1976; Brandt *et al.*, 1976). En estudios posteriores se observó que la frecuencia de descarga de los potenciales de acción inducidos por acetilcolina correlacionaba bastante bien con la respuesta secretora de las células (Kidokoro y Ritchie, 1980). Con el advenimiento en los años 80 de la tecnología del "patch-clamp" se ha podido llegar a un conocimiento notable de los procesos iónicos implicados en la excitabilidad de las células cromafines (Hamill *et al.*, 1981).

Como resultado de los estudios de "patch-clamp" se han descrito en células cromafines hasta 15 canales iónicos diferentes. En mayor o menor grado, estos canales contribuyen a las propiedades eléctricas de las células tanto en reposo como tras estimulación mediante diferentes secretagogos (Artalejo, 1995).

El potencial de membrana de las células cromafines en reposo se ha estimado que es de -50 mV (dependiendo del estudio varía de -50 a -80 mV) (Fenwick *et al.*, 1982a; Artalejo, 1995; Calvo *et al.*, 1995). Como en cualquier neurona, este potencial de membrana es una consecuencia directa de la acción electrogénica de la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , que acumula  $\text{K}^+$  en el interior de la célula al mismo tiempo que excluye  $\text{Na}^+$ ; así como de un flujo de  $\text{K}^+$  a través de canales abiertos en reposo.

Las células cromafines son eléctricamente excitables. Los potenciales de acción que se pueden registrar en estas células muestran las características típicas de los descritos en axones neuronales (Hodgkin y Huxley, 1952; Biales *et al.*, 1976; Brandt *et al.*, 1976). Fisiológicamente, la despolarización de las células tiene lugar cuando la acetilcolina interacciona con receptores específicos para este neurotransmisor presentes en la membrana de las células cromafines. Desde el punto de vista experimental, las células se pueden despolarizar también con soluciones de alto  $\text{K}^+$  (KCl en el rango 10-15 hasta 100 mM o superiores) o con veratridina, entre otros métodos. Cada una de estas estrategias supone la participación en mayor o menor grado de diferentes canales iónicos de la membrana: receptor/canal nicotínico de acetilcolina, canales de  $\text{Na}^+$ , canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y canales de  $\text{K}^+$ .

#### *Receptores nicotínicos de acetilcolina*

Los receptores colinérgicos se clasifican en nicotínicos (cuando son específicamente activados por el alcaloide del tabaco, nicotina) o muscarínicos (activados por muscarina, un compuesto extraído a partir del hongo *Amanita muscaria*). Los receptores nicotínicos son ionotrópicos, es decir, responsables de respuestas sinápticas rápidas; mientras que los muscarínicos son metabotrópicos y su acción biológica pasa por una ruta más o menos larga de señalización intracelular (para revisión general ver Nicholls, 1994).

El receptor nicotínico de acetilcolina es el miembro mejor conocido de esta familia, principalmente debido a que ha podido ser aislado a partir del órgano eléctrico de peces del género *Torpedo* y se ha estudiado estructuralmente mediante microscopía electrónica de cristales del receptor/canal reconstituido (Mitra *et al.*, 1989). La proteína es un pentámero compuesto por cuatro subunidades diferentes ( $\alpha_2\beta\gamma\delta$ ) que conforman un cilindro alrededor de un poro central hidrofóbico cuya apertura se activa por unión del ligando a la subunidad  $\alpha$ . Existen distintas formas de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , hecho que determina el diferente comportamiento de los receptores nicotínicos de tipo muscular y neuronal. A esta última clase pertenecen los receptores nicotínicos encontrados en las células cromafines (Criado *et al.*, 1992).

Entre las características más importantes de estos canales activados por acetilcolina destaca su capacidad de permear tanto iones  $\text{Na}^+$  como  $\text{Ca}^{2+}$  (Nooney *et al.*, 1992). No obstante, en condiciones fisiológicas, el  $\text{Ca}^{2+}$  sólo contribuye en un 2.5 % a la corriente que fluye por el canal (Zhou y Neher, 1993).

Otra importante propiedad del canal es la desensibilización en presencia continuada del agonista, especialmente a altas concentraciones (Callewaert *et al.*, 1991). Merece la

pena destacar que diferentes péptidos, como sustancia P, somatostatina o neuropéptido Y, modulan negativamente las corrientes nicotínicas mediante un incremento de la velocidad de desensibilización. En un contexto fisiológico, este proceso puede tener su importancia puesto que estos péptidos son, o bien cosecretados con las catecolaminas por las células, o bien se pueden liberar a partir de las fibras nerviosas preganglionares (Artalejo, 1995).

#### *Canales de Na<sup>+</sup> activados por voltaje*

La conductancia de Na<sup>+</sup> dependiente de voltaje en células cromafines es debida a canales similares a los descritos originalmente por Hodgkin y Huxley en el axón gigante del calamar (Hodgkin y Huxley, 1952; Fenwick *et al.*, 1982b). Desde el punto de vista fisiológico, estos canales amplifican la despolarización iniciada mediante la activación del receptor/canal nicotínico. Sin embargo, esta amplificación sólo funciona cuando se usan bajas concentraciones de acetilcolina, como se ha podido demostrar mediante estudios de sensibilidad de la secreción de catecolaminas a tetrodotoxina, una toxina que bloquea específicamente estos canales. Cuando se usan altas concentraciones de acetilcolina, la despolarización mediada por los receptores nicotínicos es suficiente para activar los canales de Ca<sup>2+</sup> y también para inducir inactivación de los canales de Na<sup>+</sup> (Kidokoro y Ritchie, 1980).

#### *Canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje*

La activación de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje es el modo más eficaz de estimular la entrada de calcio e iniciar la secreción de catecolaminas en células cromafines.

La primera caracterización de los canales de Ca<sup>2+</sup> responsables de los flujos de este ión que tienen lugar durante potenciales de acción se realizó en células cromafines bovinas en una cita que se ha convertido en un clásico en el campo de la electrofisiología (Fenwick *et al.*, 1982b). Aunque en este trabajo pionero no se mencionaba la posible existencia de múltiples tipos de canales de Ca<sup>2+</sup>, prácticamente todos los trabajos posteriores han puesto de manifiesto la diversidad (y también la complejidad) de los canales de Ca<sup>2+</sup> en células cromafines (Rosario *et al.*, 1989; Bossu *et al.*, 1991; Artalejo *et al.*, 1991; Albillos *et al.*, 1993; López *et al.*, 1994; Artalejo *et al.*, 1994; Albillos *et al.*, 1996b).

Mediante el empleo combinado de técnicas electrofisiológicas y diferentes herramientas farmacológicas, se han descrito en células cromafines bovinas (las mejor estudiadas en este aspecto) al menos 4 tipos de canales de Ca<sup>2+</sup> voltaje-dependientes: L, N, P y Q. Cada uno de estos tipos se caracteriza por el bloqueo más o menos específico por determinados compuestos (o familias de compuestos) de la corriente iónica que fluye a través de ellos (para revisiones ver Spedding y Paoletti, 1992; Dunlap *et al.*, 1995). Así, por ejemplo, las dihidropiridinas, mediante interacción específica con los canales de tipo L, pueden ser agonistas o antagonistas de estos canales de calcio (Fleckenstein, 1983; Schramm *et al.*, 1983). Las toxinas procedentes de caracoles marinos del género *Conus* son bloqueantes de los canales N,  $\omega$ -conotoxina-GVIA, o canales Q,  $\omega$ -

conotoxina-MVIIC (Olivera *et al.*, 1994). Por otro lado, la toxina procedente del veneno de la araña *Agelenopsis aperta*,  $\omega$ -agatoxina-IVA, se comporta como bloqueante de los canales de tipo P (Mintz *et al.*, 1992). Aunque estas toxinas han sido muy útiles para dilucidar los diferentes tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , debido a que la especificidad de cada bloqueante por un determinado tipo de canal es relativa y dependiendo de la concentración a la que se empleen pueden afectar más de un tipo de canal; en la práctica, estos experimentos resultan de difícil interpretación (López *et al.*, 1993; Fernández *et al.*, 1995; Granja *et al.*, 1995).

Como características globales, todos estos canales pertenecen al grupo denominado canales activados por alto voltaje. Además, en mayor o menor grado, todos experimentan inactivación de la corriente durante una despolarización sostenida (Artalejo, 1995).

Como se explicará posteriormente, dado el papel crucial que estos canales desempeñan en la respuesta secretora, sobre ellos recaen gran parte de los mecanismos moduladores de la secreción de catecolaminas mediados por diferentes rutas de 2° mensajeros.

#### *Canales de $\text{K}^+$ dependientes de voltaje*

Los canales de  $\text{K}^+$  participan en la regulación tanto del potencial de membrana en reposo como de los potenciales de acción, por lo que se puede afirmar que, en términos generales, controlan la excitabilidad de las células. Para llevar a cabo estas funciones existen múltiples tipos de canales de  $\text{K}^+$ , muchos de los cuales se han identificado en células cromafines. Entre ellos destacan ciertos canales con características de rectificación retrasada cuya finalidad sería la repolarización de la membrana tras un potencial de acción. También existen diferentes tipos de canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos canales se activan cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  alcanza un determinado umbral y su función es producir un efecto hiperpolarizante.

Mediante la modulación de conductancias de  $\text{K}^+$ , determinadas señales hormonales pueden regular la amplitud y la duración de los potenciales de acción. Este proceso implica en la mayor parte de los casos la participación de proteínas G (Artalejo, 1995).

#### **Respuesta de las células cromafines a compuestos secretagogos**

Las características de los canales iónicos implicados en los potenciales de acción determinan su grado de participación en la despolarización inducida por acetilcolina, alto  $\text{K}^+$  o veratridina.

#### *Respuesta a acetilcolina*

Tras aplicación de acetilcolina, las células cromafines disparan potenciales de acción que implican la participación coordinada de todos los canales iónicos mencionados anteriormente.

La secuencia de procesos se inicia con la interacción de la acetilcolina con el receptor nicotínico. Esta interacción induce la apertura del canal iónico asociado y, por tanto,

produce una despolarización que, a su vez, activa los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . Tanto el receptor nicotínico, mediante desensibilización; como los canales activados por voltaje, mediante inactivación, se cierran rápidamente y la célula se repolariza con participación de conductancias de  $\text{K}^+$ , preparándose para una posterior señal. Determinadas bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática y del retículo endoplásmico son las encargadas de reducir la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a los niveles basales. En presencia continuada del agonista este proceso tarda en completarse y normalmente la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  permanece largo tiempo en un estado casi estacionario por encima del valor basal.

La acetilcolina también activa receptores metabotrópicos de tipo muscarínico. Estos receptores están asociados a una elevación transitoria de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mediante una liberación dependiente de  $\text{IP}_3$  de calcio almacenado en reservorios intracelulares, elevación que en algunos casos es suficiente para promover secreción de catecolaminas. La contribución al proceso secretor de receptores colinérgicos nicotínicos y muscarínicos es altamente variable entre las diferentes especies animales. Así, mientras en la médula adrenal de pollo el componente muscarínico es el protagonista de la secreción estimulada por acetilcolina, las células cromafines bovinas no experimentan secreción mediante aplicación de agonistas muscarínicos. En otras especies, como en gato, rata, perro o cobaya, el comportamiento es mixto y ambos componentes participan en la respuesta secretora fisiológica (Ledbetter y Kirshner, 1975; Knight y Baker, 1986; Ballesta *et al.*, 1989).

En algunas especies se ha descrito que la activación de receptores muscarínicos induce respuestas secretoras a través de mecanismos adicionales que implican, por ejemplo, proteínas G (Artalejo, 1995).

Aunque es ampliamente aceptado que la acetilcolina es el neurotransmisor de la sinapsis espláncnico-cromafín, determinados estudios han demostrado que existe un claro componente no colinérgico, sobre todo a bajas frecuencias de estimulación (Malhotra y Wakade, 1987). Dicho componente se asocia con la liberación de determinados péptidos a partir de las fibras preganglionares. Entre los péptidos que podrían desempeñar esta función biológica están el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y el péptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria (PACAP), aunque el mecanismo preciso por el que promueven la liberación de catecolaminas no se conoce todavía (Wakade *et al.*, 1991; Watanabe *et al.*, 1995).

#### *Respuesta a alto cloruro potásico*

Puesto que el potencial de membrana en reposo está gobernado por la conductancia al  $\text{K}^+$ , la membrana celular se comporta como un electrodo de  $\text{K}^+$  y despolariza cuando se eleva la  $[\text{K}^+]_{\text{extracelular}}$ . La despolarización sostenida que se produce activa de modo directo los canales activados por voltaje, los cuales rápidamente se inactivan a pesar de que la membrana continúe despolarizada largo tiempo.

Mediante esta estrategia experimental los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  son activados independientemente de procesos que pudieran afectar los potenciales de acción (por

ejemplo, conductancias de  $K^+$ ), por lo que dicha estrategia resulta muy útil para estudiar posibles modulaciones de los canales de  $Ca^{2+}$  voltaje-dependientes.

Diferentes investigadores han observado que, a pesar de la rápida inactivación de los canales de  $Ca^{2+}$ , la  $[Ca^{2+}]_i$  permanece elevada durante todo el tiempo que las células se incuban con KCl. Este hecho sugiere que los procesos de extrusión de  $Ca^{2+}$  al medio extracelular o su secuestro en almacenes intracelulares pudieran ser también dependientes de voltaje, de tal manera que no funcionasen o no fuesen del todo activos hasta la repolarización de la membrana (Calvo *et al.*, 1995).

#### *Respuesta a veratridina*

Los canales de  $Na^+$  dependientes de voltaje experimentan procesos de activación espontánea que en condiciones fisiológicas no inducen potenciales de acción. La rápida inactivación de estos canales se puede inhibir con veratridina. Este compuesto permite que en cuestión de segundos se acumule un número considerable de canales de  $Na^+$  abiertos lo que se traduce en una despolarización de la membrana. La veratridina produce una despolarización lenta y sostenida de las células cromafines que normalmente se asocia con oscilaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  (López *et al.*, 1995). Como estrategia experimental resulta un modo alternativo de activar los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje.

#### **Acoplamiento estímulo-secreción**

Las neuronas motoras que inervan el tejido muscular estriado liberan el neurotransmisor acetilcolina en la unión neuromuscular. La acetilcolina despolariza la célula muscular produciendo un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  que se traduce en una contracción muscular. Este proceso, en términos globales, se denominó acoplamiento estímulo-contracción (Katz, 1961). Por analogía, Douglas y Rubin en 1961 denominaron acoplamiento estímulo-secreción al proceso de estimulación por acetilcolina de las células cromafines y posterior exocitosis del contenido de los gránulos (Douglas y Rubin, 1961).

Tras el transporte de vesículas hasta las inmediaciones de la membrana plasmática, el proceso de exocitosis constituye la fusión de ambas membranas y el vertido de los componentes intravesiculares al medio extracelular. Cualquier célula del organismo presenta el tipo de exocitosis denominada constitutiva, una fusión continua de vesículas cuyo objetivo es el transporte de membrana y de proteínas de membrana desde el aparato de Golgi hasta la propia membrana plasmática. La acción biológica de determinadas células (neuronas, células neurosecretoras, células endocrinas) requiere procesos de exocitosis de vesículas especializadas bajo estímulos específicos. Este tipo de exocitosis recibe el nombre de exocitosis regulada. Una diferencia importante entre ambos mecanismos es que la exocitosis regulada tiene un requerimiento absoluto de incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , utilizando esencialmente el mismo mecanismo que la secreción constitutiva pero con componentes reguladores adicionales (Burgoyne y Morgan, 1993).

La exocitosis regulada implica la secreción del contenido de diferentes tipos de vesículas. Las terminales nerviosas de la unión neuromuscular o de las sinapsis rápidas del sistema nervioso central contienen vesículas pequeñas de núcleo de baja densidad bajo microscopía electrónica (Landis *et al.*, 1988). Las neuronas que liberan neuropéptidos, las células cromafines y otras células endocrinas poseen vesículas de mayor tamaño y cuyo núcleo presenta una alta densidad electrónica (Burgoyne, 1991; Thomas-Reetz y De Camilli, 1994; Engisch y Nowycky, 1996). En las sinapsis del primer grupo, la liberación de neurotransmisores ocurre con una escala de tiempo de 100  $\mu$ s, período en el que se completa tanto la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  como la fusión de vesículas con la membrana y liberación de su contenido. Por el contrario, la exocitosis en células neuroendocrinas es mucho más lenta (50 ms-1 s). Este hecho sugiere que el mecanismo a través del cual se produce la exocitosis en ambos tipos de células no tiene necesariamente que ser el mismo. De hecho, los estudios realizados a nivel molecular muestran que, aunque comparten muchas características, ciertas proteínas encontradas en las sinapsis rápidas no se han identificado en las células neuroendocrinas (Burgoyne y Morgan, 1993).

Hoy día se conocen muchas de las proteínas implicadas en el proceso de exocitosis en sinapsis rápidas. Estas incluyen proteínas asociadas con interacciones vesícula-citoesqueleto (CaM PKII, sinapsina I, F-actina), proteínas implicadas en el transporte y posicionamiento de las vesículas en la membrana (rab3, proteína de fusión sensible a N-etilmaleimida (NSF)/proteínas solubles de interacción con NSF (SNAPs), sintaxinas, sinaptotagmina, sinaptobrevina, neurexinas) y proteínas implicadas con el proceso de fusión (sinaptofisina) (para revisión ver Nicholls, 1994; Sudhof, 1995). El hecho de que estas vesículas sinápticas sean tan pequeñas, y, por tanto, su contenido proteico bastante limitado; ha permitido su caracterización casi completa, aunque obviamente queda mucho camino que recorrer, especialmente en lo referente a su función. Por el contrario, la enorme cantidad de proteínas presentes en los gránulos cromafines, así como la ausencia de estructuras de membrana especializadas (zonas activas), han dificultado la identificación de proteínas implicadas en la exocitosis en células cromafines. No obstante, algunas de las proteínas mencionadas anteriormente también se han encontrado en células cromafines: sinaptotagmina, rab3, NSF/SNAPs o sinaptobrevina (Burgoyne *et al.*, 1993; Hohne-Zell *et al.*, 1994; Morgan y Burgoyne, 1995).

El empleo de células cromafines permeabilizadas con digitonina ha permitido la obtención de información muy valiosa en cuanto a la identificación de proteínas implicadas en la exocitosis (Dunn y Holz, 1983). En esta preparación de células, la digitonina produce poros en la membrana a través de los cuales se puede reintroducir  $\text{Ca}^{2+}$ , y, por tanto, simular el proceso exocitótico. Por estos poros también permean (o se reintroducen experimentalmente) diferentes proteínas citoplásmicas. La relación existente entre la pérdida (o la reintroducción) de determinadas proteínas y la extensión de la exocitosis ha hecho posible identificar y estudiar determinados componentes del proceso (Sarafian *et al.*, 1987). Entre éstos destaca la anexina II, una proteína que une

Ca<sup>2+</sup> y fosfolípidos con capacidad de agregar gránulos cromafines *in vitro* en presencia de Ca<sup>2+</sup> (Chasserot-Golaz *et al.*, 1996). Otras son las proteínas Exo1 y Exo2, que se asocian con efectos estimuladores de la exocitosis dependiente de Ca<sup>2+</sup> (Morgan y Burgoyne, 1992). Este campo de investigación está en constante expansión, y, con bastante frecuencia, se descubren nuevos aspectos del proceso secretor.

La alta rapidez de respuesta de las sinapsis del sistema nervioso central se basa principalmente en la existencia en las llamadas zonas activas de algún tipo de interacción entre los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje y una serie de vesículas listas para ser secretadas en la zona subplasmalemal (Pumplin *et al.*, 1981; Llinas *et al.*, 1992). La entrada masiva de Ca<sup>2+</sup> durante un potencial de acción a través de estos canales incrementa considerablemente y de forma muy rápida la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en el entorno de estas vesículas. Se ha estimado que la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> próxima a los canales podría ser de hasta 100 μM. Aunque no se conoce con certeza la identidad del sensor de Ca<sup>2+</sup> que inicia el proceso excitotico, sí se conoce que tiene una afinidad para el calcio de 10-100 μM (Augustine y Neher, 1992; Llinas *et al.*, 1992; Engisch y Nowycky, 1996).

En células cromafines la existencia de zonas activas de exocitosis ha sido siempre objeto de controversia. Recientemente se ha descrito mediante sofisticadas técnicas de imagen que existe una colocalización muy fiable de los sitios de entrada de Ca<sup>2+</sup> y de los lugares de la membrana en los que ocurre secreción; si bien este resultado sólo se observa con estímulos de corta duración. Cuando las células son despolarizadas durante períodos mayores de 100 ms, los sitios de exocitosis y de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> elevada se observan en todo el perímetro de la membrana de las células cromafines (Robinson *et al.*, 1995). Por otro lado, resulta obligatorio comentar que en células cromafines el principal estímulo para la secreción es un incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> debido a la entrada desde el medio extracelular. Aunque existen sustancias capaces de movilizar calcio almacenado en reservorios intracelulares (histamina, ATP, etc.), su eficacia a la hora de promover secreción depende enormemente de su capacidad de estimular al mismo tiempo rutas de entrada de calcio desde el medio extracelular (Cheek *et al.*, 1989; Burgoyne, 1991). Estos resultados sugieren que, aunque no tan estrecha como en las sinapsis rápidas, en células cromafines existe una asociación entre los gránulos listos para ser secretados y los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje. Un acoplamiento más eficaz con determinados subtipos de canales de Ca<sup>2+</sup> explicaría también el diferente comportamiento inhibitorio de los bloqueantes de canales de Ca<sup>2+</sup> (Artalejo *et al.*, 1994; López *et al.*, 1994).

Otra posible explicación a la diferente capacidad de respuesta de las sinapsis rápidas y las células cromafines surgió originalmente de los estudios de microscopía electrónica. En las uniones neuromusculares o en las sinapsis del sistema nervioso central es frecuente observar la existencia de un número de vesículas que interaccionan físicamente con la membrana plasmática y que estarían listas para ser secretadas (Landis *et al.*, 1988). Por el contrario, en las células neurosecretoras, aunque también existe un "pool" de vesículas listas para su liberación, estas vesículas no interaccionan físicamente con la membrana plasmática sino que están separadas de ella por (e

inmersas en) una compleja red de citoesqueleto. Tras la activación de las células cromafines y la elevación de la  $[Ca^{2+}]_i$  se ha observado una desorganización de la red de actina (Cheek y Burgoyne, 1986; Burgoyne *et al.*, 1989b; Vitale *et al.*, 1995). Parece muy plausible que el acceso de los gránulos secretores a la membrana plasmática esté restringido por esta estructura del citoesqueleto subplasmalemal, si bien se ha descrito que su desorganización no es suficiente para que exista exocitosis (Burgoyne *et al.*, 1989b).

Estos resultados indican que deben existir múltiples etapas cinéticas en el proceso exocitótico que den cuenta del transporte de vesículas y de su interacción con la membrana. La aplicación de la tecnología del "patch-clamp" ha posibilitado un profundo estudio cinético de estas etapas. Esta técnica permite una estimación real de los procesos exocitóticos de vesículas individuales mediante medidas de capacitancia de la membrana (Neher y Marty, 1982). La exocitosis ha podido resolverse en, al menos, 2 etapas: una etapa rápida, independiente de ATP, que implica la liberación de vesículas listas para ser secretadas; y una etapa lenta, que requiere ATP y es sensible a la temperatura, cuya finalidad es la translocación de gránulos desde un "pool" de reserva hasta las cercanías del lugar exocitótico (Burgoyne, 1991; Neher y Zucker, 1993; Parsons *et al.*, 1995).

### **Rutas de 2º mensajeros en células cromafines**

Multitud de trabajos de investigación han demostrado que las células cromafines poseen receptores para una gran cantidad de agentes hormonales. Estas sustancias constituyen una larga lista compuesta por, entre otras, histamina, ATP, adenosina, GABA, diferentes péptidos, endotelina, dopamina (para revisión ver Burgoyne, 1991). La interacción de estos compuestos con sus receptores presentes en la membrana de las células cromafines modula la respuesta secretora fisiológica a través de diferentes rutas de 2º mensajeros. Además de los efectos moduladores mediados por esta pléyade de receptores, la propia señal colinérgica promotora de la respuesta de secreción se asocia también con la activación de rutas de señalización intracelular (PKC, AMPc, GMPc, etc.), cuya finalidad es la regulación de la propia secreción mediante, por ejemplo, una síntesis más activa de catecolaminas u otros mecanismos.

### *Proteínas G*

Las proteínas ligantes de nucleótidos de guanina (proteínas G) constituyen una compleja familia de proteínas de membrana que sirven de nexo para la comunicación entre receptores y sistemas efectores (los cuales, a su vez, pueden ser también sistemas de transducción de señales). Los miembros de esta familia, mediante interacciones proteína-proteína, transducen la señal biológica desde receptores para diferentes sustancias hasta enzimas como la adenilato ciclasa, la fosfolipasa C, o incluso hasta canales iónicos en la membrana (para revisión general ver Nicholls, 1994).

En células cromafines, las proteínas G son responsables del elemento regulador mejor conocido, y posiblemente más importante, de la secreción de catecolaminas: la

autoinhibición de la secreción por los productos secretados (Doupnik y Pun, 1994; Albillos *et al.*, 1996a; Currie y Fox, 1996).

En el campo de investigación de las proteínas G, una de las herramientas farmacológicas más poderosas es la toxina pertúsica (PTx), extraída de la bacteria *Bordetella pertussis*. Esta toxina bacteriana cataliza específicamente una ADP-ribosilación de las isoformas  $G\alpha_0$  y  $G\alpha_i$  de proteínas G, lo que se traduce en una inactivación permanente de su actividad biológica. La preincubación de las células cromafines con la PTx produce un dramático efecto estimulador sobre la secreción de catecolaminas (Blocklehurst y Pollard, 1988; Ceña *et al.*, 1991). Aunque diferentes grupos de investigación han dedicado importantes esfuerzos a esta cuestión, no existe un consenso pleno sobre el mecanismo molecular implicado en este incuestionable efecto de la PTx.

La opinión más generalizada es que la toxina desacopla un efecto inhibitorio directo sobre canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje mediado por la activación de autorreceptores para productos secretados por las células cromafines (Albillos *et al.*, 1996a; Currie y Fox, 1996). Entre los diferentes productos secretados con capacidad de activar este mecanismo destacan los péptidos opiáceos y, sobre todo, el ATP. Merece la pena recordar que la concentración intragranular de ATP está en el rango molar y, por tanto, durante la respuesta secretora, el medio extracelular que rodea las células debe contener una concentración de ATP suficiente para activar los receptores purinérgicos acoplados a proteínas G.

Por otro lado, como posible explicación al efecto estimulador de la toxina pertúsica, otros autores han sugerido la participación de conductancias de  $K^+$ . En el contexto de este mecanismo, la actividad tónica de canales de  $K^+$  regulados por proteínas G controlaría la secreción de catecolaminas mediante un incremento en la velocidad de repolarización y, por tanto, una disminución de la entrada de  $Ca^{2+}$  a las células (Cannon *et al.*, 1994; Walsh *et al.*, 1996).

Las proteínas G participan no sólo en procesos modulatorios sino también en mecanismos de iniciación de la respuesta secretora. Así, en células cromafines de cobaya, las proteínas G están implicadas en la activación de canales catiónicos por agentes muscarínicos. Dichos canales catiónicos contribuyen a la despolarización de la membrana en estas células, en las cuales existe un claro componente muscarínico en la secreción (Inoue e Imanaga, 1995).

### Calcio

Además del importante papel de los iones  $Ca^{2+}$  en el proceso de exocitosis, los incrementos en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducidos tanto por compuestos secretagogos como mediante la liberación de calcio almacenado en el retículo endoplásmico activan directamente rutas de señalización intracelular. Entre estos sistemas destacan las señales mediadas por la proteína quinasa C (PKC) y por la proteína ligante de calcio, calmodulina (Burgoyne, 1991).

En células cromafines se han descrito diferentes efectos de la activación de PKC sobre la respuesta secretora. En primer lugar, la PKC está implicada en la dinámica de la red de citoesqueleto presente en la zona cortical de las células cromafines. Así, se ha descrito que los ésteres de forbol, análogos estructurales del diacilglicerol, el activador fisiológico de la PKC; inducen desorganización de los filamentos de actina, un proceso que facilita la exocitosis (Grant y Aunis, 1990; Vitale *et al.*, 1992). Por otro lado, en estudios recientes utilizando técnicas electrofisiológicas, Gillis *et al.* han descrito que la PKC estimula la secreción de catecolaminas mediante un aumento del número de vesículas listas para ser secretadas; a pesar de que, según estos autores, la activación de la PKC inhibe las corrientes de  $Ca^{2+}$  a través de canales dependientes de voltaje (Gillis *et al.*, 1996). En células intactas, Sena *et al.* han descrito que la respuesta secretora está gobernada por el efecto inhibitorio de PKC sobre los canales de  $Ca^{2+}$  voltaje-dependientes, de tal manera que estos autores no observaron un efecto estimulador sino una inhibición de la secreción estimulada después de preincubación con ésteres de forbol (Sena *et al.*, 1995).

Un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  también activa la proteína calmodulina. El complejo activo  $Ca^{2+}$ /calmodulina es responsable de la activación de numerosas enzimas, entre las que destacan las quinasas dependientes de  $Ca^{2+}$ /calmodulina (CaM PKs). La isoforma CaM PKII es la quinasa dependiente de  $Ca^{2+}$  predominante en neuronas, en las que da cuenta de un 1 % de la proteína total del cerebro (Hanson y Schulman, 1992). Esta isoforma ha sido también detectada en células cromafines bovinas (Yanagihara *et al.*, 1994).

Entre los sustratos fosforilados por CaM PKII en células cromafines está la enzima tirosina hidroxilasa (Haycock, 1990). Puesto que la fosforilación de TH se asocia con un incremento de la síntesis de catecolaminas y la CaM PKII se activa durante la estimulación colinérgica de las células, la fosforilación de TH por CaM PKII podría ser un importante mecanismo de regulación *in vivo* de la síntesis de catecolaminas. En este punto merece la pena comentar que la TH de células cromafines también se fosforila *in vitro* por PKC, por lo que esta enzima clave en el metabolismo de las catecolaminas es sustrato de diferentes quinasas que se activan durante la estimulación de las células (Haycock, 1993; Kumer y Vrana, 1996).

Por otro lado, mediante estudios llevados a cabo en células permeabilizadas, se ha descrito que la calmodulina podría estar implicada en el proceso excitotóxico. La calmodulina es capaz de interaccionar con gránulos cromafines, aunque el papel exacto de esta interacción no está claro (Bader *et al.*, 1985; Okabe *et al.*, 1992).

#### *Nucleótidos cíclicos*

En células cromafines, las rutas de 2° mensajeros basadas en nucleótidos cíclicos son quizás las peor conocidas. En ocasiones, este desconocimiento resulta, no de la ausencia de estudios, sino de la existencia de resultados contradictorios en la Bibliografía.

Se ha descrito que los niveles intracelulares de AMPc se incrementan de manera transitoria después de un estímulo secretor. Este hecho se ha explicado mediante la

activación de una adenilato ciclasa sensible a  $Ca^{2+}/CaM$ , una enzima que se ha identificado en células cromafines bovinas (LeDonne y Coffee, 1980; Anderson *et al.*, 1992). Los efectos del AMPc están mediados por fosforilación de sustratos proteicos por la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA). De hecho, en células cromafines bovinas, la PKA fosforila la enzima TH y, por tanto, se suma al efecto estimulador de la síntesis de catecolaminas (Haycock, 1993).

Respecto al efecto del AMPc sobre la respuesta secretora se han descrito tanto efectos inhibitorios como estimulatorios (Peach, 1972; Gutman y Boonyaviroj, 1979; Baker *et al.*, 1985; Chern *et al.*, 1988; Parramón *et al.*, 1995). Entre los efectos estimulatorios merece la pena destacar los trabajos de los grupos de Morita y Artalejo. Morita *et al.* describieron un incremento de la secreción de catecolaminas por el 8-bromo-AMPc, un análogo permeable de AMPc, y la forskolina, un activador de la adenilato ciclasa. Estos autores explicaron este resultado mediante una inhibición por PKA de la ATPasa de  $Na^+/K^+$  de la membrana. Una reducción de la actividad de esta enzima resultaría en una acumulación intracelular de  $Na^+$  y, por tanto, en una despolarización (Morita *et al.*, 1991).

Por otro lado, Artalejo *et al.* encontraron que las corrientes de calcio de tipo L están reguladas por un complejo mecanismo que denominaron "facilitación". Según estos autores, cuando las células son sometidas a prepulsos despolarizantes o a agentes que incrementan los niveles de AMPc; canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L, hasta ese momento inactivos, son activados y participan notablemente en una potenciación de la secreción. Una fosforilación de canales de tipo L por PKA sería el mecanismo responsable de la facilitación observada con agentes que incrementan el AMPc intracelular (Artalejo *et al.*, 1994). No obstante, merece la pena puntualizar que la existencia de este mecanismo regulatorio de "facilitación" es actualmente objeto de controversia. Una regulación por fosforilación de canales de  $Ca^{2+}$  también ha sido sugerida por Mateo *et al.* Estos autores demostraron que la activación de fosfatasa intracelulares conduce a una reducción de la entrada de  $Ca^{2+}$  asociada a la estimulación de las células, aunque el subtipo exacto de canal de  $Ca^{2+}$  no fue estudiado (Mateo *et al.*, 1995)

Respecto al GMPc, los primeros datos acerca de la existencia de una ruta de 2º mensajeros basada en el GMPc en células cromafines fueron aportados por Aunis *et al.* en 1978. Estos autores detectaron una actividad enzimática de guanilato ciclasa en fracciones solubles y particuladas de médula adrenal bovina (Aunis *et al.*, 1978). Posteriormente, empleando células cromafines bovinas, otros investigadores describieron que secretagogos como acetilcolina, a través de la activación de receptores muscarínicos, eran capaces de incrementar los niveles de GMPc intracelular (Schneider *et al.*, 1979; Lemaire *et al.*, 1981; Derome *et al.*, 1981; Nakaki *et al.*, 1988). Por otro lado, en glándulas adrenales de perro, Dohi *et al.* describieron notables aumentos en los niveles de GMPc por compuestos como azida sódica, hidroxilamina, nitrito sódico e incluso óxido nítrico gas (Dohi *et al.*, 1983).

La existencia en células cromafines de receptores para péptidos natriuréticos acoplados a una actividad guanilato ciclasa intracelular se ha puesto de manifiesto en numerosos trabajos de investigación. Merece la pena destacar que las células cromafines producen, almacenan y liberan los 3 miembros de la familia de péptidos natriuréticos: ANP, BNP y CNP (Ong *et al.*, 1987; Pruss y Zamir, 1987; Okazaki *et al.*, 1989; Nguyen *et al.*, 1990; Babinski *et al.*, 1992; 1995; Niina *et al.*, 1996).

Respecto a la enzima NOS, Palacios *et al.* describieron la existencia de una producción endógena de NO en preparaciones citosólicas de glándula adrenal bovina. Estos autores demostraron también que el NO endógeno era capaz de activar una guanilato ciclasa soluble presente en esta preparación biológica (Palacios *et al.*, 1989).

En cuanto a la localización exacta de la enzima NOS en células cromafines, los primeros estudios histoquímicos no detectaron la enzima en estas células, aunque fueron capaces de encontrarla en neuronas y fibras nerviosas de la glándula adrenal (Bredt *et al.*, 1990; Dawson *et al.*, 1991; Afework *et al.*, 1992; Marley *et al.*, 1995). Por el contrario, otros estudios detectaron la enzima NOS tanto en neuronas como en células cromafines dentro de la médula adrenal (Dun *et al.*, 1993; Heym *et al.*, 1994). Como se puede deducir a partir de estos resultados, no existe un consenso claro acerca de la presencia de la enzima NOS en las células cromafines.

Tampoco está muy claro cuál es el efecto del NO/GMPc sobre la respuesta secretora de las células. Mientras una serie de investigaciones han mostrado la existencia de efectos inhibitorios (Derome *et al.*, 1981; Torres *et al.*, 1994; Babinski *et al.*, 1995), otros han descrito un efecto dual, estimulador a bajas dosis de secretagogo e inhibitorio a altas (O'Sullivan y Burgoyne, 1990; Oset-Gasque *et al.*, 1994); e incluso otros no han encontrado ningún efecto del GMPc sobre la secreción de catecolaminas (Moro *et al.*, 1993; Marley *et al.*, 1995). En cualquiera de los casos, no se ha estudiado el mecanismo exacto a través del cual el NO/GMPc podría ejercer estos efectos. Esta ruta de 2º mensajeros constituye quizás el menos conocido de los sistemas de señalización intracelular presentes en células cromafines.



## **II. OBJETIVOS**



Durante los últimos años, la ruta de señalización intracelular del NO/GMPc ha acaparado un enorme interés científico, de tal manera que se ha llegado a un conocimiento importante del papel de este sistema en numerosos procesos biológicos. No obstante, la función que el NO desempeña en el complejo proceso de la neurotransmisión es todavía una asignatura pendiente, básicamente debido a la dificultad experimental que plantea el estudio de los mecanismos neuronales a nivel molecular. Las células cromafines de la médula adrenal bovina constituyen un modelo experimental muy adecuado para estudiar la modulación de la neurosecreción por sistemas de segundos mensajeros. Estas células son relativamente fáciles de obtener como una población homogénea y se pueden mantener en cultivo con objeto de realizar cualquier tipo de estudio bioquímico. Varios grupos de investigación han dedicado tiempo y esfuerzo a estudiar el papel del NO/GMPc en el proceso secretor cromafín. Sin embargo, la existencia de resultados contradictorios, por un lado, y la ausencia de un estudio profundo del mecanismo molecular implicado, por otro, no han permitido hasta el momento obtener una idea clara acerca de la función de la vía NO/GMPc en el proceso de la neurosecreción. El presente trabajo de investigación se fijó los siguientes objetivos:

- 1) Identificar en células cromafines bovinas en cultivo los elementos de señalización intracelular del sistema NO/GMPc: óxido nítrico sintasa, guanilato ciclasas y proteína quinasa dependiente de GMPc.
- 2) Estudiar la regulación de los niveles intracelulares de GMPc por compuestos secretagogos y por activadores directos de las isoformas de guanilato ciclasa soluble y particulada: donadores de NO (SNP) y el péptido natriurético de tipo C, respectivamente. Estudiar el efecto de determinados inhibidores de la NOS y de la GCS sobre los niveles del nucleótido cíclico.
- 3) Estudiar la posible modulación por GMPc de la secreción de catecolaminas mediante diferentes aproximaciones experimentales: a) activación de las isoformas de guanilato ciclasa soluble y particulada por SNP y CNP, respectivamente; b) inhibición de la hidrólisis de GMPc por zaprinast; c) empleo de análogos permeables de GMPc. Analizar la participación de la proteína quinasa dependiente de GMPc en esta posible modulación de la secreción de catecolaminas en células cromafines bovinas en cultivo.
- 4) Analizar el mecanismo molecular implicado en la posible modulación por GMPc de la respuesta secretora. Estudiar el efecto de la activación de esta ruta de 2º mensajeros sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  y sobre la actividad de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1.MATERIALES

### Productos

Los materiales utilizados en este trabajo de investigación fueron de las siguientes casas comerciales.

Los plásticos de cultivo utilizados fueron: botellas de 75 cm<sup>2</sup> de FALCON, multiplacas de 24 pocillos (2 cm<sup>2</sup>/pocillo) de COSTAR y cámaras portaobjetos para cultivos (Microslides Chambers, 10 cm<sup>2</sup>/cámara) de NUNC.

Como anticuerpos se han utilizado:

Primarios:

-anti-NOS I policlonal de conejo (No.6761-9) generado de acuerdo al método descrito por Schmidt *et al.* (1992a) en el laboratorio del Profesor Ulrich Förstermann del Departamento de Farmacología de la Universidad Johannes Gutenberg, Mainz (Alemania).

-anti-NOS II monoclonal de ratón de TRANSDUCTION LABORATORIES.

-anti-NOS III (H32) monoclonal de ratón de ABBOTT LABORATORIES.

-anti-GCS subunidad  $\alpha$  y  $\beta$ , anticuerpos policlonales de conejo generados frente a las subunidades  $\alpha$  (GCpep8) y  $\beta$  (GCpep3) de GCS en el laboratorio de la Dra. Doris Koesling del Departamento de Farmacología de la Universidad Libre de Berlín (Alemania) de acuerdo al método descrito por Guthmann *et al.* (1992).

-anti-TH monoclonales de ratón de CHEMICON o SIGMA.

-anti-PNMT policlonal de conejo de DIANOVA.

-anti-PKG subunidades I $\alpha$  y I $\beta$  policlonal de conejo de CALBIOCHEM.

Secundarios:

-anti-IgG FITC, anti-IgG de cabra o de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) de VECTOR LABORATORIES o de SIGMA.

-anti-IgG Cy3, anti-IgG de conejo conjugado a indocarbocianina (Cy3) de DIANOVA.

-anti-IgG TRITC, anti-IgG de conejo conjugado a isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) de SIGMA.

-anti-IgG HRP, anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa (HRP) de AMERSHAM.

-anti-IgG de ratón generado en cabra y ligado a agarosa de SIGMA.

-anti-IgG de conejo o caballo biotinilados de VECTOR LABORATORIES.

Controles negativos:

-suero normal de conejo de SIGMA o de VECTOR LABORATORIES.

-IgG no antigénica de ratón de SIGMA o de VECTOR LABORATORIES.

Los oligonucleótidos iniciadores específicos para NOS I bovina utilizados para amplificación en reacción en cadena de la polimerasa fueron obtenidos en el Departamento de Farmacología de la Universidad Johannes Gutenberg de Mainz (Alemania) de acuerdo al método descrito por Bredt *et al.* (1991a).

Los isótopos [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP, [ $^{32}\text{P}$ ]-ortofosfato, L-[2,3,4,5- $^3\text{H}$ ]-arginina, o productos relacionados con isótopos como los kits para radioinmunoensayo de GMPc y AMPc basados en  $^3\text{H}$ , las películas fotográficas Hyperfilm- $\beta$ max (18x24 cm) y los casetes para autorradiografía (18x24 cm), así como el complejo de peroxidasa biotinilada-streptavidina, los reactivos para ECL (Enhanced Chemoluminescence Western blotting), las membranas de nitrocelulosa para inmunotransferencia Hybond ECL y las películas Hyperfilm-ECL fueron de AMERSHAM. Las membranas Centricon-30 para concentrar proteínas fueron de AMICON. El colágeno aislado de placenta bovina fue de BIOCHROM. El análogo permeable de GMPc, 8-*p*-clorofeniltioguanosina 3':5'-monofosforotioato cíclico, isómero Rp (Rp-8-*p*CPT-GMPcS) fue de BIOLOG. La resina de intercambio iónico Dowex 50W-X8,  $\beta$ -mercaptoetanol, dodecilsulfato sódico (SDS), geles de 10 % (p/v) acrilamida preparados para el sistema mini-Protein II fueron de BIO-RAD. También fue de esta compañía el reactivo de ensayo de proteínas basado en la detección espectrofotométrica del complejo proteína-Azul de Coomassie Brillante G-250 (Bradford, 1976). La colagenasa (EC.3.4.24.3) de *Clostridium histolyticum*, HEPES, fluoruro de fenilmetilsulfonilo, los análogos permeables de GMPc 8-bromo-GMPc (8Br-GMPc) y dibutiril-GMPc (db-GMPc), así como el de AMPc dibutiril AMPc (db-AMPc), fueron de BOEHRINGER MANNHEIM. La proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG, EC 2.7.1.37, isoforma I $\alpha$  bovina, recombinante), el péptido inhibidor de proteína quinasa A IP $_{20}$ -amido, los inhibidores de proteínas quinasas N-[2-(metilamino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida (H-8) y N-[2-((*p*-bromocinamil) amino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida (H-89), calmidazolium, ionomicina y forskolina de *Coleus forskohlii* fueron de CALBIOCHEM. El medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) y el suero bovino fetal normal o inactivado por calor fueron de GIBCO. Los antibióticos penicilina/streptomycin, kanamicina y anfotericina fueron de ICN. Las soluciones de revelador y fijador GBX para autorradiografías fueron de KODAK. El reactivo transcriptasa reversa SuperScript fue de LIFE TECHNOLOGIES. El azul Tripán, ácido tricloroacético, ninhidrina, ácido ascórbico, ácido perclórico y el detergente Triton X-100 fueron de MERCK. Las sondas fluorescentes Fura-2/AM y bisoxonol [Bis-(1,3-dibutiril-barbiturato)trimetino oxonol] fueron de MOLECULAR PROBES. Los patrones coloreados (rango 4-250 kDa) para electroforesis fueron de NOVEX. El péptido sustrato de la proteína quinasa dependiente de GMPc (RKRSRAE) y el péptido natriurético de tipo C fueron de PENINSULA. Las toxinas específicas de canales de calcio dependientes de voltaje  $\omega$ -agatoxina IVA y  $\omega$ -conotoxina GVIA fueron de PEPTIDE INSTITUTE, aunque algún lote adicional de ésta última toxina fue adquirido de SIGMA. La solución de Percoll, los oligonucleótidos iniciadores (random

primers) pd(N)<sub>6</sub> y el tampón de reacción para Taq polimerasa fueron de PHARMACIA. Los soportes de celulosa para cromatografía en capa fina fueron de POLYGRAM. El inhibidor de la fosfodiesterasa de GMPc, zaprinast (M&B 22,948) fue generosamente donado por Rhône-Poulenc Rorer Pharmaceuticals (Dagenham, Essex, Inglaterra). La urografina empleada en los gradientes de densidad para purificar células cromafines fue de SCHERING. Los gases CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> y He, así como el N<sub>2</sub> líquido fue de la compañía SEO. La albúmina de suero bovino, el detergente Tween-20, (±) BayK 8644, rojo neutro, citosina arabinofuranósido, fluorodeoxiuridina, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), los ácidos etilendiamino tetracético (EDTA) y etilénbis(oxi-etileno nitrilo) tetracético (EGTA), el inhibidor de la enzima NOS N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME), L-arginina, L-citrulina, ATP, los inhibidores de proteasas leupeptina y pepstatina, AMPc, la histona F<sub>2b</sub>, el detergente Nonidet P40, azul de bromofenol, glicocola, adrenalina, noradrenalina, metabisulfito sódico, 3,4-dihidroxibenzilamina (DHBA), ácido octanosulfónico, 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), gelatina-glicerol, neomicina, toxina pertúsica de *Bordetella pertussis*, histamina, nitroprusiato sódico (SNP), muscarina, veratridina, 1,1-dimetil-4-fenil piperazinio (DMPP), acetilcolina, nifedipina, las tabletas de sustrato DAB para peroxidasa: 3,3'-diaminobencidina y los reactivos de grado ácido ribonucleico (RNA) isotiocianato de guanidinio, fenol, cloroformo y *n*-lauroilsarcosina fueron de SIGMA. El inhibidor específico de la guanilato ciclase soluble 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalín-1-ona (ODQ) fue de TOCRIS-COOKSON. La resina de intercambio iónico DEAE-celulosa y los filtros GF/C fueron de WHATMAN. El rotulador de preparaciones histológicas (Pap-Pen) fue de ZYMED. Otros reactivos y materiales de carácter general no indicados en esta extensa lista fueron de grado analítico.

### Instrumental general

A continuación se detalla una lista de aparatos de carácter general que se han empleado en la realización de este trabajo de investigación.

Para las centrifugaciones se emplearon las siguientes centrífugas:

Centrífuga de mesa de baja velocidad Omnifuge 2.0 RS Heraeus para la obtención y lavado de células cromafines bovinas.

Para la purificación de células cromafines en gradientes de densidad se empleó una centrífuga preparativa refrigerada Sorvall RC-5C.

En la mayoría de los experimentos se usaron microfugas para tubos Eppendorf de Beckman, Sigma o Denver Instruments.

Todas las tareas realizadas bajo atmósfera estéril se efectuaron con campanas de flujo laminar vertical Gelaire modelos Twin 30 y TC 48 de Flow. Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador Heraeus termostatzado a 37°C y con flujo controlado de CO<sub>2</sub> al 5 %.

Los materiales de cultivo se esterilizaron mediante autoclaves Autotester-G de Selecta (alta capacidad) o Certoclav (baja capacidad). Los medios de cultivo se esterilizaron por filtración empleando una bomba peristáltica Millipore y membranas Acrocap de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Gelman Sciences).

Para la perfusión de las glándulas adrenales bovinas se emplearon 2 bombas peristálticas LKB de Pharmacia con 3 canales cada una permitiendo la perfusión simultánea de 6 glándulas.

Para el conteo de células se utilizó un microscopio óptico Leitz HM-Lux3. Para la observación de los cultivos celulares se dispuso de un microscopio de contraste de fases Wilovert. Los estudios de inmunofluorescencia se analizaron con un microscopio invertido Nikon Diaphot-TMD usando una lámpara de mercurio también de Nikon. Las micrografías se realizaron en el mismo microscopio al que se le acopló una cámara Nikon HFX-DX.

Las suspensiones celulares se sonicaron en un sonicador Ultrasonic Braun Labsonic.

La radiactividad procedente de los emisores  $\beta$   $^3\text{H}$  y  $^{32}\text{P}$  se cuantificó en contadores de centelleo líquido Beckman LS 3801 y LS 6000 IC.

Las medidas de determinación de proteínas se realizaron en un espectrofotómetro Pharmacia LKB-Ultrospec III. Para la determinación fluorimétrica de catecolaminas, calcio libre citosólico y potencial de membrana se empleó un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 50 B controlado por ordenador y con baño termostatzado modelo Frigomix U.

Las determinaciones por HPLC se realizaron con un sistema alimentado con una bomba Spectra Physics SP 8800 con inyector manual Rheodyne. La detección electroquímica se realizó con un detector Metrohm 641 VA acoplado a un integrador modelo Chromjet de Spectra Physics.

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS se realizaron empleando el sistema mini-Protein II de Bio-Rad alimentado con una fuente modelo 200/2.0 también de Bio-Rad. Para secar los geles se empleó un secador modelo 543 de Bio-Rad al que se suministró vacío con una bomba de aceite Edwards VP 100. Los experimentos de inmunotransferencia se realizaron empleando el sistema mini-Trans Blot de Bio-Rad. El análisis cuantitativo de los autorradiogramas se realizó empleando un densitómetro Molecular Dynamics empleando el programa ImageQuant perteneciente al Instituto de Bioquímica (C.S.I.C.)-Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

Para las incubaciones que requirieron condiciones controladas de temperatura se emplearon placas calentadoras Plactronic y baños Tectron ó Unitronic 320 R de Selecta y calentador en multibloque de Lab-Line.

Cuando se necesitó aspirar medios se emplearon bombas de vacío Millipore o Eyela.

Para la preparación de disoluciones se emplearon balanzas de precisión AND ER-60 A y granatario AND FX2000, así como pHmetros Crison 2001 y Metrohm 654. Las soluciones o suspensiones se agitaron con agitadores magnéticos Agimatic-S de Selecta, orbitales Luckham 802 o para tubos Heidolph Reac 2000. El agua de alta calidad empleada para la preparación de las soluciones se obtuvo de un aparato Milli-Q Water Purification System de Millipore. Para la limpieza de todo tipo de material se empleó agua obtenida de un aparato Milli-Ro Plus también de Millipore. Una máquina Scotsman AF 10 produjo el hielo picado utilizado en muchos de los experimentos. Como cámara fría se emplearon frigoríficos de Liebherr. Para congelar se utilizaron congeladores Liebherr a -20°C y Revco a -80°C.

Las disoluciones se pipetearon empleando pipetas automáticas Gilson. En el área de cultivos se emplearon pipetas de aspiración Pipetboy Acu de Integra Biosciences. Para medidas de precisión de pequeños volúmenes (1-10  $\mu$ l) se emplearon jeringas Hamilton.

## 2.METODOS

### Obtención de células adrenomedulares

Las células cromafines se obtuvieron a partir de glándulas adrenales bovinas mediante perfusión con colagenasa (EC.3.4.24.3) y posterior purificación en gradiente de densidad según el método descrito por Miras-Portugal *et al.* (1985) y modificado por Wilson (1987).

Las glándulas adrenales bovinas procedían de animales sacrificados para el consumo humano en el matadero y se extrajeron de dichos animales unos 20-30 minutos después de su muerte. Las glándulas se trasladaron hasta el laboratorio en un medio salino a 4°C (solución lavado, ver composición en la siguiente tabla).

<b>Solución de lavado</b> (Solución de Locke para la obtención y aislamiento de células)	
NaCl	154.0 mM
KCl	5.6 mM
NaHCO <sub>3</sub>	3.6 mM
Glucosa	5.6 mM
HEPES	5.0 mM
pH 7.4	
Penicilina	50.0 UI/ml
Streptomicina	50.0 µg/ml
<b>Solución de lavado + albúmina</b> Solución de lavado conteniendo:	
Albúmina	2.5 g/l
<b>Solución para perfusión con colagenasa</b> Solución de lavado + albúmina conteniendo:	
Colagenasa	330 UI/l

Una vez en el laboratorio y aproximadamente 45 min-1 hora después de la muerte del animal, las glándulas se limpiaron del exceso de grasa y tejido conjuntivo que las rodeaba y se canularon a través del orificio de la vena medular central para su posterior perfusión.

Las características peculiares de la circulación adrenal posibilitan una adecuada perfusión de la médula adrenal a través de la vena medular central. La anatomía de los

vasos sanguíneos adrenales está basada en arterias adrenales que forman un plexo subcapsular a partir del cual 2 tipos de estrechos vasos se originan. Por un lado, las arterias corticales drenan la corteza, y, por otro, arterias medulares, más largas en longitud, cruzan la corteza sin ramificaciones y alcanzan la médula directamente. Los capilares corticales procedentes de las arterias corticales forman un plexo venoso que drena también en la médula. Por tanto, la médula recibe sangre arterial procedente de las arterias medulares y sangre venosa procedente de la corteza. Dentro de la médula, los capilares medulares convergen en la vena medular central que, por tanto, recibe toda la sangre que entra en la glándula (Vinson *et al.*, 1985). Esta vena medular central abandona la glándula por un ancho orificio fácilmente canulable para la perfusión, pudiendo considerarse ésta de carácter retrógrado, puesto que va de venas a arterias.

Para favorecer el flujo de las diferentes soluciones a través de la glándula, se efectuaron además pequeños cortes longitudinales en la superficie externa de las glándulas a nivel de cápsula y corteza.

Por medio de una jeringa y con objeto de eliminar la mayor cantidad posible de sangre retenida en los vasos, se introdujeron a través de la cánula varios mililitros de solución de lavado. Esta solución de lavado carece de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  con el fin de evitar la coagulación de la sangre en los vasos, y además labilizar las uniones celulares a través de desmosomas.

Seguidamente, las glándulas se perfundieron en un baño termostático a  $37^{\circ}\text{C}$  bajo atmósfera estéril, en primer lugar, con 200-300 ml de solución de lavado mediante el uso de una bomba peristáltica de flujo 1.5-2 ml/min por glándula. La segunda perfusión se realizó con otros 200-300 ml de la misma solución de lavado a la que se añadió albúmina de suero bovino para dar una concentración final de 2.5 g de albúmina/litro. El objeto de añadir albúmina es proteger en lo posible a las células frente a proteasas que se liberan de los tejidos durante la perfusión.

Por último, las glándulas se perfundieron en circuito cerrado con 200 ml de solución de lavado conteniendo colagenasa (330 U/litro). Debido a que la colagenasa comercial que se utilizó es en realidad una preparación cruda obtenida de la bacteria *Clostridium histolyticum* que contiene además de colagenasa (estrictamente clostridiopeptidasa A), otras proteasas, lipasas, etc.; a esta solución de perfusión se le añadió también albúmina de suero bovino con objeto de minimizar el daño celular producido por estas otras enzimas.

El tiempo de digestión con colagenasa fue de 1 hora aproximadamente. Ya que la matriz extracelular de la médula adrenal es mucho más sensible que la corteza a la acción de la colagenasa, transcurrido ese período la corteza permanece intacta y, sin embargo, la médula adrenal se digiere y presenta un aspecto reblandecido, pudiendo desprenderse fácilmente de la corteza. Para extraer la médula, las glándulas se abrieron longitudinalmente y, con la ayuda de un bisturí, las médulas se rasparon para obtener una papilla que contenía trozos de tejido sin digerir, matriz extracelular digerida y células adrenomedulares.

A continuación, esta papilla se pasó a través de una malla de nylon de 250  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro lavándose con solución de lavado. La solución obtenida se centrifugó en una centrífuga de mesa Heraeus de baja velocidad a 100xg durante 10 min a 20°C. El sobrenadante resultante se desechó y el sedimento conteniendo las células se resuspendió en solución de lavado, se pasó por una malla de nylon, esta vez de 82  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro, y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones que la vez anterior. El sedimento resultante contenía las células adrenomedulares totales.

### **Purificación de células cromafines mediante gradientes discontinuos de urografina**

2 diferentes técnicas se han usado para purificar células cromafines a partir de la suspensión inicial: 1) centrifugación isopícnica en gradiente de densidad, y 2) sembrado diferencial (Livett, 1984).

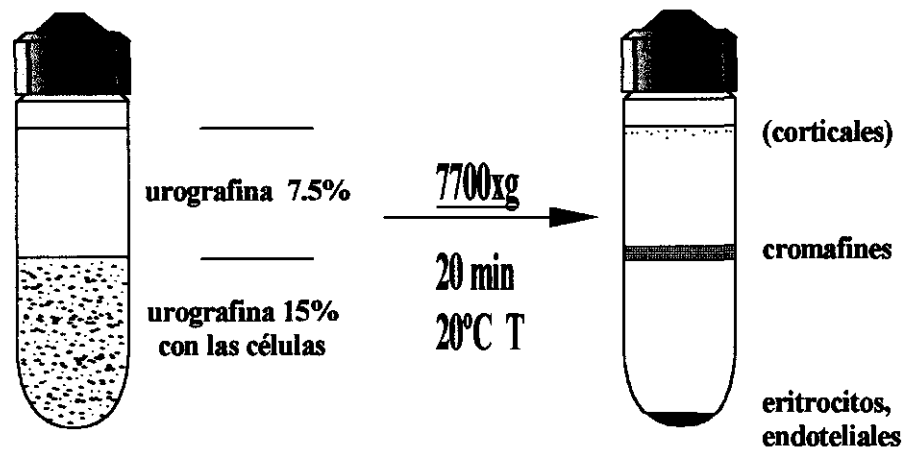
El primer método es quizás el más utilizado para obtener poblaciones puras a partir de mezclas complejas de diferentes tipos de células. Se basa en el hecho de que diferentes tipos celulares presentan diferentes densidades de flotación, de tal manera que centrifugadas en gradientes de naturaleza continua o discontinua equilibran en diferentes regiones a lo largo del tubo del gradiente.

Para la separación de células cromafines del resto de células que contaminan la suspensión inicial (principalmente endoteliales, eritrocitos, rara vez corticales, además de debris y otros fragmentos subcelulares) se han empleado 3 diferentes medios para crear gradientes de densidad: 1) albúmina de suero bovino, 2) Percoll, 3) urografina (Lemaire *et al.*, 1983; Kilpatrick *et al.*, 1980; Role y Perlman, 1980).

En experimentos preliminares, el uso de gradientes discontinuos de urografina resultó ser el método que ofreció una mayor pureza en cromafines. Por esta razón, se usó este tipo de gradiente en prácticamente todos los cultivos.

Urografina es el nombre comercial de una mezcla de amidotrizoato sódico y meglumina (10:66) (p/p) que se usa como medio de contraste para la urografía y la angiografía. La solución comercial es del 76 % (p/v) en urografina y el gradiente discontinuo consta de 2 fases, 15 y 7.5 % (ver esquema). Las células adrenomedulares totales se resuspendieron en la fase de urografina al 15 % y sobre ella se depositó la fase al 7.5 %. El gradiente se centrifugó a 7700xg durante 20 min a 20°C en una centrífuga Sorvall rotor SS-34.

Tras la centrifugación, las células cromafines equilibran en la interfase entre las 2 bandas de urografina, mientras que endoteliales y eritrocitos aparecen como un precipitado en el fondo del tubo. En raras ocasiones, una difusa banda de células corticales apareció en lo alto del tubo.



**Figura 1-III. Gradiente de Urografina.** Este esquema muestra el aspecto inicial y final del gradiente de urografina utilizado para purificar células cromafines.

La banda de células cromafines se recogió y las células se lavaron varias veces (al menos 2) con solución de lavado mediante centrifugaciones a baja velocidad para eliminar la urografina. Tras la última centrifugación las células se resuspendieron en 5-10 ml de medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's medium (ver composición en la tabla que se incluye).

Cuando las preparaciones de células cromafines obtenidas no resultaban de la pureza exigida para los experimentos (cromafines >85-90 %, ver capítulo siguiente), la purificación a partir de gradientes discontinuos de urografina se combinó con la técnica de sembrado diferencial para intentar en lo posible aumentar el grado de pureza del cultivo (Unsicker y Müller, 1981). Esta técnica explota las diferencias en las afinidades que los diferentes tipos de células que componen el cultivo tienen por las superficies de plástico de las placas de cultivo. Las células cromafines, como células neurales que son, tienen una baja afinidad para adherirse a los plásticos de cultivo, necesitando, o bien un tiempo considerable para fijarse al sustrato, o alternativamente, la ayuda de superficies tratadas con colágeno. Sin embargo, las células que contaminan el cultivo, mayoritariamente células endoteliales, presentan gran afinidad por el plástico por lo que requieren un tiempo mucho más corto para adherirse.

**Medio de Cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)**

<b>Componente</b>	<b>mg/l</b>
<b>Sales Inorgánicas</b>	
CaCl <sub>2</sub> (anhidro)	200.00
Fe(NO <sub>3</sub> )·9H <sub>2</sub> O	0.10
KCl	400.00
MgSO <sub>4</sub> (anhidro)	97.67
NaCl	6400.00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	125.00
<b>Otros componentes</b>	
D-Glucosa	1000.00
Rojo Fenol	15.00
Piruvato sódico	110.00
<b>Aminoácidos</b>	
L-Arginina·HCl	84.00
L-Cistina·2HCl	62.57
L-Glutamina	584.00
Glicocola	30.00
L-Histidina HCl·H <sub>2</sub> O	42.00
L-Isoleucina	105.00
L-Leucina	105.00
L-Lisina HCl	146.00
L-Metionina	30.00
L-Fenilalanina	66.00
L-Serina	42.00
L-Treonina	95.00
L-Triptófano	16.00
L-Tirosina Na <sub>2</sub>	104.18
L-Valina	94.00
<b>Vitaminas</b>	
D-pantotenato Ca	4.00
Cloruro de colina	4.00
Acido Fólico	4.00
i-Inositol	7.20
Nicotinamida	4.00
Piridoxal HCl	4.00
Riboflavina	0.40
Tiamina HCl	4.00

Por esta razón, cuando las células cromafines fueron purificadas por sembrado diferencial, se resuspendieron a una densidad de  $10^6$  cel/ml en medio de DMEM conteniendo 10 % (v/v) de suero bovino fetal. A continuación 30 ml de esa suspensión celular se sembraron en botellas de cultivo de  $75 \text{ cm}^2$  de superficie y se mantuvieron en una estufa de cultivo a  $37^\circ\text{C}$  durante al menos 2 horas. Tras ese período las células endoteliales tuvieron tiempo suficiente para adherirse al sustrato, y, por el contrario, las células cromafines, permanecieron flotando en el medio. Este medio enriquecido en células cromafines se retiró y las células se centrifugaron a baja velocidad y fueron resuspendidas en medio fresco DMEM (5-10 ml).

### **Estimación del número de células. Integridad y pureza del cultivo**

La estimación del número de células, así como de su pureza en cromafines se realizó mediante conteo de las mismas en una cámara de Neubauer. Para esta determinación sólo se contaron las células vivas, es decir, aquellas que excluyeron el colorante Azul Tripán. Este colorante se preparó a una concentración del 0.5 % (p/v) en una solución tamponada e isosmótica (138 mM NaCl, 48.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7.2) según Keith y Elliot (1979). Una alícuota diluida de células cromafines resuspendidas en medio DMEM se mezcló con solución de colorante. Por otro lado, otra alícuota se diluyó con el colorante Rojo Neutro que en este cultivo específicamente tiñe las células cromafines de acuerdo a Stuart *et al.* (1974) y Role y Perlman (1980). Según estos autores, el colorante se comporta como una base débil y se acumula preferentemente en el entorno ácido de los gránulos cromafines. El colorante se preparó en condiciones isosmóticas a una concentración de 0.3 mg/ml en NaCl al 0.9 % (p/v).

Ambas mezclas (células en Azul Tripán y células en Rojo Neutro) fueron transferidas a la cámara y se procedió a su conteo. El número de células/campo se transformó en células/ml de acuerdo a la relación que tiene el cuenta en volumen de la cámara:

$$\text{N}^\circ \text{ células/ml} = \text{N}^\circ \text{ células contadas} \times 10^4 \times \text{dilución}$$

En todas las preparaciones efectuadas para este trabajo de investigación la viabilidad estimada, es decir, el porcentaje de células que excluyeron el colorante vital Azul Tripán, fue superior al 95 %.

En cuanto a la pureza del cultivo, ésta se estimó como el porcentaje de células cromafines respecto del total. Se consideró célula cromafin aquella que mostró un intenso color rojo frente al colorante específico. Este criterio de pureza también se confirmó mediante inmunocitoquímica con anticuerpos frente a la enzima tirosina hidroxilasa, de tal manera que el % de células positivas para tirosina hidroxilasa resultó equivalente al % de células teñidas con rojo neutro. Generalmente la pureza del cultivo fue  $>95$  % en cromafines. Como ya se ha comentado en el capítulo anterior, cuando la pureza del cultivo fue menor de un 85-90 %, las células fueron posteriormente purificadas por sembrado diferencial.

### Mantenimiento en cultivo

Para el mantenimiento en cultivo de las células cromafines, así como para los procesos de obtención y purificación se mantuvieron condiciones de estricta esterilidad bajo una campana de flujo laminar vertical. Todo el material utilizado (vidrio o instrumental del tipo tijeras, pinzas, mallas de nylon, puntas de pipeta, etc.) se esterilizó en autoclave. El material de plástico (tubos de centrifuga, pipetas, superficies de cultivo, etc) se adquirió esterilizado mediante irradiación. Los medios de cultivo y disoluciones empleados fueron esterilizados mediante filtración a través de membranas Acrocap de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro empleando una bomba peristáltica Millipore. Para reforzar las condiciones de esterilidad, los medios de lavado y perfusión se suplementaron con antibióticos (penicilina 50 UI/ml y streptomycin 50  $\mu\text{g/ml}$ ).

Las células cromafines resuspendidas en medio de DMEM se diluyeron a la densidad adecuada con medio DMEM conteniendo:

Suero bovino fetal inactivado por calor	10 % (v/v)
Penicilina	100 UI/ml
Streptomycin	100 $\mu\text{g/ml}$
Kanamycin	100 $\mu\text{g/ml}$
Anfotericina	2.5 $\mu\text{g/ml}$
Citosine arabinofuranósido	10 $\mu\text{M}$
Fluorodeoxiuridina (FDU)	10 $\mu\text{M}$

El suero aporta al medio principalmente factores de adhesión al sustrato necesarios para una adecuada fijación al plástico de las placas de cultivo. Aunque muchos grupos de investigación que trabajan con células cromafines prefieren utilizar suero bovino fetal no inactivado, en experimentos preliminares las células sembradas con suero inactivado demostraron una mayor respuesta secretora que células del mismo cultivo en medio con suero bovino fetal sin inactivar. Por otra parte, los antibióticos empleados abarcaron un amplio espectro para evitar en lo posible la contaminación por bacterias y hongos. No obstante, en determinadas épocas del año (principalmente otoño y primavera), ocasionalmente los cultivos presentaron problemas de contaminación por un tipo de levadura sin identificar.

Aunque los cultivos utilizados fueron prácticamente puros en cromafines, una pequeña contaminación (<5 %) en células endoteliales puede llegar a convertirse en un problema debido a que estas células tienen una alta capacidad de multiplicación. Las células cromafines, por el contrario, son células de cultivo primario que no sufren divisiones. Para evitar que con el paso del tiempo en cultivo las células contaminantes se conviertan en células mayoritarias se añadieron los antimetabólicos FDU y citosinarabinofuranósido. El empleo del suero inactivado frente a suero normal también dificultó la proliferación de células endoteliales debido a la destrucción en el proceso de inactivación de factores esenciales para la división de dichas células.

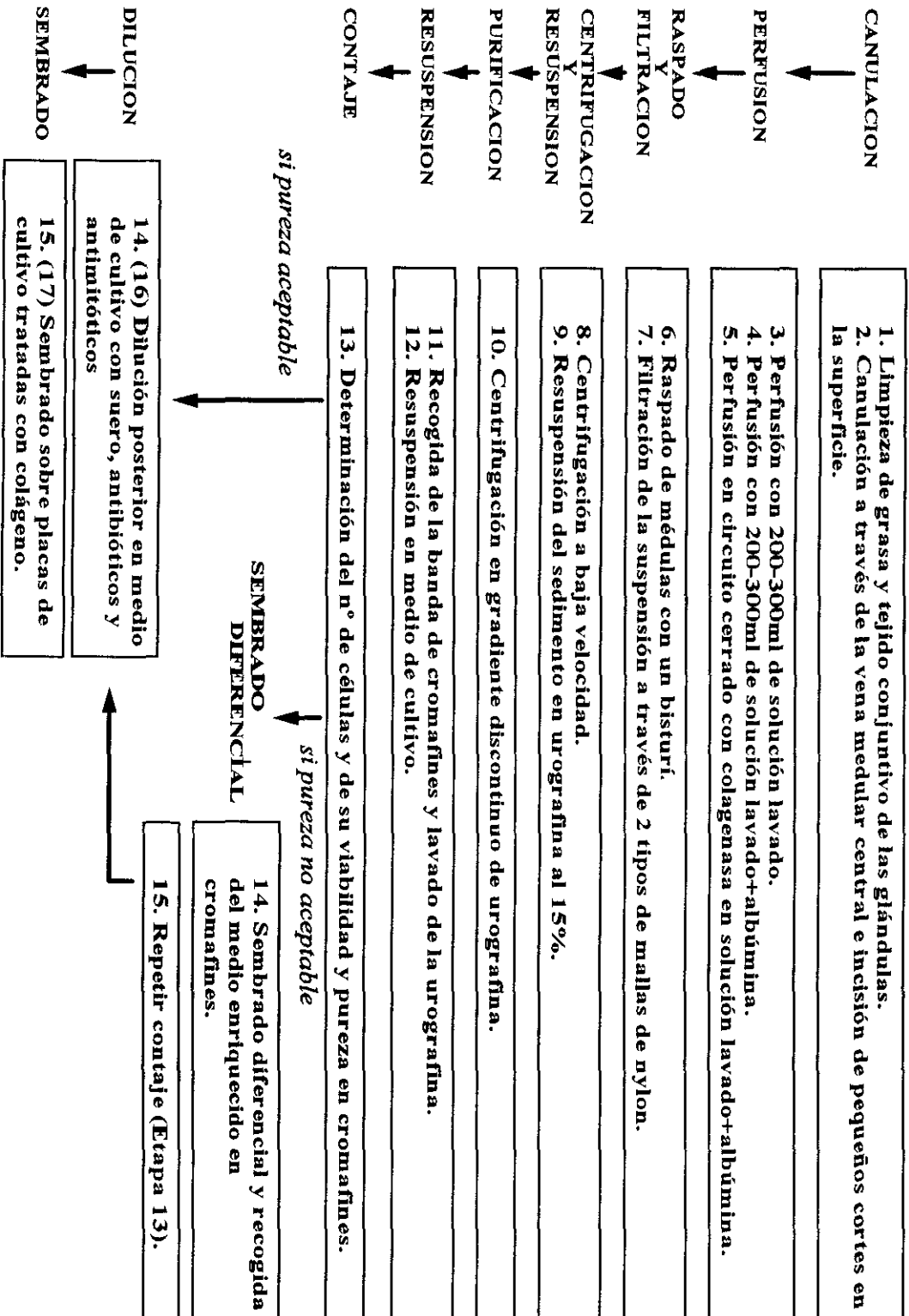
Las células se sembraron a densidad variable entre  $0.5-1 \times 10^6$  cel/ml en placas de cultivo de diferente formato dependiendo del tipo de experimento a realizar. Debido a que estas células se adhieren mal al plástico, el proceso de adhesión se facilitó con el tratamiento con colágeno de las placas de cultivo. El colágeno constituye el principal componente de la matriz extracelular al cual las células se adhieren. El colágeno utilizado fue adquirido de la compañía Biochrom y procedía de placenta bovina, presentándose en una solución de 0.1 % (p/v) de colágeno soluble en ácido. El tratamiento consistió en cubrir los pocillos de las placas de cultivo con 1 ml/ 10 cm<sup>2</sup> de área de cultivo con una mezcla colágeno-DMEM (1:1). Las placas de cultivo se incubaron durante ½ hora y después se lavaron con DMEM. Inmediatamente después las células cromafines fueron sembradas.

Las células se mantuvieron en una estufa a 37°C en 95 % aire/ 5 % CO<sub>2</sub>. En estas condiciones, las células estuvieron perfectamente adheridas al plástico de las placas después de 24 horas. Debido a que las células mantenidas durante largo tiempo pueden sufrir transformaciones que las alejan del fenotipo que muestran en el órgano intacto, preferimos usar las células para la experimentación no más allá del 5° día de cultivo. Ya que se ha demostrado que el suero contiene factores que pueden afectar sistemas de 2° mensajeros celulares, el medio de cultivo se cambió 24 horas antes del experimento por un medio que no contenía suero con objeto de minimizar las posibles influencias del suero en dichos sistemas.

### **Mantenimiento en suspensión**

Aunque para la mayor parte de experimentos efectuados resultó idóneo mantener las células en cultivo adheridas a superficies de plástico, en otros experimentos se prefirió mantenerlas en suspensión. Con este fin las células se resuspendieron a una densidad de  $10^6$ /ml en DMEM conteniendo suero inactivado y antibióticos pero sin antimetabólicos, y se mantuvieron a 4°C hasta el experimento. En esta situación, sin adhesión a sustrato y a baja temperatura, los procesos de proliferación de las células contaminantes se encuentran totalmente frenados. Las células cromafines así mantenidas son perfectamente viables hasta el 2° día después del aislamiento presentando idénticas respuestas de secreción o calcio intracelular que células mantenidas en placas de cultivo a 37°C.

**Figura 2-III. (página siguiente) Esquema general del proceso de obtención y purificación de células cromafines bovinas.**



### **Obtención de ácido ribonucleico total a partir de células cromafines bovinas**

Para la obtención de ácido ribonucleico total (RNA total) se siguió el método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987) basado en la extracción con tampón isotiocianato de guanidinio (GITC). Este tampón contiene 4 M GITC, 0.5 % (p/v) sarcosil (sal sódica de *n*-lauroilsarcosina), 0.7 % (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol, 25 mM citrato sódico pH 7.0. Un sedimento de aproximadamente  $100 \times 10^6$  células se solubilizó con 5 ml de tampón GITC. En las drásticas condiciones de desnaturalización proteica suministradas por este tampón, el RNA celular es totalmente estable frente a digestión por ribonucleasas que pudieran liberarse en el proceso de extracción. No obstante, el resto del proceso de obtención, así como los ensayos posteriores se realizaron en condiciones libres de ribonucleasas: material estéril mediante autoclavado y soluciones preparadas en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

A continuación se añadieron 500  $\mu$ l de 2 M acetato sódico y 5 ml de fenol saturado de agua. La solución se agitó y se añadió 1 ml de cloroformo. Después de una breve agitación apareció un precipitado de ácido desoxirribonucleico (DNA) y proteínas.

La solución se centrifugó a 5000xg durante 20 min en una centrífuga Heraeus refrigerada a 4°C. Tras la centrifugación, la fase acuosa contenía el RNA mientras que la fase orgánica presentaba los lípidos disueltos. En la interfase se acumuló el precipitado de DNA y proteínas. La fase acuosa se trasvasó a un tubo limpio y se añadió un volumen equivalente de isopropanol. La solución se agitó y se dejó reposar a -20°C durante 1 hora con objeto de permitir la precipitación del RNA.

El RNA precipitado se recuperó con una etapa de centrifugación y se lavó con 500  $\mu$ l de tampón GITC transfiriéndose a tubos Eppendorf a los cuales se añadió de nuevo un volumen equivalente de isopropanol para precipitar el RNA a -20°C durante 1 hora.

La suspensión se volvió a centrifugar, al precipitado se añadió 1 ml de etanol al 80 % (v/v) y se volvió a centrifugar repitiéndose esta operación otras 3 veces. Finalmente, el sedimento se dejó escurrir y se redisolvió con agitación suave en 30  $\mu$ l de agua tratada con DEPC.

Para cuantificar el RNA obtenido, se monitorizó su absorbancia a 260 nm. La concentración de RNA total se calculó teniendo en cuenta que un valor de densidad óptica  $OD_{260}=1$  corresponde a 40  $\mu$ g/ml de RNA. Para estimar la pureza de la preparación se midió también la absorbancia a 280 y a 320 nm. Si el RNA no contiene proteínas, la  $OD_{260}$  debe ser alta, la  $OD_{280}$  aproximadamente la mitad que a 260 nm, y prácticamente nula a 320 nm.

El rendimiento del proceso de extracción fue de aproximadamente 1  $\mu$ g de RNA por  $1 \times 10^6$  células, con una presencia casi nula de proteínas.

### **Detección del RNA mensajero de NOS I mediante transcripción reversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)**

Para la detección de NOS I, 2 µg de RNA total fueron apareados con 40 ng de oligonucleótidos iniciadores (random primers pd(N)<sub>6</sub>) y transcritos en modo reverso con transcriptasa reversa (SuperScript) siguiendo las instrucciones del suministrador. El DNA complementario generado por TR que codifica para NOS I bovina fue amplificado usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos fueron 5'-GGCAACAGCGGCAATTTG-3' (sentido) y 5'-TGGACTCAGATCTAAGGCGGTTG-3' (antisentido) correspondientes a las posiciones 4221-4238 y 4657-4679 del DNA complementario de la NOS I humana (Bredt *et al.*, 1991b). La PCR se realizó en 100 µl de tampón de reacción Taq polimerasa conteniendo 0.25 mM dNTPs, 50 pmol de oligonucleótidos iniciadores, 2 unidades de DNA polimerasa termoestable aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* y productos de RT. Después de una etapa de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, se realizaron 40 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C y 3 min a 72°C seguido de una etapa final de extensión de 10 min a 72°C. Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa de 15 g/litro en tampón Tris borato/EDTA conteniendo 0.5 µg/ml de bromuro de etidio para su visualización. Un control positivo del experimento se realizó empleando RNA de cerebelo de rata.

### **Estudios inmunocitoquímicos**

Los estudios inmunocitoquímicos se efectuaron mediante 2 diferentes técnicas de detección del marcaje específico dependiendo del tipo de anticuerpo secundario empleado en el ensayo: 1) detección inmunofluorescente si el anticuerpo 2° estaba ligado a una sonda fluorescente, ó 2) detección mediante peroxidasa cuando se usó un anticuerpo 2° biotinilado.

Para los estudios inmunocitoquímicos las células cromafines bovinas se sembraron en pocillos de cámaras portaobjetos de vidrio para cultivos (Microslides Chambers de Nunc) a una densidad de 3x10<sup>6</sup>/10 cm<sup>2</sup> de superficie/ 4 ml de medio de cultivo. Una vez que las células estuvieron bien adheridas a la superficie de cultivo (1-2 días), se fijaron con una mezcla de acetona:metanol (1:1) a 4°C durante 2 minutos. Los portaobjetos se dejaron secar al aire y se conservaron a -20°C.

Para la detección inmunocitoquímica de los diferentes antígenos estudiados en este trabajo de investigación, las células se atemperaron al aire y se preincubaron en jarras de histoquímica durante 2 períodos de 10 min en medio salino tamponado con fosfato PBS (composición en la tabla que se incluye).

Para los estudios de inmunofluorescencia, los portaobjetos se preincubaron durante 1 hora con medio PBS + 4 % (p/v) leche deslipidizada en polvo como agente bloqueante. A continuación, sobre las monocapas se dibujaron unos anillos con un rotulador especial para preparaciones histológicas efectuándose las incubaciones con los anticuerpos en pequeños volúmenes sobre las células del interior de esos anillos.

Usualmente, la incubación con el anticuerpo primario se efectuó a 4°C durante aproximadamente 15 horas. El exceso de anticuerpo se lavó dos veces con PBS + 4 % leche deslipidizada en polvo durante 10 minutos. La incubación con los anticuerpos secundarios ligados a sondas fluorescentes de rodamina o fluoresceína se efectuó durante 1 hora y media a 4°C. El exceso de anticuerpo 2° se lavó también con 2 lavados de 10 minutos con PBS + 4 % leche deslipidizada en polvo. A continuación, las monocapas se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente con el compuesto fluorescente marcador del DNA 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a una concentración de 1 µM en medio PBS con objeto de visualizar fácilmente los núcleos celulares.

#### Composición del medio PBS

NaCl	8.00 g/l
KCl	0.20 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g/l
pH 7.4	

Cuando se realizaron estudios de doble marcaje, éstos se hicieron de forma separada, de tal manera que primero se realizaron las incubaciones con los anticuerpos 1° y 2° de un antígeno, y, a continuación, las correspondientes al 2° antígeno para después finalizar con la incubación con DAPI.

En los estudios de detección por peroxidasa el protocolo fue ligeramente distinto y consistió en un lavado inicial de 10 min en PBS y, a continuación, las peroxidasas endógenas fueron bloqueadas mediante incubación durante 30 min con una solución recientemente preparada de 40 % (v/v) metanol, 0.6 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en medio PBS. Posteriormente, las biotinas endógenas fueron también bloqueadas usando el kit avidin D/biotin blocking siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de un período de incubación de 10 min en PBS + 4 % leche deslipidizada en polvo, las células se incubaron durante 30 min en una solución 1:10 de suero normal de la especie a partir de la cual se obtuvo el anticuerpo secundario. A continuación, las monocapas se incubaron durante aproximadamente 15 horas a 4°C con el anticuerpo primario. El exceso de anticuerpo se lavó 2 veces con PBS + 4 % leche deslipidizada en polvo durante 10 min. El paso siguiente fue la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado y las monocapas se lavaron de nuevo para eliminar el exceso de dicho anticuerpo secundario. Después las células fueron expuestas al complejo peroxidasa biotinilada-streptavidina (1:100 en PBS) durante 20 min. La reacción cromógena se desarrolló con 3,3'-diaminobencidina (tabletas de sustrato peroxidasa DAB) y después las células se lavaron con agua destilada.

Tanto los portaobjetos de inmunofluorescencia como los de detección por peroxidasa fueron montados con gelatina/glicerol y cubiertos con cubreobjetos. Posteriormente, para el estudio de inmunofluorescencia las células se visualizaron con un microscopio

invertido Nikon Diaphot-TMD usando como fuente una lámpara de mercurio también de Nikon. Los portaobjetos para el estudio con peroxidasa se visualizaron en contraste de fase. Las fotografías se realizaron con una cámara Nikon HFX-DX.

Para los controles negativos de estos experimentos se siguió idéntico protocolo excepto que la incubación con anticuerpo primario se efectuó con un suero normal (ó un anticuerpo IgG no antigénico) del mismo huésped y a la misma concentración de inmunoglobulina reactiva que el anticuerpo específico que se usó para los experimentos. Estos controles negativos dieron cuenta del marcaje inespecífico de los sistemas de detección.

#### **Determinación de los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos GMPc y AMPc**

Los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos se determinaron mediante sendos radioinmunoensayos basados en la competición entre el GMPc/AMPc procedente de extractos desproteinizados de células cromafines y una cantidad fija de [<sup>3</sup>H]-GMPc/AMPc en su unión a una proteína que reconoce específicamente cada uno de los nucleótidos. Para el GMPc, esta proteína es un anticuerpo generado en conejos frente al antígeno GMPc ligado a albúmina. En el caso del AMPc, esta proteína es la subunidad reguladora de la proteína quinasa A extraída de músculo bovino. Transcurrido un período de incubación en el que se alcanza el equilibrio, mediante técnicas sencillas es posible separar el nucleótido libre del que está específicamente ligado a la proteína. Cuanto mayor cantidad de radiactividad permanezca unida a la proteína, significará que en el extracto de partida había menos nucleótido que compete. Comparando con una serie de tubos en los que se añadió cantidades conocidas de GMPc ó AMPc patrón se puede conocer con exactitud la cantidad de nucleótido cíclico en el extracto celular (Harper y Brooker, 1975).

Para esta determinación, las células cromafines se sembraron en multiplacas de 24 pocillos a una densidad de 10<sup>6</sup>cel/pocillo en 1 ml de medio de cultivo. 24 horas antes del experimento se cambió el medio a las células por uno sin suero. El día del experimento, se les retiró el medio DMEM y se lavaron los pocillos 1 vez con 500 µl de solución de Locke:

#### **Solución de Locke**

NaCl	140.0 mM
KCl	4.4 mM
CaCl <sub>2</sub>	2.5 mM
MgSO <sub>4</sub>	1.2 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2 mM
NaHCO <sub>3</sub>	4.0 mM
Glucosa	5.6 mM
HEPES	10.0 mM
pH 7.4	

A continuación se preincubaron durante 30 minutos con el mismo medio. Dependiendo del experimento particular, este medio de preincubación contenía diferentes agentes cuyo efecto se quería estudiar. En algunas ocasiones, en la preincubación y también durante el período de estimulación, al medio se añadió 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) a una concentración final de 0.5 mM con objeto de inhibir las fosfodiesterasas y de esta manera aumentar la sensibilidad del ensayo. Durante el período de estimulación las células se incubaron con los agentes cuyo efecto sobre los niveles intracelulares de GMPc/AMPC se quería evaluar. Para terminar el período de estimulación se aspiró el sobrenadante, se añadieron a cada pocillo 300  $\mu$ l de una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 6 % (p/v) y las células se rasparon. Esta solución ácida precipita las proteínas y tras una centrifugación en Microfuga, el sobrenadante constituye el extracto desproteinizado. Para evitar la precipitación de la proteína de unión a GMPc/AMPC, estos extractos ácidos se neutralizaron añadiendo gota a gota una solución de 3 M KOH, 1.5 M trietanolamina hidrocloreuro (TEA) hasta que la mezcla alcanzó el pH neutro según papel indicador.

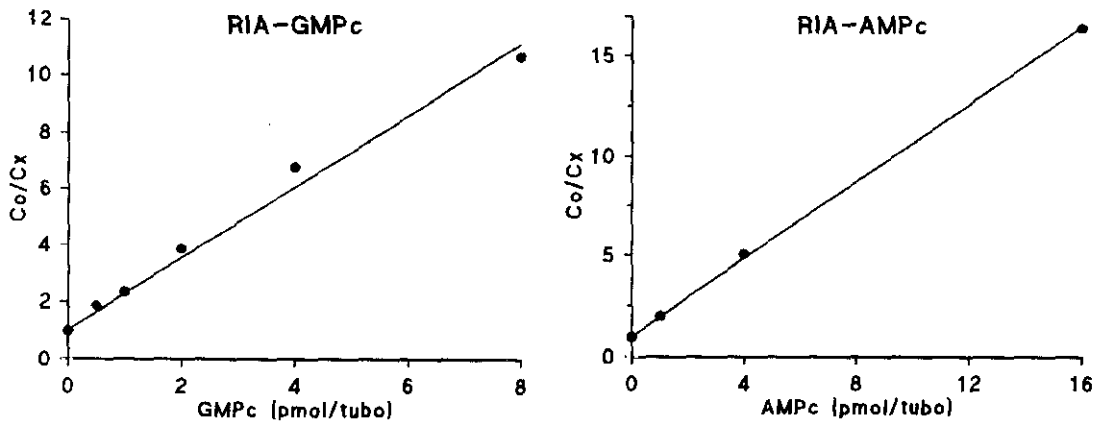
Ambos radioinmunoensayos (GMPc/AMPC) se realizaron en un volumen final de 200  $\mu$ l, que contenía los siguientes volúmenes de las diferentes soluciones (en  $\mu$ l):

RIA-GMPc	[ <sup>3</sup> H]-GMPc	Tampón	Patrón	Extracto	Blanco	Anticuerpo
No GMPc	50	100	-	-	-	50
Patrones	50	-	100	-	-	50
Blanco	50	-	-	-	100	50
Extracto	50	-	-	100	-	50

RIA-AMPC	[ <sup>3</sup> H]-AMPC	Tampón	Patrón	Extracto	Proteína de unión
No AMPC	50	50	-	-	100
Patrones	50	-	50	-	100
Blanco	50	150	-	-	-
Extracto	50	-	-	50	100

El blanco de los ensayos consistió, para el GMPc, en un tubo que en lugar de extracto contenía una proteína que desplazaba completamente al GMPc del anticuerpo. En el caso del AMPC, al tubo blanco no se le añadió proteína de unión. Una vez alcanzado el equilibrio, para separar el nucleótido ligado a proteína del que se encuentra libre, para el ensayo de GMPc se precipitó el anticuerpo con una solución de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  al 60 % (p/v). Tras una centrifugación en Microfuga el precipitado contiene el [<sup>3</sup>H]-GMPc ligado al anticuerpo. Para el AMPC, a cada tubo se añadieron 100  $\mu$ l de una suspensión de carbón activo (charcoal). Esta suspensión sólo es capaz de unir el nucleótido libre, por tanto, tras una centrifugación en Microfuga, la radiactividad en el sobrenadante refleja el valor del [<sup>3</sup>H]-AMPC ligado a la proteína de unión. La radiactividad se determinó en cuentas por minuto (cpm) con un contador de centelleo líquido.

El GMPc/AMPC contenido en los extractos se determinó por interpolación en rectas construidas tras linealización de curvas de calibrado obtenidas con los tubos "No GMPc/No AMPC" y los de los patrones (conteniendo de 0.5-8 pmol de GMPc ó 1-16 pmol de AMPC/tubo). En estas rectas se representan pmol de nucleótido cíclico/tubo frente a Co/Cx siendo Co la radiactividad en cpm unida al anticuerpo o a la proteína de unión en ausencia de GMPc ó AMPC no marcado y Cx, el valor de radiactividad unida al anticuerpo para cada extracto problema.



**Figura 3-III. Calibración de las medidas de nucleótidos cíclicos.** Ejemplos de rectas de calibrado para los ensayos de nucleótidos cíclicos GMPc y AMPC mediante radioinmunoensayo.

Tanto la preparación de los extractos celulares como la incubación con el anticuerpo o la proteína de unión se realizaron a 4°C en hielo para evitar tanto la degradación del nucleótido cíclico como la desnaturalización térmica de ambas proteínas. Además el tampón en el que se llevó a cabo el radioinmunoensayo contenía EDTA como quelante de cationes divalentes  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  que son esenciales para la actividad de fosfodiesterasas residuales que pudieran haber resistido el proceso de extracción.

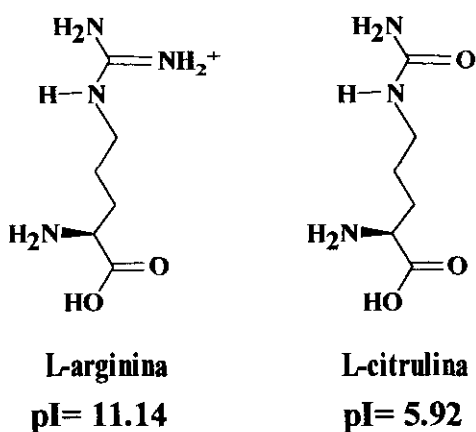
Ambos ensayos, tal como se realizaron, presentaron una alta especificidad para los nucleótidos cíclicos además de una sensibilidad adecuada para las cantidades de dichos nucleótidos presentes en células cromafines. Aparte, estos métodos presentaron ventajas con respecto a otros como por ejemplo, determinación por HPLC, en términos de rapidez y capacidad de procesar un número muy alto de muestras.

#### Determinación de actividad óxido nítrico sintasa

La actividad enzimática de óxido nítrico sintasa (NOS) se determinó midiendo la conversión de [ $^3\text{H}$ ]-arginina en [ $^3\text{H}$ ]-citrulina de acuerdo al método descrito por Bredt y Snyder (1990) adaptado a células intactas.

Para esta determinación, las células cromafines se sembraron en multiplacas de 24 pocillos a una densidad de  $10^6$  cel/pocillo/ml. El día previo al experimento el medio DMEM que incluía suero se cambió por uno sin suero. Para el experimento, las células se lavaron 2 veces con solución de Locke y se preincubaron durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  con dicha solución en presencia o ausencia de 1 mM  $\text{N}^G$ -nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME). Esta molécula es un inhibidor específico de la actividad NOS. Esto significa que de la conversión  $[^3\text{H}]$ -arginina a  $[^3\text{H}]$ -citrulina, sólo aquella que sea sensible a este inhibidor puede ser considerada procedente de una enzima NOS. En los últimos 20 minutos de preincubación se añadieron a cada pocillo 200  $\mu\text{l}$  de una solución de 5  $\mu\text{Ci/ml}$  de L-[2,3,4,5- $^3\text{H}$ ]-arginina con objeto de marcar el "pool" intracelular de arginina. A continuación las células fueron estimuladas con los agentes cuyo efecto sobre la actividad NOS se quería estudiar. Tras este período de estimulación, el sobrenadante de las células se aspiró y los pocillos se lavaron 2 veces con 1 ml de solución de Locke conteniendo 1 mM L-citrulina. Una alta concentración de citrulina en el medio extracelular hace que el flujo de citrulina sea del exterior al interior de la

célula, por tanto, el propósito de añadir citrulina a esta solución de lavado fue el de evitar que la citrulina que se formó a partir de la arginina marcada saliese fuera de la célula.



**Figura 4-III. Estructuras y puntos isoeléctricos de los aminoácidos arginina y citrulina.**

de cationes debido a sus restos de ácido sulfónico ( $\text{R-SO}_3^-$ ). Puesto que la arginina presenta carga neta positiva al pH en el que se equilibró la resina (20 mM HEPES, 5 mM EDTA pH 6.0) y, por el contrario, la citrulina está próxima a carga neta cero, sólo la arginina se retuvo en el lecho de la resina.

Para confirmar que la resina utilizada retenía la arginina de manera efectiva, patrones de arginina, citrulina y mezclas de ambos a los que se les aplicó idéntico protocolo que a los extractos celulares fueron analizados mediante cromatografía en capa fina sobre soportes de celulosa con una fase móvil de butanol:acético: $\text{H}_2\text{O}$  (65:15:20) (v/v/v). Este tipo de cromatografía combinada con el revelado de las placas con ninhidrina para visualizar los aminoácidos demostró que la resina estaba reteniendo toda la arginina, mientras que la citrulina no presentó ninguna afinidad por el lecho cromatográfico.

El experimento continuó con la centrifugación de la mezcla extracto-resina en Microfuga para precipitar esta última. La radiactividad de una alícuota del sobrenadante conteniendo solamente citrulina se determinó en un contador de centelleo líquido. Para normalizar los resultados de pocillo a pocillo, una alícuota de cada extracto neutralizado que representó la radiactividad total incorporada por las células también se analizó con el contador. La actividad NOS se expresó como cantidad de [<sup>3</sup>H]-citrulina transformada a partir de [<sup>3</sup>H]-arginina y se asignó un valor de 100 % al resultado procedente de los pocillos que fueron incubados en estado basal y sin L-NAME.

### **Detección de la proteína quinasa dependiente de GMPc mediante inmunotransferencia**

La proteína quinasa dependiente de GMPc fue detectada mediante técnicas de inmunotransferencia empleando un anticuerpo comercial (Calbiochem) generado frente a un péptido sintético de la región C-terminal de la PKG I. Esta región se encuentra tanto en la isoforma I $\alpha$  como en la I $\beta$  por lo que dicho anticuerpo reconoce específicamente ambas formas de la enzima (Keilbach *et al.*, 1992).

Para la preparación de las muestras celulares,  $25 \times 10^6$  células se homogeneizaron mediante sonicación (Ultrasonic Cell Disruptor de Braun Labsonic) en 500  $\mu$ l de tampón 150 mM NaCl, 4 mM EDTA, 0.5 mM PMSF tamponado con 20 mM Tris a pH 7.4. Con objeto de enriquecer el extracto celular en contenido soluble, el homogenado se centrifugó a 13000xg durante 10 minutos a 4°C, recogiendo el sobrenadante. Después de determinar la concentración de proteínas, tres volúmenes de extracto celular se mezclaron con un volumen de una solución 4 veces concentrada del tampón de muestras de electroforesis (concentraciones finales: 10 % (v/v) glicerol, 5 % (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol, 3 % (p/v) dodecilsulfato sódico (SDS), 0.005 % (p/v) azul de bromofenol, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8). Con objeto de desnaturalizar las proteínas, las muestras se sometieron a 100°C durante 5 minutos en un calentador en multibloque.

El extracto celular se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (Laemmli, 1970). Las muestras proteicas se aplicaron en pocillos de geles de 10 % (p/v) de acrilamida en un sistema de electroforesis mini-Protein II (Bio-Rad) y la electroforesis se desarrolló a 4°C en tampón 0.1 % SDS, 200 mM glicocola, 25 mM Tris pH 8.3, durante 55 minutos a un voltaje constante de 200 V. Uno de los pocillos del gel se reservó para una mezcla de patrones proteicos coloreados de peso molecular conocido.

Tras el proceso electroforético, los geles se equilibraron durante 10 minutos en tampón de transferencia (glicocola 192 mM, metanol 20 % (v/v), Tris 25 mM pH 8.3) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (equilibrada en el mismo tampón) durante 2 horas (4°C) a una intensidad de 300 mA empleando el sistema mini-Trans Blot (Bio-Rad). Finalizada la transferencia, la membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con tampón PBS conteniendo 0.1 % (v/v) Tweén-20 y 5 % leche deslipidizada en polvo empleando un agitador orbital. A continuación se incubó

durante aproximadamente 15 horas a 4°C con el anticuerpo primario (anti-PKG I $\alpha$  y I $\beta$ , 1:300) en tampón PBS + Tween-20 + leche. El exceso de anticuerpo se lavó con el mismo tampón y, a continuación, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario ligado a peroxidasa (anti-IgG HRP de conejo, 1:1000). Esta incubación se llevó a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente en el mismo tampón. El exceso de anticuerpo secundario se lavó con tampón PBS + Tween-20 y la membrana se reveló mediante ECL (Enhanced Chemiluminescence Western blotting) siguiendo las instrucciones del suministrador (Amersham).

Como controles positivos del experimento se utilizaron extractos citosólicos de cerebelo de rata y preparaciones de PKG I $\alpha$  (Calbiochem).

La densidad de marcaje inmunorreactivo se analizó con un Densitómetro Molecular Dynamics empleando el programa ImageQuant.

### **Determinación de actividad de proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG)**

2 diferentes tipos de ensayo se utilizaron para determinar actividades enzimáticas de proteína quinasa dependiente de GMPc, ambos basados en la fosforilación de un sustrato exógeno en presencia de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP. En el primero de los métodos se utilizó una preparación parcialmente purificada de la enzima procedente de la fracción soluble de células cromafines. El objeto de este tipo de ensayo fue poner de manifiesto la presencia de la enzima en estos extractos solubles. El segundo de los métodos se realizó con extractos solubles sin posterior purificación procedentes de células que fueron sometidas a tratamientos específicos y que para la determinación de PKG se congelaron rápidamente en N<sub>2</sub> líquido con objeto de preservar la actividad PKG en el mismo estado de activación en el que se encontraba en las células intactas.

Para la purificación parcial de PKG a partir de células cromafines bovinas se siguió el procedimiento descrito por Cornwell y Lincoln (1989). Células cromafines bovinas mantenidas en suspensión se lavaron por centrifugación 4 veces con 5 ml de una solución conteniendo 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM glucosa, 0.025 % (p/v) albúmina de suero bovino, tamponada con 20 mM HEPES a pH 7.4. Tras la última centrifugación las células se resuspendieron en tampón de homogeneización compuesto de 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 15 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 50  $\mu$ g/ml leupeptina, 100  $\mu$ M fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) tamponado con 20 mM fosfato potásico a pH 6.8. La homogeneización se realizó en un sonicador Ultrasonic Cell Disruptor (Braun Labsonic) ajustado a fuerza 4 durante 5 segundos. El homogenado se centrifugó a 10000xg durante 30 min a 4°C y se obtuvo una fracción soluble y una fracción particulada. El sedimento se desechó y el sobrenadante se diluyó 10 veces en tampón de homogeneización sin NaCl (tampón PEM) y se aplicó a una columna de 2 ml (1x3 cm) de DEAE-celulosa previamente equilibrada en el tampón. La columna se lavó con 2.5 volúmenes de tampón PEM conteniendo 0.1 mM AMPc con objeto de eliminar el GMPc unido a la enzima PKG. Después de este tratamiento la columna se lavó de nuevo con 5 volúmenes de tampón PEM. La primera elución se realizó con tampón PEM con 50 mM NaCl. Esta solución elimina prácticamente toda

la PKA de tipo I retenida en la columna y que constituye la principal interferencia en el ensayo de fosforilación. La 2ª elución se realizó con tampón PEM con 150 mM NaCl con objeto de eluir la PKG. Las proteínas que eluyeron en esta 2ª elución se concentraron por centrifugación en un Centricon-30 a un volumen de 2 ml. Posteriormente, se analizó la concentración de proteína y estos extractos se utilizaron después para el ensayo de PKG.

El ensayo de PKG se realizó en un volumen de 100 µl de una solución de 75 mM acetato magnésico tamponada con 20 mM Tris-HCl a pH 7.5 conteniendo como dador de fósforo 30 µM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (200-300 cpm/pmol) y como aceptor en la reacción catalizada por la enzima PKG, 10 µg de Histona F<sub>2b</sub>. El efecto de diferentes agentes sobre la actividad de PKG se estudió en presencia y ausencia de 2 µM 8Br-GMPc como activador de la quinasa. Las reacciones de fosforilación se dispararon con la adición de la enzima semipurificada (20 µg de proteína) y se incubó durante 5 min a 30°C. La reacción se terminó con la adición de 2 ml de TCA al 5 % conteniendo 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y 2 mM ATP a 4°C. La mezcla se filtró sobre filtros Whatman GF/C a los que las proteínas precipitadas se unieron. Estos filtros fueron extensivamente lavados con 5 ml/filtro de la anterior solución con objeto de eliminar la marca radiactiva no asociada a proteínas, después se secaron y su radiactividad fue determinada en un contador de centelleo líquido.

Para la determinación de PKG de acuerdo al 2º método se utilizaron también células mantenidas en suspensión. Alicuotas de 5x10<sup>6</sup> de células sometidas a tratamientos específicos dependiendo del experimento particular, se centrifugaron; el sobrenadante se aspiró y el sedimento celular se congeló inmediatamente por inmersión en N<sub>2</sub> líquido. Para el ensayo de fosforilación estos sedimentos se descongelaron por adición de una solución de 200 µl de 1 mM EDTA, 15 mM β-mercaptoetanol, 100 µM PMSF, 10 µM leupeptina tamponada con 10 mM fosfato potásico a pH 6.8, y se homogeneizaron por sonicación. A continuación, estos homogenados se centrifugaron para obtener la fracción soluble conteniendo la actividad de PKG. Se determinó la cantidad de proteína en estos extractos solubles y alicuotas de 30 µl (60-70 µg proteína) se utilizaron en el ensayo de PKG. Este se realizó en las mismas condiciones que para el primer método con las excepciones siguientes. Debido a que en estos extractos sin purificar estaba presente la PKA que podía interferir en el ensayo por la similitud en secuencias de fosforilación entre PKA y PKG, la actividad de quinasa A se inhibió añadiendo al medio de reacción el péptido inhibidor de dicha proteína IP<sub>20</sub>-amido a 50 nM concentración final. Como sustrato de la PKG se utilizó el heptapéptido RKRSRAE, mucho mejor sustrato para PKG que para PKA, a una concentración de 10 µg/tubo. Para parar la reacción una alicuota de 50 µl se depositó sobre porciones cuadradas (2,5 cm x 2,5 cm) de papel Whatman P81 (intercambiador catiónico). Los filtros se lavaron extensivamente con 75 mM ácido fosfórico (4 veces con 10 ml/filtro).

La actividad de quinasa se expresó como pmol de  $^{32}\text{P}$  incorporado al sustrato por minuto, para el primer método; o como porcentaje de actividad comparada con el valor de unas células incubadas en condiciones basales en el caso del 2º método.

### Immunoprecipitación de tirosina hidroxilasa

Para estudiar el grado de fosforilación de la enzima tirosina hidroxilasa (TH, EC.1.14.16.2) de células cromafines bovinas, se utilizó la técnica de marcaje metabólico de las proteínas con  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato y análisis por inmunoprecipitación de la radiactividad asociada a tirosina hidroxilasa mediante electroforesis y posterior autorradiografía.

Para estos experimentos, las células cromafines se sembraron en multiplacas de 24 pocillos a una densidad de  $10^6$ /pocillo/ml. Los pocillos se lavaron con 1 ml de solución de Locke sin fosfato y después se preincubaron con 500  $\mu\text{l}$  de esa misma solución durante 1 hora. A continuación, las células se incubaron durante 1 hora con 0.1 mCi/pocillo de  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato en solución de Locke sin fosfato (volumen final 200  $\mu\text{l}$ ). Las preincubaciones específicas para cada experimento particular se efectuaron en este período y consistieron en añadir el agente a estudiar su efecto en un volumen concentrado con objeto de no variar apreciablemente el volumen final.

Tras esta incubación, las células se lavaron 2 veces con 1 ml de solución de Locke sin fosfato y se añadieron después 300  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis a 4°C conteniendo detergente e inhibidores de proteasas y de fosfatasa (ver composición en la siguiente tabla ).

#### Tampón de lisis

Nonidet P40	1 % (v/v)
Albúmina de suero bovino	1 mg/ml
Tris-HCl pH 7.5	20 mM
<b>Inhibidores inespecíficos</b>	
EGTA	4 mM
EDTA	10 mM
<b>Inhibidores de fosfatasa</b>	
NaF	50 mM
$\text{Na}_3\text{VO}_4$	1 mM
<b>Inhibidores de proteasas</b>	
PMSF	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Leupeptina	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Pepstatina	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Las células se rasparon en el tampón de lisis y se centrifugaron en Microfuga a 10000xg durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se recogió y con objeto de disminuir la unión inespecífica al anticuerpo secundario utilizado para la inmunoprecipitación, estos sobrenadantes se incubaron durante 1 hora a 4°C con dicho anticuerpo (anti-IgG de

ratón generado en cabra y ligado a agarosa) a una dilución de 1:18. Posteriormente estos extractos se centrifugaron en Microfuga a 200xg durante 1 min para precipitar el anticuerpo ligado a agarosa y el sobrenadante se recogió para la incubación con el anticuerpo primario.

El sobrenadante se separó en alícuotas de 60-100  $\mu$ l dependiendo del experimento y dichas alícuotas se llevaron a un volumen final de 200  $\mu$ l al que se añadió el anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal frente a tirosina hidroxilasa generado en ratón) a una dilución de 1:100. El control negativo de estos experimentos se realizó añadiendo a tubos controles IgG de ratón no antigénica a la misma concentración que la anti-TH presente en los otros tubos. Esta incubación se realizó a 4°C durante aproximadamente 15 horas.

Después de ese período de incubación se añadió anti-IgG de ratón generado en cabra y ligado a agarosa para una dilución final de 1:18 y se incubó durante 1 hora a 4°C. Posteriormente los tubos se centrifugaron, el sobrenadante se aspiró y el sedimento de agarosa se lavó 5 veces con 1 ml de tampón de lisis pero sin inhibidores ni albúmina. Finalmente el sedimento se solubilizó en 30  $\mu$ l de tampón 10 % (v/v) glicerol, 5 % (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol, 3 % (p/v) dodecilsulfato sódico (SDS), 0.005 % (p/v) azul de bromofenol, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8. Con objeto de desnaturalizar las proteínas los tubos se sometieron a 95°C durante 5 minutos en un calentador en multibloque y después se centrifugaron en Microfuga.

Los sobrenadantes fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (Laemmli, 1970). Las muestras (25  $\mu$ l) se aplicaron en pocillos de geles de 10 % (p/v) de acrilamida del sistema de electroforesis mini-Protein II (Bio-Rad) y la electroforesis se desarrolló a 4°C en tampón 0.1 % SDS, 200 mM glicocola, 25 mM Tris pH 8.3, manteniendo un voltaje constante de 200 V. Uno de los pocillos del gel se reservó para una mezcla de patrones proteicos coloreados de peso molecular conocido. La electroforesis se detuvo cuando la banda azul de bromofenol llegó al final del gel. Posteriormente los geles fueron secados en un secador de geles Bio-Rad modelo 543.

La fosforilación de los geles se determinó mediante autorradiografía directa en películas fotográficas Hyperfilm- $\beta$ max de Amersham expuestas en el interior de cassetes para autorradiografía de Amersham. La exposición duró entre 4-6 días después de los cuales las películas fueron reveladas manualmente por inmersión durante 5 minutos en soluciones de revelador y fijador.

En los autorradiogramas procedentes de extractos incubados con anti-TH como anticuerpo primario fue perfectamente visible una banda marcada (sólo ligeramente marcada en aquellos tubos incubados con IgG normal de ratón) de peso molecular  $\approx$  60kDa, equivalente al de la TH purificada (Kumer y Vrana, 1996). La densidad de marcaje radiactivo se analizó con un Densitómetro Molecular Dynamics empleando el programa ImageQuant y los resultados se expresaron como porcentaje de fosforilación asignándose un valor 100 % a células no estimuladas o preincubadas con agentes.

### Determinación de secreción de catecolaminas de células cromafines

Para este tipo de experimentos, las células se sembraron en multiplacas de 24 pocillos a una densidad de  $0.5$  ó  $1 \times 10^6$  cel/pocillo/ml de medio de cultivo.

Para la determinación de catecolaminas, 2 tipos de técnicas se han empleado: 1) detección fluorométrica y 2) detección electroquímica. Aunque ambas técnicas permiten el análisis diferencial de adrenalina (A) y noradrenalina (NA), las dos aminas mayoritarias liberadas por células cromafines, se utilizó la detección fluorométrica para analizar las catecolaminas totales (A+NA) y la detección electroquímica para el análisis específico de cada una de ellas. No obstante, en experimentos puntuales se utilizó la detección electroquímica para determinar las catecolaminas totales.

Adrenalina y noradrenalina son moléculas con propiedades de óxido-reducción que pueden detectarse gracias a este comportamiento químico. Las 2 técnicas usadas en este trabajo de investigación explotan estas características redox.

El método fluorométrico se basa en la oxidación de las catecolaminas a sus derivados fluorescentes trihidroxi indólicos (lutinas) (Elworthy, 1986). Esta oxidación tiene lugar en presencia de oxidantes como ferricianuro y las catecolaminas llevan rápidamente a cabo una ciclación dando lugar a las formas adrenocromo. Estas formas adrenocromo o noradrenocromo, tras el tratamiento con una base fuerte se isomerizan y forman 1-metil-3,5,6-trihidroxi indol (adrenolutina) ó 3,5,6-trihidroxi indol (noradrenolutina), respectivamente.

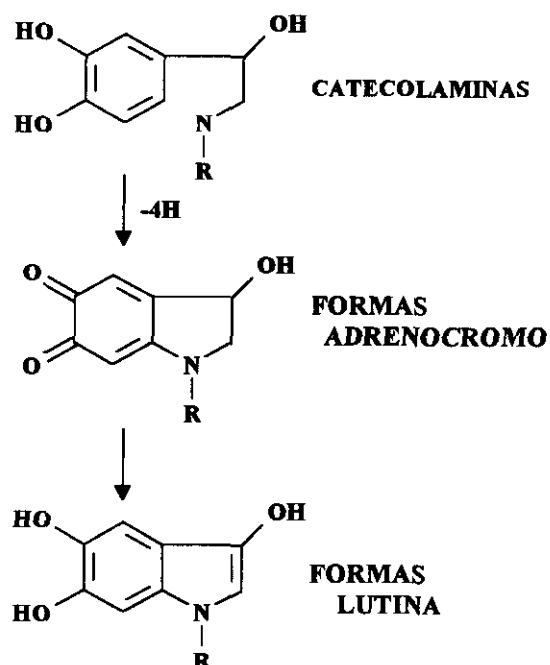
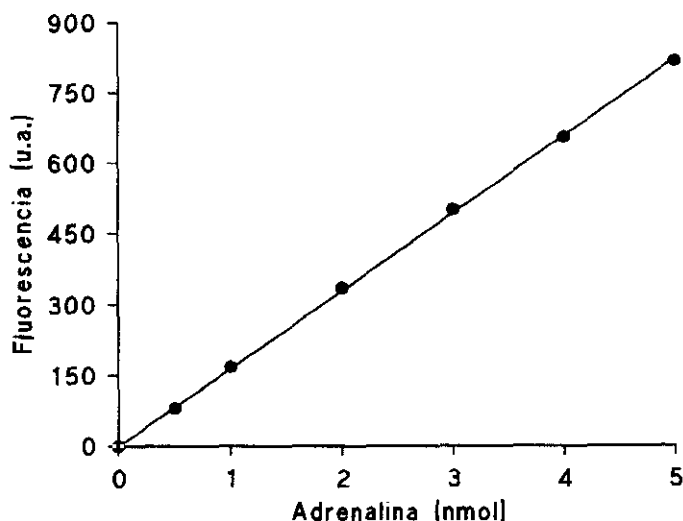


Figura 5-III. Esquema de la reacción de formación de los derivados trihidroxi indol. (R=H, noradrenalina; R=CH<sub>3</sub>, adrenalina).

Las lutinas fluorescentes son compuestos muy inestables que rápidamente podrían oxidarse dando lugar a derivados no fluorescentes. La adición de ácido ascórbico junto con la base fuerte estabiliza la fluorescencia alargando la vida de las lutinas fluorescentes. El protocolo experimental a describir tiene en cuenta estas características reactivas.

Para este experimento, las células se lavaron 2 veces con solución de Locke y se preincubaron durante 30 min en esa misma solución. Dependiendo del experimento particular las células fueron preincubadas con determinados agentes previo al período de estimulación. La estimulación se realizó en un volumen final de 200  $\mu\text{l}$  de solución de Locke conteniendo el compuesto a estudiar su efecto sobre la secreción. Tras el período de estimulación el medio extracelular conteniendo las catecolaminas liberadas se transfirió a tubos Eppendorf preenfriados a 4°C y sobre las células se añadieron 300  $\mu\text{l}$  de 10 % (v/v) ácido acético. Las células se rasparon en esa solución y se centrifugaron en Microfuga obteniéndose un sobrenadante que contenía las catecolaminas no liberadas por las células. Las medidas se realizaron en cubetas para fluorescencia que contenían 100  $\mu\text{l}$  de medio extracelular ó 10  $\mu\text{l}$  del sobrenadante procedente de las catecolaminas no liberadas (en este caso se igualó a un volumen de 100  $\mu\text{l}$  con solución de Locke). A las cubetas se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato (6  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7.0). La oxidación se disparó añadiendo 50  $\mu\text{l}$  de oxidante 2 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  y la reacción se detuvo a los 5 minutos exactos con 500  $\mu\text{l}$  de una solución conteniendo 1 N KOH y 8 mg/ml ascorbato. Las cubetas se dejaron reposar al menos 5 min y se midió la fluorescencia de las mismas excitando a una longitud de onda de 410 nm, registrándose la emisión a 520 nm.



**Figura 6-III.** Ejemplo de recta de calibrado para la determinación de catecolaminas mediante el método fluorométrico.

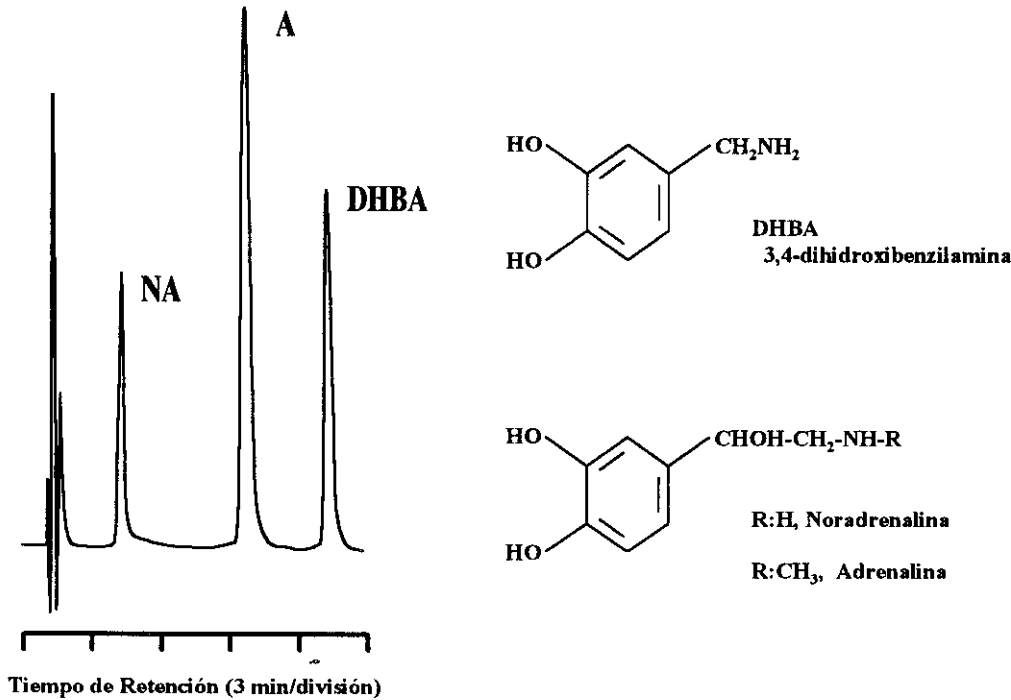
Para conocer la cantidad de catecolaminas presentes tanto en el medio extracelular como la que permaneció en el interior de las células tras el período de estimulación, las medidas obtenidas se compararon con valores obtenidos para una serie de cubetas con cantidades crecientes de adrenalina patrón a las que se sometió a idéntico protocolo que a las muestras celulares. Para este fin se construyó una recta de calibrado de rango 0.5-5 nmol de adrenalina. Como puede verse en el ejemplo de recta patrón, dentro de ese rango se cumplió una perfecta linealidad y las catecolaminas en las muestras se determinaron por interpolación en dicha recta.

Como se ha comentado anteriormente, este método también permite el análisis de mezclas de adrenalina y noradrenalina. Esto es posible ya que ambas moléculas se oxidan en diferentes rangos de pH dando compuestos fluorescentes con ligeramente diferentes espectros de emisión. En las condiciones en que se usó en este trabajo de investigación, esta técnica permite la medida preferencial de adrenalina. Este hecho se escogió así debido a que la amina mayoritaria en células cromafines bovinas es la adrenalina. Sin embargo, cuando se quisieron analizar de manera específica cada una de las catecolaminas, se usó el 2º método: cromatografía líquida de alta presión (HPLC) acoplada a detección electroquímica.

Para las medidas realizadas mediante este segundo método, el protocolo experimental hasta el período de estimulación de las células fue el mismo que para el método fluorimétrico. El resto del experimento consistió en mezclar una alícuota del medio extracelular conteniendo las catecolaminas secretadas con una solución ácida de perclórico/metabisulfito/EDTA para dar una concentración final de 0.2 N HClO<sub>4</sub>, 0.5 mM metabisulfito sódico y 0.45 mM EDTA. Así mismo, las células se rasparon en 300 µl de esa misma solución. A diferencia del método fluorimétrico en el que las determinaciones debieron hacerse inmediatamente después de la obtención de las muestras celulares con objeto de evitar la oxidación espontánea de las aminas, las muestras en solución ácida de perclórico/metabisulfito/EDTA son estables bastante tiempo. Posteriormente, tanto las muestras procedentes del medio extracelular como las de los pocillos, se centrifugaron y los sobrenadantes fueron diluidos teniendo en cuenta la sensibilidad del detector electroquímico con la misma solución ácida conteniendo 3,4-dihidroxibenzilamina (DHBA) como estándar interno (usualmente dilución 1:2 para las catecolaminas secretadas y 1:20 para las catecolaminas totales).

Estas muestras (10 µl/inyección) fueron posteriormente analizadas por HPLC en fase reversa en un sistema alimentado por una bomba Spectra Physics SP 8800 trabajando en modo isocrático con una fase móvil de 25 mM ácido cítrico, 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>, 5 µM EDTA, 0.12 mM ácido octanosulfónico, pH 3.4 ajustado con fosfórico; a una velocidad de flujo de 1.2 ml/min. La fase estacionaria fue una columna LC-18-DB (15 cm x 4.6 mm, 5-µm) de Supelco, especialmente preparada para separar compuestos orgánicos básicos. El efluente de la columna se monitorizó por oxidación sobre un ánodo de grafito de un detector electroquímico Metrohm 641 VA ajustado a un potencial de +0.8 V y a una sensibilidad de 50 nA. La oxidación de las catecolaminas generó una corriente medible y proporcional a la concentración de las mismas. La señal

se envió a un integrador modelo Chromjet de Spectra Physics que analizó los picos como unidades de área. Un ejemplo de cromatograma se muestra en la siguiente figura junto con las estructuras de las 3 aminas.



**Figura 7-III. Análisis diferencial de catecolaminas por HPLC acoplada a detección electroquímica.** Ejemplo de cromatograma procedente de células cromafines mostrando los picos de adrenalina y noradrenalina junto con el estándar interno dihidroxibenzilamina. Las estructuras de las 3 aminas también se muestran.

Las unidades de área de los picos de A y NA se transformaron en ng comparando con las unidades de área del estándar interno de DHBA asumiendo que los 3 compuestos (A, NA y DHBA) producen corrientes equivalentes /ng de amina.

En experimentos puntuales la suma de A+NA se analizó mediante detección electroquímica. En este caso, los sobrenadantes obtenidos después del período de estimulación se analizaron con un sistema similar al descrito anteriormente pero en ausencia de columna de separación. Por tanto, la corriente generada en el electrodo procedía de la mezcla A+NA. Esta corriente se transformó en nmol de catecolaminas por comparación con inyecciones de adrenalina patrón.

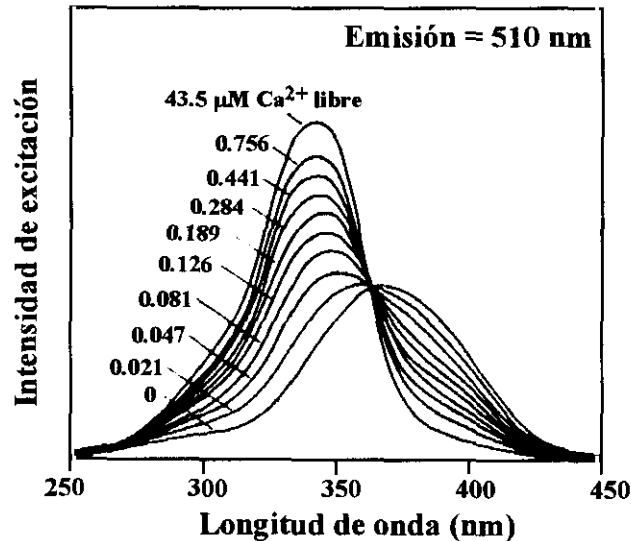
La secreción de catecolaminas (tanto para A, NA ó la suma de ambas) se expresó como porcentaje de catecolaminas liberadas respecto del total de las mismas, considerándose el total la suma de las liberadas al medio y las que permanecieron en las células. Esta forma de expresar los resultados permitió la normalización de cultivo a

cultivo ya que, mientras la cantidad de catecolaminas presentes en las células presentó una cierta variabilidad, no ocurrió lo mismo con el porcentaje de secreción con un estímulo y un tiempo determinados (ver capítulo Resultados).

### Determinación de la concentración de calcio citosólico

La determinación de la concentración de calcio libre citosólico  $[Ca^{2+}]_i$  se realizó empleando Fura-2 como indicador fluorescente (Grynkiewicz *et al.*, 1985; Castro *et al.*, 1992).

Este indicador fluorescente pertenece a una familia de compuestos cuya estructura tiene como base la molécula de EGTA a la cual se han añadido diferentes grupos cromóforos. La intensidad de fluorescencia del Fura-2 aumenta a medida que el compuesto liga  $Ca^{2+}$  al mismo tiempo que el espectro de excitación se desplaza al azul, cambiando la longitud de onda del máximo de  $\approx 370$  nm a unos 340 nm.



**Figura 8-III. Espectro de excitación de Fura-2 en presencia de diferentes concentraciones de calcio libre.** Adaptado de "Handbook of fluorescent probes and research chemicals" R.P. Haugland, Molecular Probes, 1992.

Para monitorizar la  $[Ca^{2+}]_i$ , la sonda debe acumularse en el interior de la célula. Como se aprecia en su estructura, el Fura-2 está cargado negativamente lo que impide a la molécula atravesar la membrana plasmática. Para solventar este problema, se emplean derivados éster acetoximetilo del Fura-2 (Fura-2/AM). Estos derivados son liposolubles y atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Una vez en el interior de la célula, los enlaces éster son hidrolizados por esterasas intracelulares liberando el Fura-2 activo, que permanece atrapado en el interior debido a sus cargas negativas lo que facilita su acumulación intracelular (Tsien, 1981).

Los experimentos se realizaron con células cromafines mantenidas en suspensión a 4°C. Las células se atemperaron a 37°C y se lavaron 2 veces por centrifugación a baja velocidad con solución de Locke. Posteriormente las células se resuspendieron en el mismo medio conteniendo 1 mg/ml de albúmina de suero bovino y 2.5 µM Fura-2/AM y se incubaron en este medio durante 30 min a 37°C. A continuación las células fueron lavadas por centrifugación para eliminar la sonda extracelular e incubadas en solución Locke hasta el experimento. Cuando las células se preincubaron con agentes a estudiar su efecto sobre la  $[Ca^{2+}]_i$ , dichas preincubaciones se realizaron durante este período. En estos casos, células control se preincubaron por el mismo espacio de tiempo con solución de Locke. Después se volvieron a lavar por centrifugación y fueron resuspendidas en medio fresco (1.5 ml=  $10^6$  cel) y transferidas a cubetas para la determinación fluorométrica.

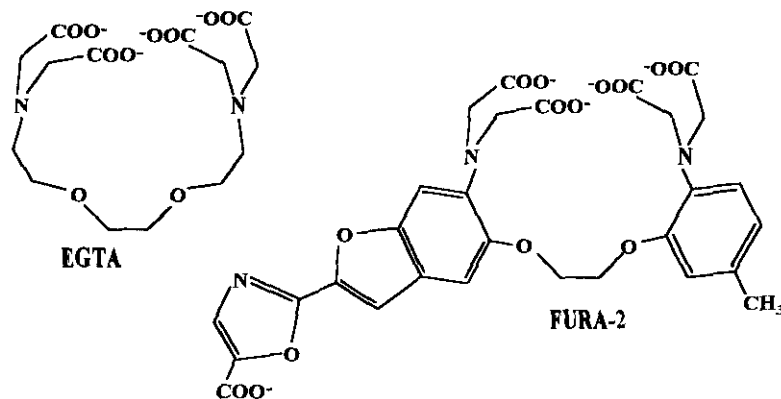
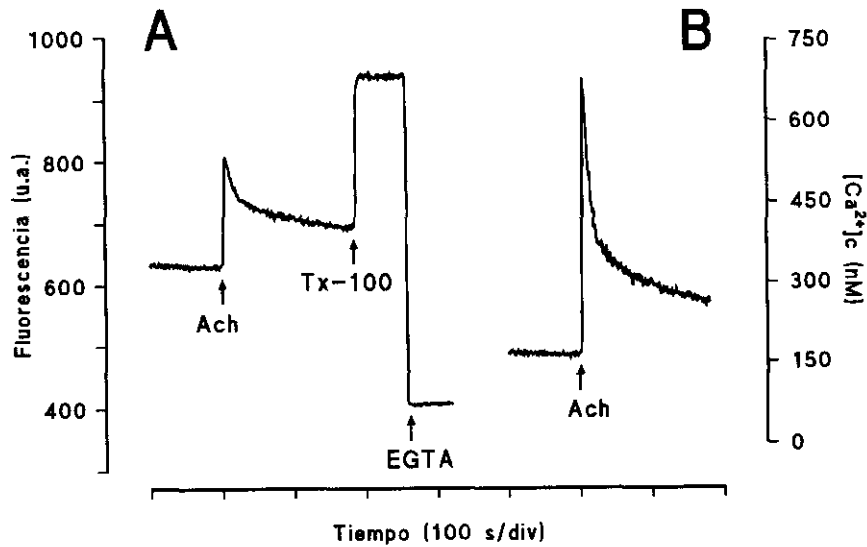


Figura 9-III. Estructuras de EGTA y Fura-2.

La fluorescencia celular debida al Fura-2 se analizó de manera continua con un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50B dotado de agitación continua y termostatización a 37°C. La sonda fluorescente se excitó a 340 nm y se registró la emisión a 510 nm. El ensayo consistió en registrar durante aproximadamente 1-2 min el nivel de fluorescencia basal y, a continuación, añadir los diferentes agentes a estudiar su efecto sobre la  $[Ca^{2+}]_i$ . Estos agentes se añadieron a la cubeta mediante jeringas Hamilton a partir de soluciones al menos 100 veces concentradas con objeto de evitar variaciones considerables en el volumen de la cubeta. Al término de cada experimento individual, las células se lisaron con 0.4 % (v/v) Triton X-100 a fin de saturar el Fura-2 con el calcio extracelular, obteniéndose la señal máxima ( $F_{max}$ ), y posteriormente se añadió EGTA 7.5 mM en un medio alcalinizado con Tris para quelar el  $Ca^{2+}$  y obtener así la señal mínima ( $F_{min}$ ).



**Figura 10-III. Calibración de la señal fluorescente de Fura-2 en  $[Ca^{2+}]_i$ .**  
 A) Registro de fluorescencia cruda mostrando las diferentes adiciones efectuadas. B) El mismo registro que en A después de efectuar la calibración.

La concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico fue calculada a partir del valor de fluorescencia ( $F$ ) según la siguiente ecuación, asumiendo un valor de constante de disociación ( $K_d$ ) para el complejo  $Ca^{2+}$ -Fura-2 de 224 nM: (Grynkiewicz *et al.*, 1985):

$$[Ca^{2+}]_i = \frac{K_d (F - F_{min})}{(F_{max} - F)}$$

### Determinación del potencial de membrana

Los cambios en el potencial de membrana se estudiaron con la sonda fluorescente bisoxonol (Kitayama *et al.*, 1990). Aunque la mayor parte de los estudios del potencial de membrana se han realizado empleando microelectrodos, el uso de sondas indicadoras del potencial de membrana es un método eficaz que evita la necesidad de poner a punto técnicas electrofisiológicas. Además, la eficacia de estas sondas se ha puesto de manifiesto en preparaciones en las que los microelectrodos no se pueden emplear, como, por ejemplo, orgánulos subcelulares o células muy pequeñas.

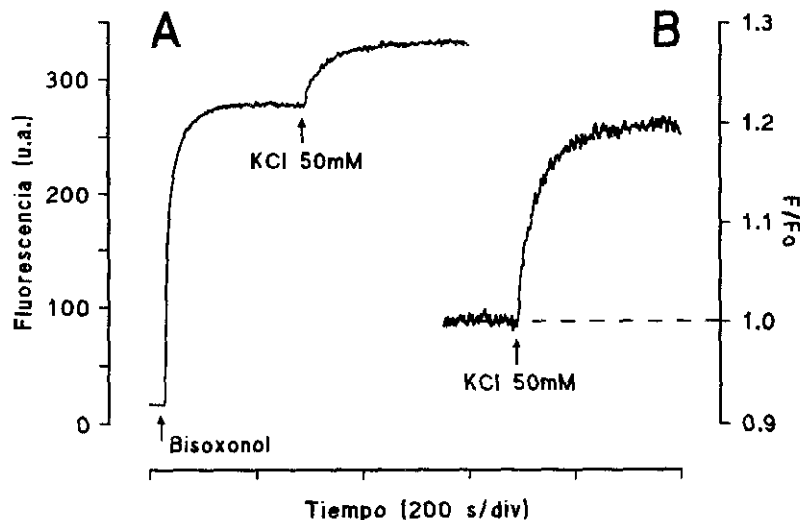
La sonda bisoxonol es un anión lipofílico que permea libremente la membrana y cuya distribución a ambos lados de la membrana depende del potencial. Cuando la membrana se despolariza permite el paso de una mayor cantidad de sonda a su través. En el interior de las células la sonda se une a proteínas intracelulares y aumenta considerablemente su fluorescencia. Este es un proceso relativamente lento y, por

tanto, los resultados que se pueden obtener sólo son un reflejo cualitativo de las variaciones del potencial de membrana.

Para este tipo de experimentos las células se mantuvieron en suspensión a 4°C. Después se atemperaron a 37°C y se lavaron 2 veces por centrifugación. A continuación fueron preincubadas en solución de Locke en presencia o ausencia de los diferentes agentes a estudiar su efecto sobre el potencial de membrana. Posteriormente se resuspendieron en medio fresco (1.5 ml= 2x10<sup>6</sup> cel) y fueron transferidas a cubetas para la determinación fluorométrica.

Como en el ensayo de Fura-2 la fluorescencia se registró de manera continua en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer dotado de agitación y termostatación a 37°C. Las longitudes de onda de excitación y de emisión fueron 485 nm y 515 nm, respectivamente. El ensayo consistió en registrar durante aproximadamente 1-2 min la autofluorescencia de las células. A continuación se añadió la sonda bisoxonol para obtener una concentración final de 200 nM. La adición de la sonda produjo un incremento considerable de la fluorescencia que requirió unos 3-5 min para mantenerse estable. Una vez estabilizado se añadieron los diferentes agentes.

Aunque es posible calibrar la señal fluorescente en unidades de voltaje añadiendo a las células diferentes concentraciones de KCl y calculando el potencial de acuerdo a la ecuación de Nernst, los resultados que se muestran en este trabajo de investigación se expresaron como valores de fluorescencia normalizados ( $F/F_0$ ) que son muy útiles en términos de comparación entre diferentes registros. Para esta normalización, el registro completo se divide por el valor de fluorescencia previo a la adición del agente despolarizante.



**Figura 11-III. Determinación del potencial de membrana.** A) Registro de fluorescencia cruda que muestra las adiciones de la sonda y del despolarizante. B) El mismo registro que en A después de la normalización.

### **Análisis de datos**

Los resultados presentados en este trabajo de investigación corresponden a un mínimo de tres experimentos realizados en duplicado o triplicado y obtenidos a partir de, al menos, dos preparaciones distintas de células. Los valores indicados en el texto o presentados en los gráficos representan el valor medio  $\pm$  la desviación estándar de la muestra de valores experimentales.

Las calibraciones de los experimentos de Fura-2 y las normalizaciones del potencial de membrana se realizaron con el programa *Grafical* diseñado por el Dr. Enrique Castro.

Las comparaciones entre pares de valores medios se realizaron por medio de una prueba *t* de Student. Las curvas concentración-respuesta para obtener valores de  $EC_{50}$  ó  $IC_{50}$  se ajustaron a un modelo sigmoidal de la forma logaritmo de la concentración frente a la respuesta. Cuando se estudió en detalle la caída exponencial de la  $[Ca^{2+}]_i$  hasta el nivel basal después de un pico, esta recuperación se ajustó a una ecuación monoexponencial de 1° orden y los valores de  $t_{1/2}$  se calcularon a partir de esta ecuación. Tanto para estos ajustes como para la propia realización de los gráficos presentados en este trabajo se utilizó el programa *Figure Processor* que emplea el ajustador de ecuaciones *Parameter Fitter* (Biosoft).



## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## **1. LAS CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS EN CULTIVO: UN MODELO NEUROSECRETOR**

### **El proceso de obtención y purificación**

Exceptuando la zona de la vena medular central y sus vasos tributarios asociados, los cuales contienen células musculares lisas y otros elementos de tejido conectivo; la médula adrenal está formada por un parénquima endocrino que contiene las células cromafines y un estroma caracterizado por una red capilar formada casi exclusivamente por tejido endotelial fenestrado. La mitad de la población celular de la médula adrenal está constituida según estimaciones por células no cromafines. Entre éstas están las células ganglionares, fibras nerviosas, fibroblastos y células endoteliales, siendo estas últimas el tipo celular no cromafín mayoritario (Kobayashi y Coupland, 1993). Por esta razón, cualquier proceso de obtención y purificación de células cromafines tiene que tener en cuenta estas consideraciones.

Las características del proceso de obtención y purificación utilizado en este trabajo de investigación tienen como objeto obtener preparaciones de células cromafines con una alta pureza y, al mismo tiempo, con un rendimiento óptimo.

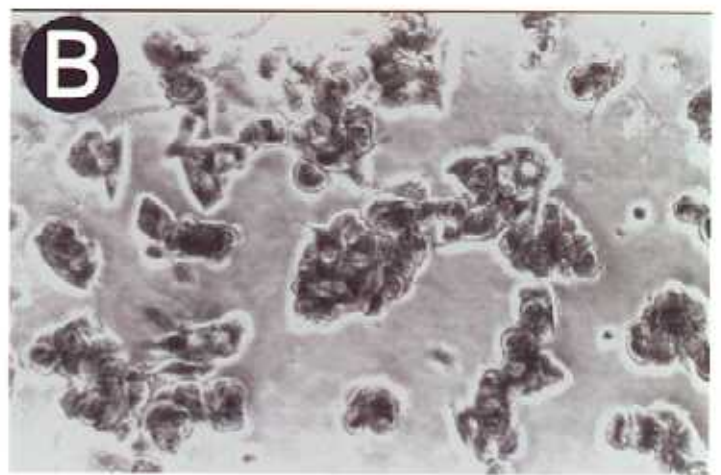
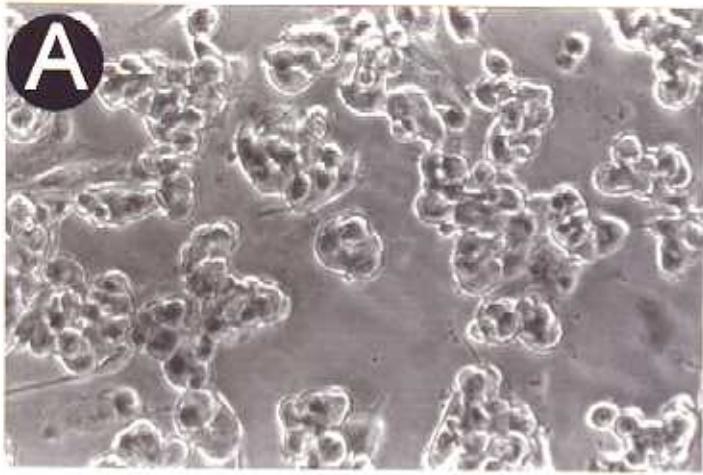
En primer lugar, la perfusión de las glándulas en sentido retrógrado permite que la acción primaria de la colagenasa utilizada para digerir el tejido tenga lugar en la médula. Manejando con cuidado el tiempo de perfusión con dicha enzima es posible conseguir la digestión parcial de la médula (que pasa a ser una papilla viscosa) y dejar completamente intacta la corteza. Este hecho resulta clave para asegurar un cultivo libre de células corticales. Con los lotes de colagenasa usados el tiempo óptimo fue aproximadamente de 1 hora.

En segundo lugar y debido a que sólo la mitad de las células obtenidas a partir de la médula digerida son cromafines, es esencial la elección de un método de purificación adecuado. Aunque muchos investigadores que trabajan con células cromafines bovinas prefieren usar un gradiente de Percoll en la etapa de purificación, para la realización de este trabajo se ha usado un gradiente de urografina. En repetidos experimentos este tipo de gradiente se ha mostrado mucho más eficaz para la purificación de las células. Este gradiente presenta la ventaja adicional de que la franja del gradiente que contiene las células cromafines es mucho más nítida que en el gradiente de Percoll, y además, a diferencia de éste, está prácticamente libre de fragmentos subcelulares y agregados de colágeno. Puede considerarse, por tanto, un método más limpio.

## LAMINA I

**Figura 1-IV. Cultivo de células cromafines bovinas.** Micrografías realizadas bajo contraste de fases de células procedentes del mismo cultivo antes (A) y después (B) de incubación con el colorante rojo neutro. La magnificación es de unas 200 veces. En B las escasas células no teñidas representan células endoteliales.

**Figura 2-IV. Células cromafines adrenérgicas y noradrenérgicas.** Estudios de inmunofluorescencia de doble marcaje de TH y PNMT en un cultivo de células cromafines bovinas fijadas en acetona/metanol (ver Métodos). A) Células en contraste de fases son indistinguibles en términos de la amina que contienen. B) Las células positivas frente a anti-TH son catecolaminérgicas. (C) TH- y PNMT-positivas son adrenérgicas mientras que aquellas positivas frente a TH pero negativas frente a PNMT son noradrenérgicas (la flecha indica la posición de una de ellas). La magnificación es de unas 300 veces. La fluorescencia en B y C se muestra en forma invertida. En A es posible ver "células" no marcadas con TH, éstas pueden representar o bien células endoteliales, o bien artefactos de la preparación/fijación.

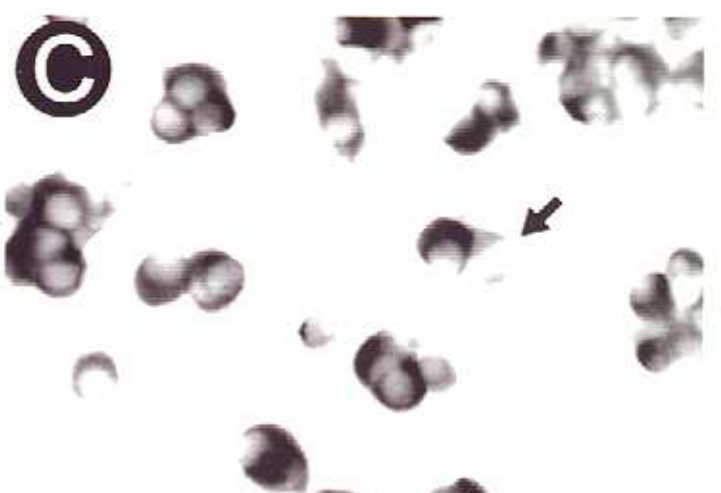
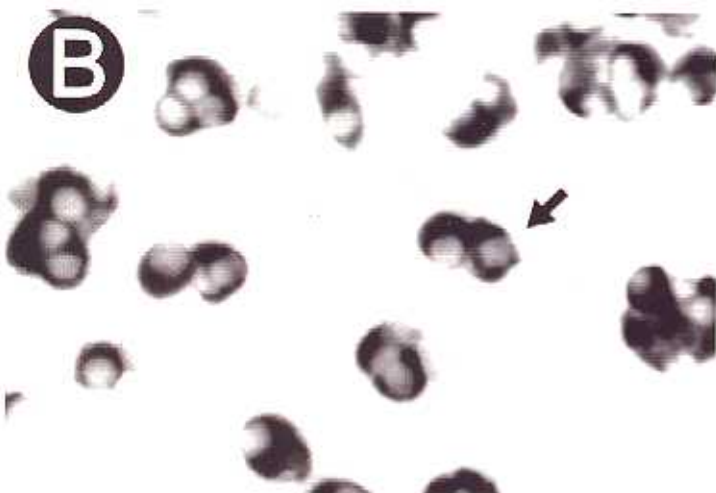


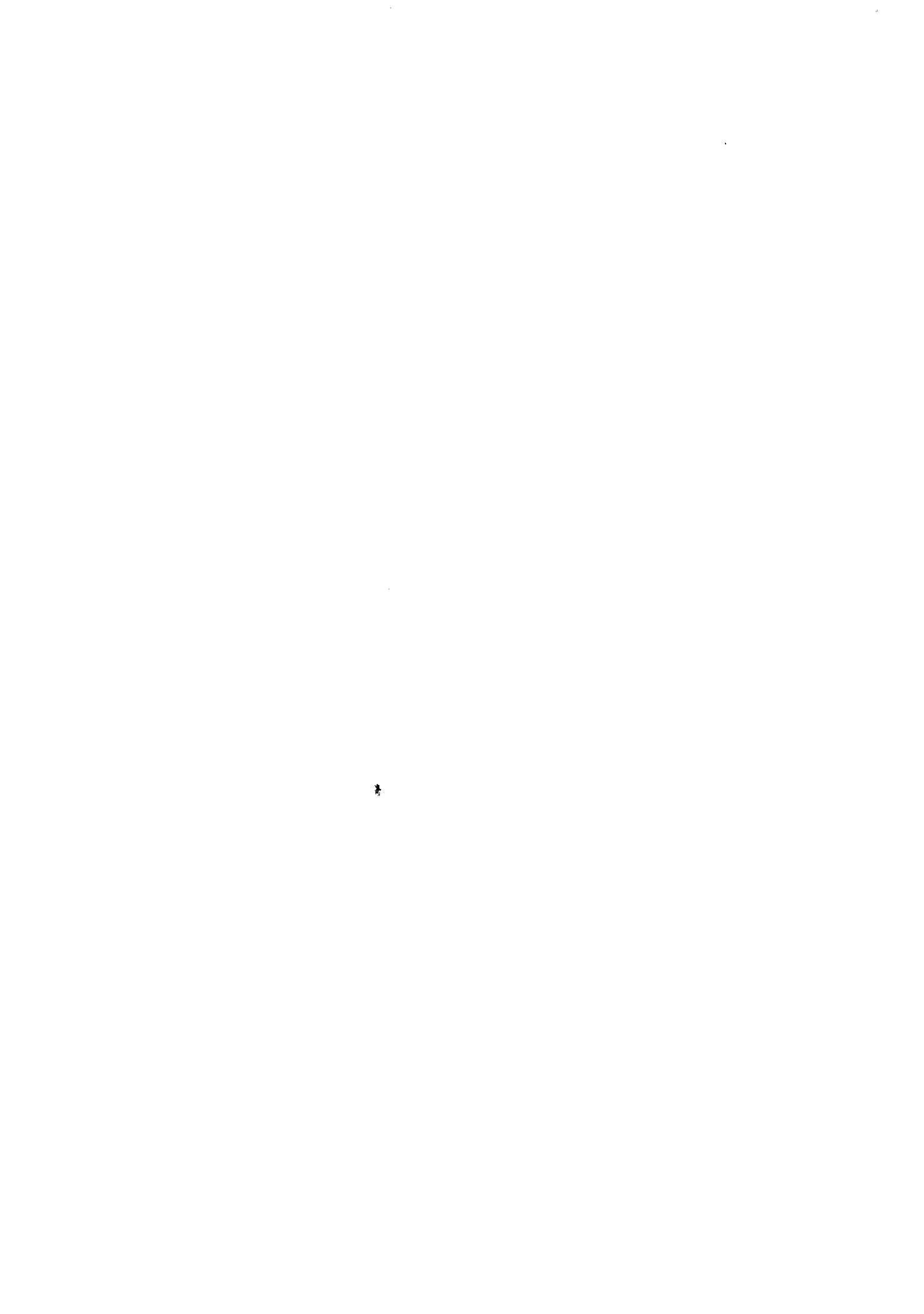
---

LAMINA I

Superior, Figura 1A y B.

Inferior, Figura 2A, B y C.





En cuanto al rendimiento, con el método empleado se obtuvieron unos  $22 \pm 10$  millones de células/glándula (valor mínimo 6 y máximo 49, en millones de células) con una pureza en cromafines  $>95\%$  en la inmensa mayoría de los cultivos. La médula de una glándula adrenal bovina puede contener según autores aproximadamente 500 millones de células cromafines (Phillips, 1982), lo que supone un rendimiento menor del 5%. De esto se deduce fácilmente que el tejido bovino es especialmente indicado para la obtención de estas células ya que, a pesar de este bajo rendimiento, es posible obtener el alto número de células que usualmente se requiere para efectuar estudios bioquímicos.

### Composición del cultivo

La figura 1 muestra células cromafines en cultivo fotografiadas 72 horas después del sembrado de las mismas. Bajo contraste de fases, estas células presentan ciertas características inequívocas como son su forma redondeada con un halo brillante y su tendencia a agregarse entre sí en grupos de hasta varias decenas de células (Fig. 1A).

Muchos autores han descrito que con el tiempo en cultivo estas células tienden a emitir prolongaciones en forma de neuritas (Unsicker *et al.*, 1980). Debido a que en este trabajo las células no se usaron más allá del 5º día en cultivo, estas células no presentan estos signos de diferenciación, según se muestra claramente en las fotografías.

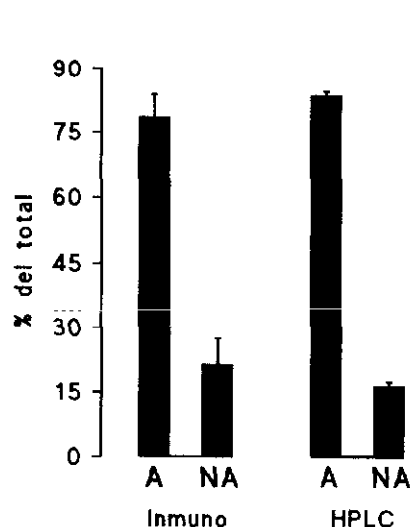
La figura 1B muestra células del mismo cultivo pero después de una tinción con el colorante rojo neutro. Aunque este colorante no es específico de células cromafines, la tinción con rojo neutro puede utilizarse como criterio de pureza ya que no tiñe las células contaminantes (endoteliales).

Estudios morfológicos indican que las catecolaminas adrenalina y noradrenalina se almacenan en distintas células en la médula adrenal (Hillarp y Hökfelt, 1953; Eranko, 1955). La diferencia principal entre células adrenérgicas y noradrenérgicas radica en la presencia o ausencia de la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT), responsable de la metilación de la noradrenalina a adrenalina; no obstante, ciertos estudios apuntan a que existen otras características diferenciales entre ambos tipos celulares (Núñez *et al.*, 1995).

Las células adrenérgicas y noradrenérgicas no pueden distinguirse bajo contraste de fases, pero sí son distinguibles mediante detección inmunofluorescente de las enzimas tirosina hidroxilasa (TH) y PNMT según se muestra en la figura 2. El marcaje específico con anticuerpos frente a TH (Fig. 2B) marca aquellas células que son cromafines, mientras que el anticuerpo anti-PNMT (Fig. 2C) solamente las que son adrenérgicas.

Estos estudios de inmunofluorescencia TH/PNMT permiten una estimación del porcentaje de células adrenérgicas/noradrenérgicas por conteo de las mismas. Este porcentaje también puede obtenerse mediante determinación por HPLC de la cantidad de adrenalina y noradrenalina contenida en las células. Como puede apreciarse en la figura 3, existe una buena correlación entre los porcentajes de células adrenérgicas (A)

y noradrenérgicas (NA) estimados mediante inmunocitoquímica y mediante determinación por HPLC. Aunque la proporción de células A/NA presenta variaciones de cultivo a cultivo, la población adrenérgica constituye normalmente alrededor de un 80-85 % de las células.



**Figura 3-IV. Células adrenérgicas y noradrenérgicas en el cultivo de cromafines. Estimación del porcentaje mediante estudios inmunocitoquímicos y por determinación de catecolaminas por HPLC.** El panel *Inmuno* muestra el porcentaje de células adrenérgicas (A) y noradrenérgicas (NA) estimado mediante conteo de las células en estudios inmunocitoquímicos de doble marcaje TH/PNMT según se describe en Fig. 2. El panel *HPLC* muestra el contenido porcentual de cada amina (A: adrenalina y NA: noradrenalina) estimado mediante separación por HPLC acoplada a detección electroquímica según se describe en la sección de Métodos.

Entre especies existe también una gran diversidad en los niveles relativos de células A y NA. Así, por ejemplo, en el cerdo las células adrenérgicas constituyen un 30 % del total (Kong *et al.*, 1989), en el gato el valor aumenta hasta un 50 % y en la glándula bovina intacta se ha descrito un valor de aproximadamente un 65 % (Moro *et al.*, 1991), que difiere considerablemente del valor obtenido para células en cultivo. Aunque, como se ha comentado anteriormente, existe una relativa variabilidad de cultivo a cultivo que podría explicar esta discrepancia; no es descartable que el método de purificación utilizado resulte en un enriquecimiento del cultivo en células adrenérgicas.

#### Actividad fisiológica de las células cromafines en cultivo

Con objeto de validar el cultivo de células cromafines como modelo neurosecretor es necesario llevar a cabo un estudio detallado de los parámetros característicos de la respuesta secretora.

Como parámetros representativos de la neurosecreción se midieron la liberación de catecolaminas y también las variaciones en la  $[Ca^{2+}]_i$  y en el potencial de membrana en respuesta al secretagogo fisiológico acetilcolina (ACh) y al agente despolarizante cloruro potásico (KCl).

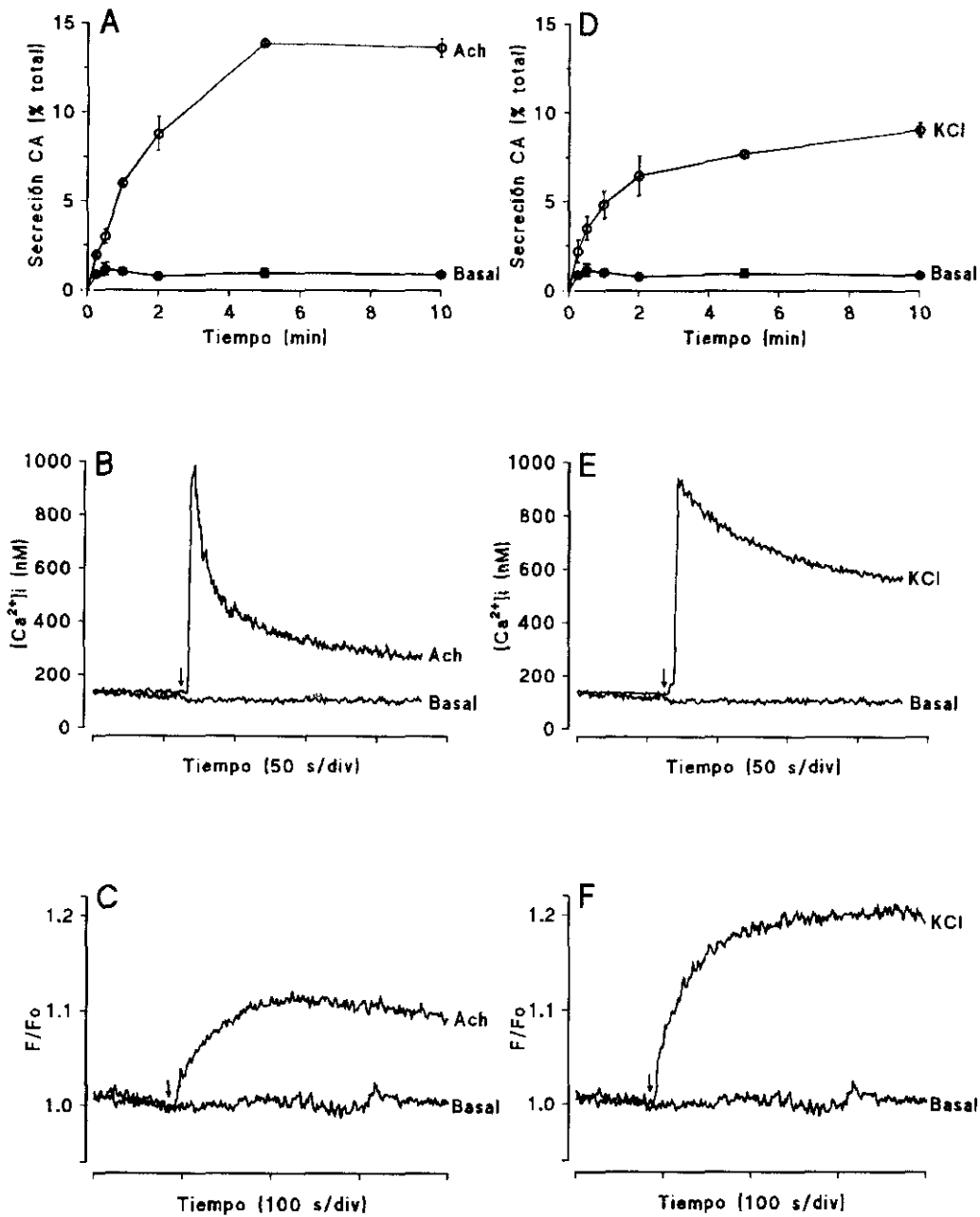
La figura 4 muestra el efecto sobre estos tres parámetros de la estimulación de células cromafines con ACh, KCl y basal en función del tiempo. Ambas moléculas producen incrementos muy significativos (comparando con células en estado basal) tanto de las catecolaminas liberadas al medio como de la  $[Ca^{2+}]_i$  y del potencial de membrana.

Estos efectos mediados por Ach y KCl son dependientes de la dosis empleada para estimular las células según se muestra en la figura 5. Los valores de  $EC_{50}$  para Ach fueron  $30.98 \pm 2.48 \mu\text{M}$  para secreción de catecolaminas,  $14.69 \pm 0.90 \mu\text{M}$  para el incremento del calcio citosólico y  $7.39 \pm 1.20 \mu\text{M}$  para el potencial de membrana (Fig. 5A). Con KCl como secretagogo los valores estimados a partir de la figura 5B fueron 25 mM para secreción de catecolaminas, 12 mM para calcio y 18 mM para potencial de membrana.

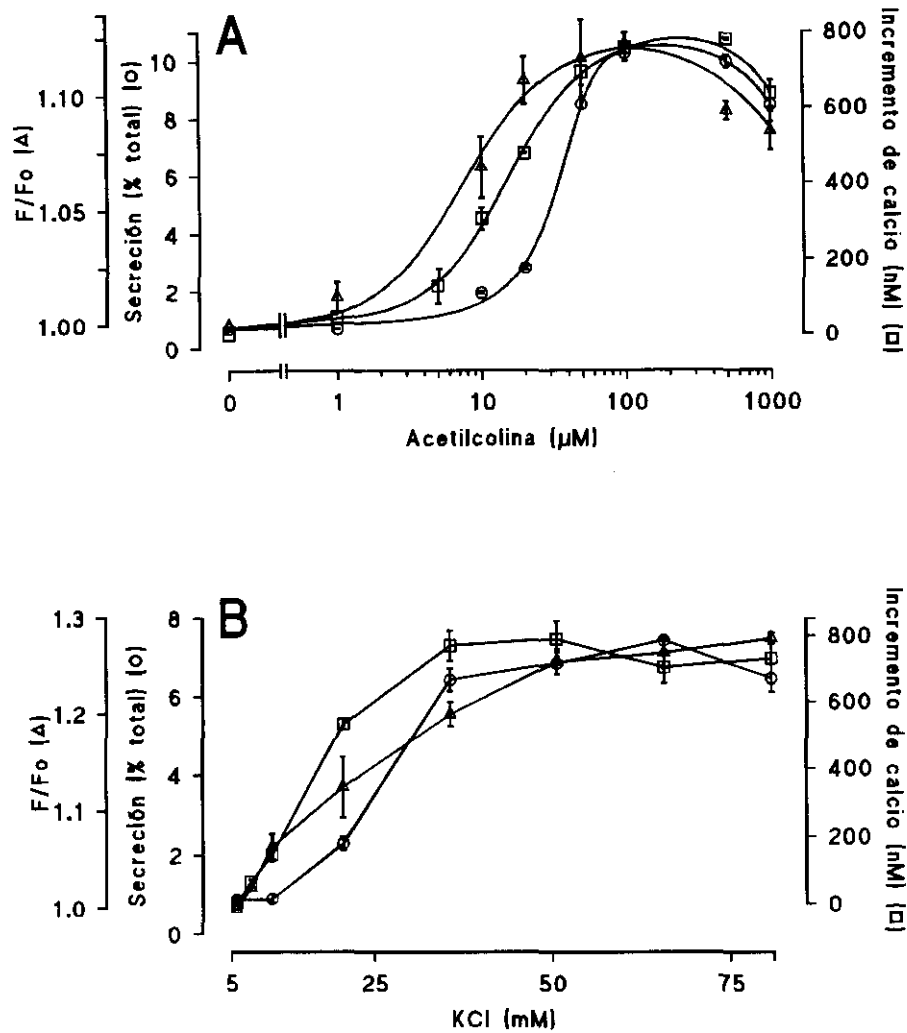
Según se muestra en la figura 4, los tres parámetros presentan diferentes cinéticas que dependen tanto de la propia respuesta de las células como del método de medida empleado. Ambos secretagogos producen una despolarización que puede detectarse midiendo la variación en la fluorescencia de la sonda bisoxonol. No obstante, debido a la lenta distribución de la sonda en respuesta a la despolarización, la fluorescencia no refleja fielmente en el tiempo las variaciones en el potencial de membrana.

Como puede apreciarse en estas medidas, Ach produce una respuesta de potencial más pequeña que KCl. Esto es debido al mecanismo por el cual ambas moléculas inducen la despolarización de las células. Mediante medidas de "patch-clamp" se ha demostrado que Ach produce una rápida despolarización seguida de una descarga de potenciales de acción. En una población de células esto significa que en un momento dado habrá simultáneamente células despolarizadas y polarizadas, es decir, en promedio la variación en el potencial de membrana es menor que si todas estuviesen despolarizadas. Por el contrario, KCl produce una despolarización permanente que, por tanto, se refleja en un valor mayor de fluorescencia procedente de la sonda bisoxonol (Douglas *et al.*, 1967a; 1967b; Biales *et al.*, 1976).

Las medidas de  $[Ca^{2+}]_i$  y de catecolaminas liberadas al medio extracelular permiten obtener una estimación más fiel en el tiempo de estos parámetros aunque también presentan limitaciones técnicas. Así, durante la respuesta secretora el citosol de las células no presenta una  $[Ca^{2+}]_i$  homogénea sino que existen zonas en las que el calcio citosólico aumenta considerablemente (las zonas próximas a los canales de calcio) y otras zonas en las que el incremento es menor o no se produce (Burgoyne *et al.*, 1989a). La determinación mediante la sonda fura-2, tal y como se ha usado en este trabajo, no discrimina entre estas zonas y sólo permite obtener una  $[Ca^{2+}]_i$  que es un promedio de toda la célula. A pesar de estas limitaciones, el estudio del calcio citosólico mediante fura-2 es una técnica muy utilizada que, bien empleada, ofrece una estimación muy veraz de las variaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  que experimentan las células. Bajo estas condiciones experimentales la  $[Ca^{2+}]_i$  basal estimada en células cromafines es de aproximadamente 100 nM. Ach produce una respuesta de calcio en forma de un pico transitorio inicial hasta un valor cercano a 1  $\mu\text{M}$  y después la  $[Ca^{2+}]_i$  disminuye hasta un valor de meseta. KCl 30 mM presenta el mismo patrón de respuesta pero el pico transitorio es mucho menos agudo y el valor de meseta al que tiende la  $[Ca^{2+}]_i$  es más alto que cuando se estimula con Ach.



**Figura 4-IV. Respuestas de secreción de catecolaminas, calcio citosólico y potencial de membrana a los secretagogos acetilcolina y cloruro potásico.** Células cromafines bovinas en cultivo fueron incubadas con acetilcolina 50  $\mu$ M (panel A, secreción; panel B, calcio; panel C, potencial) ó KCl 30 mM (D, secreción; E, calcio, F, potencial) y se midieron los citados parámetros en función del tiempo según se describe en la sección Métodos.



**Figura 5-IV. Dosis-dependencia de las respuestas de secreción de catecolaminas, calcio citosólico y potencial de membrana a los secretagogos acetilcolina y cloruro potásico.** Células cromafines bovinas en cultivo fueron incubadas con diferentes dosis de acetilcolina (A) o de KCl (B) y los parámetros de secreción de catecolaminas (círculos), incremento del calcio (cuadrados) y potencial de membrana (triángulos) se determinaron según se describe en la sección Métodos. Los valores correspondientes a Ach se ajustaron a un modelo sigmoideal de la forma *logaritmo de la concentración frente a la respuesta* con objeto de determinar los valores de  $EC_{50}$ . Para el KCl, ningún tipo de ajuste fue empleado y los valores de  $EC_{50}$  del texto se obtuvieron por intersección con las líneas que unen los puntos.

Un millón de células cromafines bovinas en cultivo contienen en promedio  $130.65 \pm 5.68$  nmol de catecolaminas. Cuando las células se estimulan con Ach y KCl, estos secretagogos producen una acumulación de catecolaminas en el medio extracelular que sigue una cinética lineal hasta aproximadamente 2-5 minutos para ir ralentizándose posteriormente. A los 5 minutos de incubación con acetilcolina las células liberan al medio un 15 % de sus catecolaminas totales. Aunque Ach no produce la despolarización sostenida que produce KCl, merece la pena destacar que ambas moléculas producen similares incrementos en la concentración de calcio citosólico e incluso Ach produce mayor secreción. Tal y como se ha comentado en el capítulo de Introducción, este hecho podría indicar que la entrada de calcio inducida por Ach está acoplada más eficientemente al proceso secretor.

Teniendo en cuenta todos estos resultados, para la mayoría de los experimentos realizados en este trabajo de investigación se eligieron concentraciones de Ach y KCl de 50  $\mu$ M y 30 mM, respectivamente, las cuales pueden ser consideradas condiciones elevadas de estimulación. Por otro lado, en algunos experimentos, se usaron como estímulos más suaves concentraciones de Ach y KCl de 20  $\mu$ M y 15 mM, respectivamente.

En lo que se refiere a secreción de catecolaminas, se eligió un tiempo de estimulación de dos minutos, ya que si bien las catecolaminas acumuladas en el medio extracelular no alcanzaban su valor máximo, se conseguía minimizar de esta manera las posibles influencias de otros fenómenos distintos al proceso secretor como la recaptación de las catecolaminas, el transporte de vesículas a la membrana o el posible efecto de los productos secretados sobre la propia secreción actuando, según se ha descrito, a través de autorreceptores inhibitorios (Doupnik y Pun, 1993).

De igual manera, para cuantificar las medidas de calcio intracelular se midieron las variaciones en la  $[Ca^{2+}]_i$  desde el nivel basal hasta el pico transitorio ya que este incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  refleja de manera más precisa la entrada de calcio asociada al proceso secretor.

Como conclusión, a partir de estos resultados se puede afirmar que las células cromafines bovinas en cultivo constituyen un buen modelo experimental para estudiar la posible modulación del fenómeno de la neurosecreción por rutas de segundos mensajeros como el óxido nítrico/GMPc.

## 2. PRESENCIA DE LA RUTA NO:GMPc EN CELULAS CROMAFINES BOVINAS

### Caracterización inmunocitoquímica de óxido nítrico sintasa (NOS) y guanilato ciclasa soluble (GCS)

La purificación de las diferentes isoenzimas de NOS (Bredt *et al.*, 1990), así como de las subunidades de GCS (Guthmann *et al.*, 1992) ha permitido el desarrollo de anticuerpos que son de gran utilidad para estudiar la distribución de las enzimas de la ruta en los diferentes tejidos.

Las figuras 6 y 7 muestran el resultado de los estudios inmunocitoquímicos que se han llevado a cabo para detectar la presencia de estas enzimas en células cromafines bovinas. Fig. 6A muestra una significativa inmunorreactividad específica para NOS I. Ningún marcaje específico se observó cuando el anticuerpo frente a NOS I fue sustituido por suero preinmune o de animales no inmunizados (Fig. 6B). Según se muestra en la figura 7, idéntico resultado se obtuvo con anticuerpos específicos frente a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de GCS (Fig. 7A, subunidad  $\alpha$ ; 7B, subunidad  $\beta$ ; 7C, suero control). En experimentos llevados a cabo en las mismas condiciones experimentales empleando anticuerpos específicos frente a NOS II y NOS III no se detectó la presencia de ninguna de estas isoformas en células cromafines como indica el hecho de que un patrón similar se obtuvo cuando las células fueron incubadas con los anticuerpos específicos y con suero control (resultados no mostrados).

Alrededor del 90 % de las células cromafines muestran una marcada inmunorreactividad NOS I. De igual manera, ambas subunidades de GCS fueron detectadas en la práctica totalidad de las células.

### Colocalización de NOS I y GCS con las enzimas de síntesis de catecolaminas TH y PNMT

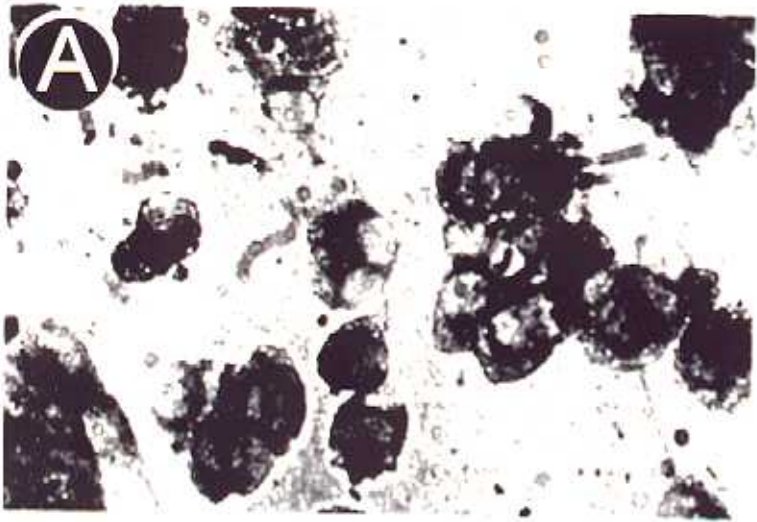
El hecho de que prácticamente todas las células cromafines muestren inmunorreactividad específica de NOS I y GCS parece indicar que esta ruta de 2° mensajeros está presente en el tejido cromafín. Para confirmar este resultado y además estudiar una posible localización específica o mayoritaria de NOS I y GCS en alguna de las dos poblaciones de células cromafines (adrenérgicas y noradrenérgicas), se hicieron estudios de inmunofluorescencia de doble marcaje con los siguientes pares de anticuerpos: TH/NOS I (Fig. 8A,B), PNMT/NOS I (8C,D) y TH/GCS (9E,F), PNMT/GCS (9G,H).

Este estudio revela que las enzimas NOS I y GCS colocalizan mayoritariamente con TH y PNMT indicando que, primero, ambos antígenos están inequívocamente presentes en células cromafines; y segundo, que la ruta NO:GCS no está preferentemente localizada en alguna de las poblaciones de células cromafines bovinas sino que, por el contrario, existe en ambos tipos celulares.

**LAMINA II**

**Figura 6-IV. Tinción inmunocitoquímica de células cromafines bovinas en cultivo con un anticuerpo biotilado anti-NOS I (A).** Cuando el anticuerpo primario fue reemplazado por suero preinmune de conejo no se observó marcaje específico (B). La magnificación es de unas 400 veces.

**Figura 7-IV. Tinción inmunocitoquímica de células cromafines bovinas en cultivo usando anticuerpos biotilados específicos frente a las subunidades  $\alpha$  (A) y  $\beta$  (B) de guanilato ciclasa soluble.** En (C) el anticuerpo primario fue sustituido por suero de conejo no inmunizado. La magnificación es de unas 400 veces.

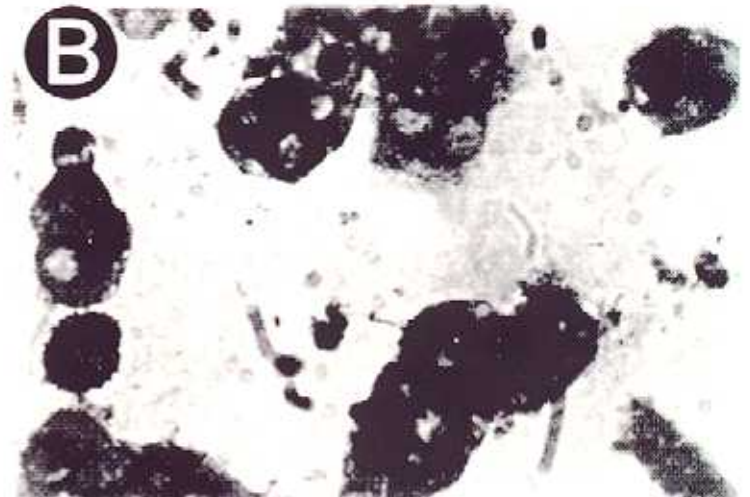
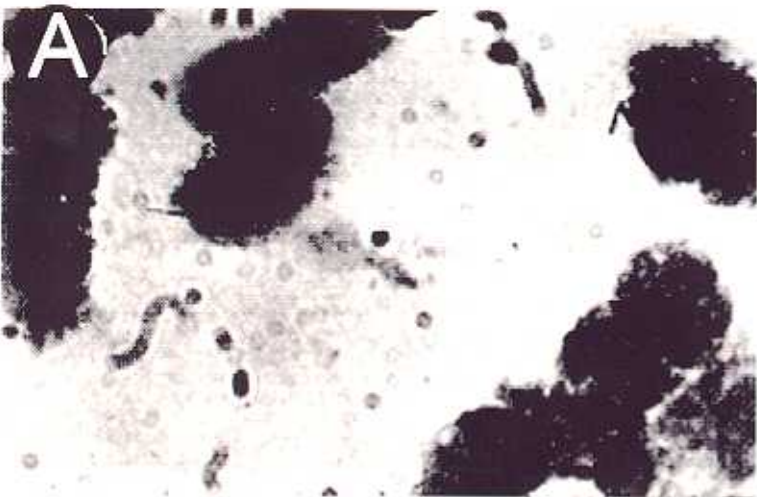


---

LAMINA II

Superior, Figura 6A y B.

Inferior, Figura 7A, B y C.



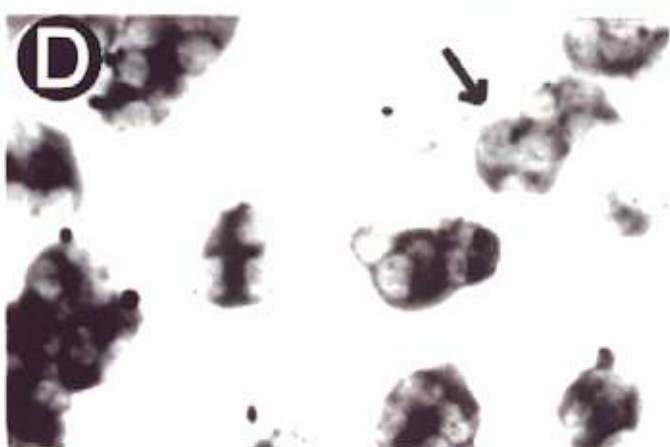
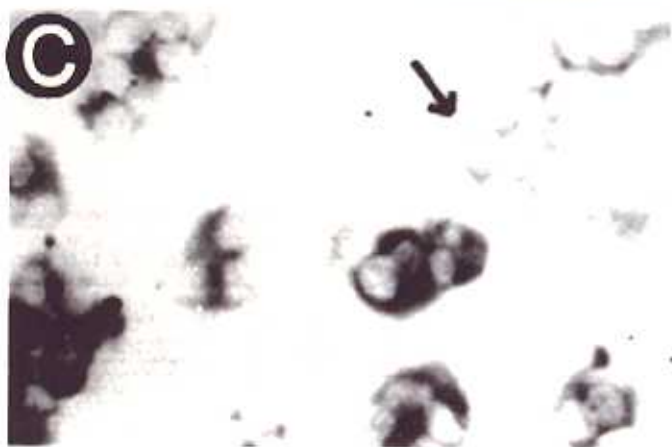
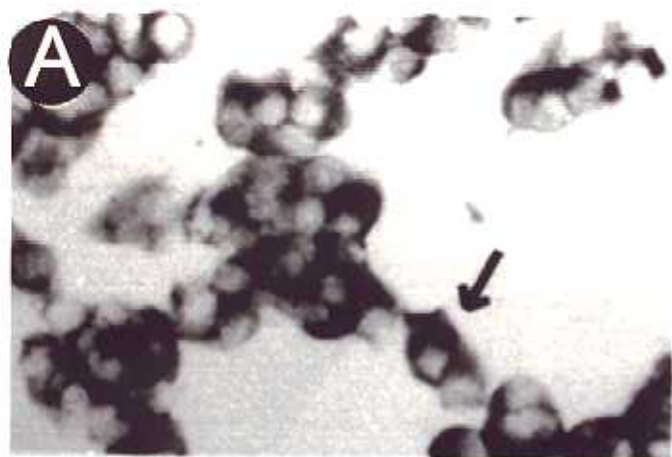




**LAMINA III**

**Figura 8-IV. Inmunofluorescencia de doble marcaje de células cromafines bovinas en cultivo con anticuerpos específicos frente a NOS I, TH y PNMT.** A) Células cromafines marcadas con anti-TH conjugado a FITC. B) Las mismas células marcadas con un anticuerpo conjugado a Cy3 frente a NOS I. Las flechas indican células positivas para TH pero negativas para NOS I. C) Células cromafines marcadas con anti-PNMT conjugado a FITC. D) Las mismas células marcadas con un anticuerpo conjugado a Cy3 específico frente a NOS I. Las flechas indican células positivas frente a NOS I pero negativas o ligeramente marcadas frente a PNMT. La fluorescencia se muestra en forma invertida. La magnificación es de unas 300 veces.

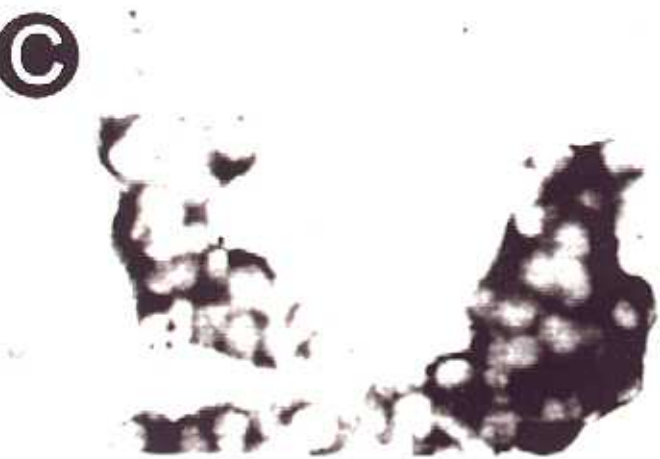
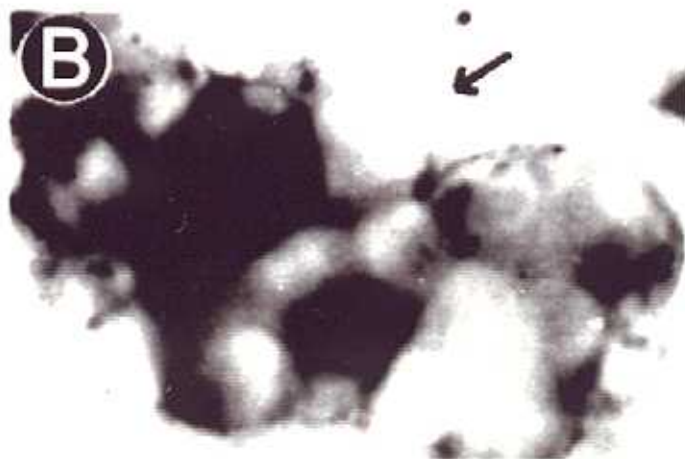
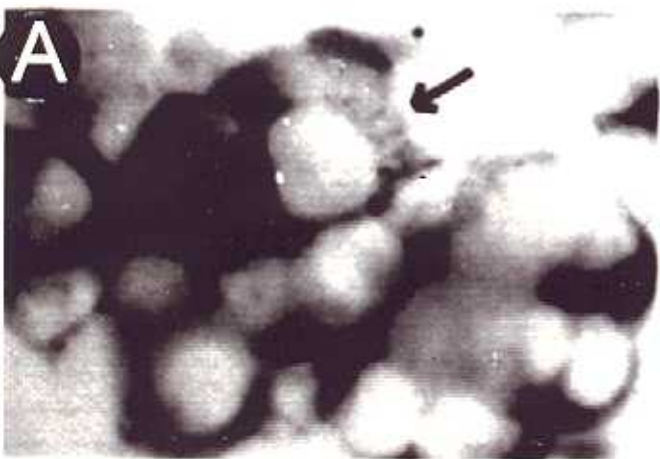
**Figura 9-IV. Inmunofluorescencia de doble marcaje de células cromafines bovinas en cultivo con anticuerpos específicos frente a GCS (subunidad  $\beta$ ), TH y PNMT.** A) Células cromafines marcadas con anti-TH conjugado a FITC. B) Las mismas células marcadas con un anticuerpo conjugado a Cy3 frente a GCS. Las flechas indican células positivas para TH pero negativas para GCS. C) Células cromafines marcadas con anti-PNMT conjugado a FITC. D) Las mismas células marcadas con un anticuerpo conjugado a Cy3 específico frente a GCS. La fluorescencia se muestra en forma invertida. La magnificación es 750 veces para C y D, y 300 veces para A y B.



LAMINA III

Superior: Figura 8A, B, C y D.

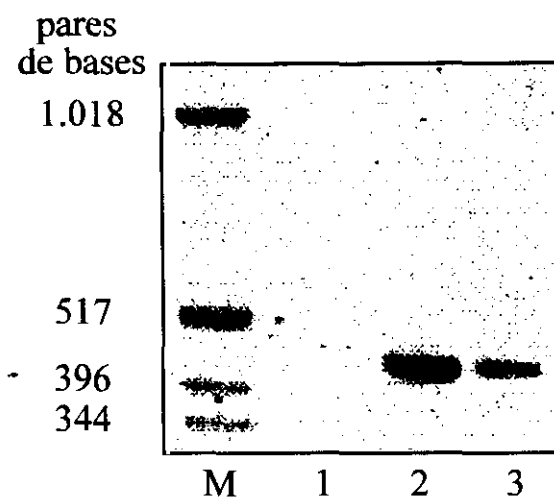
Inferior: Figura 9A, B, C y D.





### Caracterización del RNA mensajero de NOS I en células cromafines bovinas

Actualmente, tanto los genes que codifican para las isoformas de NOS como los de GCS están clonados y se conoce exactamente su secuencia nucleotídica (Bredt *et al.*, 1991b; Koesling *et al.*, 1988, 1990; Nakane *et al.*, 1988, 1990). Este hecho ha permitido la aplicación de técnicas de detección de mensajeros específicos en extractos de tejidos para estudiar la distribución de estas enzimas en los diferentes tejidos. En este trabajo se utilizó la técnica de transcripción reversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para detectar el RNA mensajero de NOS I en RNA total extraído a partir de células cromafines bovinas.



**Figura 10-IV. RT-PCR de DNA complementario de células cromafines bovinas usando oligonucleótidos iniciadores específicos para NOS I.** RNA total obtenido a partir de células cromafines bovinas y a partir de cerebelo (control positivo) fue transcrito en modo reverso y el DNA complementario usado como molde para PCR. El fragmento DNA-NOS I (de tamaño 460 pares de bases) fue amplificado a partir de cerebelo de rata (2) y a partir de células cromafines (3). En ausencia de DNA complementario, no se observó producto de amplificación (1). M: marcadores de peso molecular conocido.

La figura 10 muestra una electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación obtenidos a partir del RNA de células cromafines bovinas y, como control positivo, de cerebelo de rata. Un fragmento del tamaño esperado para el DNA de NOS I (460 pares de bases) fue amplificado a partir de cerebelo de rata y de células cromafines bovinas, indicando este hecho la presencia de NOS I en estas células no sólo a nivel de proteína sino también a nivel de RNA.

### Caracterización bioquímica de NOS: Producción de óxido nítrico

Los estudios inmunocitoquímicos realizados ponen de manifiesto la presencia de la enzima NOS I en células cromafines bovinas, sin embargo, este tipo de estudios no ofrece ninguna información acerca del grado de activación de la enzima en las células ni de su regulación. Este tipo de información sólo puede obtenerse a partir de estudios bioquímicos en los que se determine directa o indirectamente la actividad enzimática de óxido nítrico sintasa.

En la bibliografía se han descrito distintas técnicas para valorar la producción de óxido nítrico generado a partir de fuentes biológicas. La mayor parte de estos métodos están basados en las propiedades de óxido-reducción de la molécula y han demostrado su eficacia en la monitorización de la producción de NO a partir de enzimas inducibles, las cuales producen grandes cantidades de óxido nítrico. Sin embargo, las mucho más modestas cantidades generadas a partir de isoformas constitutivas son más difíciles de detectar. El método más sensible para valorar actividad enzimática NOS está basado en la formación de L-citrulina a partir del precursor radiactivamente marcado L-arginina en la reacción enzimática catalizada por la NOS (Bredt y Snyder, 1990).

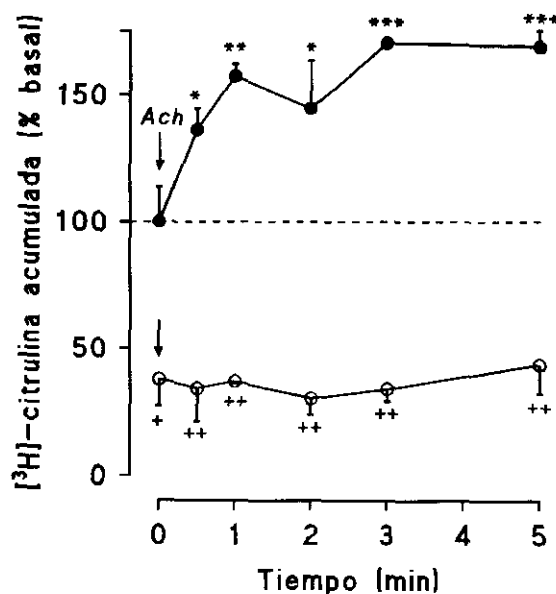
Aunque este método fue inicialmente descrito para valorar actividad NOS en extractos de células o tejidos, o incluso en preparaciones más o menos purificadas de la enzima, la técnica es igualmente aplicable a células intactas. En células funcionalmente activas la participación de otras rutas enzimáticas distintas a NOS puede dar cuenta de una transformación inespecífica de L-arginina en L-citrulina, como ocurre, por ejemplo, en células hepáticas y macrófagos a través de la enzima arginasa en el ciclo de la urea, o incluso conversión de arginina a otros productos que con la técnica empleada no pueden ser distinguidos de L-citrulina. Por esta razón, es muy importante conocer de manera efectiva el porcentaje de L-citrulina realmente producida a partir de una enzima NOS. Así, se emplean inhibidores específicos de la enzima NOS con objeto de discriminar la L-citrulina marcada procedente de NOS de aquella producida por otras vías.

Para la determinación de la actividad NOS, las células cromafines se preincubaron con [<sup>3</sup>H]-L-arginina durante 20 minutos para marcar el "pool" intracelular de este aminoácido. La figura 11 muestra la acumulación intracelular de [<sup>3</sup>H]-L-citrulina a partir de la [<sup>3</sup>H]-L-arginina incorporada en las células.

Puesto que las isoformas constitutivas de NOS son Ca<sup>2+</sup>/calmodulina dependientes, se estudió el efecto sobre la acumulación de citrulina marcada del secretagogo acetilcolina, el cual incrementa considerablemente la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Según se muestra en la citada figura, existe una clara acumulación dependiente del tiempo de estimulación con Ach. Esta acumulación alcanza un valor máximo del 150 % del basal entre 2-5 minutos. Cuando el experimento se realizó preincubando las células con 1 mM NG-nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME), una concentración suficiente para bloquear la actividad NOS (ver resultados capítulo siguiente), se observó que la acumulación de

citulina se redujo considerablemente (hasta un 40 % del basal) y el incremento producido por acetilcolina se abolió totalmente.

Estos resultados demuestran mediante una aproximación bioquímica que las células cromafines bovinas poseen una actividad enzimática NOS de tipo constitutivo, estimulada por  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina, resultado que concuerda perfectamente con la caracterización realizada por métodos inmunológico y de expresión de RNA. Además estos resultados indican que esta actividad NOS no sólo se activa tras estimulación de las células con Ach, sino que también es enzimáticamente activa en condiciones basales.



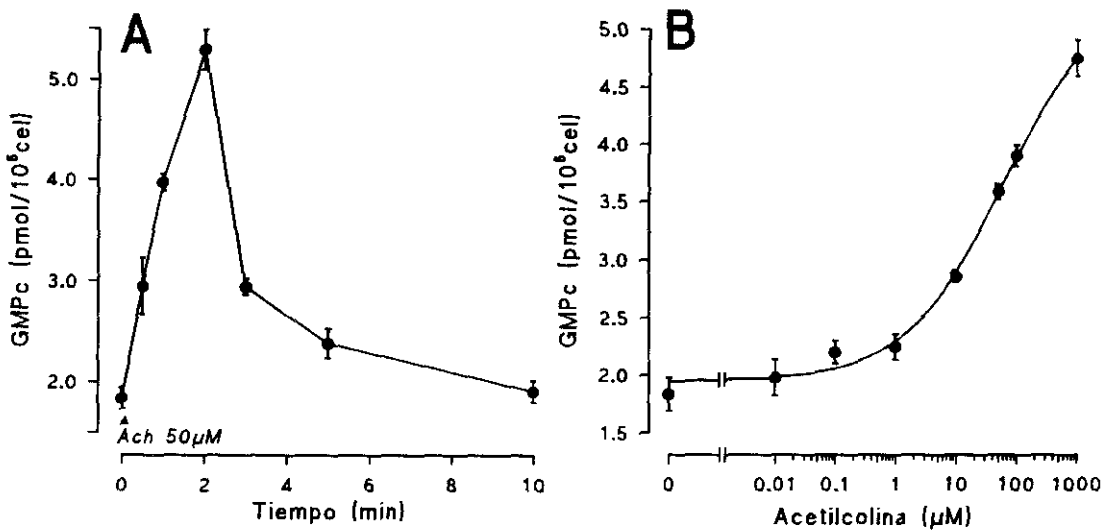
**Figura 11-IV. Efecto de Ach 100  $\mu\text{M}$  sobre la acumulación de  $[^3\text{H}]$ -citulina a partir de  $[^3\text{H}]$ -arginina.** Las células se preincubaron en presencia (círculos abiertos) o ausencia (círculos cerrados) de L-NAME 1 mM y la acumulación de citulina marcada a partir de arginina se determinó según se describe en Materiales y Métodos. En condiciones basales (tiempo cero y en ausencia de L-NAME), la conversión en  $[^3\text{H}]$ -citulina fue del  $3.7 \pm 1.5$  % de la  $[^3\text{H}]$ -arginina incorporada. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  indican diferencias significativas cuando se compara con el basal. + $p < 0.01$  y ++ $p < 0.001$  indican inhibición significativa cuando se compara con los correspondientes valores de tiempo en ausencia de L-NAME.

Ya que en este trabajo de investigación no se determinó la concentración intracelular de L-arginina, la acumulación de L-citulina no se puede expresar en términos cuantitativos como cantidad total de L-citulina producida (y, por tanto, estequiométricamente de óxido nítrico). Para normalizar, dicha acumulación se expresó como porcentaje respecto del basal (tiempo cero).

### Caracterización bioquímica de GCS: Producción de GMPc

El principal receptor intracelular del óxido nítrico en la mayoría de los tejidos es la guanilato ciclasa soluble. Esta enzima es una hemoproteína que aumenta considerablemente su actividad cuando el NO interacciona con el grupo hemo (Gerzer *et al.*, 1981), de tal manera que una producción de NO se correlaciona en la mayor parte de los casos con un aumento en los niveles intracelulares de GMPc.

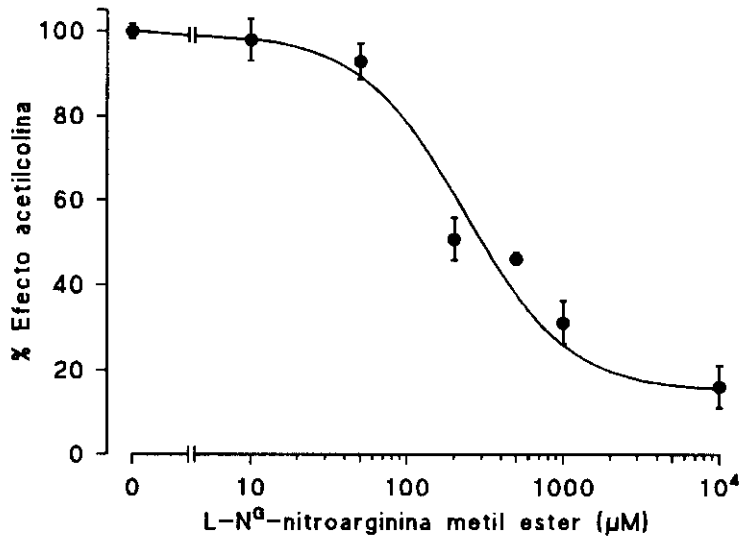
Del mismo modo que las medidas de actividad enzimática de NOS coinciden con los estudios realizados mediante técnicas inmunocitoquímicas en demostrar la presencia de una enzima NOS constitutiva, es previsible que la determinación de los niveles intracelulares de GMPc también confirme la presencia de una guanilato ciclasa soluble en células cromafines bovinas.



**Figura 12-IV. Formación de GMPc estimulada por acetilcolina en células cromafines bovinas.** A) Estudio en función del tiempo de la producción de GMPc estimulada por Ach 50  $\mu$ M. B) Curva concentración-respuesta para la producción de GMPc inducida por una estimulación de 1 minuto con Ach. Las células se preincubaron durante 30 min con 0.5 mM IBMX a 37°C. Después, las células fueron incubadas con Ach en presencia de IBMX. El GMPc acumulado en las células se determinó mediante radioinmunoensayo según se describe en la sección Métodos.

Según se muestra en la figura 12A, células cromafines bovinas preincubadas durante 30 minutos con 0.5 mM 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) contienen  $1.840 \pm 0.107$  pmol GMPc/10<sup>6</sup>cel. La citada figura muestra también que Ach incrementa (2.5 veces) de un modo tiempo-dependiente los niveles intracelulares de GMPc. Este incremento es de naturaleza transitoria alcanzándose un pico a los dos minutos de estimulación con Ach, después de los cuales los niveles retornan lentamente al valor del basal. El efecto de Ach es dependiente de la dosis, obteniéndose a partir del panel B de la figura 12 un valor de EC<sub>50</sub> de  $61.05 \pm 5.24$   $\mu$ M. Estos resultados indican que una enzima que



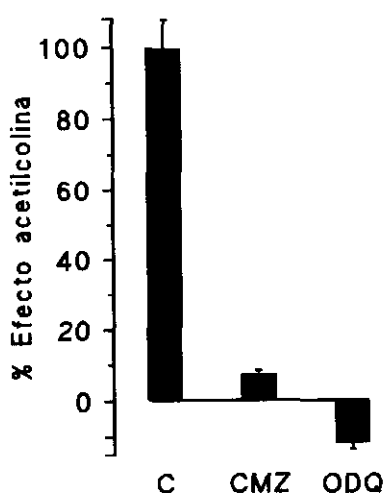


**Figura 14-IV. Efecto de la preincubación con L-NAME sobre la producción de GMPc estimulada por acetilcolina.** Las células se preincubaron con diferentes concentraciones de L-NAME en presencia de 0.5 mM IBMX durante 30 min a 37°C. Después de la preincubación se incubaron durante 1 min con Ach 100 μM en presencia de IBMX periodo tras el cual el GMPc se determinó. Los valores se presentan como porcentaje de la respuesta de acetilcolina en ausencia de preincubación con el análogo de arginina. El valor de 100 % equivale a un incremento de  $2.06 \pm 0.1$  pmol/10<sup>6</sup>cel sobre el nivel basal.

Puesto que no se conoce el grado de hidrólisis a L-NNA en los diferentes tejidos, es muy difícil comparar parámetros de inhibición obtenidos con L-NAME en diferentes preparaciones celulares. Además conviene tener en cuenta que la inhibición es competitiva frente a L-arginina, por tanto, la concentración intracelular de este aminoácido (usualmente entre 100-800 μM en la mayoría de los tejidos) afecta de manera notable al grado de inhibición (Förstermann *et al.*, 1994).

Otra serie de resultados que indican que existe un acoplamiento funcional de NOS y GCS se muestra en la figura 15. Dicha figura muestra que el incremento en los niveles de GMPc intracelular estimulado por Ach se inhibe completamente cuando las células se preincubaban con un antagonista de calmodulina, calmidazolium (30 μM CMZ) y con el inhibidor específico de guanilato ciclasa soluble, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (10 μM ODQ).

El histograma de la figura 15 junto con los resultados obtenidos con L-NAME confirman la presencia de una actividad GCS y además indican que el acoplamiento propuesto entre NOS y GCS existe y es activo en células cromafines bovinas.

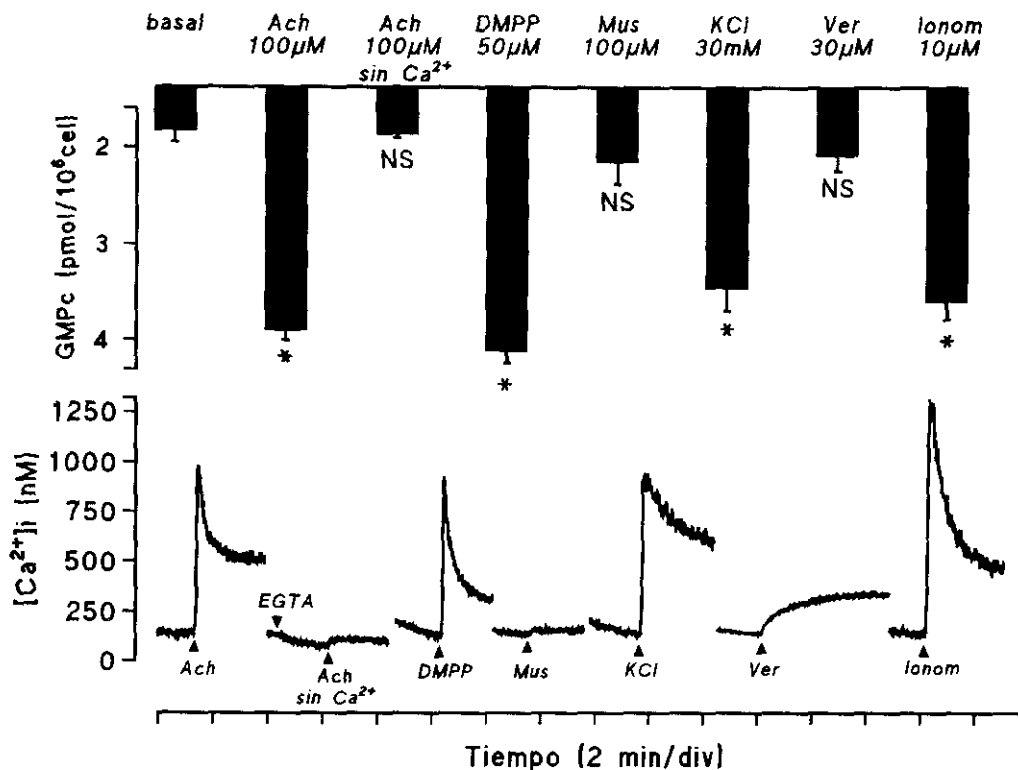


**Figura 15-IV. Participación de calmodulina y guanilato ciclasa soluble en la señal de GMPc mediada por acetilcolina.** Las células se preincubaron en presencia de IBMX durante 30 min con el antagonista de calmodulina, calmidazolium (CMZ, 30  $\mu$ M), o con el inhibidor específico de guanilato ciclasa soluble, 1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-ona (ODQ, 10  $\mu$ M). Después del período de preincubación las células se estimularon durante 1 min con Ach 100  $\mu$ M y el GMPc se determinó según se describe en la sección Métodos.

#### Efecto de secretagogos sobre los niveles intracelulares de GMPc

La actividad NOS de células cromafines bovinas es activada mediante  $Ca^{2+}$ /calmodulina por el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  suministrado por Ach. Con objeto de confirmar que existe un requerimiento absoluto de calcio para la activación de NOS, y, por tanto, de GCS, se estudió el efecto de Ach y de otros compuestos secretagogos que aumentan la  $[Ca^{2+}]_i$  mediante mecanismos distintos a Ach. Para estudiar esta posible correlación entre el NO/GMPc y la  $[Ca^{2+}]_i$ , las determinaciones de GMPc intracelular se combinaron con medidas de los incrementos en la  $[Ca^{2+}]_i$  estimulados por los siguientes secretagogos: acetilcolina en presencia y ausencia de calcio extracelular; el agonista nicotínico, 1,1-dimetil-4-fenil piperazinio (DMPP); el agonista muscarínico, muscarina; cloruro potásico; el ionóforo de calcio, ionomicina; y el activador de canales de  $Na^+$ , veratridina.

Acetilcolina en presencia de calcio extracelular activa receptores colinérgicos nicotínicos y muscarínicos. Ya que los primeros están acoplados a entrada de calcio a través del receptor-canal nicotínico y los últimos están acoplados a movilización de calcio del retículo endoplásmico, en ausencia de calcio en el medio extracelular, acetilcolina sólo actúa a través de receptores muscarínicos. DMPP y muscarina se usaron para estudiar con mayor profundidad la farmacología del efecto de Ach. Una alta concentración de KCl en el medio extracelular activa directamente los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, mientras que veratridina, al activar los canales de  $Na^+$ , produce despolarización y, por tanto, también activación de los canales de  $Ca^{2+}$ . El ionóforo de calcio se empleó como un medio de incrementar de manera inespecífica la  $[Ca^{2+}]_i$ .



**Figura 16-IV.** Efecto de diferentes secretagogos sobre el GMPc intracelular y sobre la concentración de calcio citosólico libre. Los estímulos empleados fueron acetilcolina 100 μM (Ach) en presencia y ausencia de calcio extracelular, el agonista nicotínico, 1,1-dimetil-4-fenil piperazinio 50 μM (DMPP); el agonista muscarínico, muscarina 100 μM (Mus); cloruro potásico 50 mM (KCl); el ionóforo de calcio, ionomicina 10 μM (Ionom); y el activador de canales de Na<sup>+</sup>, veratridina 30 μM (Ver). Los niveles de GMPc y la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> se determinaron según se describe en Materiales y Métodos. En los resultados de GMPc, \*p < 0.001 indica una diferencia significativa con respecto a la respuesta control, NS significa no significativo.

Como se puede ver en la figura 16, sólo aquellos compuestos que incrementan de una manera notable la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> son capaces de producir aumentos significativos en los niveles de GMPc intracelular. Cuando se utilizó muscarina, veratridina o acetilcolina en ausencia de calcio externo; condiciones experimentales que producen incremento nulo o muy pequeño de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, no se observó variación en el GMPc intracelular.

Respecto a la farmacología de la respuesta colinérgica, es claro a partir de estos resultados experimentales que la respuesta NO/GMPc de Ach se produce por activación de receptores nicotínicos. Aunque se ha descrito que las células cromafines bovinas poseen ambos tipos de receptores, nicotínicos y muscarínicos (Livett *et al.*, 1979; Mizobe *et al.*, 1979); en estas condiciones experimentales la señal de calcio producida por activación del componente muscarínico es tan pequeña (prácticamente nula) que no activa la Ca<sup>2+</sup>/calmodulina y, por tanto, no inicia una respuesta NOS:GCS.

Por otro lado, puesto que KCl incrementa la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en la misma extensión que la activación de receptores nicotínicos, resulta obvio el hecho de que también sea capaz

de incrementar el GMPc intracelular en tanto en cuanto el único requisito para la activación de esta señal es el incremento en el calcio citosólico. Este mecanismo es confirmado de manera más firme con los resultados obtenidos con veratridina e ionomicina. Veratridina, aunque produce un pequeño incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , parece no ser suficiente para activar NOS:GCS. Por el contrario, ionomicina, capaz de aumentar grandemente la  $[Ca^{2+}]_i$ , y cuyo efecto es totalmente independiente de receptores y canales iónicos, produce un incremento significativo de GMPc.

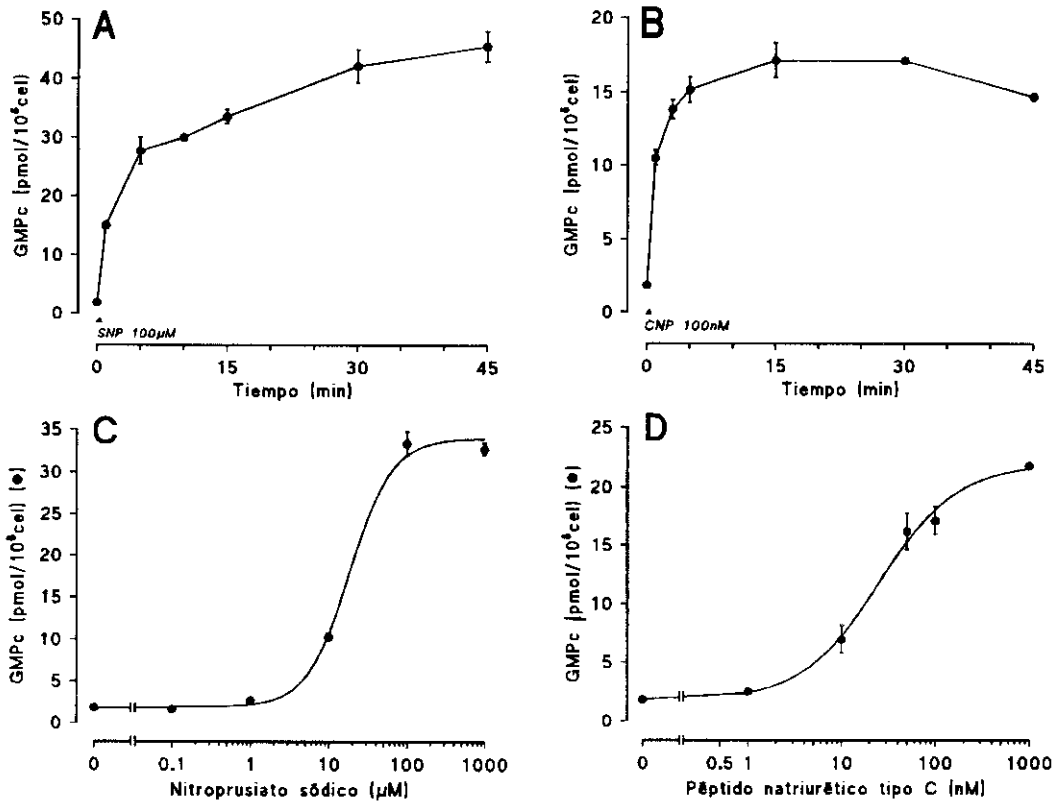
#### **Activación independiente de $Ca^{2+}$ de los niveles de GMPc intracelular: Efecto del donador de NO, nitroprusiato sódico (SNP), y del péptido natriurético de tipo C (CNP)**

El conjunto de los resultados anteriores demuestra una estrecha correlación entre la señal de calcio intracelular y los niveles de GMPc. Sin embargo, existen otras formas de activar la ruta del GMPc que no pasan por un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ . Estos mecanismos implican una activación directa de las guanilato ciclasas presentes en las células cromafines.

La guanilato ciclasa soluble puede activarse por óxido nítrico que puede provenir de la propia célula o de células vecinas. El NO proveniente de células vecinas puede producir en las células objeto de estudio incrementos de GMPc que son independientes de calcio. Para la experimentación, se pueden usar como fuentes de NO exógeno compuestos donadores de NO (ver sección Introducción). Estas moléculas mimetizan el efecto del NO producido fisiológicamente de un modo paracrino a partir de células vecinas. Por esta razón, constituyen una importante herramienta farmacológica en el estudio de los efectos del óxido nítrico. Para este estudio se usó el nitroprusiato sódico ( $[(CN)_5Fe^{2+}]NO$ , abreviado SNP), un complejo nitro-ferroso que es metabólicamente transformado en los tejidos liberando NO (Bates *et al.*, 1991). Merece la pena destacar que aunque la cantidad de NO liberado a partir de SNP no se conoce con exactitud puesto que puede variar en función del tejido que se estudia, al menos, de acuerdo a la bibliografía, se puede decir que el SNP es un donador de NO de baja actividad si se compara con otros compuestos donadores como espermina-NO ó S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) (Brunner *et al.*, 1995). Por tanto, SNP mimetiza de manera más fisiológica el NO exógeno producido a partir de una NOS de tipo constitutivo, la cual produce modestas cantidades de NO.

Por otro lado, aunque a lo largo de los anteriores capítulos de esta sección de Resultados se ha reiterado que las células poseen una actividad guanilato ciclasa soluble, las células cromafines bovinas podrían tener también una guanilato ciclasa particulada. Estas isoformas, presentes en la mayoría de los tejidos, tienen dominios transmembrana con un sitio catalítico de síntesis de GMPc en el lado intracelular, que aumenta considerablemente su actividad enzimática cuando determinados péptidos (péptidos natriuréticos) interaccionan con un sitio de unión en el lado extracelular (Chinkers *et al.*, 1989).

Se ha descrito en células cromafines bovinas la existencia del péptido natriurético de tipo C. Dicho péptido se acumula en el interior de los gránulos de secreción y se libera al medio extracelular durante la respuesta secretora (Babinski *et al.*, 1992). Por esta razón, en este trabajo de investigación se estudió la capacidad de este péptido natriurético para aumentar los niveles de GMPc en las propias células cromafines.

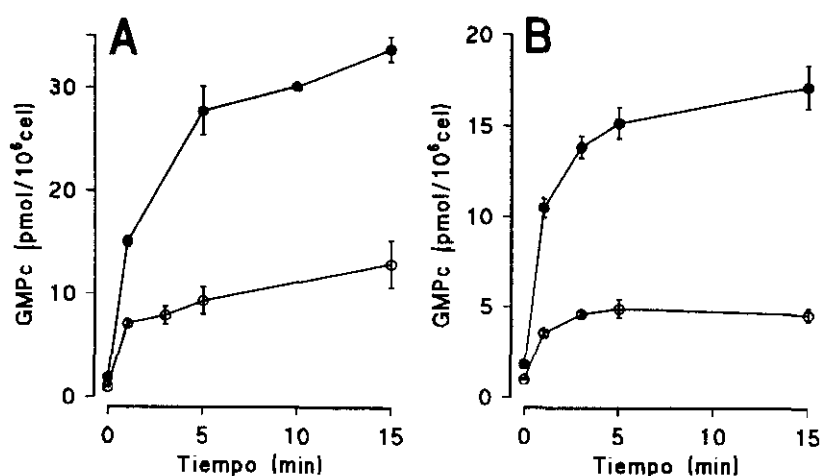


**Figura 17-IV. Efecto de Nitroprusiato sódico (SNP) y Péptido Natriurético de tipo C (CNP) sobre los niveles de GMPc intracelular.** Los paneles (A) y (B) muestran el efecto tiempo-dependiente de la incubación de células cromafines bovinas con SNP 100 μM o CNP 100 nM, respectivamente. Las curvas concentración-respuesta para este efecto sobre el GMPc se muestran en los paneles (C) y (D) para SNP y CNP, respectivamente. Los experimentos se realizaron en células preincubadas con IBMX 0.5 mM durante 30 min.

La figura 17 muestra el efecto de SNP y CNP sobre el GMPc intracelular. Como se aprecia, ambas moléculas producen grandes incrementos (18 y 9 veces para SNP y CNP, respectivamente) de carácter tiempo-dependientes en los niveles de GMPc. Además, según se muestra en la citada figura, el efecto de ambos activadores de guanilato ciclasas es dependiente de la dosis ( $EC_{50}$  de  $18.13 \pm 2.99$  μM para SNP, y  $25.63 \pm 5.96$  nM para CNP, medidos a 15 min).

### Efecto de SNP y CNP en ausencia de IBMX. Evaluación de un posible efecto sobre los niveles de AMPc

De acuerdo a los anteriores resultados, SNP y CNP pueden resultar de gran utilidad para estudiar una posible modulación por GMPc de la respuesta secretora en células cromafines bovinas. Sin embargo, las medidas de GMPc se realizaron en presencia del inhibidor inespecífico de fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos, IBMX, y la incubación con este inhibidor puede indirectamente producir incrementos no deseados en los niveles de AMPc. Por tanto, es muy importante determinar si ambos compuestos son también capaces de incrementar los niveles de GMPc en ausencia de cualquier inhibidor de fosfodiesterasas.



**Figura 18-IV. Producción de GMPc inducida por SNP y CNP en presencia y ausencia de IBMX.** El efecto tiempo-dependiente de SNP 100  $\mu$ M (A) y CNP 100 nM (B) se estudió sobre la acumulación de GMPc en células preincubadas en presencia (círculos cerrados) o ausencia (círculos abiertos) de IBMX 0.5 mM durante 30 min. Tras el período de incubación con SNP o CNP, el GMPc acumulado en las células se ensayó según se describe en la sección Métodos.

Según se muestra en la figura 18, en ausencia de preincubación con IBMX, SNP y CNP también producen incrementos en el GMPc intracelular; aunque, obviamente, estos incrementos son mucho menores que cuando las células se preincuban con el inhibidor.

Por otro lado, se ha descrito en algunos sistemas celulares que incrementos en los niveles de GMPc se acompañan de variaciones en el AMPc intracelular. Esta acción se produce a través de fosfodiesterasas de tipo II (estimulada por GMPc) y tipo III (inhibida por GMPc), cuya actividad enzimática depende de la concentración intracelular de GMPc (ver sección Introducción) (LeTrong *et al.*, 1990; Sonnenburg *et al.*, 1991; Meacci *et al.*, 1991). Para estudiar la posibilidad de que un mecanismo de este tipo tuviera lugar en células cromafines bovinas, se midieron los niveles de AMPc después de la incubación de las células con SNP y CNP. El posible efecto de estos compuestos se estudió no sólo sobre los niveles basales de AMPc sino también sobre los incrementos de AMPc producidos después de incubación con forskolina, un activador de la adenilato ciclasa. Estos resultados se resumen en la tabla I (página siguiente).

Como puede verse, SNP y CNP no producen ningún efecto sobre los niveles de AMPc tanto en condiciones basales como después de activación por forskolina.

Los resultados que se muestran en este capítulo son doblemente importantes puesto que demuestran que, en primer lugar, SNP y CNP producen incrementos significativos de los niveles intracelulares de GMPc en ausencia del inhibidor de fosfodiesterasas, IBMX; y segundo, que no modifican en absoluto los niveles de AMPc. Estos resultados, por tanto, indican que ambos compuestos pueden ser usados en este modelo experimental en ausencia de IBMX con la seguridad de que cualquier efecto observado no es atribuible al AMPc sino que debe estar mediado por GMPc.

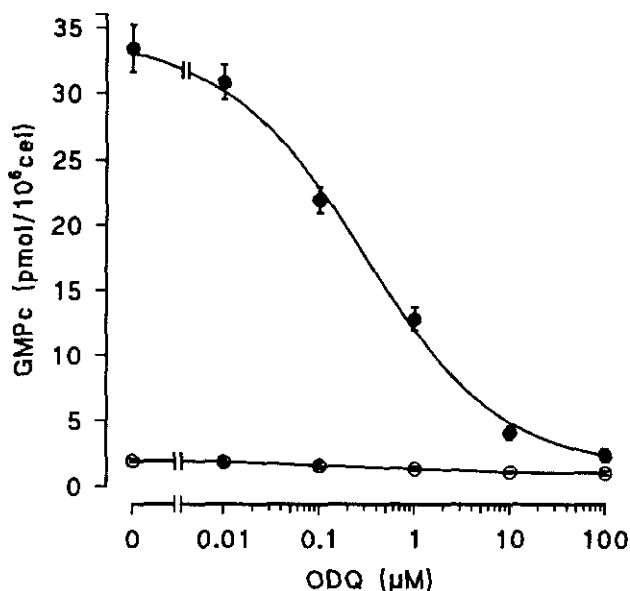
### **Estudio comparativo de la producción de GMPc por NO endógeno y exógeno**

La guanilato ciclasa soluble de células cromafines bovinas se puede activar por NO exógeno o por aquel producido endógenamente mediante NOS. La carencia de un inhibidor específico de la enzima GCS ha dificultado durante mucho tiempo los estudios sobre esta proteína. Recientemente, se ha identificado un potente y selectivo inhibidor de la guanilato ciclasa sensible a NO, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxaline-1-ona (ODQ) (Garthwaite *et al.*, 1995). Este compuesto se ha convertido en una herramienta farmacológica muy útil para investigar la contribución de la enzima GCS en efectos mediados por NO:GMPc. No obstante, debido a que ODQ ha sido recientemente desarrollado y la información de que se dispone sobre su comportamiento inhibitorio es aún escasa (Garthwaite *et al.*, 1995; Brunner *et al.*, 1995, 1996; Moro *et al.*, 1996), es necesario llevar a cabo un estudio detallado de la dosis requerida para inhibir la GCS en el modelo de la célula cromafin bovina.

**TABLA I****Efecto de SNP y CNP sobre el AMPc intracelular basal y estimulado por forskolina**

<b>Tratamiento</b>	<b>AMPc</b>	<b>% del basal</b>	<b>GMPc</b>	<b>% del basal</b>
	<i>pmol/10<sup>6</sup>cel</i>		<i>pmol/10<sup>6</sup>cel</i>	
Basal	6.820 ± 0.330	100	0.976 ± 0.050	100
CNP 100 nM	6.790 ± 0.110	99	4.774 ± 0.358	489
SNP 100 µM	6.811 ± 0.171	99	11.277 ± 0.571	1155
Forskolina 10 µM	10.918 ± 0.673	160	0.988 ± 0.133	101
CNP + forskolina	11.237 ± 0.789	164	5.089 ± 0.173	521
SNP + forskolina	10.768 ± 0.118	157	10.896 ± 0.250	1116

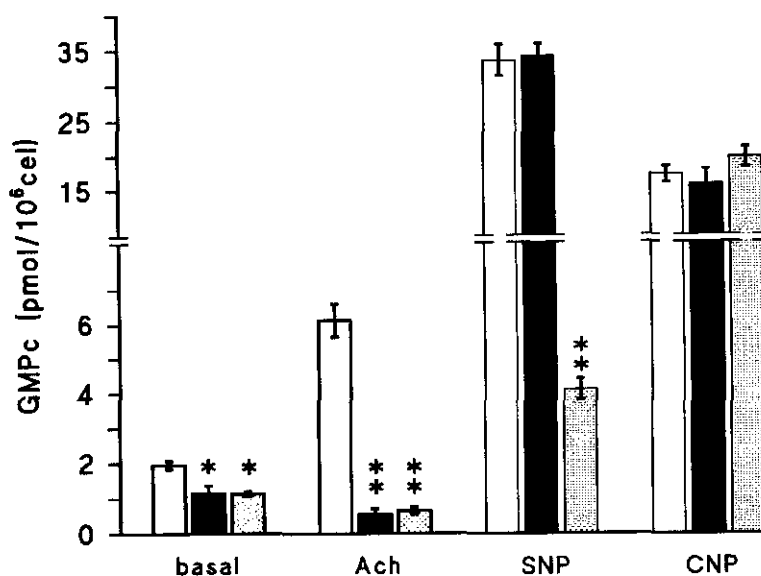
Células cromafines bovinas preincubadas durante 30 minutos con solución de Locke en ausencia de IBMX fueron incubadas otros 30 minutos de acuerdo a los diferentes tratamientos. El AMPc acumulado durante los 30 minutos de incubación se determinó según se describe en Materiales y Métodos. A efectos de comparación, el GMPc acumulado durante el período de incubación también se muestra.



**Figura 19-IV. Efecto de ODQ sobre los niveles de GMPc intracelular de células cromafines bovinas.** Las células se preincubaron durante 30 min con diferentes concentraciones de 1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3-a]quinoxaline-1-ona (ODQ) en presencia de IBMX 0.5 mM y los niveles de GMPc intracelular en condiciones basales (círculos abiertos) o estimulados por SNP 100 μM (círculos cerrados) determinados según se describe en Métodos.

La figura 19 muestra el efecto de la preincubación de las células con diferentes dosis de ODQ (desde 10 nM hasta 100 μM) sobre la producción de GMPc basal y estimulada por SNP 100 μM. En la figura se observa un claro efecto inhibitorio de ODQ sobre los niveles intracelulares de GMPc, obteniéndose a partir de los experimentos con SNP un valor de  $IC_{50}$  de  $0.31 \pm 0.09$  μM. Para el resto de experimentos en los que se empleó ODQ como inhibidor específico de GCS, se escogió una concentración de 10 μM para bloquear la producción de GMPc a partir de esta enzima.

Utilizando L-NAME 1 mM y ODQ 10 μM para determinar la contribución de NOS y GCS, se realizó un estudio comparativo de la producción de GMPc mediada por las diferentes vías a través de las cuales es posible incrementar los niveles del nucleótido cíclico en células cromafines bovinas. Para este estudio se usaron, en concentraciones supramáximas (o casi supramáximas), Ach (100 μM), como activador fisiológico de la ruta endógena; y SNP (100 μM), como fuente de NO exógeno. Además, para evaluar un posible efecto inespecífico de L-NAME y ODQ, se estudió la producción de GMPc mediada por CNP 100 nM en presencia de estos inhibidores. Estos resultados se muestran en el histograma de la figura 20.



**Figura 20-IV. Comparación de la producción de GMPc estimulada por acetilcolina, SNP y CNP. Efecto de L-NAME y ODQ.** Los niveles de GMPc intracelular en condiciones basales o tras estimulación con acetilcolina (ACh), nitroprusiato sódico (SNP) o péptido natriurético de tipo C (CNP) se determinaron en células preincubadas con IBMX conteniendo N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME, 1 mM 1 h, barras negras) o 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxaline-1-ona (ODQ, 10 μM 30 min, barras grises) o en condiciones control (barras abiertas). Los asteriscos indican inhibición significativa (\*p < 0.01, \*\*p < 0.001) de la producción de GMPc respecto de los correspondientes controles. Para mayor claridad, el eje y se muestra dividido en dos tramos.

Varias conclusiones pueden obtenerse a partir de los resultados de la figura 20. En primer lugar, L-NAME y ODQ disminuyen el contenido de GMPc en condiciones basales. Este hecho indica que NOS y GCS contribuyen activamente a los niveles de GMPc en células en reposo. Por otro lado, como ya se ha mostrado en éste y anteriores capítulos de esta sección de Resultados, ODQ fue capaz de inhibir la producción de GMPc estimulada por ACh y SNP, confirmando la participación de la enzima GCS. Sin embargo, L-NAME sólo pudo inhibir la producción estimulada por ACh y no la de SNP, discriminando, por tanto, el NO producido por la enzima NOS endógena y el generado a partir del donador exógeno. Además, como era de esperar, L-NAME y ODQ se mostraron incapaces de inhibir la producción de GMPc estimulada por CNP. Este hecho confirma la especificidad de los inhibidores empleados.

Otros dos aspectos de la figura 20 resultan interesantes y plantean cuestiones a estudiar en detalle. Primero, tanto SNP como Ach ejercen su efecto por activación de la GCS. Sin embargo, a concentraciones supramáximas, SNP produce un considerablemente mayor incremento en los niveles de GMPc que Ach. Por otro lado, cuando las células se preincubaban con L-NAME y ODQ, Ach no sólo no fue capaz de aumentar el GMPc sino que los niveles resultan más bajos que en células en condiciones basales preincubadas con estos inhibidores (reducción significativa:  $p < 0.05$ ).

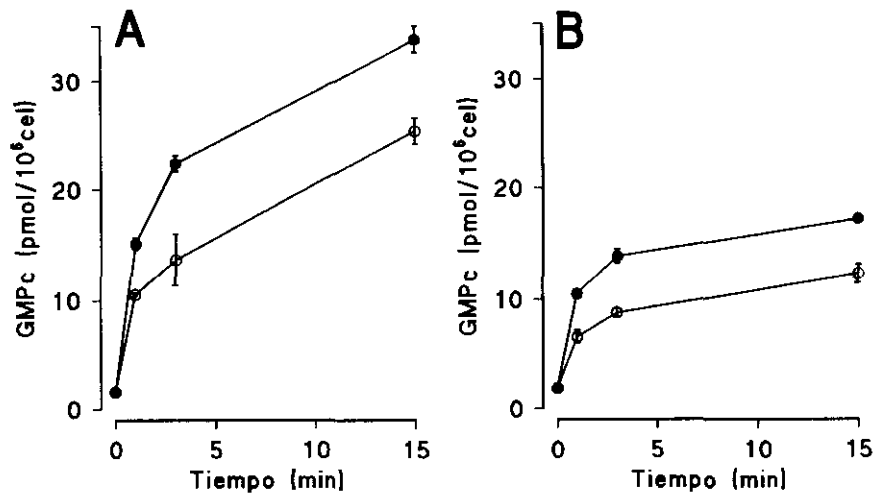
La diferencia más notable entre la estimulación con Ach y aquella con SNP es que la primera conlleva un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  mientras que SNP no produce ningún efecto sobre el calcio citosólico (ver más adelante en esta sección de Resultados). Se ha descrito en la bibliografía que en algunos tejidos, entre ellos la glándula adrenal de rata, la acumulación de GMPc es atenuada a medida que la concentración de calcio libre aumenta (Olson *et al.*, 1976; Palacios *et al.*, 1989). Aunque algunos autores propusieron que este efecto podría estar mediado por una inhibición por  $Ca^{2+}$  de la guanilato ciclasa soluble (Knowles *et al.*, 1989; Garthwaite, 1991; Southam y Garthwaite, 1991), se ha demostrado posteriormente que la actividad de esta enzima es insensible a calcio (Mayer y Böhme, 1989; Mayer *et al.*, 1989,1990). El mecanismo a través del cual el  $Ca^{2+}$  ejerce su efecto es por activación de una fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos estimulada por  $Ca^{2+}$ /calmodulina (tipo I). Esta actividad enzimática presenta características muy peculiares, como son, insensibilidad a IBMX incluso a concentraciones de 1 mM (superiores a las que se han usado en este trabajo de investigación) y una pronunciada selectividad para GMPc frente a AMPc a concentraciones de sustrato entre 2 y 10  $\mu$ M (Mayer *et al.*, 1992).

Aún teniendo en cuenta que Ach pueda producir un menor efecto sobre el GMPc intracelular debido a que la activación de GCS es transitoria, mientras que SNP produce una liberación continua y prolongada de NO; es muy plausible que una fosfodiesterasa  $Ca^{2+}$ /CaM-dependiente sea la responsable del menor efecto de Ach y también de la disminución de los niveles de GMPc que se observa cuando las células preincubadas con ODQ ó NAME se estimulan con Ach.

Por todas estas consideraciones, merece la pena estudiar en profundidad la posibilidad de que en células cromafines bovinas exista una regulación de la señal de GMPc a través de activación por  $Ca^{2+}$ /calmodulina de una fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos.

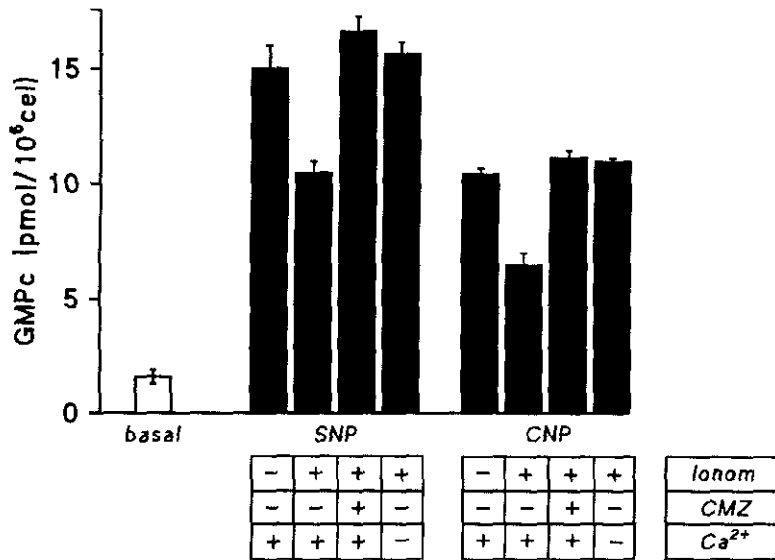
### Regulación por calcio de la señal de GMPc

Para estudiar esta posible regulación por  $\text{Ca}^{2+}$ , las células cromafines se estimularon con los activadores de guanilato ciclasas, SNP y CNP, en condiciones control o incubando las células con el ionóforo de calcio, ionomicina.



**Figura 21-IV. Efecto de ionomicina sobre la producción de GMPc inducida por SNP y CNP.** Las células se preincubaron 30 min con IBMX 0.5 mM y después fueron estimuladas durante diferentes períodos de tiempo con SNP 100 μM (A) o CNP 100 nM (B) en presencia (círculos abiertos) o ausencia (círculos cerrados) de ionomicina 10 μM. La ionomicina se añadió simultáneamente con el estímulo. Cuando el ionóforo se añadió durante el período de preincubación, la inhibición fue mayor que cuando se añadió simultáneamente al estímulo, hasta un 55-60 % comparado con un 30-40 % en las condiciones mostradas en la figura (resultados no mostrados).

Según se muestra en la figura 21, en células cromafines bovinas en cultivo existe también el mecanismo de regulación negativa de la señal de GMPc que previamente se ha descrito en otros tejidos. Los resultados de esta figura permiten una conclusión adicional. Si SNP y CNP actúan a través de diferentes isoenzimas de GC que no se regulan por calcio, y si la regulación por calcio se observa con ambos activadores, entonces el mecanismo no puede estar mediado por inhibición de guanilato ciclasa sino que podría deberse a una mayor hidrólisis de GMPc.



**Figura 22-IV. Papel clave de los iones calcio y de calmodulina en la reducción por ionomicina de la producción de GMPc estimulada por SNP o CNP.** Las células se preincubaron durante 30 min con IBMX 0.5 mM. El efecto del antagonista de calmodulina, calmidazolium (CMZ) se estudió añadiendo este compuesto los últimos 10 min de preincubación con IBMX a una concentración de 30  $\mu$ M. Después de la preincubación las células se estimularon con SNP 100  $\mu$ M o CNP 100 nM durante 1 min en presencia o ausencia de ionomicina 10  $\mu$ M (Ionom). Los experimentos en ausencia de calcio se realizaron en un medio que contenía una mezcla de Ca<sup>2+</sup>/EGTA calculada para dar una concentración final de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> de  $\approx$  100 nM.

El histograma de la figura 22 ofrece más datos acerca de la posible participación de una fosfodiesterasa estimulada por Ca<sup>2+</sup>/calmodulina en el fenómeno de regulación por calcio de la señal de GMPc. La figura muestra que cuando la incubación se realiza con ionomicina en ausencia de calcio extracelular (con EGTA añadido), no se observa el efecto inhibitorio. Este hecho confirma el papel clave que los iones calcio juegan en este mecanismo. Por otro lado, si la ionomicina se añade a células preincubadas con calmidazolium, un antagonista de la calmodulina, también se revierte la inhibición. Este resultado demuestra la participación de la calmodulina, y, por tanto, de alguna de las proteínas reguladas por calmodulina, una de las cuales es la fosfodiesterasa de tipo I.

*Como conclusión, estos resultados demuestran que las células cromafines bovinas poseen una ruta de segundos mensajeros basada en las enzimas NOS y GCS. Dicha ruta es activa en condiciones basales y se estimula por secretagogos como acetilcolina mediante un incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. La GCS de células cromafines bovinas es sensible al NO exógeno procedente de donadores de NO como SNP. Las células poseen también una guanilato ciclasa particulada que se activa por el péptido natriurético de tipo C. Los niveles de GMPc intracelular están estrechamente*

---

*regulados por las enzimas de síntesis, guanilato ciclasas soluble y de membrana; y por las enzimas de degradación, una de las cuales podría ser una fosfodiesterasa tipo I, estimulada por  $Ca^{2+}$ /calmodulina.*

### 3. PROTEINA QUINASA DEPENDIENTE DE GMPc EN CELULAS CROMAFINES BOVINAS

#### Caracterización inmunológica de proteína quinasa dependiente de GMPc en células cromafines bovinas

Los efectos celulares del GMPc están mediados por diferentes proteínas receptoras encargadas de transducir la señal química en una acción biológica. La más caracterizada de estas proteínas receptoras es la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG) (Butt *et al.*, 1993). En células de mamífero se han descrito 2 tipos de PKG: tipo I, que es relativamente abundante en tejidos como músculo liso, cerebelo y plaquetas; y tipo II, con una distribución más limitada y que se localiza en el epitelio intestinal y cerebro (Walter, 1981; Keilbach *et al.*, 1992; Jarchau *et al.*, 1994).

En cuanto a la distribución subcelular de estas isoenzimas, la isoforma de tipo II es una enzima asociada a membranas, mientras que la tipo I, aunque esta cuestión es aún objeto de discusión, puede considerarse una proteína soluble (De Jonge, 1981; Butt *et al.*, 1993; MacMillan-Crow y Lincoln, 1994).

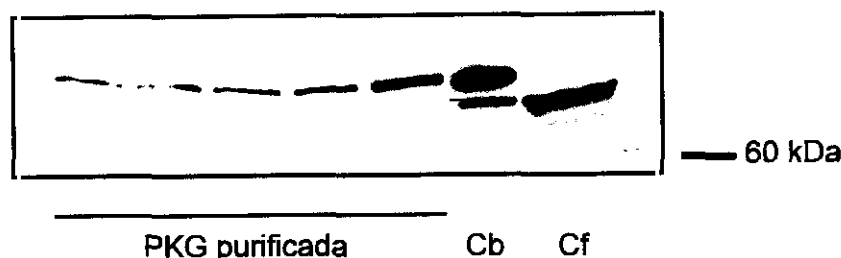
Las características bioquímicas de la PKG I se han estudiado con mayor profundidad. Se han descrito 2 isoformas de PKG I ( $I\alpha$  y  $I\beta$ ), productos de un "splicing" alternativo en el extremo N-terminal. Ambas isoenzimas son homodímeros de subunidades de aproximadamente 76 kDa de peso molecular. La isoenzima tipo  $I\alpha$  está compuesta por 670 aminoácidos, mientras que la forma  $I\beta$  presenta una cadena polipeptídica de 684 aminoácidos, compartiendo ambas una amplia región de la molécula en el extremo C-terminal. La PKG II ha sido clonada y su secuencia primaria predice una proteína de 761 aminoácidos con una masa molecular de 87 kDa (Francis y Corbin, 1994a).

Los estudios de distribución tisular llevados a cabo hasta el momento han detectado mediante técnicas inmunológicas la isoforma de tipo I en extractos solubles de glándula adrenal de rata (Walter, 1981). Por el contrario, la isoforma de tipo II no ha podido ser encontrada en tejido adrenal (Jarchau *et al.*, 1994).

Con estos antecedentes, uno de los objetivos de este trabajo fue investigar la presencia de la enzima en células cromafines. Ya que la isoforma detectada en tejido adrenal de rata fue la soluble de tipo I, aprovechando la disponibilidad de un anticuerpo comercial frente a PKG  $I\alpha$  y  $I\beta$ , en este trabajo de investigación se estudió la posible presencia de la enzima en extractos obtenidos a partir de células cromafines bovinas.

Mediante la utilización del mencionado anticuerpo y utilizando técnicas de inmunotransferencia, el presente trabajo de investigación demuestra la existencia de inmunorreactividad específica de PKG I en células cromafines bovinas (Fig. 23). Como controles positivos de este experimento se han empleado extractos citosólicos de cerebelo de rata (4.1  $\mu$ g) y preparaciones de PKG  $I\alpha$  recombinante (0.1-2 ng de proteína). En los pocillos cargados con PKG  $I\alpha$  se pudo detectar una sola banda de 83 kDa de peso molecular y de inmunorreactividad proporcional a la cantidad de proteína empleada. Por otro lado, en el pocillo correspondiente al extracto de cerebelo se

obtuvieron 2 bandas inmunorreactivas; una mayoritaria, de peso molecular coincidente con el de la PKG I $\alpha$  recombinante, y otra minoritaria de menor peso molecular (71 kDa). En el extracto procedente de células cromafines (55  $\mu$ g) sólo se detectó una única banda inmunorreactiva de peso molecular 71 kDa, que coincide con el de la banda minoritaria del extracto cerebelar.



**Figura 23-IV. Detección inmunológica de proteína quinasa dependiente de GMPc en células cromafines bovinas mediante inmunotransferencia.** La presencia de la proteína en extractos obtenidos a partir de células cromafines bovinas (Cf, 55  $\mu$ g de proteína) se ha estudiado mediante la utilización de un anticuerpo específico frente a PKG I según se describe en la sección de Métodos. Como controles positivos del experimento se han utilizado cantidades crecientes de PKG I $\alpha$  purificada (0.1; 0.25; 0.5; 1 y 2 ng de PKG I $\alpha$ ) y un extracto de cerebelo de rata (4.1  $\mu$ g de proteína). La inmunorreactividad obtenida en las calles correspondientes a la PKG I $\alpha$  purificada ha servido para cuantificar la cantidad de proteína presente en los extractos de cerebelo y de células cromafines bovinas.

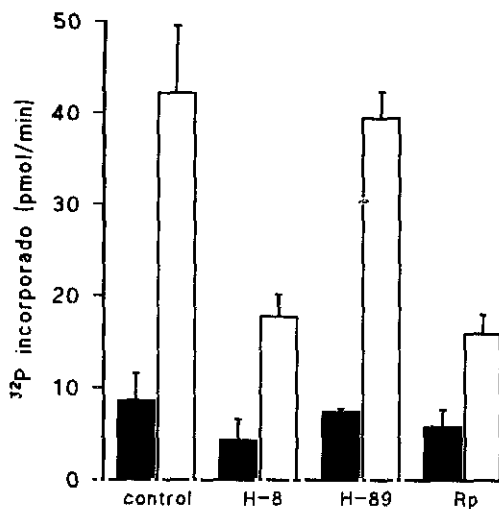
Puesto que el anticuerpo empleado reconoce ambas isoformas, la existencia en el extracto de cerebelo de rata de dos bandas inmunorreactivas (de pesos moleculares 83 y 71 kDa) podría sugerir la presencia en este tejido de las dos isoformas de PKG I ( $\alpha$  y  $\beta$ ). Sin embargo, según se ha descrito, el cerebelo de rata no contiene PKG I $\beta$ , y además, según se muestra en la mencionada figura, la banda adicional que putativamente podría corresponder a esta forma tiene un menor peso molecular que la PKG I $\alpha$ , cuando es justamente lo contrario lo que se ha descrito en todos los tejidos estudiados (Keilbach *et al.*, 1992; Francis y Corbin, 1994a). La naturaleza de la banda de menor peso molecular, la única detectada en células cromafines bovinas, es una incógnita. Dicha banda proteica podría corresponder con una nueva variante de la isoforma I de PKG.

Mediante un radioinmunoensayo específico para la PKG I, Walter describió en 1981 que el cerebelo contiene aproximadamente 12 veces más quinasa que la glándula adrenal (Walter, 1981). Utilizando la PKG I $\alpha$  purificada como patrón (0.1-2 ng), y asumiendo el mismo comportamiento inmunorreactivo para las dos bandas detectadas en el presente trabajo de investigación, los resultados de la figura 23 presentan una cierta similitud con las observaciones de Walter en tanto en cuanto el tejido cerebelar

posee una mayor cantidad de la enzima. Según esta figura, el extracto cerebelar contiene 1.46  $\mu\text{g}$  de PKG I por mg de proteína, mientras que las muestras procedentes de células cromafines poseen 0.054  $\mu\text{g}$  por mg de proteína (aproximadamente 27 veces). No obstante, conviene tener en cuenta que estos experimentos se realizaron utilizando diferentes técnicas experimentales a las empleadas en el trabajo de Walter.

#### Actividad enzimática de proteína quinasa dependiente de GMPc en células cromafines bovinas

Puesto que la isoforma detectada en células cromafines fue la soluble de tipo I, con objeto de obtener información acerca de la regulación de la enzima, en este trabajo de investigación se estudió la actividad enzimática de PKG en extractos solubles de células cromafines bovinas en cultivo empleando una técnica de fosforilación de un sustrato exógeno en presencia de ATP radiactivamente marcado.



**Figura 24-IV. Actividad de proteína quinasa dependiente de GMPc en células cromafines bovinas.** La fosforilación de histona F2b en ausencia (barras negras) o presencia (barras blancas) de 8Br-GMPc fue determinada en extractos solubles de células cromafines bovinas. La reacción de fosforilación fue iniciada al añadir 20  $\mu\text{g}$  de proteínas del extracto conteniendo PKG parcialmente purificada. Para estudiar el efecto inhibitorio, los extractos fueron preincubados durante 10 min a 30°C con H-8 1  $\mu\text{M}$ , H-89 100 nM o Rp-8pCPT-GMPcS 50  $\mu\text{M}$  antes del ensayo de fosforilación.

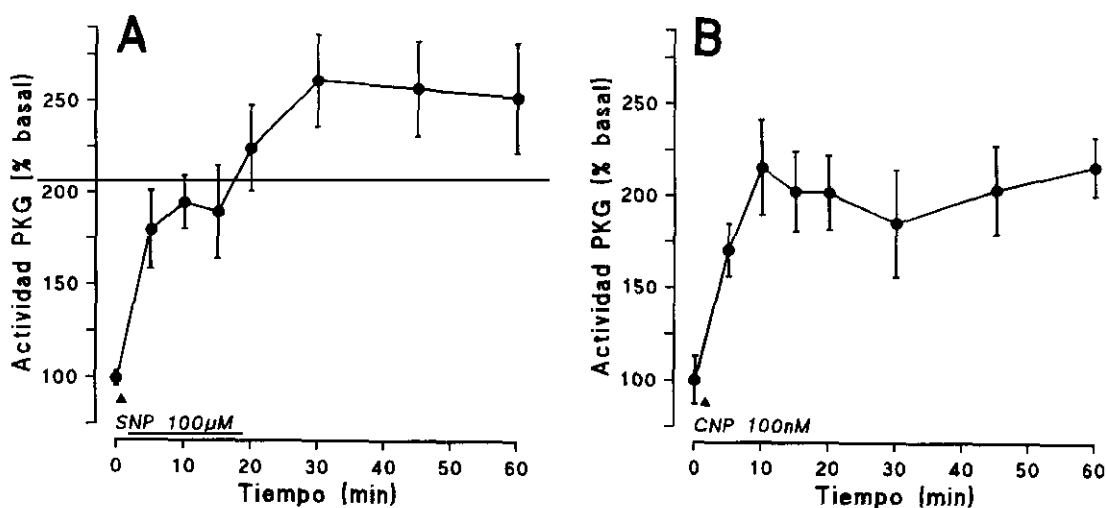
La figura 24 muestra la actividad de PKG expresada como  $^{32}\text{P}$  incorporado a histona F2b (pmol/min) en extractos incubados en presencia o ausencia de 8Br-GMPc 100  $\mu\text{M}$  en diferentes condiciones experimentales. Este análogo de GMPc resistente a la hidrólisis por fosfodiesterasas es, según se ha descrito, capaz de activar la PKG (Rapoport *et al.*, 1982). La figura muestra que en condiciones control, 8Br-GMPc produce un aumento sustancial de la incorporación de marca radiactiva al sustrato de PKG, indicando este hecho la presencia en el extracto de una proteína quinasa con características de PKG.

PKG cataliza la fosforilación de algunos sustratos que también son fosforilados por proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA). Esto es debido a que existe una gran similitud en las secuencias de fosforilación para ambas quinasas (Lincoln y Corbin, 1977). Aunque la PKA es eliminada del extracto en el proceso de semipurificación de

PKG, con objeto de discriminar entre PKA y PKG, se emplearon además diferentes inhibidores de quinasas. Los inhibidores de quinasas del tipo isoquinolinesulfonamidas, entre ellos N-[2-(metilamino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida (H-8) y N-[2-((*p*-bromocinamil) amino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida (H-89), presentan diferentes afinidades para las distintas proteínas quinasas. Así, H-8 presenta valores muy similares de  $IC_{50}$  para PKA y PKG (1.2  $\mu$ M y 0.48  $\mu$ M para PKA y PKG, respectivamente), mientras H-89 presenta diferencias de un orden de magnitud en su afinidad por ambas quinasas (48 nM y 0.48  $\mu$ M para PKA y PKG, respectivamente) (Hidaka *et al.*, 1984; Chijiwa *et al.*, 1990).

H-8 1  $\mu$ M puso de manifiesto la participación de una (o ambas) de estas quinasas en la fosforilación observada con 8Br-GMPc. Por otro lado, H-89 fracasó en inhibir la incorporación de fosfato radiactivo al péptido sustrato. Este resultado indica que PKA no está implicada en el efecto, y, por tanto, por eliminación, debe estar mediado por PKG.

La figura 24 también muestra los resultados obtenidos con un inhibidor de PKG de distinta naturaleza que H-8 ó H-89, el análogo de GMPc, (Rp)-8-(*p*-clorofeniltio) guanosina 3'-5'-cíclico monofosforotioato (Rp-8-*p*CPT-GMPcS) (Butt *et al.*, 1994). Este análogo, usado a una concentración de 50  $\mu$ M, fue capaz de inhibir la fosforilación estimulada por 8Br-GMPc. Estos resultados confirman la presencia en el extracto obtenido a partir de células cromafines de una proteína quinasa dependiente de GMPc.



**Figura 25-IV. Efecto tiempo-dependiente de SNP y CNP sobre la actividad de PKG de células cromafines bovinas.** Las células fueron preincubadas durante los tiempos indicados con SNP 100  $\mu$ M (A) o CNP 100 nM (B), y después la actividad de PKG se midió mediante un ensayo de fosforilación según se describe en la sección Métodos. PKG es expresada como porcentaje de la actividad basal: 100 % corresponde a  $441.19 \pm 89.43$  unidades/mg de proteína (1 unidad se define como la actividad enzimática capaz de incorporar 1 pmol/min de fosfato en el heptapéptido sustrato a 30°C).

Con objeto de obtener información adicional acerca de la regulación de PKG en condiciones fisiológicas, el ensayo enzimático fue adaptado para medir actividad de PKG en células cromafines intactas incubadas con SNP y CNP.

SNP 100  $\mu$ M (Fig. 25A) y CNP 100 nM (Fig. 25B) produjeron incrementos tiempo-dependientes en la actividad de PKG (150 % y 125 % sobre el basal para SNP y CNP, respectivamente).

Estos resultados demuestran que en células cromafines bovinas en cultivo existe una actividad enzimática de proteína quinasa dependiente de GMPc que se activa cuando los niveles del nucleótido cíclico se incrementan por estimulación con los activadores de guanilato ciclasa, SNP y CNP.

### **Fosforilación de tirosina hidroxilasa por proteína quinasa dependiente de GMPc en células cromafines bovinas en cultivo**

En la bibliografía se han descrito algunos sustratos que son fosforilados específicamente por PKG (revisado por Lincoln, 1995). Sin embargo, debido a que PKA y PKG reconocen similares secuencias de fosforilación, en la práctica, estos supuestos sustratos específicos de PKG lo son también de PKA. Aunque la distribución subcelular (y también tisular) de ambas quinasas introduce variables muy importantes a tener en cuenta cuando se estudian sustratos de estas quinasas, *a priori*, cualquier sustrato de PKA puede potencialmente ser sustrato de PKG.

Un conocido sustrato de PKA que es, al mismo tiempo, una proteína clave para la actividad fisiológica de las células cromafines, es la tirosina hidroxilasa (TH). Esta enzima cataliza la hidroxilación de tirosina a L-DOPA en lo que constituye la etapa limitante en la síntesis de catecolaminas (Levitt *et al.*, 1965).

La fosforilación de TH se traduce en un incremento de la actividad catalítica de la enzima, por tanto, la regulación por fosforilación es un proceso muy importante (Joh *et al.*, 1978). La enzima es susceptible de fosforilación en diferentes residuos de serina de su secuencia, y, al parecer, cada sitio de fosforilación es regulado por una ruta de 2° mensajeros (Haycock, 1993; Kumer y Vrana, 1996). PKA fosforila Ser<sup>40</sup> en TH de células cromafines bovinas (Haycock, 1990). Debido al reconocimiento de secuencias similares de fosforilación, PKG podría también fosforilar ese residuo de serina.

En la bibliografía se ha descrito que en células cromafines y también en células PC12, los sistemas de 2° mensajeros basados en AMPc y GMPc producen incrementos en la actividad enzimática de TH (Roskoski y Roskoski, 1987). Además, se ha demostrado que TH purificada a partir de células PC12 es fosforilada *in vitro* por PKG (Roskoski *et al.*, 1987). Por tanto, merece la pena investigar si la ruta del GMPc es capaz de incrementar el estado de fosforilación de TH en células cromafines intactas.

TABLA II

Tratamiento	Contenido de Catecolaminas <i>nmol/10<sup>6</sup> células</i>	% del control
Control	130.65 ± 5.68	100
SNP 100 µM	169.37 ± 10.10	130
CNP 100 nM	168.42 ± 6.74	129

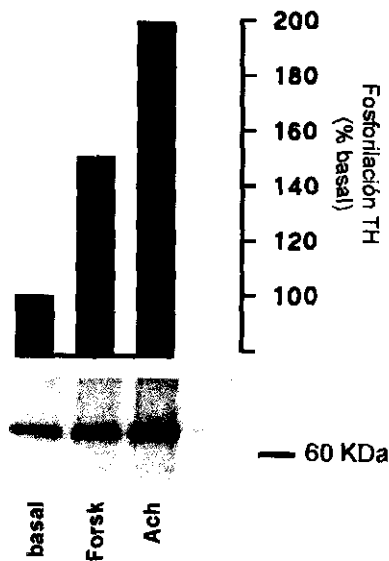
Para la determinación de catecolaminas, las células se preincubaron durante 1 hora con SNP 100 µM o CNP 100 nM o en condiciones control. Después, el contenido total de catecolaminas se determinó según se describe en Métodos.

La tabla II muestra que en las condiciones experimentales en las que se llevó a cabo este trabajo de investigación, los activadores de guanilato ciclasas SNP y CNP producen incrementos significativos del contenido total de catecolaminas. Aunque en estos experimentos no se midió directamente la actividad enzimática de TH en las células, debido a que la reacción catalizada por TH es la etapa limitante en la síntesis de catecolaminas, las medidas del contenido total constituyen un buen índice del grado de activación de la ruta de síntesis y, por tanto, muy posiblemente, de la actividad TH.

Para estudiar el grado de fosforilación de TH, las células cromafines bovinas se preincubaron durante 1 hora con ortofosfato radiactivo según se describe en la sección de Métodos. Durante este periodo de preincubación, el ortofosfato es transportado al interior de la célula e incorporado en ATP intracelular, el cual es en parte utilizado para fosforilar proteínas. De éstas, una de las que más fosfato radiactivo incorpora es la TH debido a que es una proteína relativamente abundante en estas células y que además presenta múltiples sitios de fosforilación en su secuencia (Haycock, 1993).

Utilizando electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y autorradiografía, muchos grupos de investigación han estudiado la fosforilación de TH y demostrado, primero, que es una proteína fosforilada en condiciones basales y, segundo, que este grado de fosforilación está considerablemente aumentado cuando las células son estimuladas con secretagogos como Ach y KCl (Haycock *et al.*, 1982; Niggli *et al.*, 1984; Gutierrez *et al.*, 1988). El análisis densitométrico de estos experimentos permite estudiar de manera cuantitativa el grado de fosforilación de las diferentes proteínas, por lo que esta técnica resulta muy adecuada para este tipo de investigaciones. No obstante, complejos estudios realizados utilizando SDS-PAGE en dos dimensiones y autorradiografía, han descrito hasta 500 polipéptidos fosforilados en células cromafines bovinas (Gutierrez *et al.*, 1988), y este hecho dificulta sobremanera el estudio cuantitativo del grado de fosforilación de proteínas individuales. Por esta razón, en este trabajo de investigación, se realizó una purificación previa de la TH mediante inmunoprecipitación con anticuerpos específicos

anti-TH y después se estudió su fosforilación por SDS-PAGE y autorradiografía. Con esta variación de la técnica se pueden obtener autorradiogramas que contienen sólo la banda proteica de interés y, por tanto, al disminuir el marcaje de fondo del gel permiten una cuantificación mucho más sensible a pequeñas variaciones en el grado de fosforilación de la proteína objeto de estudio.

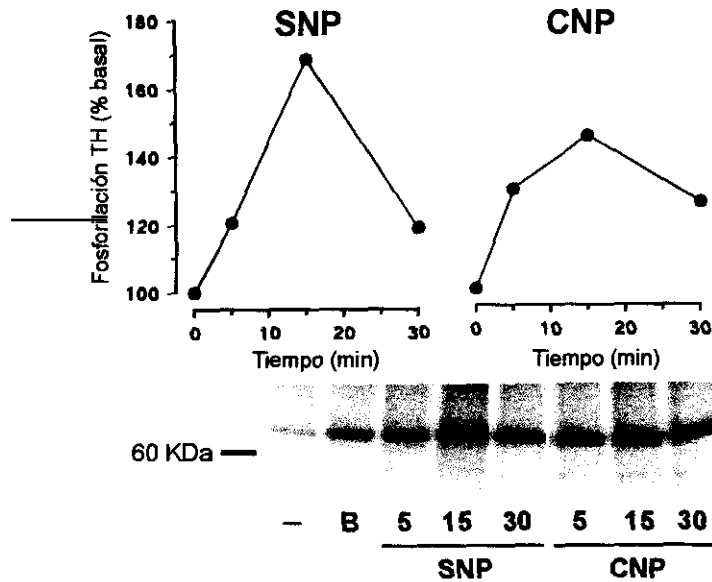


**Figura 26-IV. Efecto de forskolina y acetilcolina sobre la fosforilación de tirosina hidroxilasa.** Células se preincubaron durante 1 hora con ortofosfato radiactivo. El efecto de forskolina (Forsk) y acetilcolina (Ach) se estudió añadiendo estos compuestos durante el período de preincubación con ortofosfato (30 min con forskolina 10  $\mu$ M o 2 min con acetilcolina 100  $\mu$ M). El grado de fosforilación de TH (proteína de  $\approx$  60 kDa) se determinó mediante inmunoprecipitación con anticuerpos específicos anti-TH y posterior SDS-PAGE y autorradiografía según se describe en Métodos. Cuando el anticuerpo anti-TH fue omitido no se obtuvo marcaje radiactivo significativo tal y como se muestra en la última calle del autorradiograma. El grado de fosforilación de TH y también la potenciación por activadores fue variable de cultivo a cultivo. La figura muestra el resultado de un experimento individual de 3 realizados con diferentes cultivos pero con idénticos resultados.

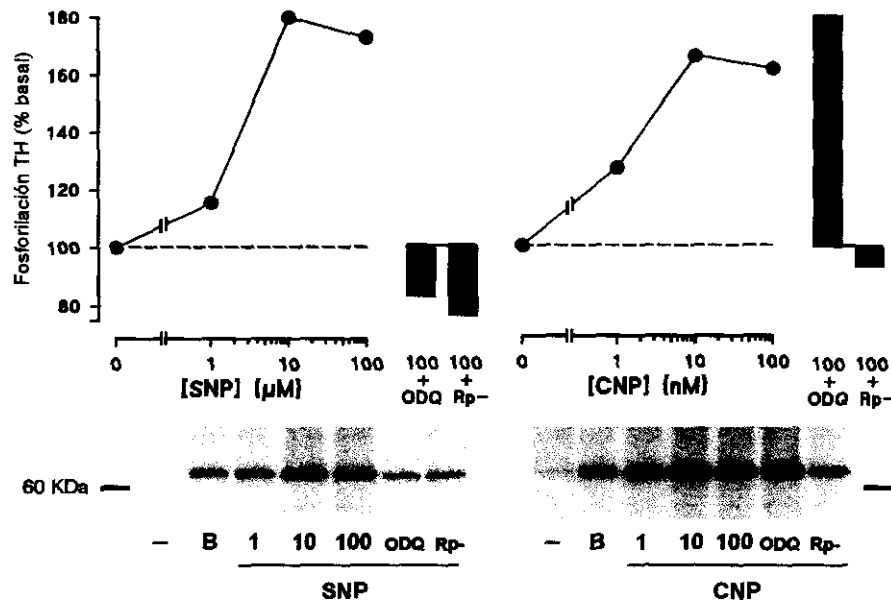
La figura 26 compara la fosforilación de TH en condiciones basales y después de incubación de las células con forskolina 10  $\mu$ M o Ach 100  $\mu$ M. Como puede apreciarse, forskolina y Ach producen incrementos notables del grado de fosforilación de TH.

La acetilcolina se ha descrito que produce fosforilación de TH en múltiples sitios por activación de diferentes rutas de segundos mensajeros, entre ellas la quinasa  $Ca^{2+}$ /calmodulina-dependiente tipo II, las quinasas MAP2 y PKA. Por el contrario, forskolina, a través de activación de adenilato ciclasa e incremento en el AMPc intracelular, produce fosforilación únicamente mediada por PKA (Haycock, 1993).

Los activadores de guanilato ciclasas, SNP y CNP, producen también incrementos significativos de la fosforilación de TH (Fig. 27). Este efecto es tiempo-dependiente alcanzándose un máximo a los 15 minutos de incubación con ambos compuestos.

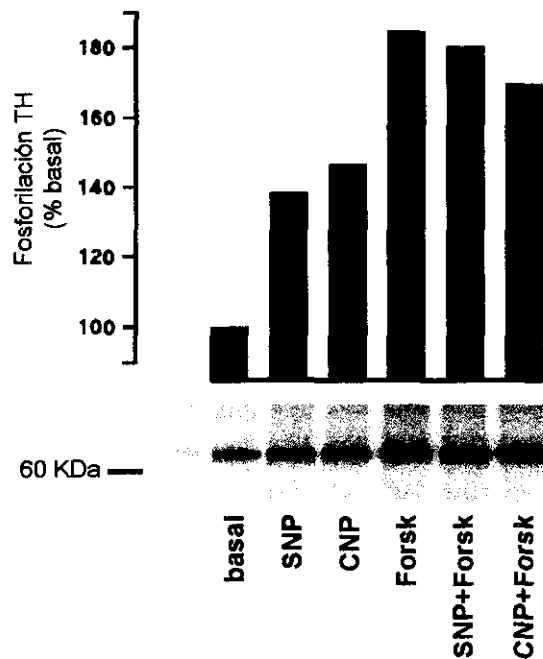


**Figura 27-IV.** Efecto tiempo-dependiente de SNP y CNP sobre el grado de fosforilación de TH. Células cromafines preincubadas 1 hora con ortofosfato radiactivo se incubaron durante la preincubación con el ortofosfato con SNP 100  $\mu$ M o CNP 100 nM durante los tiempos indicados. El grado de fosforilación de TH se determinó según se describe en Métodos. Cuando el anticuerpo anti-TH fue omitido no se obtuvo marcaje radiactivo significativo (primera calle). La figura muestra el resultado de un experimento individual de 3 realizados con diferentes cultivos y con idénticos resultados.



**Figura 28-IV.** Dosis-dependencia de SNP y CNP sobre la fosforilación de TH. Efecto de los inhibidores ODQ y Rp-8pCPT-GMPcS. Células cromafines preincubadas 1 hora con ortofosfato radiactivo se incubaron durante los últimos 15 min de preincubación con la marca radiactiva con diferentes concentraciones de SNP o CNP. El efecto del inhibidor de GC, ODQ; y del inhibidor de PKG, Rp-8pCPT-GMPcS, se estudió sobre el efecto de SNP 100  $\mu$ M y CNP 100 nM, añadiendo los inhibidores durante el período de preincubación con ortofosfato. El grado de fosforilación de TH se determinó según se describe en Métodos. Cuando el anticuerpo anti-TH fue omitido no se obtuvo marcaje radiactivo significativo (primera calle de cada panel). La figura muestra el resultado de un experimento individual de 3 realizados con diferentes cultivos y con idénticos resultados.

La figura 28 muestra que el efecto de SNP y CNP (medido a 15 min) es dependiente de la dosis. El máximo efecto se obtuvo con concentraciones de SNP de 10-100  $\mu\text{M}$  o de CNP de 10-100 nM. Esta figura demuestra también que el efecto de SNP está mediado por la activación de la guanilato ciclasa soluble ya que se revierte con el inhibidor específico de GCS, ODQ. La reversión observada del efecto de ambos activadores de GC por el inhibidor de PKG, Rp-8-pCPT-GMPcS, indica que PKG está implicada en la fosforilación de TH inducida por SNP y CNP.



**Figura 29-IV.** Efecto de SNP o CNP y forskolina sobre el grado de fosforilación de TH en células cromafines bovinas. Las células se preincubaron durante 1 hora con ortofosfato radiactivo en presencia de SNP 100  $\mu\text{M}$ , CNP 100 nM (15 min), forskolina 10  $\mu\text{M}$  (30 min) o con mezclas de estos compuestos. El grado de fosforilación de TH se determinó según se describe en Métodos. Cuando el anticuerpo anti-TH fue omitido no se obtuvo marcaje radiactivo significativo (primera calle). La figura muestra el resultado de un experimento individual de 3 realizados con diferentes cultivos y con idénticos resultados.

Cuando las células se incubaron simultáneamente con SNP ó CNP y con forskolina, el grado de fosforilación alcanzado fue similar al que se obtuvo cuando las células se incubaron únicamente con forskolina (Fig. 29). La falta de aditividad de estos efectos sugiere que la activación de PKG con SNP y CNP resulta en fosforilación en los mismos residuos susceptibles de fosforilación por PKA.

*Los resultados de este trabajo de investigación demuestran la existencia de inmunorreactividad específica de proteína quinasa dependiente de GMPc tipo I en células cromafines bovinas. Los estudios enzimáticos llevados a cabo confirman la*

*presencia de una actividad enzimática con características de PKG en estas células. Los activadores de guanilato ciclasa soluble y particulada, SNP y CNP, respectivamente, producen incrementos significativos en la actividad enzimática de PKG. Ambos activadores, a través de esta quinasa, producen un aumento de la fosforilación de tirosina hidroxilasa, la enzima clave en la ruta de síntesis de catecolaminas. Forskolina, actuando vía AMPc/PKA, produce también notables incrementos en el grado de fosforilación. Sin embargo, cuando las células se incuban de manera simultánea con SNP o CNP y forskolina no se obtiene una mayor fosforilación que únicamente con forskolina. Este resultado sugiere que la fosforilación vía GMPc/PKG tiene lugar en los mismos residuos que PKA es capaz de fosforilar. La fosforilación de tirosina hidroxilasa mediada por PKG podría ser responsable del aumento sustancial del contenido total de catecolaminas que se observa cuando las células se preincuban con SNP o CNP.*

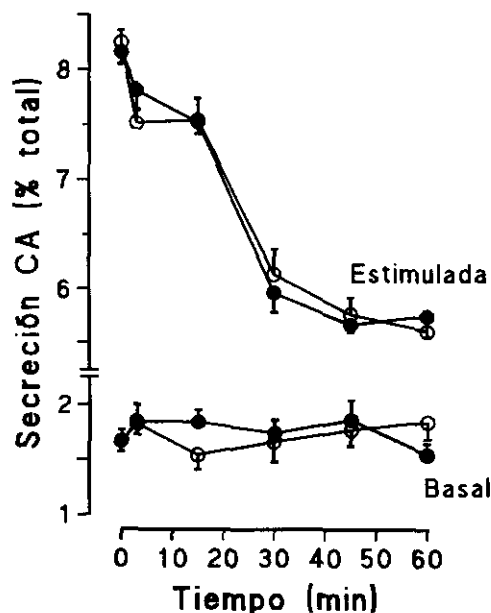


#### 4. MODULACION DE LA SECRECION DE CATECOLAMINAS POR NO:GMPc

##### Efecto de los activadores de guanilato ciclasas, nitroprusiato sódico (SNP) y péptido natriurético de tipo C (CNP) sobre la secreción de catecolaminas y el calcio libre citosólico

Las células cromafines bovinas en cultivo liberan un  $9.83 \pm 0.10$  % de sus catecolaminas totales cuando se estimulan durante 2 minutos con acetilcolina  $50 \mu\text{M}$ . En condiciones basales, es decir, en ausencia de secretagogos durante el período de estimulación, las células acumulan un  $1.67 \pm 0.05$  % de sus catecolaminas totales en el medio extracelular.

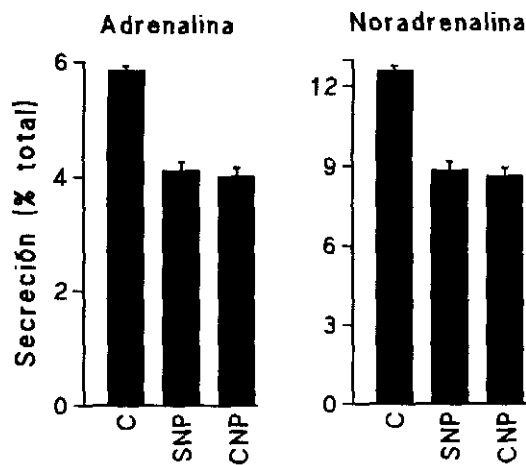
Cuando las células cromafines se preincubaron durante diferentes períodos de tiempo con SNP  $100 \mu\text{M}$  o CNP  $100 \text{ nM}$  se observó una inhibición tiempo-dependiente de la secreción de catecolaminas estimulada por Ach  $50 \mu\text{M}$ . Por el contrario, la secreción basal no se vio afectada (Fig. 30). SNP y CNP produjeron una inhibición que se desarrolló lentamente en el tiempo, siendo prácticamente nula con preincubaciones de 3-15 minutos y alcanzando un valor máximo de aproximadamente un 30 % a los 45 minutos de preincubación con estos compuestos.



**Figura 30-IV. Efecto inhibitorio de SNP y CNP sobre la secreción de catecolaminas estimulada por acetilcolina pero no sobre la secreción basal.** Estudio en función del tiempo del efecto inhibitorio de SNP  $100 \mu\text{M}$  (círculos cerrados) o CNP  $100 \text{ nM}$  (círculos abiertos) sobre la secreción de catecolaminas estimulada por acetilcolina  $50 \mu\text{M}$  o basal. Las células se preincubaron durante diferentes períodos de tiempo con SNP o CNP y después la secreción de catecolaminas se determinó según se describe en Métodos. Los valores de secreción estimulada que se muestran fueron obtenidos después de la substracción de la liberación basal. En ambos casos la secreción se expresa como porcentaje del contenido total de catecolaminas. Para mostrar con más claridad los efectos sobre secreción estimulada y basal, el eje y está dividido en 2 secciones.

Para la realización de estos estudios las catecolaminas se determinaron mediante un método fluorimétrico que, en las condiciones experimentales en las que se llevó a cabo este trabajo, permite una cuantificación de la secreción en términos de catecolaminas totales, no pudiendo discriminar entre las aminor adrenalina y noradrenalina. No obstante, pudiera ocurrir que SNP y CNP afectasen solamente a una de las dos poblaciones celulares productoras de estas aminor, células adrenérgicas y noradrenérgicas. Con objeto de investigar esta posibilidad, la secreción estimulada por Ach 50  $\mu$ M se determinó también mediante separación de las aminor por HPLC y posterior análisis mediante detección electroquímica.

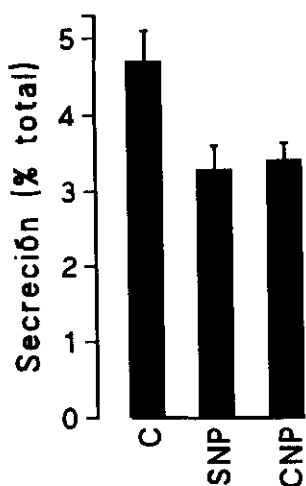
La figura 31 muestra una reducción en porcentajes muy similares (aproximadamente un 30 %) tanto de la secreción de adrenalina como la de noradrenalina después de la preincubación de las células con SNP y CNP.



**Figura 31-IV. Efecto inhibitorio de SNP y CNP sobre la secreción de adrenalina y noradrenalina en células cromafines bovinas.** Las células se preincubaron durante 45 minutos con SNP 100  $\mu$ M, CNP 100 nM o control. Tras la preincubación, las células se estimularon con Ach 50  $\mu$ M y la cantidad de adrenalina y noradrenalina liberada al medio extracelular durante 2 minutos se determinó mediante HPLC según se describe en la sección Métodos.

Puesto que SNP y CNP tienen en común su capacidad para incrementar de manera notable los niveles intracelulares de GMPc en células cromafines bovinas, estos resultados sugieren que el GMPc ejerce una modulación negativa de la secreción de catecolaminas y que esta modulación parece estar presente tanto en células adrenérgicas como en noradrenérgicas.

La inhibición por SNP y CNP de la secreción de catecolaminas no es exclusiva de la estimulación de las células por acetilcolina, sino que, según se muestra en la figura 32, también se observa cuando la estimulación se efectuó con KCl 30 mM.

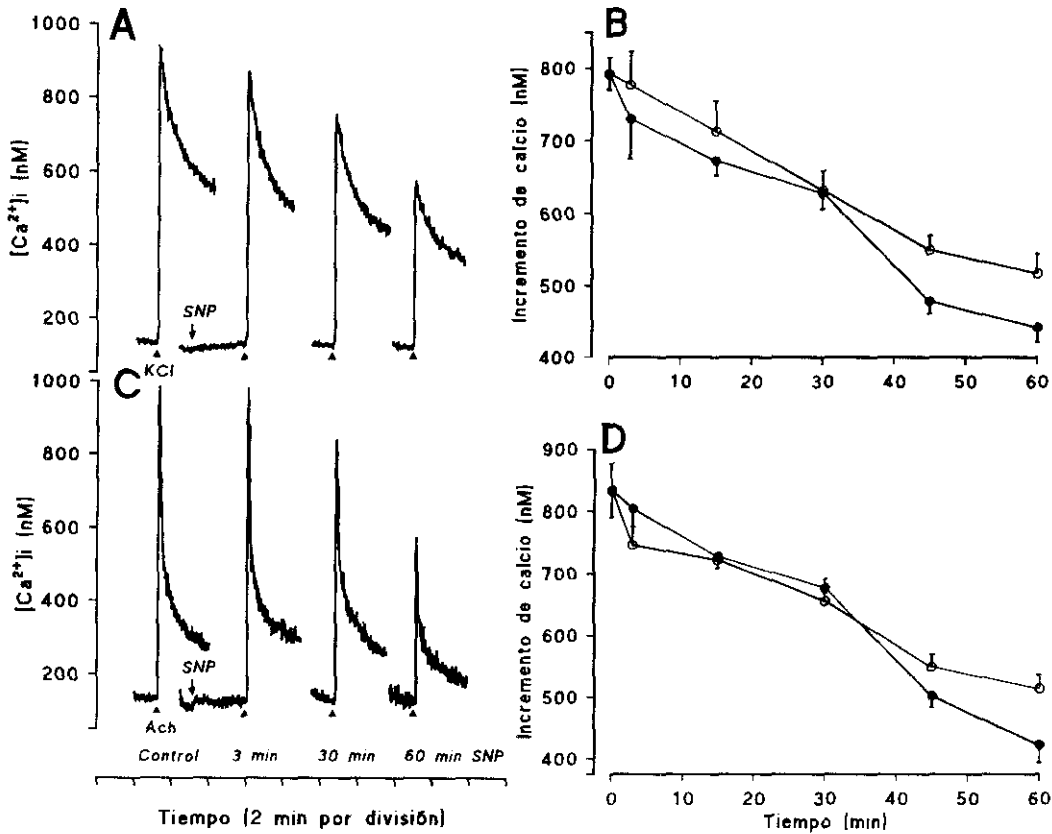


**Figura 32-IV. Efecto inhibitorio de SNP y CNP sobre la secreción estimulada por KCl 30 mM.** Las células se preincubaron durante 45 minutos con SNP 100  $\mu$ M, CNP 100 nM o control. Después del período de preincubación, las células se estimularon con KCl 30 mM y la secreción de catecolaminas se determinó según se describe en la sección de Métodos.

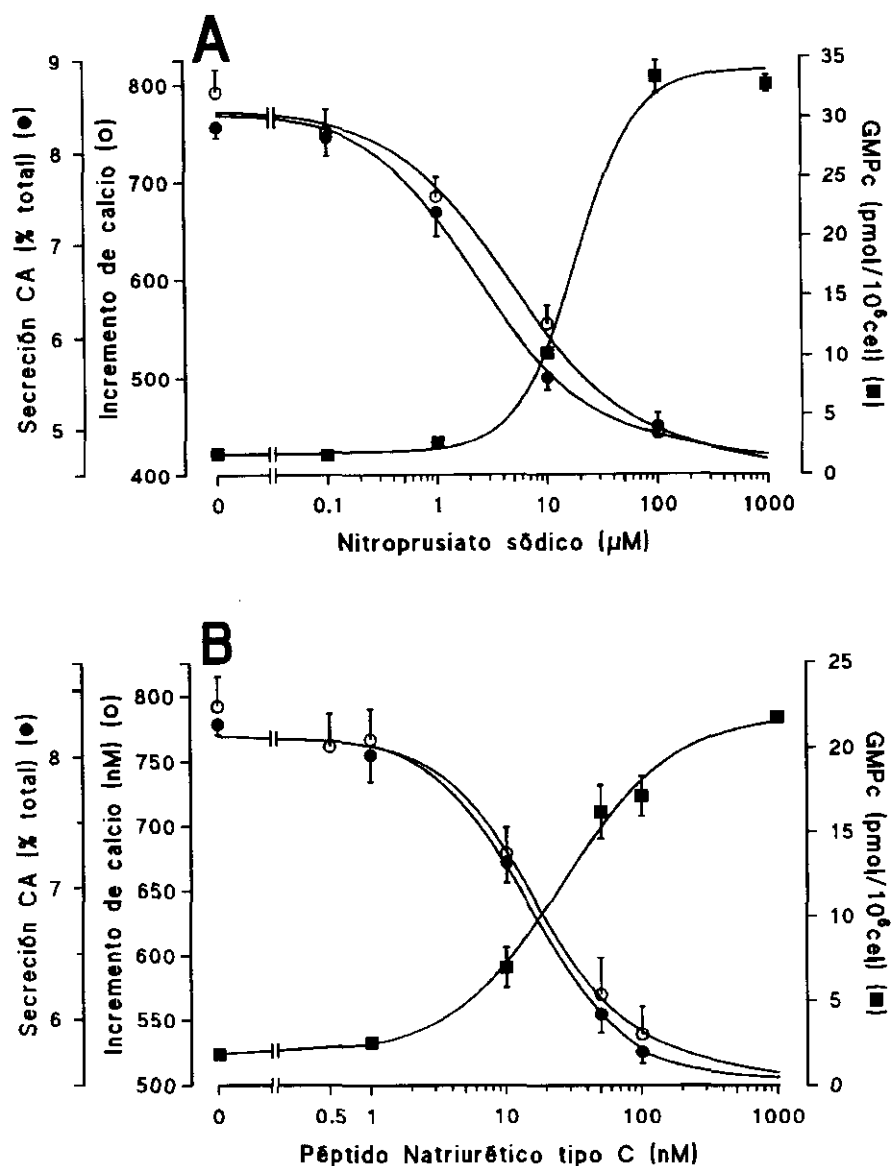
El principal estímulo fisiológico para la exocitosis en células cromafines es un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ . Aunque a través de diferentes mecanismos, los secretagogos empleados en este trabajo de investigación, Ach y KCl, producen grandes incrementos en la  $[Ca^{2+}]_i$ . La estimulación con estos compuestos aumenta rápidamente la  $[Ca^{2+}]_i$  hasta un pico inicial que resulta de la entrada masiva de iones calcio a través de canales voltaje-dependientes. Según se ha descrito en la bibliografía, esta entrada rápida de calcio al interior de la célula esta acoplada de manera muy efectiva al fenómeno secretor (Burgoyne, 1991). Por tanto, merece la pena estudiar en profundidad si la modulación negativa de la secreción estimulada de catecolaminas que se observa con SNP y CNP se acompaña también de una reducción en el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  producida por los secretagogos empleados.

Se estudió, en primer lugar, si los activadores de guanilato ciclasas producían por sí mismos un efecto sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  basal. El segundo registro de los paneles A y C de la figura 33 muestra que la  $[Ca^{2+}]_i$  basal no se vio afectada cuando las células se trataron con SNP 100  $\mu$ M o CNP 100 nM. Sin embargo, de forma paralela a lo que se observa con la secreción de catecolaminas, ambos compuestos inhibieron el incremento de calcio (medido como altura del pico inicial) estimulado por Ach 50  $\mu$ M o KCl 30 mM (Fig. 33). Este efecto inhibitorio alcanzó un máximo de aproximadamente 40-50 % después de una preincubación con SNP o CNP de 45-60 minutos.

La recuperación del  $[Ca^{2+}]_i$  tras el pico transitorio sigue una cinética exponencial que se analizó en detalle en células estimuladas con Ach 50  $\mu$ M y KCl 30 mM en condiciones control y tratadas con SNP o CNP. El valor de  $t_{1/2}$  para la fase de recuperación en células estimuladas con Ach en condiciones control fue de  $14.50 \pm 1.11$  segundos, y de  $14.71 \pm 0.44$  y  $14.72 \pm 0.82$  cuando las células se preincubaron con SNP y CNP, respectivamente. En el caso de KCl, el control fue de  $52.08 \pm 4.24$  segundos, y de  $52.19 \pm 4.97$  y  $51.71 \pm 2.80$  después de la preincubación con SNP y CNP, respectivamente. Estos resultados indican que la inhibición por SNP y CNP sólo afectó al rápido pico inicial y no afectó en absoluto al mucho más lento proceso de recuperación de la  $[Ca^{2+}]_i$ , que depende de sistemas intracelulares de tamponamiento del calcio (bomba de  $Ca^{2+}$ , intercambiador  $Na^+-Ca^{2+}$ , etc.).



**Figura 33-IV. Efecto inhibitorio dependiente del tiempo de SNP y CNP sobre los incrementos de calcio estimulados por acetilcolina o cloruro potásico.** Células cargadas con Fura-2 se preincubaron durante diferentes períodos de tiempo con SNP 100  $\mu$ M (círculos cerrados en B y D) o CNP 100 nM (círculos abiertos en B y D). Tras el período de preincubación, los incrementos en la concentración de calcio citosólico estimulados por KCl 30 mM (A, registros representativos, B, estudio en función del tiempo) o acetilcolina 50  $\mu$ M (C, registros representativos, D, estudio en función del tiempo) se determinaron según se describe en Métodos.



**Figura 34-IV. Dosis-dependencia de los efectos inhibitorios de SNP y CNP sobre la secreción de catecolaminas y el incremento de calcio citosólico estimulados por acetilcolina.** Las células se preincubaron con diferentes concentraciones de SNP (A) o CNP (B) y la secreción de catecolaminas (círculos cerrados) y el incremento de calcio citosólico (círculos abiertos) estimulados por Ach 50  $\mu\text{M}$  fueron determinados según se describe en Métodos. Por comparación, los efectos dosis-dependiente de SNP y CNP sobre los niveles de GMPC intracelular también se muestran (cuadrados).

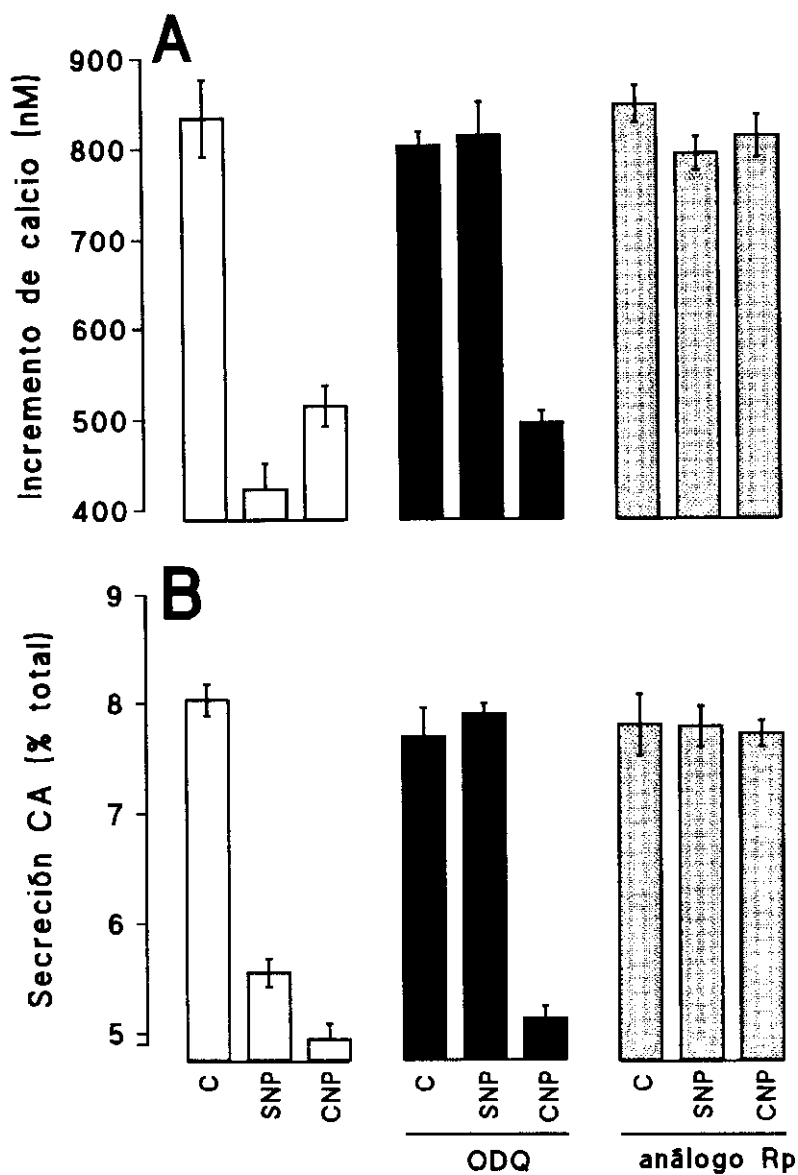
### Confirmación del papel del GMPc en la modulación de la secreción de catecolaminas y el calcio citosólico por SNP y CNP

Una serie de experimentos se realizaron con objeto de confirmar el papel del GMPc en la modulación por SNP y CNP de la secreción de catecolaminas, así como obtener información adicional sobre el mecanismo de acción.

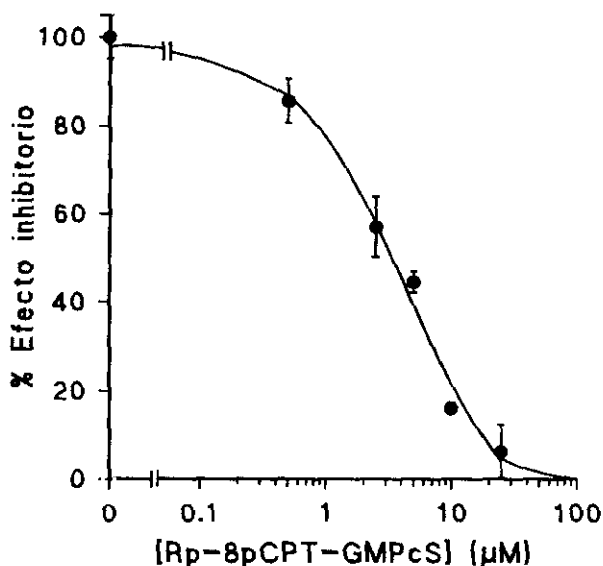
En primer lugar, se estudió la dependencia de la dosis de SNP o CNP necesaria para producir inhibición de la secreción de catecolaminas y del incremento del calcio intracelular asociado al proceso secretor. La figura 34 ilustra este estudio. Por comparación, en esta figura se muestra también el efecto dosis-dependiente de SNP y CNP sobre los niveles de GMPc (valores obtenidos a partir de la figura 17). A partir de la figura 34 se calcularon los valores de  $IC_{50}$  para la inhibición de la secreción de catecolaminas y del incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  siendo  $2.40 \pm 1.06 \mu M$  y  $6.94 \pm 2.41 \mu M$  para SNP en secreción y calcio, respectivamente;  $19.00 \pm 5.76 nM$  y  $11.01 \pm 2.11 nM$  para CNP en secreción y calcio, respectivamente. Dichos valores correlacionan bastante bien con el valor de  $EC_{50}$  para la producción de GMPc ( $18.13 \pm 2.99 \mu M$  para SNP y  $25.63 \pm 5.96 nM$  para CNP), indicando este hecho que la modulación de la secreción y el calcio citosólico podría estar mediada por el GMPc producido por SNP y CNP.

Por otro lado, se estudió el efecto de ODQ, inhibidor de la guanilato ciclasa soluble, y de Rp-8pCPT-GMPcS, inhibidor de la proteína quinasa dependiente de GMPc, sobre la modulación por GMPc de la respuesta secretora.

La figura 35 muestra que ODQ  $10 \mu M$  fue capaz de revertir el efecto inhibitorio de SNP sobre la secreción de catecolaminas y el calcio citosólico, mientras que no afectó en absoluto a la inhibición producida por CNP. Este hecho confirma el requerimiento de la producción de GMPc a través de guanilato ciclasa soluble para que se observe el efecto inhibitorio de SNP. Por otro lado, el inhibidor de la PKG revirtió el efecto inhibitorio producido por SNP y CNP. Para la reversión de la inhibición producida por CNP sobre la secreción de catecolaminas estimulada por Ach se obtuvo un valor de  $IC_{50}$  de  $4.34 \pm 1.87 \mu M$  (figura 36). Este valor es relativamente comparable al descrito para la inhibición de PKG purificada por este análogo de GMPc ( $K_i$  de  $0.5 \mu M$ ), especialmente teniendo en cuenta que la inhibición es de tipo competitivo (Butt *et al.*, 1994) y el valor de  $IC_{50}$  de la figura 35 se obtuvo a partir de células cromafines tratadas con CNP  $100 nM$ , el cual produce grandes incrementos en la concentración de GMPc intracelular. Estos resultados sugieren la participación de la quinasa en la modulación negativa de la función secretora de células cromafines bovinas por la ruta del GMPc.



**Figura 35-IV. Efectos del inhibidor de la enzima guanilato ciclasa soluble, ODQ; y del inhibidor de la proteína quinasa dependiente de GMPc, Rp-8-pCPT-GMPcS, sobre la inhibición por SNP y CNP de la secreción de catecolaminas y el incremento de calcio citosólico.** Las células se preincubaron durante 45 minutos con SNP 100  $\mu$ M, CNP 100 nM o control; en ausencia (barras blancas) o presencia de ODQ 10  $\mu$ M (barras negras) o Rp-8-pCPT-GMPcS 25  $\mu$ M (barras grises). Después de la preincubación, la secreción de catecolaminas (A) y el incremento de calcio citosólico (B) estimulados por acetilcolina 50  $\mu$ M se determinaron según se describe en Métodos.

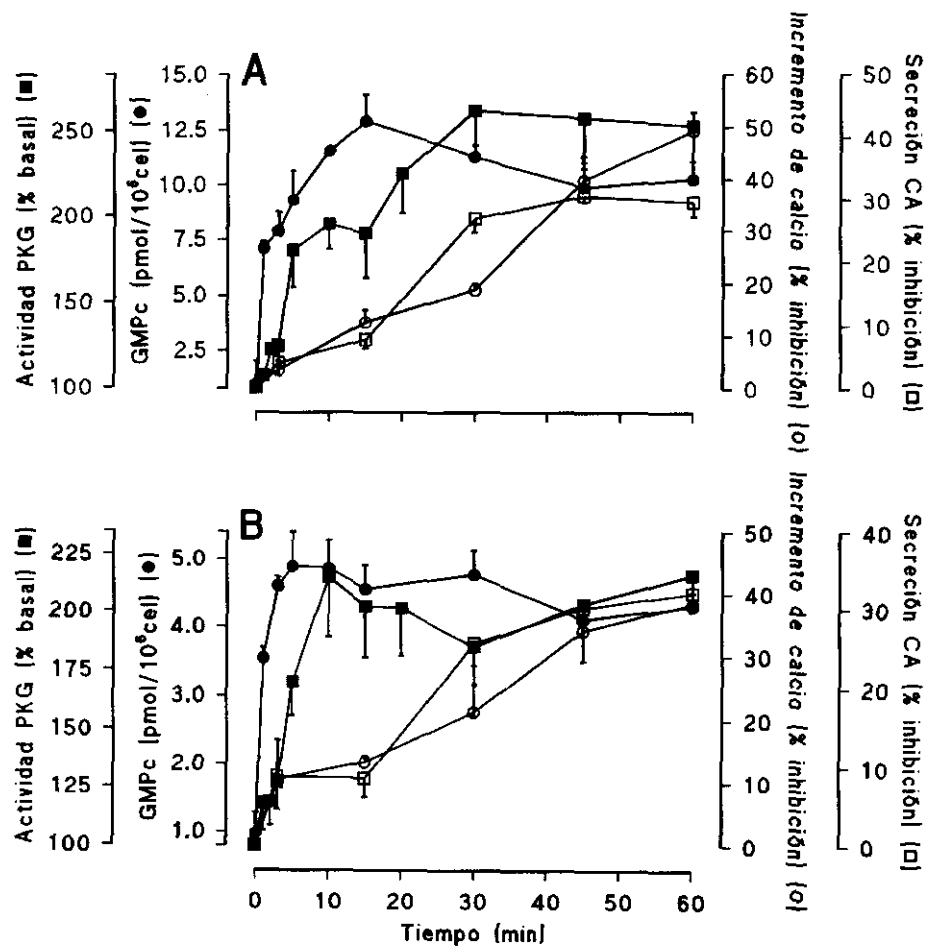


**Figura 36-IV. Reversión concentración-dependiente del efecto inhibitorio de CNP sobre la secreción de catecolaminas por Rp-8pCPT-GMPcS.** Las células cromafines se preincubaron durante 5 minutos con diferentes concentraciones de Rp-8pCPT-GMPcS antes de una preincubación de 45 minutos con CNP 100 nM conteniendo el análogo de GMPc a su correspondiente concentración. Las células se estimularon con Ach 50 μM y la secreción de catecolaminas se determinó según se describe en la sección Métodos. Un efecto inhibitorio de  $43.57 \pm 1.63$  % sobre la secreción de catecolaminas fue normalizado a 100 %.

Con objeto de investigar en profundidad el desarrollo de los acontecimientos que se observaron cuando células cromafines bovinas se incubaron con SNP y CNP, la figura 37 muestra el estudio en función del tiempo de la producción de GMPc, la activación de PKG y la aparición de la inhibición en la secreción de catecolaminas y del incremento de calcio citosólico. Dichos valores se obtuvieron a partir de las figuras 17, 25, 30 y 33; y se muestran juntos en esta figura para facilitar la comparación.

Según se muestra en la citada figura, la producción de GMPc y la activación de PKG ocurren primero y preceden a los efectos inhibitorios sobre secreción y calcio, los cuales tienen lugar con similares períodos de preincubación con SNP o CNP. El orden de los acontecimientos que se observó refuerza la posibilidad de que la producción de GMPc y posterior activación de PKG sean responsables de la reducción en la secreción de catecolaminas y en el calcio citosólico. No obstante, es muy plausible que etapas intermedias adicionales entre la activación de la PKG y la aparición de los efectos inhibitorios ocurran y den cuenta del desfase que existe entre estos fenómenos. Por otro lado, este desfase no significa que el GMPc intracelular tenga que estar elevado durante todo ese tiempo para que se observe un efecto inhibitorio por SNP y CNP. Una preincubación de 5 minutos con SNP y CNP seguida de un período de 55 minutos en ausencia de cualquier activador de guanilato ciclasa, período en el cual los niveles

de GMPc retornan a los valores basales, fue suficiente para producir una inhibición de la respuesta secretora medida inmediatamente después del período de recuperación (experimentos no mostrados). Estos resultados sugieren que para la consecución de los efectos inhibitorios sólo se requieren intervalos cortos de activación por agentes que elevan el GMPc intracelular. El incremento transitorio del GMPc desencadena procesos intracelulares que conducen a una inhibición tardía de la respuesta secretora.



**Figura 37-IV.** Estudio en función del tiempo del efecto de SNP y CNP sobre los niveles intracelulares de GMPc, la actividad de proteína quinasa dependiente de GMPc y la secreción de catecolaminas y el incremento de calcio citosólico estimulados por acetilcolina. Las células se incubaron los tiempos indicados con SNP 100  $\mu$ M (A) o CNP 100 nM (B) y la producción de GMPc (círculos cerrados), la actividad de PKG (cuadrados cerrados), la secreción de catecolaminas (cuadrados abiertos) y el incremento de calcio citosólico (círculos abiertos) se determinaron según se describe en Métodos. Los efectos sobre secreción de catecolaminas e incremento de calcio citosólico se muestran como porcentaje de inhibición. Los valores que se muestran en esta figura se obtuvieron a partir de las figuras 17, 25, 30 y 33.

Todos estos experimentos confirman que el efecto inhibitorio de SNP y CNP sobre la secreción de catecolaminas y el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  estimulados por los secretagogos acetilcolina y KCl está mediado por el GMPc producido a partir de las isoformas de guanilato ciclasa. Estos resultados también sugieren la participación de la PKG en la modulación por GMPc de la función secretora en células cromafines bovinas en cultivo.

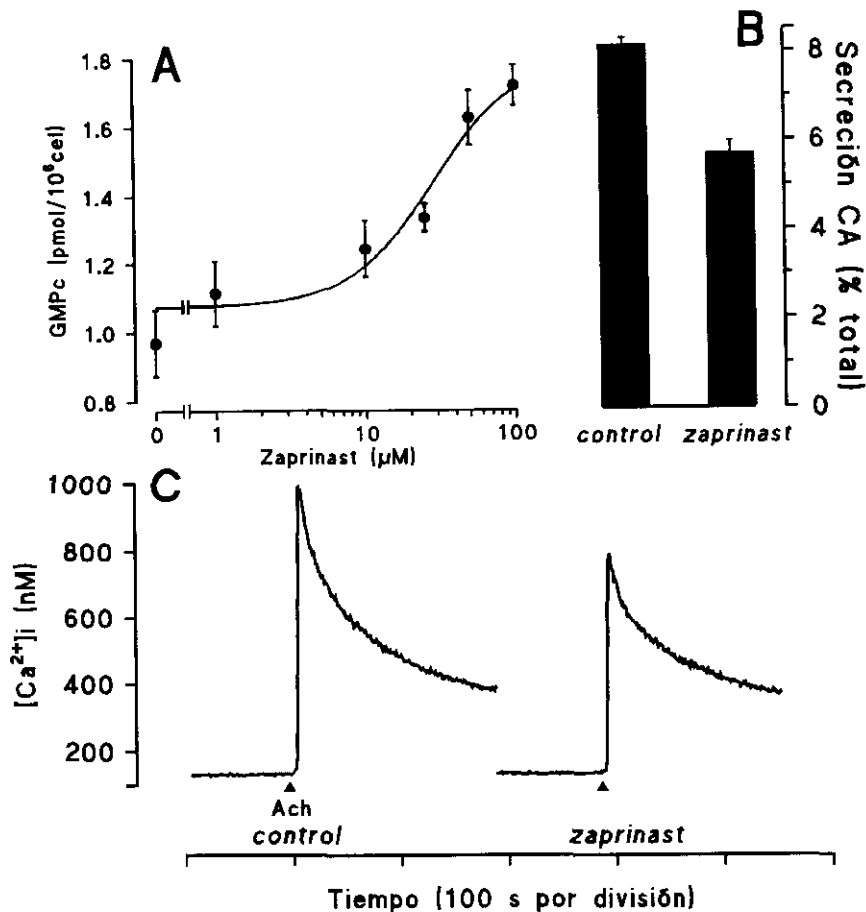
### **Modulación de la respuesta secretora por inhibición de la degradación de GMPc**

Las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos catalizan la hidrólisis de los nucleótidos 3',5'-cíclicos a los correspondientes nucleósidos 5'-monofosfatos en lo que constituye el único mecanismo conocido de degradación de nucleótidos cíclicos en células eucarióticas (Beavo y Reifsnnyder, 1990). Inhibidores de fosfodiesterasas que selectivamente incrementan los niveles de GMPc o de AMPc pueden ser, por tanto, importantes herramientas farmacológicas para la investigación en nucleótidos cíclicos. Los inhibidores que convencionalmente se usan para aumentar la sensibilidad de los ensayos de GMPc o AMPc (por ejemplo, IBMX) no son válidos puesto que inespecíficamente incrementan los niveles de ambos nucleótidos cíclicos mediante una acción sobre las diferentes isoformas.

Zaprinast (2-o-propoxi-fenil-8-azapurin-6-ona), compuesto sintetizado en 1975 y ensayado clínicamente como tratamiento para mejorar procesos asmáticos, presenta una afinidad, al menos, dos órdenes de magnitud mayor para inhibir la fosfodiesterasa específica de GMPc (tipo V) que para inhibir las restantes fosfodiesterasas, según se ha descrito para preparaciones enzimáticas aisladas de aorta humana (Merkel, 1993; Miyahara *et al.*, 1995; Coste y Grondin, 1995). Estas características de inhibición hacen de zaprinast un inhibidor selectivo de la fosfodiesterasa específica de GMPc y, por tanto, puede emplearse con el propósito de incrementar selectivamente los niveles de este nucleótido.

Los valores de  $IC_{50}$  de zaprinast para la inhibición de la fosfodiesterasa de tipo V en diferentes tejidos varían desde 0.5 hasta 30-40  $\mu M$ , aunque en algunos se han descrito valores  $>100 \mu M$  (Merkel, 1993). Esta variabilidad en el comportamiento inhibitorio de zaprinast hace necesario un estudio detallado de los parámetros de inhibición de la hidrólisis de GMPc en el tejido en cuestión, en este caso las células cromafines bovinas en cultivo. Estos parámetros se estudiaron como las dosis necesarias para aumentar los niveles basales de GMPc intracelular después de una preincubación de 30 minutos con diferentes concentraciones de zaprinast.

El panel A de la figura 38 muestra el efecto dosis-dependiente de zaprinast sobre los niveles de GMPc intracelular. Como se aprecia en esta figura, concentraciones de zaprinast  $> 10 \mu M$  incrementan significativamente los niveles de GMPc, pudiéndose estimar un valor de  $EC_{50}$  de  $28.44 \pm 3.93 \mu M$  para este efecto.



**Figura 38-IV.** Efecto de zaprinast, inhibidor de la fosfodiesterasa específica de GMPc (tipo V), sobre los niveles de GMPc intracelular y la secreción de catecolaminas y el incremento de calcio citosólico estimulados por acetilcolina. A) Estudio del efecto dependiente de la dosis de zaprinast sobre los niveles intracelulares de GMPc de células cromafines preincubadas durante 30 minutos con diferentes concentraciones de este compuesto. B) Histograma que muestra el efecto de una preincubación de 30 minutos con zaprinast 100  $\mu\text{M}$  sobre la secreción de catecolaminas estimulada por acetilcolina 50  $\mu\text{M}$ . C) Registros representativos del efecto de una preincubación de 30 minutos con zaprinast 100  $\mu\text{M}$  sobre el incremento de calcio citosólico estimulado por acetilcolina 50  $\mu\text{M}$ .

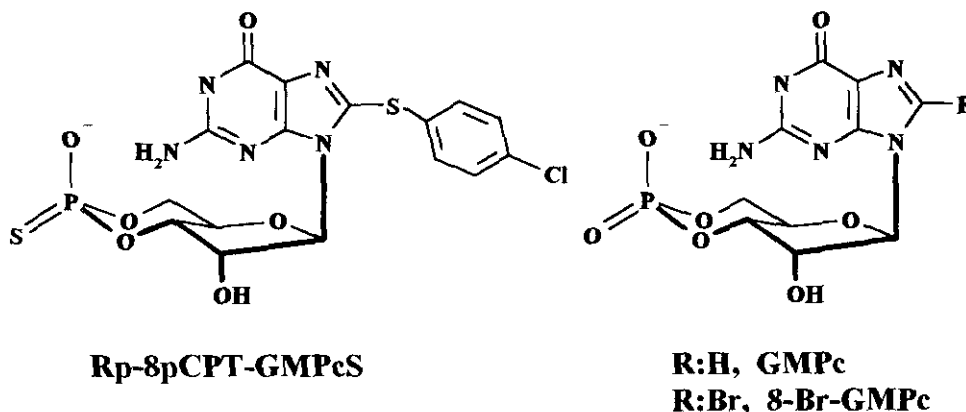
La figura 38 (paneles B y C) muestran que la preincubación de las células con zaprinast 100  $\mu\text{M}$  produjo una inhibición de la secreción de catecolaminas y del incremento del calcio citosólico estimulados por Ach 50  $\mu\text{M}$ . Aunque el zaprinast no consiguió aumentar los niveles intracelulares de GMPc hasta un valor mayor del doble del basal, estos resultados muestran que la modulación negativa de la función secretora por GMPc se puede inducir no sólo activando la ruta de síntesis sino también inhibiendo los mecanismos de degradación.

### Mecanismo de acción del GMPc: Estudio del efecto del análogo permeable de GMPc, 8-bromo-GMPc

Para el estudio del papel que el GMPc pueda jugar en diferentes acciones biológicas ha sido de gran ayuda el empleo de análogos de GMPc (Miller *et al.*, 1973). Estos análogos, en el interior de la célula, mimetizan las acciones del GMPc mediante interacción con los sistemas receptores del nucleótido cíclico, de modo que en este tipo de experimentos los incrementos en los niveles de "GMPc intracelular" se consiguen de manera totalmente independiente de la activación de las isoformas de guanilato ciclasa u otros elementos que pudieran participar en la producción endógena de GMPc.

Sin tener en cuenta importantes consideraciones, este tipo de ensayos podrían llevarse a cabo simplemente incubando las células con GMPc. Sin embargo, el nucleótido cíclico natural es relativamente poco permeable a través de las membranas biológicas por lo que difícilmente podría acceder a los elementos intracelulares de respuesta al GMPc (quinasas, canales, etc.). A esto habría que añadir que el GMPc es rápidamente hidrolizado por fosfodiesterasas, haciendo estos ensayos inviables en la práctica (Zimmerman *et al.*, 1985).

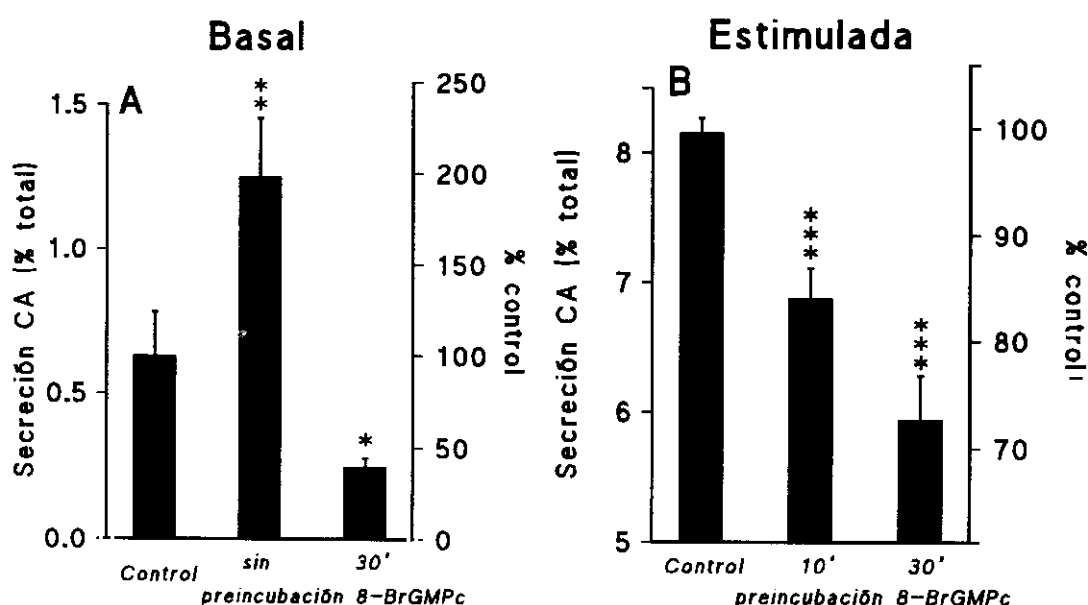
La Química de Síntesis ha permitido el desarrollo de análogos de GMPc con sustituciones en diversas posiciones de la molécula que han aumentado considerablemente la permeabilidad de estos compuestos a través de membranas biológicas y su resistencia a hidrólisis por fosfodiesterasas, así como dotado a estos análogos de propiedades selectivas frente a proteínas específicas que interaccionan con GMPc. Como ejemplo, el análogo Rp-8pCPT-GMPcS, un derivado de GMPc empleado en otros experimentos de este trabajo de investigación es, como consecuencia de estas sustituciones, un excelente inhibidor de la proteína quinasa dependiente de GMPc (Miller *et al.*, 1973; Zimmerman *et al.*, 1985; Corbin *et al.*, 1986; Sekhar *et al.*, 1992; Butt *et al.*, 1994).



**Figura 39-IV. Estructuras del GMPc y análogos empleados, 8Br-GMPc y Rp-8pCPT-GMPcS.** Como se aprecia en las estructuras, 8Br-GMPc es similar al GMPc con la diferencia de que el hidrógeno de la posición 8 de la nucleobase se ha sustituido por bromo. En el caso del análogo Rp-8pCPT-GMPcS, el hidrógeno de la posición 8 se ha reemplazado por el grupo lipofílico *p*-clorofenil-tio, y además uno de los 2 oxígenos que no participan en formar el ciclo es sustituido por azufre.

El 8-bromo-GMPc (8Br-GMPc) es un análogo de GMPc en el que el hidrógeno de la posición 8 de la nucleobase se ha reemplazado por bromo. Esta modificación resulta en un incremento de la lipofilidad de la molécula (2.5 veces más que GMPc) y de su afinidad por la proteína quinasa dependiente de GMPc (tipo  $I\alpha$ ), haciendo de este compuesto un excelente activador de esta enzima. 8Br-GMPc no es totalmente resistente a la hidrólisis por fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos, pero es degradado mucho más lentamente que el nucleótido cíclico natural (estructuras en Fig. 39) (Rapoport *et al.*, 1982; Corbin *et al.*, 1986; Wolfe *et al.*, 1989).

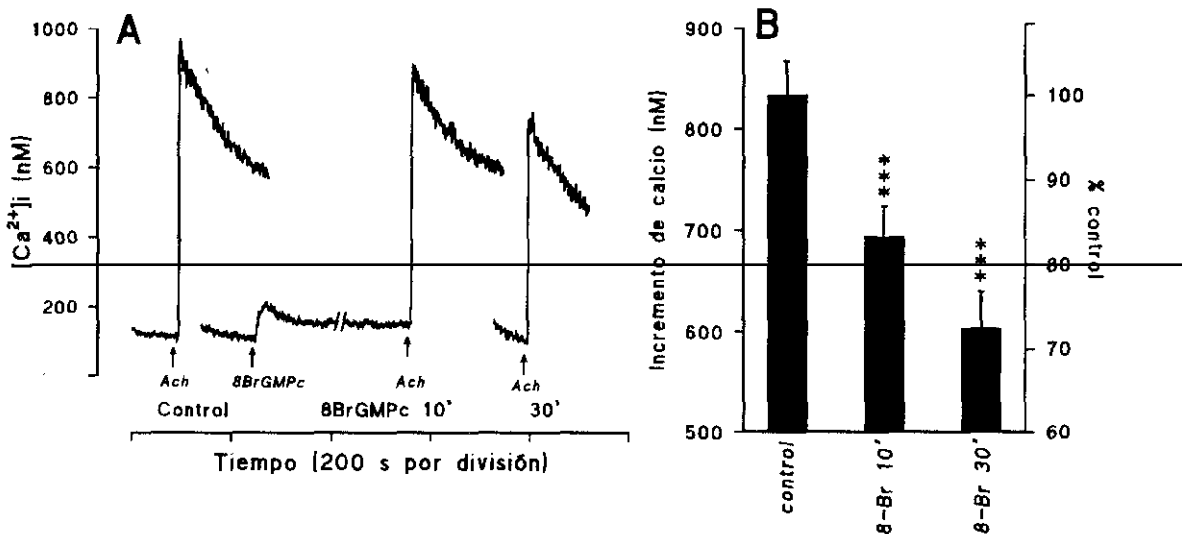
Para este trabajo de investigación se escogió 8Br-GMPc con objeto de investigar el mecanismo a través del cual GMPc modula la secreción de catecolaminas en células cromafines bovinas.



**Figura 40-IV. Efecto de la preincubación con 8Br-GMPc sobre la secreción de catecolaminas en células cromafines bovinas.** Las células fueron preincubadas durante los tiempos indicados en ausencia (control) o presencia de 8Br-GMPc 100  $\mu$ M. Después de la preincubación la secreción de catecolaminas basal (A) o estimulada por acetilcolina 50  $\mu$ M se determinó según se describe en la sección Métodos. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.05$  indican diferencias significativas respecto del valor control.

La figura 40 muestra el efecto de la preincubación con 8Br-GMPc 100  $\mu$ M sobre la secreción de catecolaminas en condiciones basales o después de la estimulación de las células con Ach 50  $\mu$ M durante 2 minutos. Los resultados muestran que, de forma similar al efecto observado con SNP y CNP, el análogo de GMPc produjo una reducción tiempo-dependiente de la secreción de catecolaminas estimulada por Ach (hasta aproximadamente un 30 %). Sin embargo, en contraste con los resultados obtenidos con SNP y CNP, cuando las células se trataron agudamente (adición del

análogo 1-2 minutos antes que la acetilcolina) con 8Br-GMPc se produjo un incremento significativo de la secreción basal de catecolaminas. Por otro lado, si 8Br-GMPc se administra en forma de una preincubación de 30 minutos la secreción basal se redujo respecto del control.

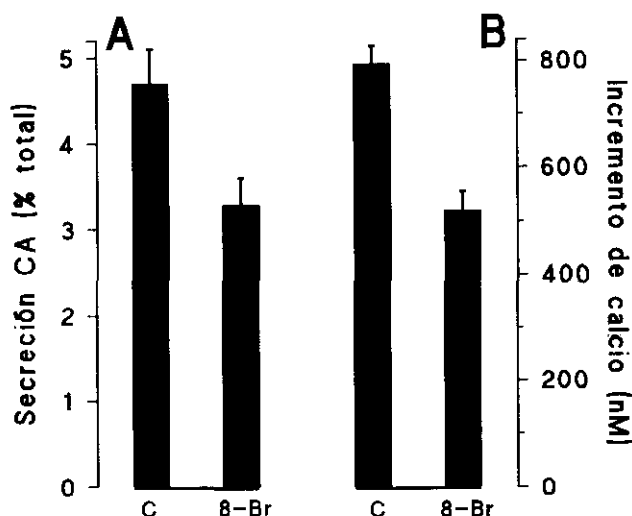


**Figura 41-IV. Efecto de la preincubación con 8Br-GMPc sobre el incremento de calcio estimulado por acetilcolina.** Células cargadas con Fura-2 se preincubaron durante los tiempos indicados en ausencia (control) o presencia de 8Br-GMPc 100  $\mu$ M. Tras el período de preincubación las células se estimularon con Ach 50  $\mu$ M y la  $[Ca^{2+}]_i$  se determinó según se describe en la sección Métodos. El panel A muestra registros representativos mostrando estos resultados, mientras que el panel B muestra la magnitud de los incrementos de calcio. \*\*p < 0.001 indica una diferencia significativa respecto del valor control.

Según se muestra en la figura 41, este comportamiento se reflejó también en las medidas de  $[Ca^{2+}]_i$ . 8Br-GMPc 100  $\mu$ M produjo una inhibición que se desarrolló lentamente en el tiempo hasta un valor de aproximadamente 30 % a los 30 minutos de incubación. Además, de forma similar al efecto sobre la secreción, el tratamiento agudo con 8Br-GMPc produjo un incremento pequeño, pero significativo de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Cuando el calcio extracelular fue tamponado a aproximadamente 100 nM con una mezcla de  $Ca^{2+}$ /EGTA, 8Br-GMPc fue capaz de incrementar la  $[Ca^{2+}]_i$  (resultados no mostrados). Este efecto podría dar cuenta de la pequeña secreción que se observa cuando el análogo se añadió directamente a las células. Debido a que, en primer lugar, se requiere un cierto tiempo para que se alcancen concentraciones intracelulares efectivas de este compuesto, y, en segundo lugar, a que estos efectos no fueron observados cuando se utilizaron los activadores de guanilato ciclasas; SNP y CNP; estos efectos no pueden ser atribuidos a mecanismos intracelulares mediados por GMPc y no fueron investigados con mayor profundidad.

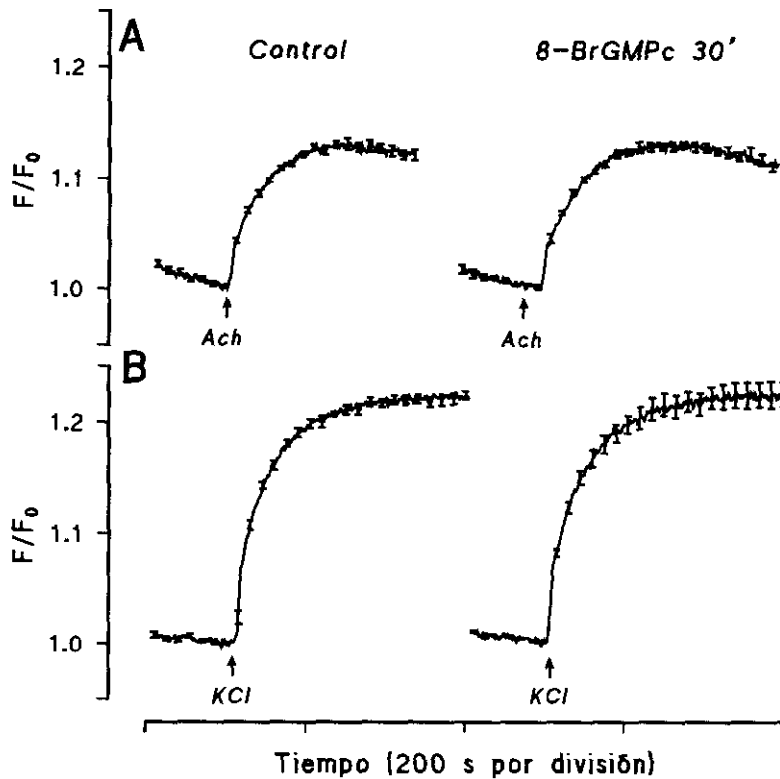
El efecto inhibitorio sobre la secreción de catecolaminas y el calcio citosólico también se observó cuando las células se estimularon con KCl 30 mM (Fig. 42).

La figura 43 muestra el efecto de una preincubación de 30 minutos con 8Br-GMPc 100  $\mu$ M sobre el potencial de membrana medido con la sonda fluorescente bisoxonol. La figura muestra claramente que el análogo de GMPc no produjo ningún efecto sobre la despolarización inducida por acetilcolina o cloruro potásico.



**Figura 42-IV.** Efecto de 8Br-GMPc sobre la secreción de catecolaminas y el incremento de calcio citosólico estimulados por KCl 30 mM. Las células se preincubaron durante 30 minutos con 8Br-GMPc 100  $\mu$ M (8-Br) o control (C) y, a continuación, la secreción de catecolaminas (A) y el incremento de calcio citosólico (B) estimulados por KCl 30 mM se determinaron según se describe en la sección Métodos.

Todos estos resultados permiten proponer un posible mecanismo de acción. El hecho de que la inhibición de la secreción de catecolaminas y el calcio citosólico sea observable estimulando las células con acetilcolina y también con KCl, indica que la acción inhibitoria tiene lugar, o bien sobre el receptor-canal nicotínico o bien sobre canales de  $\text{Ca}^{2+}$ -voltaje dependientes, o sobre ambos. Los experimentos de potencial de membrana resultan claves para proponer con mayor detalle un posible modo de actuación del GMPc. La despolarización inducida por ACh y KCl no se modificó con la preincubación con el nucleótido cíclico. Este resultado descarta la participación del receptor-canal nicotínico en el mecanismo de acción, así como un posible efecto sobre canales de  $\text{K}^{+}$  que pudieran modular la excitabilidad de la membrana y, por tanto, la despolarización y la consiguiente exocitosis. Estos resultados sugieren que el mecanismo de acción a través del cual el GMPc ejerce su efecto se produce mediante inhibición de la entrada de calcio a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ -voltaje dependientes.

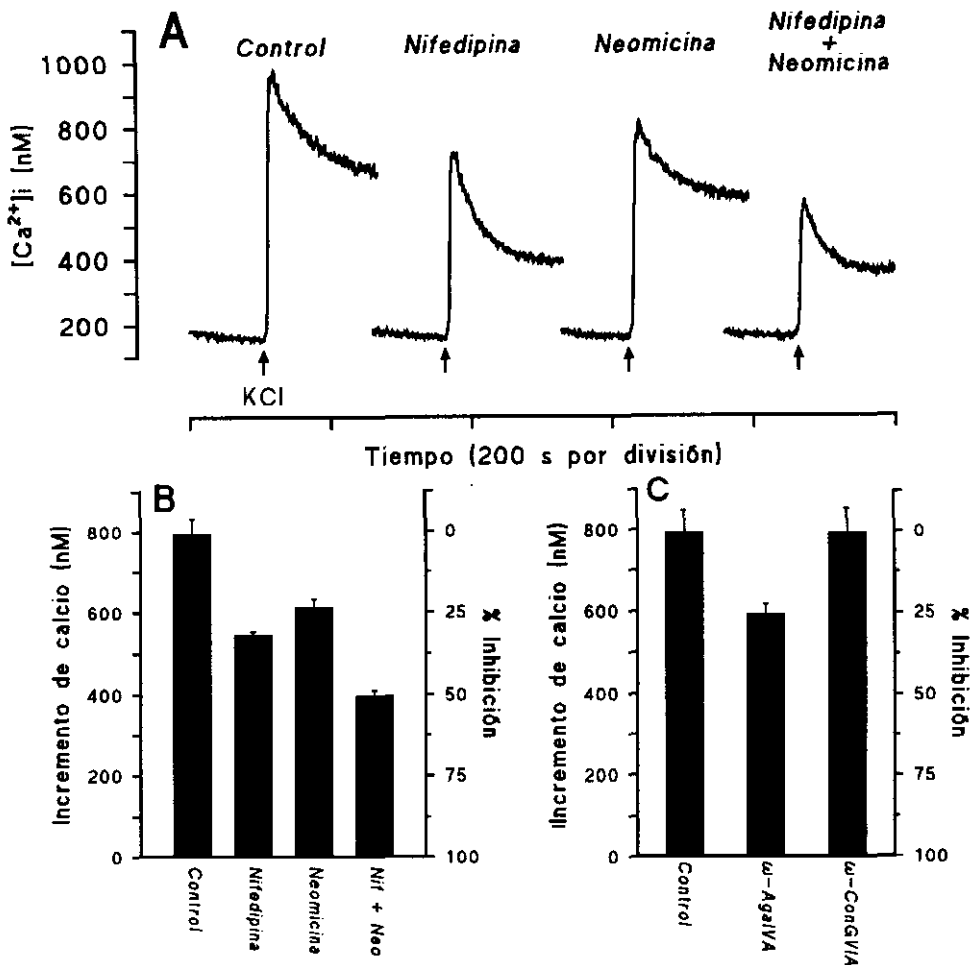


**Figura 43-IV.** Efecto de una preincubación con 8Br-GMPc sobre las respuestas de potencial de membrana de células cromafines estimuladas con acetilcolina o cloruro potásico. Las células se preincubaron durante 30 minutos con 8Br-GMPc 100  $\mu$ M o control. A continuación, la fluorescencia de la sonda de potencial bisoxonol se midió en respuesta a los agentes despolarizantes acetilcolina (ACh 50  $\mu$ M) o cloruro potásico (KCl 30 mM) según se ha descrito en la sección de Métodos.

#### Estudio del tipo de canal de calcio voltaje-dependiente responsable del efecto inhibitorio mediado por GMPc

Como se ha explicado en detalle en la sección de Introducción, las células cromafines bovinas poseen al menos 4 tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes: L, N, P y Q. Cada uno de estos tipos se caracteriza por el bloqueo más o menos específico por determinados compuestos; dihidropiridinas para los canales de tipo L; toxinas derivadas de caracoles marinos del género *Conus*,  $\omega$ -conotoxina-GVIA para los canales N y  $\omega$ -conotoxina-MV1IC para los canales Q; o la toxina del veneno de la araña *Agelenopsis aperta*,  $\omega$ -agatoxina-IVA, para los canales de tipo P.

El propósito de los experimentos que se muestran en este capítulo fue el de investigar el tipo de canal de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependiente implicado en la modulación por GMPc de la respuesta secretora. Debido a las limitaciones que tiene el empleo de bloqueantes de canales, se realizó una caracterización somera que permitió la discriminación en términos de sensibilidad a dihidropiridinas.



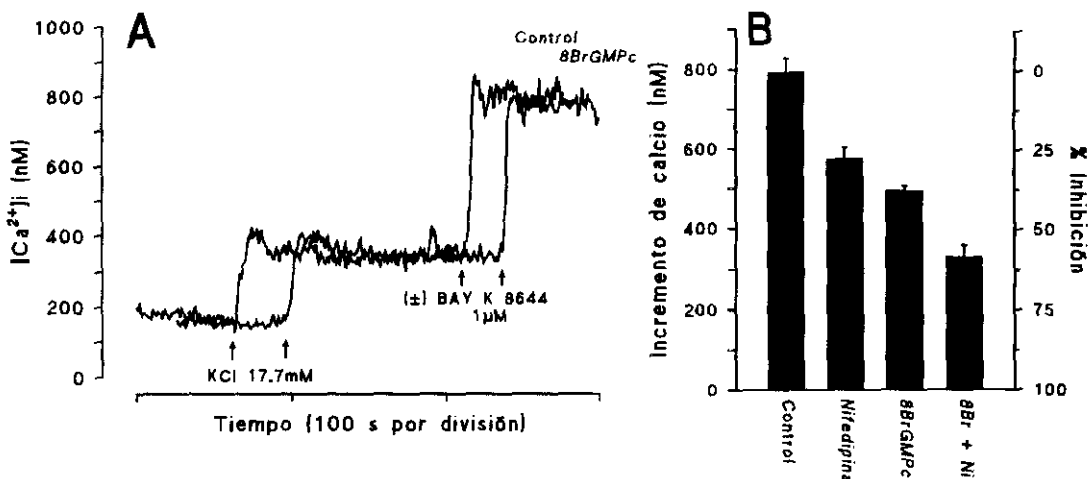
**Figura 44-IV. Efecto de diferentes bloqueantes de canales de  $Ca^{2+}$  sobre el incremento de calcio estimulado por KCl 30 mM.** Registros representativos (A) e histograma (B) que muestran la magnitud de los incrementos de calcio estimulados por KCl 30 mM de células cargadas con Fura-2 preincubadas durante 30 minutos en ausencia (control) o presencia de nifedipina 10  $\mu$ M, neomicina 0.2 mM o ambos. C) Histograma que muestra el efecto de una preincubación de 30 minutos con  $\omega$ -conotoxina-GVIA o  $\omega$ -agatoxina-IVA 1  $\mu$ M sobre el incremento de calcio inducido por KCl 30 mM.

La figura 44 muestra el grado de inhibición obtenido con diferentes bloqueantes de canales de  $Ca^{2+}$  del incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  estimulado por KCl 30 mM. En los paneles A (registros) y B (histograma) de la mencionada figura se usaron nifedipina 10  $\mu$ M, neomicina 0.2 mM o mezclas de ambos. La nifedipina, una dihidropiridina que se comporta como antagonista de canales de tipo L, fue capaz de inhibir el incremento de calcio citosólico en un porcentaje próximo al 30 % respecto del control. Aunque no ha sido muy empleado con este fin, el antibiótico neomicina es un buen bloqueante de la entrada de calcio insensible a dihidropiridinas, según ha sido descrito en células cromafines bovinas (Duarte *et al.*, 1993). Este resultado fue confirmado con los experimentos de la figura 44. Neomicina 0.2 mM produjo una inhibición de la entrada de calcio estimulada por KCl de aproximadamente un 25 % respecto del control.

Cuando las células se preincubaban simultáneamente con nifedipina y neomicina la inhibición alcanzó aproximadamente un 50 %, que corresponde a la suma de los efectos obtenidos de forma separada con ambos compuestos. Estos resultados demuestran que ambos bloqueantes interactúan con diferentes tipos de canales de calcio.

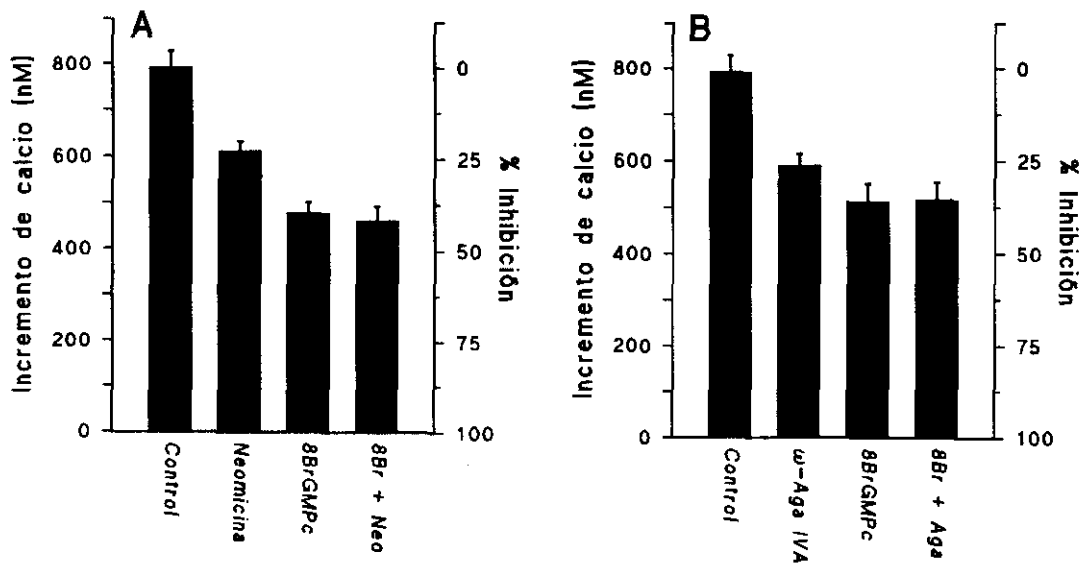
El panel C de la figura 44 muestra también el efecto de las toxinas  $\omega$ -conotoxina-GVIA y  $\omega$ -agatoxina-IVA, ambas a una concentración de 1  $\mu$ M. La preincubación con  $\omega$ -conotoxina-GVIA (procedente de 2 diferentes lotes comerciales) no produjo ningún efecto inhibitorio sobre el incremento de calcio estimulado por KCl 30 mM. Aunque corrientes de  $Ca^{2+}$  sensibles a esta toxina han sido descritas en células cromafines bovinas, los experimentos mostrados indican que, o bien las células no poseían canales de tipo N, o bien no fueron activos en las condiciones experimentales en las que se llevó a cabo este trabajo de investigación (Hans *et al.*, 1990). Por otro lado,  $\omega$ -agatoxina-IVA produjo una inhibición de aproximadamente un 30 % respecto del control. Ya que esta toxina se usó a 1  $\mu$ M, concentración suficiente para inhibir canales P y también canales Q, según se ha descrito, estos resultados demuestran la participación de alguno (o ambos) de estos tipos de canales de  $Ca^{2+}$  (Hillyard *et al.*, 1992).

Los resultados de la figura 44 demuestran la participación de canales sensibles (L) e insensibles (P/Q, pero no N) a dihidropiridinas en el incremento de calcio estimulado por KCl 30 mM en células cromafines bovinas. El efecto de una preincubación de las células con 8Br-GMPc 100  $\mu$ M durante 30 minutos se estudió sobre la entrada de calcio a través de estos canales.



**Figura 45-IV. Participación de canales de tipo L en el efecto modulador de 8Br-GMPc.** A) Efecto de la preincubación con 8Br-GMPc sobre el incremento de calcio estimulado por un estímulo despolarizante suave (KCl 17.7 mM) y sobre la potenciación por ( $\pm$ ) Bay K 8644 1  $\mu$ M. B) Efecto de 8Br-GMPc sobre la inhibición por nifedipina del incremento de calcio estimulado por KCl 30 mM. Las células cromafines se preincubaron durante 30 minutos con nifedipina 10  $\mu$ M, 8Br-GMPc 100  $\mu$ M o ambos antes de la despolarización con KCl.

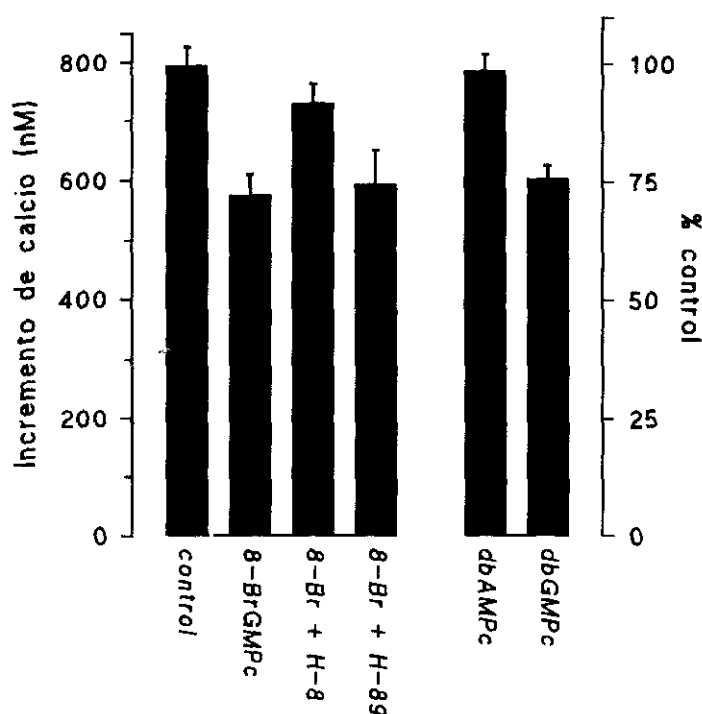
En primer lugar se estudió la participación de canales de tipo L (fig. 45). Tal y como se muestra en el panel B de la mencionada figura, la incubación simultánea de las células con nifedipina 10  $\mu\text{M}$  y 8Br-GMPc 100  $\mu\text{M}$  produjo una inhibición del incremento de calcio estimulado por KCl que correspondió aproximadamente a la suma de las inhibiciones que ambos compuestos producen por separado. Este resultado sugiere que los canales de calcio de tipo L no participan en la modulación por GMPc de la respuesta secretora. Para confirmar este resultado se utilizó la dihidropiridina ( $\pm$ ) BayK 8644 (1  $\mu\text{M}$ ), que se comporta como agonista de canales de tipo L (García *et al.*, 1984). Cuando este compuesto se añade a células estimuladas mediante despolarizaciones suaves (por ejemplo, KCl 17.7 mM, panel A de la figura 45), se produce una considerable potenciación de la entrada de calcio a través de canales de tipo L. Como se muestra en esta figura, el incremento de calcio producto de la potenciación con ( $\pm$ ) BayK 8644 no se vio afectado cuando las células se preincubaron con 8Br-GMPc.



**Figura 46-IV. Modulación del componente resistente a dihidropiridinas de la entrada de calcio por 8Br-GMPc.** El efecto de 8Br-GMPc sobre la entrada de calcio resistente a dihidropiridinas se estudió usando neomicina (A) o  $\omega$ -agatoxina-IVA (B) para bloquear estos canales. Las células cromafines se preincubaron durante 30 minutos con neomicina 0.2 mM, 8Br-GMPc 100  $\mu\text{M}$  o ambos para el panel A; o con  $\omega$ -agatoxina-IVA 1  $\mu\text{M}$ , 8Br-GMPc 100  $\mu\text{M}$  o ambos para el panel B.

Por otro lado, empleando neomicina y  $\omega$ -agatoxina-IVA, se estudió la participación de los canales sensibles a estos compuestos en el efecto modulador de GMPc. La figura 46 muestra que la inhibición del incremento de calcio citosólico inducida por 8Br-GMPc no pudo ser aumentada cuando las células fueron incubadas con el análogo de GMPc y, al mismo tiempo, con neomicina (panel A) y  $\omega$ -agatoxina-IVA (panel B). Estos resultados indican que la acción inhibitoria inducida por GMPc tiene lugar sobre el mismo tipo de canales sensibles a neomicina y a  $\omega$ -agatoxina-IVA: canales insensibles a dihidropiridinas, de tipo P/Q.

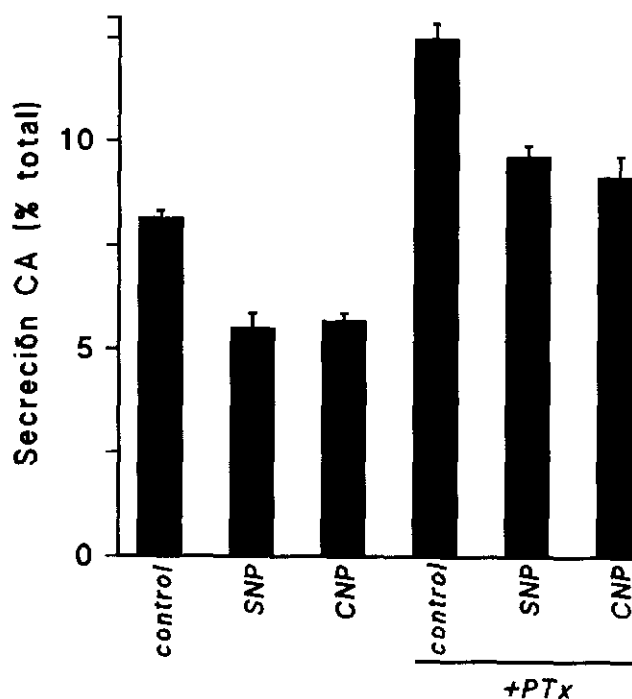
La participación de la proteína quinasa dependiente de GMPc en la modulación de canales de calcio queda clara a la vista de los resultados de la figura 47. De forma similar a lo observado cuando la actividad de PKG se midió en preparaciones semipurificadas de la enzima procedentes de células cromafines, la inhibición del incremento de calcio citosólico que se observó con 8Br-GMPc se revirtió cuando en el periodo de preincubación se añadió a las células el inhibidor de proteínas quinasas A y G, H-8 (1  $\mu$ M). Por el contrario, el inhibidor específico de PKA, H-89 (100 nM), no consiguió revertir el efecto inhibitorio de 8Br-GMPc. Además, este efecto es específico de nucleótidos cíclicos de guanosina, y, por tanto, muy presumiblemente mediado por activación de PKG, puesto que se pudo observar con otro análogo permeable de GMPc, el dibutilil-GMPc (db-GMPc), pero no se observó con el derivado de adenosina, dibutilil-AMPc (db-AMPc).



**Figura 47-IV. Efecto de los inhibidores de quinasas H-8 y H-89 sobre la inhibición por 8Br-GMPc del incremento de calcio estimulado por acetilcolina.** Las células se preincubaron durante 30 minutos con 8Br-GMPc 100  $\mu$ M en presencia de H-8 1  $\mu$ M, H-89 100 nM o en ausencia de cualquiera de estos inhibidores, y, a continuación, el incremento de calcio estimulado por acetilcolina 50  $\mu$ M se midió según se describe en la sección de Métodos. La figura también muestra el efecto de los derivados dibutilil de AMPc y GMPc sobre el incremento de calcio estimulado por Ach 50  $\mu$ M.

Se ha descrito en algunos tejidos la participación de proteínas G en la modulación de canales de cationes vía proteína quinasa dependiente de GMPc (Meriney *et al.*, 1994). Para comprobar una posible participación de proteínas G en la modulación de la función secretora por GMPc en el modelo experimental de las células cromafines bovinas en cultivo, las células se preincubaron durante 24 horas con toxina pertúsica de

*Bordetella pertussis* (PTx) 150 ng/ml. La incubación con toxina pertúsica desacopla irreversiblemente las proteínas G de sus sistemas efectores mediante una ADP-ribosilación de subunidades  $G\alpha_o$  y  $G\alpha_i$  (Bokoch *et al.*, 1993). En este modelo experimental, de acuerdo a la bibliografía, es bien conocido la existencia de una modulación negativa de la respuesta secretora de carácter autocrino por los propios productos de secreción, principalmente ATP y péptidos opiáceos. Esta modulación negativa se produce a través de autorreceptores acoplados a proteínas G que transducen la señal inhibitoria a canales de  $Ca^{2+}$  voltaje-dependientes (Doupnik y Pun, 1994; Currie y Fox, 1996; Albillos *et al.*, 1996a). Según se muestra en la figura 48, en las condiciones experimentales en las que se llevó a cabo este trabajo experimental existe una modulación negativa de la exocitosis a través de proteínas G como demuestra el hecho de que exista potenciación de la secreción en células preincubadas durante 24 horas con PTx. El desacoplamiento de esta ruta inhibitoria produce una potenciación de la secreción de catecolaminas mediante reversión de la autoinhibición producida por la acumulación de nucleótidos y opiáceos en el medio extracelular durante el cultivo. Sin embargo, el mecanismo inhibitorio basado en el GMPC intracelular parece ser independiente de la modulación mediada por proteínas G como sugiere el resultado de que la inhibición por SNP y CNP se observó en células preincubadas con PTx.



**Figura 48-IV.** Efecto de un pretratamiento de las células con toxina pertúsica sobre la inhibición por SNP y CNP de la secreción de catecolaminas estimulada por acetilcolina. Las células en cultivo se trataron durante 24 horas con toxina pertúsica (PTx) 150 ng/ml. Después del pretratamiento, las células se preincubaron durante 45 minutos con SNP 100  $\mu$ M, CNP 100 nM o control y, a continuación, la secreción de catecolaminas estimulada por acetilcolina 50  $\mu$ M se determinó según se describe en la sección de Métodos.

Aunque otros posibles mecanismos de acción que implicasen, por ejemplo, la propia maquinaria secretora, no son descartables, los resultados experimentales mostrados en éste y en el anterior capítulo apuntan hacia la participación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes en la modulación negativa por GMPc de la función secretora en células cromafines bovinas. Dichos canales podrían pertenecer al tipo insensibles a dihidropiridinas, de tipo P/Q. En este mecanismo, dichos canales, o alguna proteína reguladora asociada a ellos, serían susceptibles de fosforilación por proteína quinasa dependiente de GMPc, de tal manera que la actividad de los canales dependiese de los niveles intracelulares del nucleótido cíclico. La actividad de canales resistentes a dihidropiridinas se regula, en la mayor parte de los casos descritos en la bibliografía, mediante modulación directa a través de proteínas G (Brown y Birnbaumer, 1990; Miller, 1990). Sin embargo, como se muestra en estos resultados, éste no es el caso en células cromafines bovinas. El mecanismo encontrado en células cromafines se parece más al descrito en canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P expresados en oocitos de *Xenopus*, en los cuales la actividad iónica de dichos canales se regula por la ruta AMPc/PKA (Fournier *et al.*, 1993).

#### **Modulación de la respuesta secretora por NO/GMPc: NO endógeno frente a NO exógeno**

En el órgano intacto la liberación de catecolaminas a partir de células cromafines está fisiológicamente gobernada por variaciones en la frecuencia de descarga de los terminales de las neuronas colinérgicas preganglionares que hacen sinapsis con las células cromafines. Esta frecuencia de descarga, que es a su vez gobernada por los núcleos cerebrales que conectan con estas neuronas, determina la concentración extracelular de acetilcolina y otras sustancias cotransmisoras (péptidos, etc.) que inician y modulan, respectivamente, la secreción de catecolaminas (Marley y Prout, 1965).

En condiciones fisiológicas, las células cromafines son estimuladas por bajas concentraciones de acetilcolina que son responsables de una liberación tónica de catecolaminas al torrente sanguíneo. Sólomente en condiciones de stress, los terminales de las neuronas colinérgicas liberan acetilcolina a pleno rendimiento haciendo que este neurotransmisor alcance altas concentraciones en el medio extracelular de las sinapsis de la médula adrenal. Estas reacciones, conocidas como respuesta de "lucha o huida", conducen a un notable incremento de la concentración de catecolaminas en el torrente sanguíneo (Marley y Prout, 1965).

Los experimentos mostrados en los anteriores capítulos de esta sección de resultados fueron realizados con el propósito de investigar el papel del GMPc como modulador de la respuesta secretora. Con este fin se estudió el efecto de activadores de las diferentes isoformas de guanilato ciclasa, de inhibidores de fosfodiesterasa y de análogos de GMPc sobre la secreción de catecolaminas y el calcio citosólico estimulados por Ach 50  $\mu\text{M}$  o KCl 30 mM. Estas concentraciones de secretagogo pueden considerarse condiciones elevadas de estimulación. No obstante, merece la pena estudiar cuál es el

papel del GMPc en condiciones más suaves de estimulación, cuando las células se estimulan, por ejemplo, con acetilcolina 20  $\mu$ M.

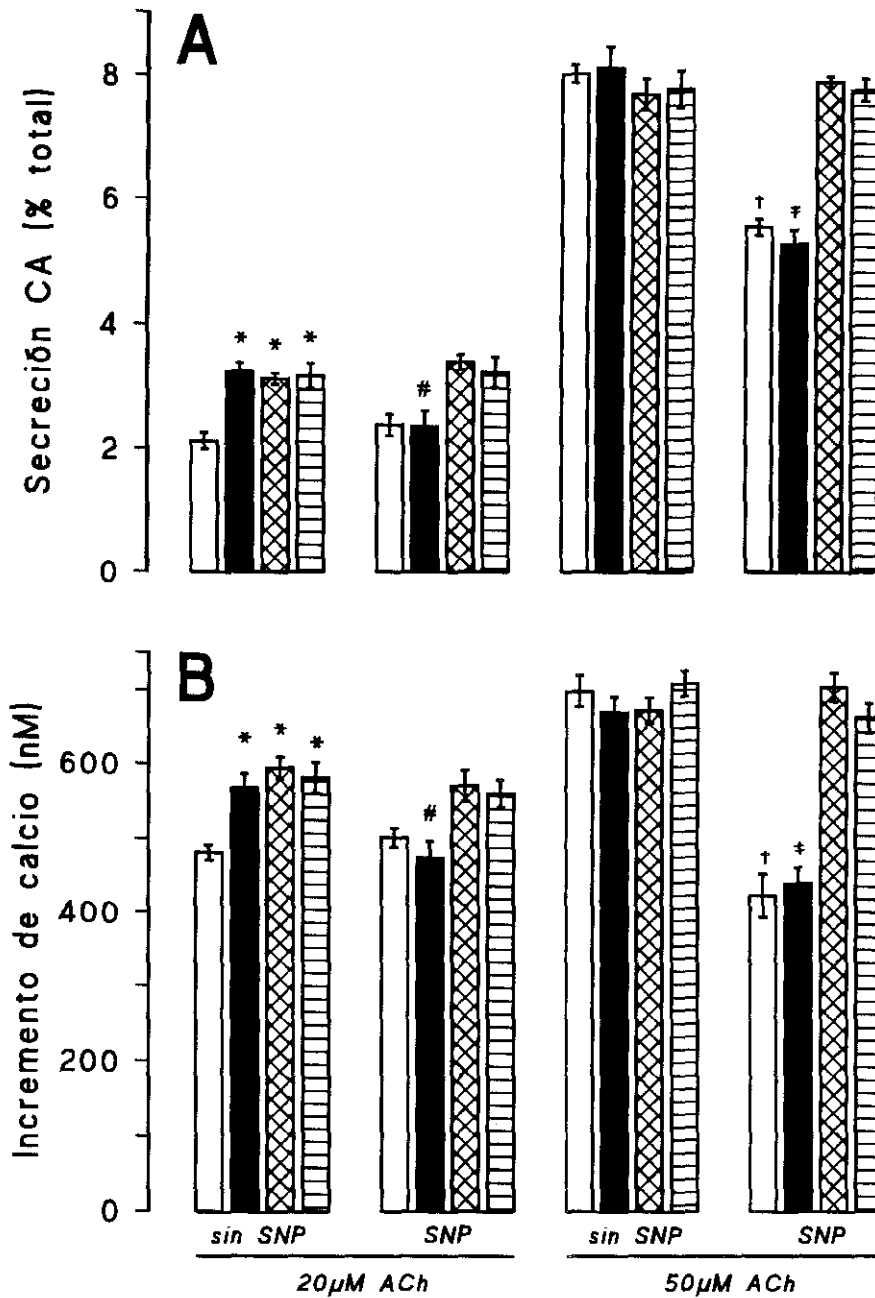
Por otro lado, según se ha descrito en el capítulo 2 de esta sección de resultados, las células cromafines bovinas en cultivo producen tónicamente NO, y, por tanto, acumulan GMPc en condiciones basales. Esta acumulación de GMPc podría también modular la respuesta secretora, por lo que también es interesante investigar qué papel juega el NO endógeno frente al NO exógeno producido a partir de un donador como SNP en la modulación de la secreción inducida por moderadas y altas condiciones de estimulación (Ach 20 y 50  $\mu$ M, respectivamente). La figura 49 ilustra este estudio.

El protocolo de la figura 49 consistió en determinar la secreción de catecolaminas y el incremento de calcio citosólico estimulados por Ach 20 y 50  $\mu$ M en células preincubadas con L-NAME 1 mM (para inhibir la producción endógena de NO), ODQ 10  $\mu$ M (para inhibir la producción de GMPc a partir de guanilato ciclasa soluble), Rp-8pCPT-GMPcS 25  $\mu$ M (para inhibir cualquier efecto mediado por proteína quinasa dependiente de GMPc), o control; en dos condiciones experimentales: en ausencia de NO exógeno (sin preincubación con SNP) y en presencia de NO exógeno producido a partir de SNP.

La figura 49 muestra que, en primer lugar y tal como se ha mostrado en anteriores capítulos de esta sección de resultados, SNP (NO exógeno) produjo una inhibición de la secreción de catecolaminas y del incremento de calcio citosólico estimulados por altas dosis del secretagogo acetilcolina (Ach 50  $\mu$ M) en un efecto mediado por GCS y PKG, de acuerdo a los experimentos realizados en presencia de ODQ y Rp-8pCPT-GMPcS. En ausencia de NO exógeno, cuando las células pueden ser influidas sólo por la producción tónica de NO endógeno, los inhibidores empleados (L-NAME, ODQ y el análogo de GMPc, Rp-8pCPT-GMPcS) no modifican la respuesta secretora control. Este hecho indica que los niveles basales de GMPc, que son una consecuencia de la actividad tónica de NOS y GCS, no ejercen ningún efecto modulador de la respuesta secretora a dosis altas de secretagogo.

Por el contrario, cuando para estimular las células se usaron concentraciones de acetilcolina de 20  $\mu$ M, la preincubación con estos inhibidores desenmascaró una inhibición tónica de la secreción de catecolaminas y el incremento de calcio citosólico mediada por las enzimas NOS, GCS y PKG. El NO exógeno, es decir, la preincubación con el donador de NO, sólo produjo inhibición de la respuesta secretora cuando ésta fue potenciada mediante tratamiento con L-NAME 1 mM. Este efecto inhibitorio de SNP se revirtió también con ODQ 1  $\mu$ M y Rp-8pCPT-GMPcS 25  $\mu$ M.

Este complejo comportamiento significa que la modulación de la respuesta secretora por GMPc existe y es activa en condiciones basales, pero sólo se manifiesta cuando las células responden a bajos o moderados estímulos. Cuando las células son estimuladas por dosis elevadas de secretagogo, no se observa una modulación por NO:GMPc producido endógenamente pero sí por aquel generado a partir de donadores de NO como el nitroprusiato sódico.

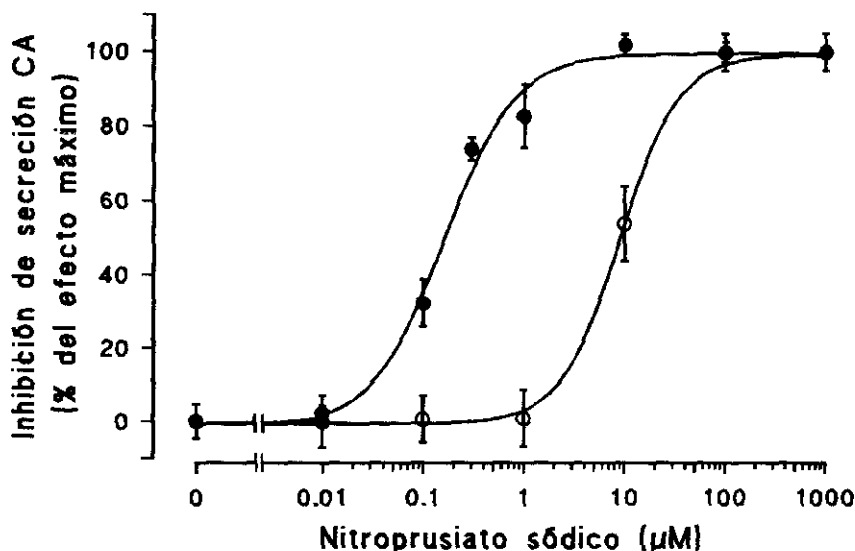


**Figura 49-IV. Papel del NO endógeno frente a NO exógeno sobre la secreción de catecolaminas (A) y el incremento de calcio citosólico (B) en células cromafines bovinas.** Las células se preincubaron durante 60 minutos en ausencia (control, barras abiertas) o en presencia de L-NAME 1 mM (barras cerradas), ODQ 10 μM (barras patrón cruzado) o Rp-8pCPT-GMPcS 25 μM (barras patrón horizontal). Los 45 minutos finales de preincubación con estos compuestos, las células se preincubaron también en ausencia (sin SNP) o presencia (con SNP) de SNP 100 μM. A continuación, la secreción de catecolaminas y el incremento de calcio citosólico estimulados por acetilcolina 20 y 50 μM se determinaron según se describe en la sección Métodos. \* indica incrementos significativos en la secreción de catecolaminas y el incremento de calcio citosólico comparado con el valor control; # indica una inhibición significativa por SNP respecto del valor con L-NAME sin SNP; † indica una inhibición significativa por SNP respecto del control; ‡ indica una inhibición significativa por SNP respecto del valor con L-NAME sin SNP ( $p < 0.01$  en todos los casos).

A la vista de los resultados obtenidos a bajas dosis de Ach resulta claro que se produce un mayor efecto modulador sobre la secreción de catecolaminas que sobre el calcio citosólico. Una preincubación con L-NAME produjo una potenciación de un 55 % de la secreción de catecolaminas, mientras que sólo produjo un aumento (aunque significativo) de un 20 % en el incremento del calcio citosólico. Este hecho podría explicarse por la distinta eficacia en términos de producir secreción de los diferentes canales de  $\text{Ca}^{2+}$  implicados en la exocitosis, según ha sido sugerido por muchos autores (López *et al.*, 1994; Artalejo *et al.*, 1994). Durante la respuesta secretora a bajas dosis de acetilcolina, al interior de la célula entra calcio a través de canales que no están acoplados de manera efectiva a la maquinaria secretora. Cuando se aumenta la dosis de secretagogo se activan canales de  $\text{Ca}^{2+}$  adicionales acoplados más eficazmente al proceso secretor que darían cuenta de un incremento sustancial de la secreción de catecolaminas (note la diferencia entre los valores de  $\text{EC}_{50}$  para secreción y calcio por acetilcolina, resultados, capítulo 1). La reversión de la inhibición tónica mediante preincubación con L-NAME podría ser la consecuencia de la recuperación de la actividad de un número pequeño de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  acoplados de manera efectiva al proceso secretor, los cuales darían cuenta de la potenciación de la secreción que se observó.

Con objeto de investigar si las dosis de NO, y, por tanto, de GMPc, juegan un papel fundamental en el comportamiento diferencial de la modulación a bajas y altas dosis de acetilcolina, se estudió en células preincubadas con L-NAME el efecto dosis-dependiente de SNP tanto sobre la inhibición de la potenciación por L-NAME observada con 20  $\mu\text{M}$  Ach, como sobre la inhibición observada con Ach 50  $\mu\text{M}$ . La preincubación con L-NAME en este experimento evitó cualquier efecto mediado por NO endógeno y, por tanto, los resultados obtenidos sólo podrían explicarse mediante un efecto del NO generado a partir de SNP.

La figura 50 muestra que son necesarias diferentes dosis de SNP para producir un efecto inhibitorio de la respuesta secretora estimulada por Ach 20  $\mu\text{M}$  que cuando se utiliza Ach 50  $\mu\text{M}$  como estímulo. La potenciación por L-NAME observada cuando la secreción se estimuló con Ach 20  $\mu\text{M}$  fue inhibida por SNP con una  $\text{IC}_{50}$  de  $0.16 \pm 0.02$   $\mu\text{M}$ . La secreción inducida por acetilcolina 50  $\mu\text{M}$  se inhibió por el donador de NO con una  $\text{IC}_{50}$  de  $9.2 \pm 0.5$   $\mu\text{M}$ . Esto significa que se necesitan concentraciones de NO casi dos órdenes de magnitud más bajas para producir la inhibición tónica a bajas dosis de secretagogo que para la inhibición por NO exógeno que se observa a 50  $\mu\text{M}$  acetilcolina. Las dosis de NO requeridas para la inhibición tónica bien podrían corresponder con la producción basal de NO (y GMPc) a partir de células cromafines bovinas.



**Figura 50-IV.** Efecto de SNP sobre la secreción de catecolaminas estimulada por dos diferentes concentraciones de acetilcolina. Las células se preincubaron durante 60 minutos con L-NAME 1 mM. Los 45 minutos finales de preincubación, las células se incubaron con variables concentraciones de SNP. A continuación, se estimularon con Ach 20 µM (círculos cerrados) o Ach 50 µM (círculos abiertos). La inhibición de la liberación de catecolaminas se expresa como porcentaje del efecto inhibitorio máximo de SNP sobre la secreción estimulada por acetilcolina (20 µM Ach: 37 % de inhibición; 50 µM Ach: 30 % de inhibición de la secreción de catecolaminas).

Un modelo hipotético que explicaría este comportamiento podría consistir en un tipo de canal de  $\text{Ca}^{2+}$  cuyos parámetros de dependencia de voltaje y de flujo de iones a través del poro estuvieran regulados por GMPc. Este nucleótido cíclico, presumiblemente a través de activación de PKG y fosforilación por PKG del canal o de alguna proteína reguladora asociada a él, produciría un aumento del umbral de activación del canal (de bajas o moderadas a altas despolarizaciones) y una inhibición de la corriente a través del mismo. Un mecanismo de este tipo no sería más que un caso particular de modulación alostérica de la afinidad de una enzima por su sustrato; siendo la enzima, el propio canal, y el sustrato, el voltaje. Así, por ejemplo, un mecanismo de este tipo recuerda la modulación de canales de potasio dependientes de calcio, cuya sensibilidad a voltaje y a iones calcio puede ser modificada mediante fosforilación por PKA (Ewald *et al.*, 1985; Reinhart *et al.*, 1991); o también la modulación de canales de calcio neuronales por neurotransmisores como la noradrenalina, aunque en este caso la modulación no parece implicar una fosforilación del canal sino una participación directa de proteínas G (Bean, 1989). De acuerdo al modelo propuesto, el NO producido endógenamente sería suficiente para activar la ruta inhibitoria hasta un estado en el que el canal, debido al desplazamiento del umbral de activación, sería incapaz de responder a bajas dosis de Ach; pero sería suficientemente activo para permitir una respuesta máxima a altas dosis de secretagogo. Un incremento

mayor de NO/GMPc, como el producido a partir de un generador exógeno como SNP, produciría poco desplazamiento en el umbral de activación, pero sí un considerable efecto sobre la propia actividad del canal, inhibiéndola. Un comportamiento de este tipo podría explicarse con la existencia de diferentes residuos susceptibles de fosforilación por PKG a diferentes estados de activación de la enzima.

Este hipotético modelo, de importantes implicaciones fisiológicas, tal y como se describirá en la discusión general, se complicaría más, si cabe, por el hecho de que el mismo estímulo que induce secreción también produce un incremento en la actividad NOS/GCS; y, aún más, el propio estímulo activa la ruta de degradación del nucleótido cíclico responsable del efecto modulador de la respuesta secretora.

*Estos resultados demuestran que los activadores de las isoformas de guanilato ciclasa, nitroprusiato sódico y péptido natriurético de tipo C, producen una inhibición de la secreción de catecolaminas y del incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  estimulados por acetilcolina 50  $\mu M$  o KCl 30 mM en células cromafines bovinas. Este efecto inhibitorio es dependiente de la dosis empleada de SNP y CNP y requirió preincubaciones con estos compuestos de 30-45 minutos.*

*Ambos compuestos producen inhibición tanto de la secreción de adrenalina como de la noradrenalina, sugiriendo este hecho que los elementos responsables de la modulación están presentes en células adrenérgicas y noradrenérgicas.*

*Existe una buena correlación entre las dosis de SNP y CNP necesarias para producir inhibición de la respuesta secretora y aquellas que producen incrementos en los niveles de GMPc intracelular. Este hecho, junto con la reversión de los efectos inhibitorios del SNP por el inhibidor de GCS, ODQ, y los de SNP y CNP por el inhibidor de PKG, Rp-8pCPT-GMPcS, sugieren que el GMPc a través de PKG es el responsable de la modulación observada.*

*Zaprinast, un inhibidor de la fosfodiesterasa específica de GMPc (tipo V), incrementa los niveles intracelulares de GMPc y es capaz de inhibir la secreción de catecolaminas y el incremento de calcio citosólico. Este resultado confirma la participación del GMPc en la modulación de la respuesta secretora de células cromafines bovinas.*

*El mecanismo de acción del GMPc se investigó empleando el análogo permeable 8Br-GMPc, un activador de la PKG. 8Br-GMPc inhibe la secreción de catecolaminas y el incremento de calcio estimulado por Ach 50  $\mu M$  y KCl 30 mM sin modificar la respuesta de potencial de membrana inducida por estos secretagogos. Estos resultados sugieren que el efecto modulador tiene lugar mediante una inhibición de la entrada de calcio a través de canales de  $Ca^{2+}$  voltaje-dependientes.*

*Utilizando diferentes bloqueantes específicos de los canales de  $Ca^{2+}$  descritos en células cromafines bovinas se estudió el tipo de canal implicado en este efecto. El bloqueo de canales de tipo L con dihidropiridinas produce una inhibición del*

*incremento de calcio que es aumentada cuando las células se coincuban con 8Br-GMPc. Sin embargo, después de tratamiento de las células con neomicina y  $\omega$ -agatoxina-IVA, bloqueantes de canales insensibles a dihidropiridinas, se pierde la capacidad de 8Br-GMPc de inhibir el incremento de calcio. Este resultado sugiere la participación de canales insensibles a dihidropiridinas, de tipo P/Q en el efecto modulador de la respuesta secretora por GMPc.*

*El NO exógeno producido a partir de SNP no modificó la secreción de catecolaminas cuando las células se estimularon con acetilcolina 20  $\mu$ M. Sin embargo, el NO producido endógenamente ejerce una inhibición tónica de la secreción en respuesta a dosis bajas de acetilcolina, como se pone de manifiesto cuando las células se preincuban con L-NAME, ODQ y Rp-8pCPT-GMPcS. Diferentes dosis de NO son requeridas para inhibir la secreción estimulada por bajas y altas dosis de secretagogo. Este comportamiento diferencial sugiere que la dosis de NO/GMPc determina el modo en que el efecto inhibitor por esta ruta de 2° mensajeros tiene lugar.*

## **V. DISCUSIÓN GENERAL**



### NOS y GCS en la médula adrenal

La enzima guanilato ciclasa, responsable de la síntesis enzimática de GMPc, se describió por primera vez en 1969 (Hardman y Sutherland, 1969; Ishikawa *et al.*, 1969; White y Aurbach, 1969). Esta enzima, que resultó ser una entidad proteica diferente a la adenilato ciclasa, fue encontrada tanto en fracciones solubles como en particuladas de una amplia serie de tejidos (Kimura y Murad, 1974). En trabajos posteriores, durante la década de los 70, muchos investigadores describieron que determinadas hormonas podían elevar los niveles de GMPc en células intactas, pero no en preparaciones de células rotas (Goldberg y Haddox, 1977). Este resultado sugería que algún tipo de mensajero químico difusible se requería para la activación de la enzima. Aunque la sensibilidad de la guanilato ciclasa soluble a óxido nítrico se conoce desde hace 20 años, la significación biológica de este resultado no fue valorada hasta el descubrimiento en los años 80 y los actuales 90 del papel del NO como mensajero biológico en multitud de procesos fisiológicos.

Esta sucesión cronológica, consistente en el descubrimiento previo de la guanilato ciclasa soluble y después del papel del NO y de las enzimas NOS en la activación de la síntesis de GMPc, ha sido una constante en la caracterización de esta ruta de 2° mensajeros en los diferentes tejidos, incluida la médula adrenal.

Así, en la médula adrenal, el primer trabajo de investigación en este campo fue la descripción de las características bioquímicas de la actividad enzimática guanilato ciclasa en preparaciones de médula adrenal bovina (Aunis *et al.*, 1978). En esta caracterización, la actividad guanilato ciclasa fue detectada en las fracciones soluble y particulada de extractos adrenomedulares. El diferente comportamiento de las actividades enzimáticas de GC procedentes de la fracción soluble y de la fracción particulada frente a fosfolípidos como lisolecitina o Triton X-100 permitió a los autores de este trabajo sugerir que ambas actividades podrían corresponder con diferentes entidades proteicas.

Un año después, otro grupo de investigación describió que suspensiones de células cromafines obtenidas a partir de glándulas adrenales bovinas respondían a secretagogos con un incremento en los niveles de GMPc intracelular (Schneider *et al.*, 1979). Esta respuesta de GMPc se obtuvo cuando las suspensiones celulares se estimularon con acetilcolina y fue mimetizada por muscarina pero no por nicotina, sugiriendo la participación de receptores muscarínicos en este efecto (Lemaire *et al.*, 1981; Derome *et al.*, 1981). Aunque la conclusión de estos trabajos difiere de la que se puede extraer de los resultados del presente trabajo de investigación en relación al tipo de receptor colinérgico implicado, según se discutirá posteriormente, estos autores fueron los primeros en describir la activación por acetilcolina de la síntesis de GMPc en células cromafines bovinas.

Por otro lado, Dohi *et al.* describieron en glándulas adrenales de perro considerables incrementos de la producción de GMPc inducidos por compuestos como azida sódica, hidroxilamina, nitrito sódico e incluso óxido nítrico gas (Dohi *et al.*, 1983). Aunque el

significado fisiológico del óxido nítrico estaba aún por descubrir, todos estos trabajos ponían de manifiesto mediante aproximaciones bioquímicas la presencia en la glándula adrenal de una actividad enzimática guanilato ciclasa soluble sensible a óxido nítrico.

Cuando se empezó a conocer la función del NO y de la enzima NOS, y la conexión fisiológica entre el óxido nítrico y la guanilato ciclasa soluble se hizo patente, varios trabajos se publicaron mostrando la localización de NOS y su acoplamiento funcional con la GCS en los diferentes tejidos. La médula adrenal no fue una excepción.

En 1989, Palacios *et al.* describieron tanto la síntesis de NO a partir de L-arginina como la estimulación de la guanilato ciclasa soluble por NO en preparaciones citosólicas obtenidas a partir de glándulas adrenales bovinas (Palacios *et al.*, 1989). Este trabajo introdujo la idea de que los iones  $\text{Ca}^{2+}$  podían jugar un papel dual en la regulación de los niveles de GMPc. El mecanismo a través del cual el  $\text{Ca}^{2+}$  ejerce este papel dual se ha estudiado en detalle en el presente trabajo de investigación y se discutirá posteriormente.

Otros trabajos investigaron la localización exacta de la enzima NOS en diversos tejidos neurales de rata empleando, o bien anticuerpos específicos frente a la enzima NOS, o bien la tinción NADPH diaforasa, una tinción que correlaciona en la mayoría de los tejidos con la enzima NOS. Bredt *et al.* encontraron inmunorreactividad específica de NOS en la médula adrenal. De acuerdo al patrón de marcaje encontrado, estos autores propusieron que la enzima NOS estaba presente en la inervación sináptica de la células cromafines (Bredt *et al.*, 1990). Combinando marcaje de NADPH diaforasa e inmunohistoquímico de NOS, Dawson *et al.* confirmaron este patrón y propusieron que la enzima estaba presente en células ganglionares de la médula adrenal (Dawson *et al.*, 1991). Afework *et al.* también encontraron inmunorreactividad de NOS en las fibras que inervan las células cromafines (Afework *et al.*, 1992). Más recientemente, Marley *et al.* detectaron nervios NOS-positivos en la médula adrenal bovina (Marley *et al.*, 1995).

Esta serie de trabajos tienen en común el hecho de que la enzima NOS fue encontrada en fibras nerviosas, pero no en células cromafines, dentro de la médula adrenal. Sin embargo, otros investigadores fueron capaces de detectar la enzima NOS en células cromafines.

Así, Dun *et al.* describen inmunorreactividad específica de NOS no sólo en fibras nerviosas sino también en las células cromafines de la médula adrenal de rata (Dun *et al.*, 1993). Por otro lado, Oset-Gasque *et al.* detectaron tanto marcaje de NADPH diaforasa en células cromafines bovinas como actividad enzimática de NOS en extractos obtenidos a partir de estas células (Oset-Gasque *et al.*, 1994). No todos los trabajos se circunscriben al modelo bovino o al de la rata, en la médula adrenal humana también se ha descrito NOS (Heym *et al.*, 1994). La NOS adrenal humana, según describen estos autores, está presente en neuronas y también en las células cromafines.

A partir de estos resultados, es fácil deducir que la presencia de NOS en células cromafines es una materia de debate. Los resultados presentados en este trabajo de

investigación demuestran inequívocamente que las células cromafines poseen la enzima NOS. A esta conclusión se ha llegado mediante 3 diferentes aproximaciones experimentales.

Aunque algunos trabajos previos han sido capaces de demostrar la existencia de una actividad enzimática que convierte L-arginina en L-citrulina con características de NOS (Palacios *et al.*, 1989; Moro *et al.*, 1993; Oset-Gasque *et al.*, 1994), la mayor parte de estos estudios se llevaron a cabo usando como material biológico extractos obtenidos a partir de médula adrenal. Estos experimentos no permiten conocer la localización exacta de la enzima en el tejido, especialmente teniendo en cuenta que las células cromafines, aunque mayoritarias, no son el único tipo celular de la médula adrenal. Debido a que en el presente trabajo de investigación, se determinó la actividad NOS en células cromafines bovinas intactas, estos resultados demuestran que estas células poseen la actividad enzimática.

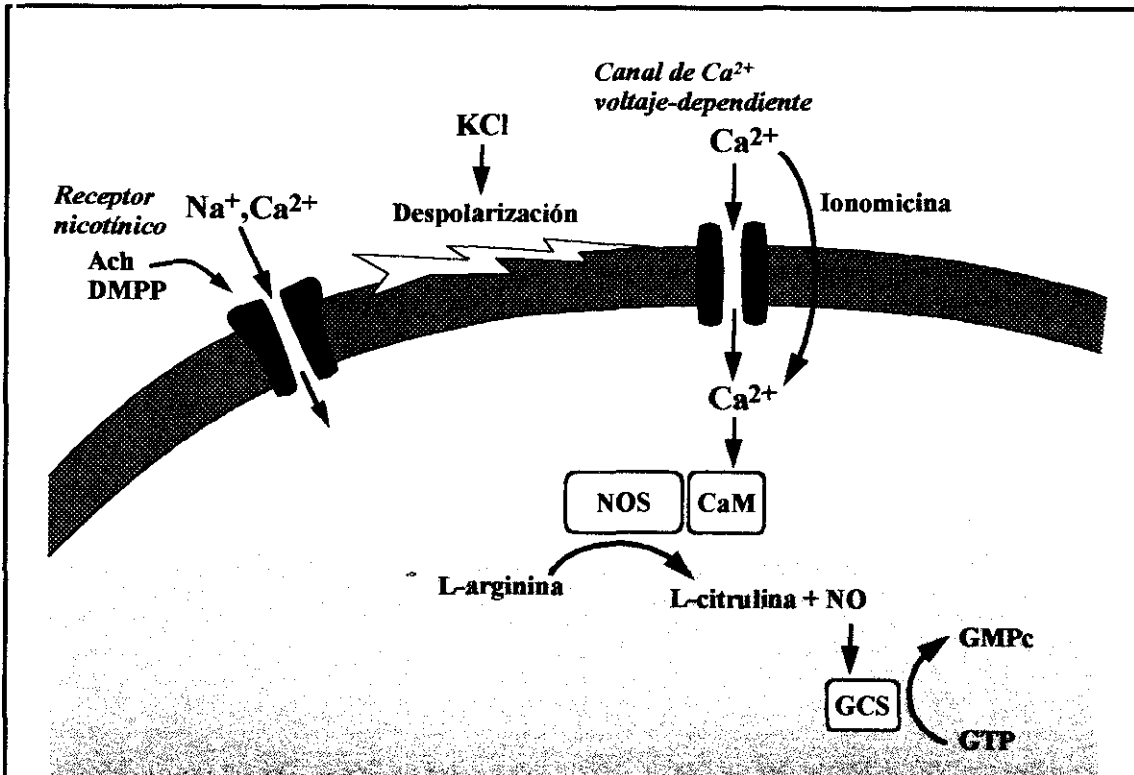
La enzima NOS fue además detectada a nivel de proteína y a nivel de RNA mensajero empleando técnicas inmunocitoquímicas y de detección de RNA específico, respectivamente. Estos experimentos no sólo ofrecen información acerca de la localización de la enzima sino que permiten conocer con exactitud la isoforma presente en las células. Mediante ambas aproximaciones experimentales, la isoforma detectada en células cromafines fue la NOS-I (forma neuronal). Estos resultados coinciden con las caracterizaciones llevadas a cabo previamente empleando anticuerpos específicos anti-NOS-I. Aunque esta isoforma ha sido detectada en algunos tejidos no neuronales, por ejemplo, músculo esquelético, los resultados del presente trabajo de investigación tienen sentido en tanto en cuanto las células cromafines son células de origen neural.

Obviando las dificultades que muchas veces presentan los estudios inmunohistoquímicos en cuanto a, por ejemplo, especificidad de los anticuerpos empleados, sensibilidad de los métodos de detección, etc.; el hecho de que algunos investigadores no fueran capaces de detectar la enzima NOS en células cromafines, pero sí en su inervación, indica quizás que las neuronas presentan una alta expresión de la proteína mientras que en las células cromafines la expresión pudiera mantenerse a un nivel más bajo.

De acuerdo a la bibliografía consultada, el presente trabajo de investigación es el primero en el que se describe la presencia de GCS en células cromafines a nivel de proteína mediante el empleo de técnicas inmunocitoquímicas. Estos estudios demuestran la presencia en células cromafines de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de GCS sensible a NO. Esta enzima, para ser activa, necesita estar como un heterodímero formado por una subunidad  $\alpha$  y otra  $\beta$ . Estos resultados, por tanto, demuestran la presencia de una enzima activa que podría dar cuenta de los incrementos en los niveles de GMPc intracelular inducidos por donadores de NO (descritos en el presente trabajo y en otros: Dohi *et al.*, 1983; Palacios *et al.*, 1989; Moro *et al.*, 1993; Oset-Gasque *et al.*, 1994).

### Regulación de la señal NO:GMPc en células cromafines bovinas

La activación de la señal NO:GMPc en células cromafines se estudió en detalle mediante medidas de la actividad NOS y determinaciones de GMPc, y responde perfectamente a las características de activación de una enzima constitutiva como NOS-I: regulación de la actividad por  $\text{Ca}^{2+}$  a través de calmodulina.



**Esquema 1.- Mecanismo de activación de la ruta NO:GMPc por secretagogos en células cromafines bovinas.** La respuesta secretora de las células cromafines se inicia cuando el neurotransmisor acetilcolina procedente de las terminales preganglionares alcanza la superficie de la célula cromafin. La acetilcolina interacciona con receptores colinérgicos nicotínicos disparando la entrada de cationes  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula a través del receptor-canal. Esta entrada masiva de iones a través del poro despolariza la membrana permitiendo la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes. El notable incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que se produce por activación de estos canales es suficiente para activar la calmodulina (CaM), que, a su vez, activa la NOS asociada a ella. El óxido nítrico producido activa la GCS y el resultado final es un incremento en los niveles de GMPc intracelular. Los otros secretagogos empleados producen una señal de NO:GMPc mediante activación de alguna de las etapas de este proceso. Así, el agonista nicotínico DMPP, como la acetilcolina, es capaz de disparar el proceso desde su fase inicial, la interacción con el receptor-canal nicotínico. Cloruro potásico (KCl) actúa mediante despolarización directa de la membrana. Finalmente, el ionóforo ionomicina introduce iones calcio al interior de la célula en un proceso totalmente independiente de receptores o canales iónicos.

La acetilcolina, un secretagogo que eleva considerablemente la  $[Ca^{2+}]_i$ , produce un aumento de la actividad NOS y de los niveles de GMPc intracelular. Empleando acetilcolina, cloruro potásico, ionomicina y el agonista nicotínico, DMPP, este trabajo de investigación demuestra la perfecta correlación entre el calcio intracelular y los niveles de GMPc. Condiciones experimentales que no producen un aumento sustancial en la  $[Ca^{2+}]_i$ , como acetilcolina en ausencia de calcio en el medio extracelular, el agonista muscarínico, muscarina, o veratridina; fracasan en incrementar de manera significativa los niveles de GMPc intracelular.

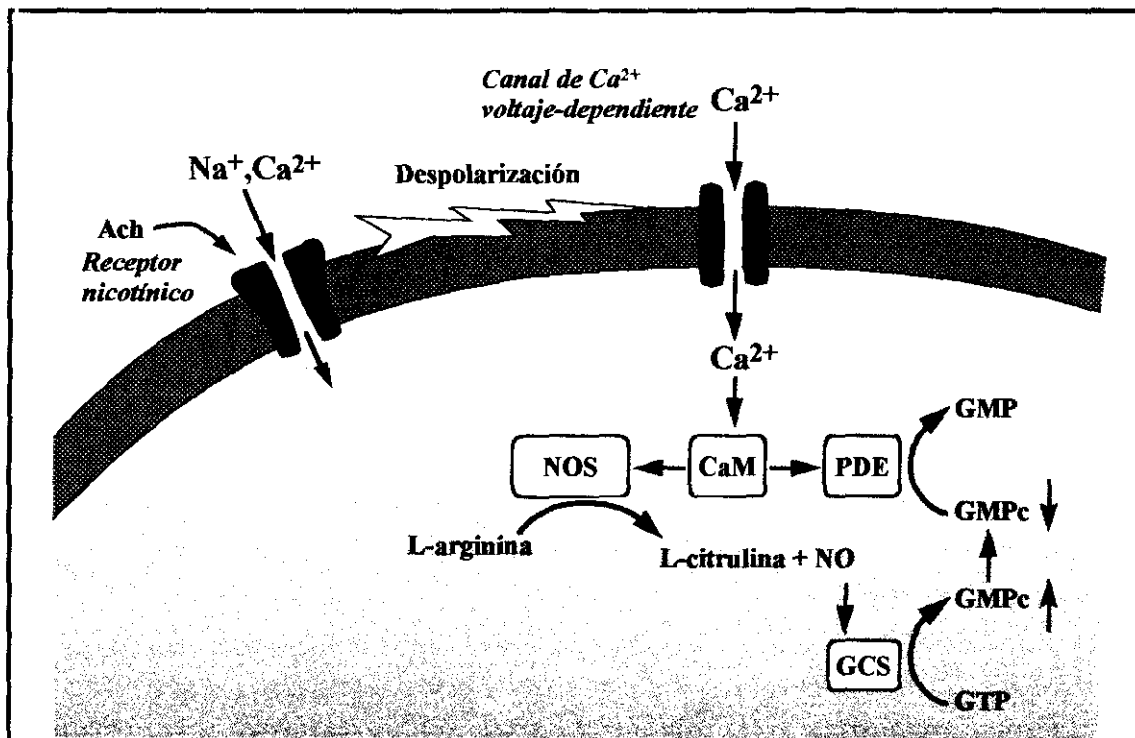
El modelo presentado en el esquema 1 muestra el mecanismo de activación de la vía NO:GMPc en células cromafines bovinas por compuestos secretagogos o afines.

Derome *et al.* y Lemaire *et al.* describieron en 1979-1981 similares resultados experimentales con la diferencia de que estos autores atribuyeron el incremento de GMPc inducido por acetilcolina a la activación de receptores muscarínicos y no nicotínicos (Derome *et al.*, 1981; Lemaire *et al.*, 1981). La razón para la discrepancia existente entre estos resultados y los presentados en este trabajo de investigación se desconoce, aunque podría explicarse por una sustitución de receptores muscarínicos por nicotínicos durante el tiempo en cultivo, según se ha descrito (Nakaki *et al.*, 1988).

El aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  estimulado por acetilcolina induce un incremento transitorio de las actividades NOS y GCS en lo que sería el modo fisiológico de activación de la señal NO:GMPc. Sin embargo, el calcio también juega un papel en el mecanismo de inactivación de la ruta de 2° mensajeros. Este hecho se constató mediante la observación de que concentraciones de calcio que activaban la enzima NOS aparentemente inhibían la guanilato ciclasa soluble en cerebro (Olson *et al.*, 1976; Knowles *et al.*, 1989) y también en glándulas adrenales (Palacios *et al.*, 1989). Sin embargo, una inhibición por  $Ca^{2+}$  de la guanilato ciclasa soluble purificada no pudo ser demostrada, por lo que un mecanismo más sutil tenía que ser responsable de la inactivación de la señal. Este mecanismo está basado en la activación por calcio/calmodulina de una fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (tipo I) (Mayer y Böhme, 1989; Mayer *et al.*, 1989, 1990).

Esta actividad, según se ha descrito, presenta la peculiaridad de que es relativamente insensible a IBMX incluso a concentraciones de 1 mM y presenta una pronunciada selectividad para hidrolizar GMPc *versus* AMPc en un rango de concentraciones entre 2 y 10  $\mu$ M, es decir, podría perfectamente ser responsable del efecto observado (Mayer *et al.*, 1992, 1993).

Aunque en el presente trabajo de investigación no se ha caracterizado la isoforma de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos implicada en el mecanismo de inactivación, los resultados obtenidos refuerzan la hipótesis de que los iones calcio, vía calmodulina, son capaces tanto de activar la enzima NOS, como de limitar la respuesta de GMPc mediante la activación de una fosfodiesterasa, según el modelo que se muestra en el esquema 2.



**Esquema 2.-Mecanismos de activación e inactivación de la señal NO:GMPc por acetilcolina en células cromafines bovinas.** Según se muestra en la figura 12 de la sección de Resultados, cuando las células cromafines se estimulan con acetilcolina y se determinan los niveles intracelulares de GMPc, la cinética que se observa es un aumento transitorio de dichos niveles hasta un pico en torno a 2 minutos de incubación con el secretagogo, y después los niveles retornan lentamente al valor basal. El esquema que se muestra ilustra los procesos que desencadenan tanto la activación como la inactivación de la señal de GMPc. Como se ha mostrado en el esquema 1, la acetilcolina, mediante un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , produce activación de calmodulina que, a su vez activa la NOS a sintetizar NO; este NO produce activación de la GCS que finalmente sintetiza el GMPc. Simultáneamente a este sucesión de acontecimientos, la calmodulina también es capaz de activar una fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (PDE) que es la responsable de la inactivación de la señal. El balance entre la capacidad de síntesis de GMPc a partir de GCS y de hidrólisis por parte de la actividad fosfodiesterasa determina las variaciones en el GMPc intracelular que se observan cuando las células se incuban con acetilcolina.

Dentro de un esquema general de comunicación entre neuronas, el NO actúa como mensajero intra- e intercelular principalmente mediante la estimulación de la enzima GCS tanto en células productoras de NO como en células adyacentes. Teniendo en cuenta el modelo presentado en el esquema 2, que la señal sea o no autocrina, es decir, que las células productoras de NO respondan o no a esta señal con una acumulación de GMPc, depende en gran medida de la expresión de la isoforma de fosfodiesterasa activable por  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . Una expresión elevada de esta fosfodiesterasa sería capaz de abolir, o al menos limitar, como ocurre en células cromafines bovinas, la señal de GMPc cuando ésta se induce mediante activación en la propia célula de la enzima NOS vía  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . Cuando la señal de GMPc se induce de manera independiente de calcio, es decir, mediante NO exógeno o por activación de receptores natriuréticos, el mecanismo de inactivación no es activo y la célula acumula grandes cantidades del nucleótido cíclico.

### **Péptidos natriuréticos y sus receptores en la médula adrenal**

Numerosos estudios han demostrado claramente que las células cromafines producen, almacenan y liberan los tres miembros de la familia de péptidos natriuréticos: ANP, BNP y CNP (Ong *et al.*, 1987; Pruss y Zamir, 1987; Okazaki *et al.*, 1989; Nguyen *et al.*, 1990; Babinski *et al.*, 1992). Sin embargo, no está tan claro el tipo de receptor/es que responden a estos ligandos presentes en las células cromafines.

Empleando [ $^{125}\text{I}$ ]-ANP como ligando en estudios farmacológicos, Niina *et al.* demostraron, primero, que las células cromafines bovinas poseen sitios de unión específicos para este ligando; y segundo, que la unión del ligando radiactivo a estos sitios es desplazada de manera efectiva por ANP pero no por CNP o C-ANF, un ligando específico del receptor que carece de actividad guanilato ciclasa (ANPC-receptor) (Niina *et al.*, 1996). Sin embargo, según se describe en este mismo trabajo, CNP produjo un considerable mayor efecto que ANP sobre los niveles intracelulares de GMPc. Sin dar ninguna explicación a esta aparente contradicción, estos autores concluyeron que las células poseen receptores de tipo GC-A (con actividad guanilato ciclasa que unen preferentemente ANP y BNP).

En estudios independientes, Babinski *et al.* también describieron considerables incrementos en el GMPc intracelular por CNP pero no por ANP. Mediante estos experimentos de determinación de GMPc y una serie de experimentos funcionales (que serán discutidos posteriormente), estos autores concluyeron que las células cromafines poseen dos tipos de receptores para péptidos natriuréticos, receptores GC-B, con actividad guanilato ciclasa que preferentemente unen CNP y responsables del efecto sobre GMPc; y receptores del tipo ANPC-receptor, no ligados a guanilato ciclasa y responsables, según estos autores, de un efecto modulador de la respuesta secretora (Babinski *et al.*, 1995) Sin embargo, este último tipo de receptor, propuesto como sitio de unión del ANP circulante para su posterior internalización y degradación ("clearance receptor"), no ha sido detectado en células cromafines de la médula adrenal de primate mediante técnicas de hibridación *in situ* (Wilcox *et al.*, 1991).

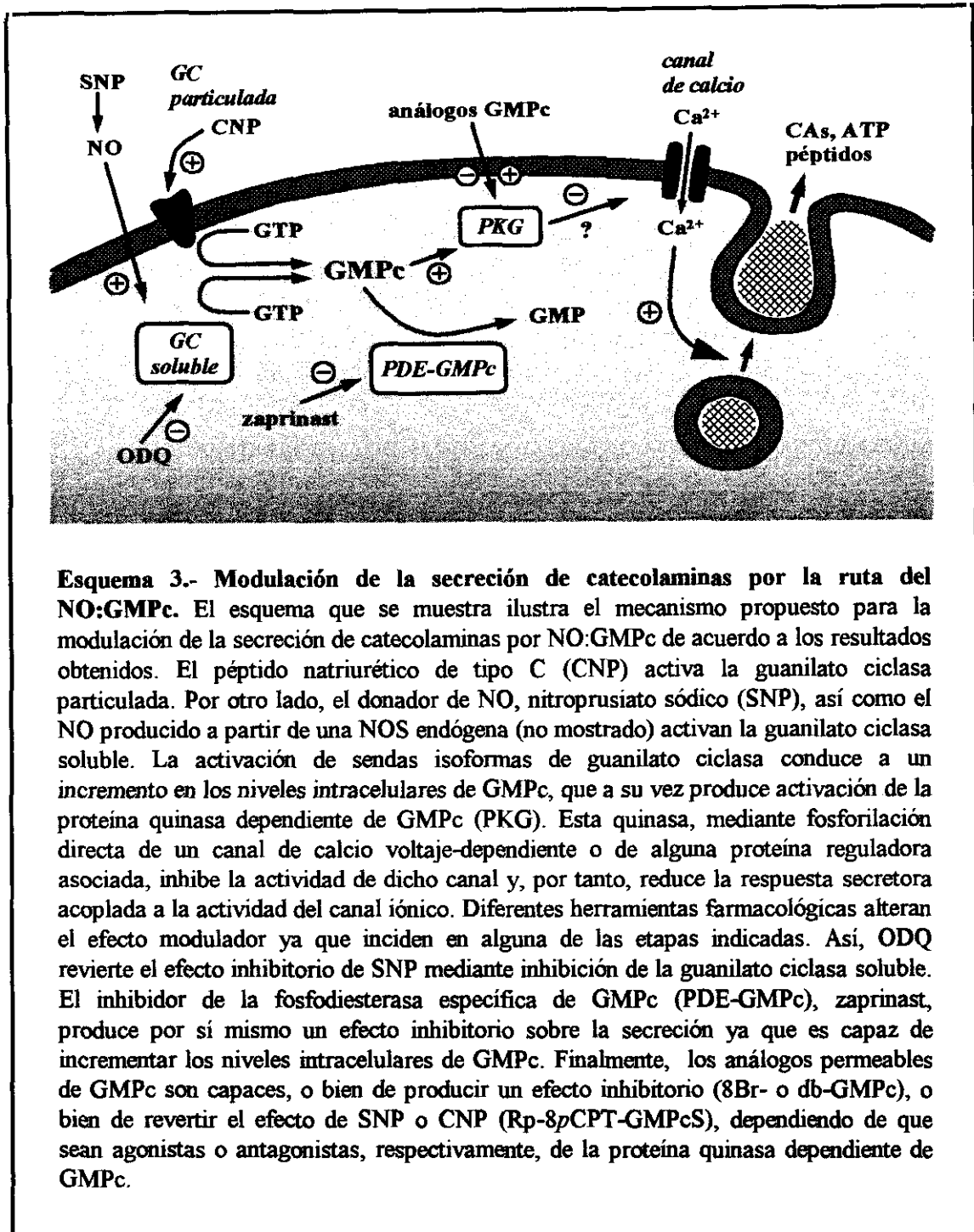
A partir de todos estos resultados experimentales se deduce que no existe un consenso en cuanto al tipo de receptor/es para péptidos natriuréticos presentes en las células cromafines. El propósito del presente trabajo de investigación está lejos de resolver esta incertidumbre que probablemente persistirá hasta que se lleve a cabo una caracterización profunda mediante técnicas de biología molecular. En este trabajo, el péptido natriurético de tipo C se ha empleado con el fin de incrementar los niveles de GMPc mediante un mecanismo independiente de la guanilato ciclasa soluble, y este hecho, de acuerdo con la bibliografía consultada, está ampliamente probado y aceptado. No obstante, el hecho de que CNP sea un producto de secreción de las propias células cromafines y, según se ha descrito, también de células endoteliales (Suga *et al.*, 1993; Yamada y Yokota, 1996), añade sentido fisiológico a estos estudios en tanto en cuanto estos experimentos simulan situaciones que pueden tener lugar en el órgano intacto.

### **Modulación de la respuesta secretora por NO:GMPc**

Las células cromafines poseen receptores para una amplia variedad de compuestos (Burgoyne, 1991). Este hecho las convierte, potencialmente, en células capaces de responder fisiológicamente a gran cantidad de estímulos. Algunos de estos agentes producen una respuesta secretora en ausencia del secretagogo clásico acetilcolina, por ejemplo, ATP o histamina. Otros, en cambio, a través de rutas de 2° mensajeros más o menos complejas, modulan la exocitosis estimulada por secretagogos.

Aunque diferentes autores han estudiado una posible modulación de la respuesta secretora por GMPc en células cromafines, la bibliografía consultada sólo aporta resultados parciales o contradictorios, de tal manera que no existe un estudio detallado del papel del GMPc como modulador de la respuesta secretora. El presente trabajo de investigación se planteó como objetivo principal la caracterización de esta posible modulación de la respuesta secretora.

Las observación más importante del estudio que se presenta aquí es la existencia de una modulación negativa de la respuesta secretora mediada tanto por el GMPc producido por activación de las isoformas de guanilato ciclasa, soluble y particulada, presentes en las células cromafines, como mediante el empleo de análogos permeables del nucleótido cíclico como 8Br- o dibutilil-GMPc. Este efecto inhibitorio, que se desarrolla lentamente en el tiempo, se acompaña de una reducción del incremento de calcio intracelular estimulado por secretagogos. Una activación de la proteína quinasa dependiente de GMPc parece ser el mecanismo a través del cual tiene lugar el efecto inhibitorio. A estas conclusiones se ha llegado mediante el empleo de diferentes herramientas farmacológicas tal y como se muestra en el esquema 3. Algunos de estos resultados experimentales confirman observaciones realizadas en trabajos previos; otros, sin embargo, son aparentemente contradictorios, y en otros casos, se estudiaron aspectos no tratados con anterioridad.



Los primeros estudios sobre el posible efecto del GMPc sobre la secreción de catecolaminas fueron realizados por Derome *et al.* en 1981. Estos autores, empleando el análogo de GMPc, dibutiril-GMPc, demostraron una inhibición de la secreción de catecolaminas estimulada por nicotina en células cromafines bovinas (Derome *et al.*, 1981). Estos resultados experimentales son confirmados con los que se presentan en

este trabajo de investigación. Sin embargo, sus autores no estudiaron con mayor profundidad el mecanismo a través del cual tenía lugar este efecto inhibitorio.

En 1990, O'Sullivan y Burgoyne estudiaron el efecto de SNP, ANP y el análogo de GMPc, 8Br-GMPc, sobre la respuesta secretora de células cromafines. Estos autores describen un efecto dual de estos compuestos. Cuando usaron bajas dosis de nicotina como secretagogo, el GMPc produjo un efecto activador sobre la secreción; mientras que cuando estimularon las células con concentraciones altas de nicotina observaron un pequeño efecto inhibitorio (O'Sullivan y Burgoyne, 1990). Estos investigadores no encontraron ningún efecto sobre la secreción basal ni sobre el calcio basal o estimulado por secretagogos. Por otro lado, Oset-Gasque *et al.*, empleando NO gas, describieron una estimulación de la secreción basal y también un efecto dual sobre la secreción inducida por nicotina, estimulador a bajas e inhibitorio a altas dosis de secretagogo (Oset-Gasque *et al.*, 1994).

La aparente contradicción de estos resultados con los presentados en este trabajo puede explicarse por las diferencias en las condiciones experimentales seleccionadas. Ambos grupos de investigación añadieron el estímulo secretagogo, nicotina, simultáneamente con el análogo de GMPc, SNP, ANP o NO gas y midieron la respuesta secretora que tuvo lugar durante 10 minutos de estimulación. Teniendo en cuenta que la respuesta secretora mayoritaria ocurre en los primeros minutos de estimulación con nicotina o acetilcolina, y que se necesita un tiempo para que se produzca una señal significativa de GMPc y posterior activación de PKG; es poco probable que los efectos que estos grupos de investigación encontraron se puedan atribuir al GMPc. Por otro lado, aunque es una práctica relativamente común en algunos laboratorios dedicados al estudio del papel biológico del NO, el empleo de disoluciones gaseadas con NO para incubar las células es un asunto delicado. En primer lugar, resulta difícil controlar de manera efectiva las concentraciones de NO presentes en las disoluciones; y, en segundo lugar, la alta reactividad de la molécula acorta considerablemente su vida media en solución y además la hace susceptible de interaccionar con, por ejemplo, grupos sulfhidrilo de proteínas modificando de manera inespecífica su actividad biológica. Teniendo en cuenta estos factores, no es extraño que la incubación aguda de las células con disoluciones gaseadas con NO produzca un efecto estimulador sobre la secreción basal de catecolaminas como describieron Oset-Gasque *et al.*

En 1995, Babinski *et al.* describieron un efecto inhibitorio por CNP de la secreción de catecolaminas estimulada por nicotina pero no por cloruro potásico. Estos autores, basándose en las concentraciones de CNP necesarias para producir este efecto (más bajas que las requeridas para incrementar los niveles de GMPc), concluyeron que estaba mediado por el receptor de tipo ANPC-receptor, no acoplado a acumulación de GMPc intracelular ("clearance receptor") (Babinski *et al.*, 1995). Los resultados presentados aquí, en contradicción con los realizados por Babinski *et al.*, muestran que CNP no produce ningún efecto inhibitorio a concentraciones más bajas que aquellas capaces de incrementar los niveles de GMPc intracelular. Resulta difícil encontrar

alguna explicación que permita reconciliar ambos resultados, especialmente teniendo en cuenta que en la médula adrenal bovina o de primate no se ha detectado la presencia de receptores de tipo ANPC-receptor (Wilcox *et al.*, 1991; Niina *et al.*, 1996).

Otra serie de investigadores estudiaron la contribución de la ruta del NO:GMPc en la respuesta secretora de glándulas adrenales perfundidas. Moro *et al.* investigaron el efecto de una perfusión de glándulas adrenales bovinas con 1 mM L-NAME sobre la secreción de catecolaminas en condiciones basal o estimulada con agonistas nicotínicos, muscarínicos, cloruro potásico, ionóforos de calcio o estimulación eléctrica (Moro *et al.*, 1993). Por otro lado, Marley *et al.* investigaron la posible existencia de una modulación de la secreción de catecolaminas inducida por estimulación eléctrica del nervio esplácnico en glándulas perfundidas con SNP, L-arginina e inhibidores de NOS (Marley *et al.*, 1995). Ninguno de los dos grupos de investigación fue capaz de demostrar un efecto modulador de la exocitosis mediado por NO:GMPc. De nuevo, resulta difícil explicar la discrepancia entre estos resultados y los mostrados aquí. Es posible que el modo en que los agentes empleados, generadores de NO o análogos de L-arginina, se hicieron llegar a la médula adrenal, esto es, la perfusión de las glándulas intactas, no permita que cantidades efectivas de estos compuestos alcancen la superficie de las células cromafines. Otras posibles explicaciones pasarían por la existencia, o bien de mecanismos prioritarios de control de la exocitosis distintos a la modulación por NO:GMPc; o bien al funcionamiento de mecanismos compensatorios. Aunque, por definición, trabajar con la glándula entera intacta supone hacerlo en condiciones *quasi* fisiológicas; en ocasiones, debido a la multiplicidad de factores que pueden afectar al fenómeno que se está estudiando, no es posible comparar dichos experimentos con estudios realizados en modelos más simples de células en cultivo.

Con estos precedentes puede parecer, aparentemente, que existe abundante bibliografía contradictoria. Sin embargo, trabajos realizados en tejidos afines a la médula adrenal muestran lo contrario. Así, en células de feocromocitoma adrenal de rata (PC12) se ha descrito que el ANP inhibe la liberación de noradrenalina estimulada por el agonista colinérgico carbacol (Drewett *et al.*, 1988). En estas mismas células, SNP, a través de un mecanismo mediado por GMPc, redujo la entrada de calcio inducida por despolarización (Desolé *et al.*, 1994). Estos autores sugirieron que el NO selectivamente inhibe canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje en células PC12. Recientemente, Simard *et al.* han descrito que una producción tónica de NO/GMPc es responsable de una reducción de la actividad de canales de  $Ca^{2+}$  en células PC12 (Simard *et al.*, 1996). También, en estrecha relación con las células cromafines o las células PC12, compuestos que incrementan el GMPc inhiben la liberación de noradrenalina en nervios simpáticos (Greenberg *et al.*, 1989). Por otro lado, en el hipotálamo de rata, la liberación de noradrenalina estimulada por KCl o angiotensina también se inhibe por ANP y en cortes de cerebro, la liberación de acetilcolina se inhibe por 8Br-GMPc (Nordstrom y Bartfai, 1981; Vatta *et al.*, 1993).

Volviendo a la célula cromafín, el trabajo de Torres *et al.* merece un comentario especial. Estos autores describieron en 1994 la existencia de un mecanismo

autoinhibitorio de la secreción de catecolaminas en células cromafines basado en la ruta L-arginina/óxido nítrico/guanilato ciclasa (Torres *et al.*, 1994). Estos resultados constituyeron el punto de partida de los experimentos presentados en este trabajo de investigación, el cual se planteó como objetivo caracterizar en profundidad el mecanismo a través del cual se producía la inhibición de la exocitosis. Empleando un ingenioso diseño experimental consistente en situar tanto células cromafines como células endoteliales de aorta en sendos filtros que fueron perfundidos con las diferentes soluciones a estudiar su efecto sobre la secreción, estos autores observaron que el proceso secretor no sólo estaba bajo un control autoinhibitorio mediado por la síntesis endógena de NO:GMPc sino que un nivel adicional de inhibición podía obtenerse cuando las células cromafines se perfundieron con medio expuesto a las células endoteliales, las cuales aportan a este medio diversas sustancias, la mayoría de ellas con propiedades vasoactivas, como prostaciclina, endotelina y también NO.

Este tipo de experimentos plantea importantes consideraciones fisiológicas. Si, de acuerdo a estos resultados, tanto el NO endógeno como el exógeno pueden jugar un importante papel en la secreción de catecolaminas, merece la pena reflexionar acerca de las fuentes de NO en el entorno de la médula adrenal. En primer lugar, las propias células cromafines son productoras de NO tanto en condiciones basales como después de incubación con un estímulo secretor. En segundo lugar, en estrecha relación con los resultados de Torres *et al.*, las células endoteliales adrenomedulares producen y liberan un amplia variedad de sustancias, entre ellas NO (Gosink y Forsberg, 1993). Merece la pena destacar que la liberación de NO a partir de células endoteliales adrenomedulares se estimula con productos liberados a partir de las propias células cromafines, por ejemplo, ATP. Finalmente, de acuerdo con la bibliografía, los terminales nerviosas también son una fuente importante de NO (Bredt *et al.*, 1990; Dawson *et al.*, 1991; Afework *et al.*, 1992; Dun *et al.*, 1993; Marley *et al.*, 1995). Estas terminales inervan tanto las células cromafines como los vasos sanguíneos indicando este hecho que el NO puede jugar un doble papel; por un lado, modulador de la respuesta secretora, y por otro, como neurotransmisor que media una respuesta vasodilatadora (Breslow *et al.*, 1993).

Con todos estos datos resulta difícil imaginar cómo funciona *in vivo* el mecanismo de regulación de la respuesta secretora por la ruta del NO:GMPc. No obstante, es posible aventurar el modo en que la médula adrenal puede responder a estímulos secretores de una manera dependiente del NO producido a partir de las posibles fuentes. El NO endógeno, como se muestra en este trabajo, mantiene un tono inhibitorio cuando el estímulo secretor es moderado o pequeño. Sin embargo, este tono inhibitorio desaparece cuando el estímulo es grande, por ejemplo, en una situación de stress. Cuando una fuerte estimulación neural produce la liberación de gran cantidad de acetilcolina en la hendidura sináptica preganglionar-cromafín, el mecanismo autoinhibitorio no es activo y se puede producir una secreción de catecolaminas máxima, no sujeta a regulación. Bajo estas condiciones, el grado de secreción es

controlado por el NO exógeno, es decir, por la estimulación de posibles "nervios nitrérgicos" o de las células endoteliales vecinas.

Por otro lado, el NO:GMPc produce un efecto adicional sobre la respuesta secretora que no se puede obviar. La activación de la proteína quinasa dependiente de GMPc induce fosforilación de la tirosina hidroxilasa, la enzima clave en la síntesis de catecolaminas. La fosforilación de TH aumenta la capacidad catalítica de la enzima y conduce, por tanto, a una mayor acumulación de catecolaminas en las vesículas de secreción. Esto significa que la señal de NO:GMPc produce, además del efecto inhibitorio sobre la secreción, un aumento del contenido total de catecolaminas; es decir, mientras las células están bajo la influencia de la señal, no sólo se inhibe la secreción sino que las células se preparan para una respuesta secretora futura mediante una síntesis más activa de catecolaminas.

Los resultados del presente trabajo de investigación demuestran la existencia en las células cromafines bovinas en cultivo de una ruta de 2º mensajeros basada en NO:GMPc que es responsable de un efecto modulador negativo sobre la secreción de catecolaminas. No obstante, la aplicación de técnicas experimentales adicionales, tanto desde el punto de vista bioquímico como desde el punto de vista fisiológico, como por ejemplo, la caracterización molecular de las proteínas implicadas (canales, quinasas, etc.), estudios electrofisiológicos, medidas de secreción *in situ*, etc., será necesaria para confirmar de manera efectiva la participación de estos mecanismos en la regulación de la secreción de catecolaminas en el órgano intacto.



## **VI. CONCLUSIONES**



1) Las células cromafines bovinas en cultivo poseen una ruta de segundos mensajeros basada en las enzimas NOS y GCS.

Esta ruta es activa en condiciones basales y se estimula por secretagogos como acetilcolina a través de un incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , activación de la NOS por  $Ca^{2+}/CaM$  y posterior activación de la GCS mediante el NO producido.

La GCS de células cromafines es también sensible al NO exógeno procedente de donadores de NO como SNP.

Las células poseen también una guanilato ciclasa particulada que se activa por el péptido natriurético de tipo C.

El GMPc intracelular está estrechamente regulado por las enzimas de síntesis, GC soluble y de membrana; y por las enzimas de degradación, una de las cuales podría ser una fosfodiesterasa de tipo I, estimulada por  $Ca^{2+}/CaM$ . Los iones calcio, por tanto, a través de la CaM, juegan un papel dual en el metabolismo del GMPc: estimulador, mediante activación de la NOS; e inhibidor: a través de la estimulación de una fosfodiesterasa.

2) Las células cromafines bovinas contienen proteína quinasa dependiente de GMPc tanto a nivel de proteína como a nivel de actividad enzimática.

Los activadores de GC soluble y particulada, SNP y CNP, producen incrementos significativos en la actividad enzimática de PKG.

SNP y CNP, a través de PKG, producen un aumento significativo del grado de fosforilación de la tirosina hidroxilasa, la enzima clave en la ruta de síntesis de catecolaminas. Dicho mecanismo podría ser responsable del aumento sustancial del contenido total de catecolaminas que se observa cuando las células se preincuban con SNP o CNP.

La fosforilación de TH mediada por GMPc/PKG parece tener lugar en los mismos residuos que la proteína quinasa A es capaz de fosforilar.

3) La vía del NO/GMPc es responsable de una modulación negativa de la secreción de catecolaminas en células cromafines bovinas.

SNP y CNP producen una reducción dependiente de la dosis y del tiempo de incubación de la secreción de catecolaminas y del incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  estimulados por Ach o KCl. Este efecto inhibitorio se basa en la producción de GMPc y posterior activación de la PKG.

Esta inhibición también puede conseguirse con el inhibidor de la fosfodiesterasa específica de GMPc (tipo V), zaprinast.

El mecanismo molecular implicado parece ser una reducción de la entrada de calcio a través de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje de tipo P/Q.

El NO producido por la NOS endógena inhibe tónicamente la secreción de catecolaminas. Este efecto sólo se observa cuando se emplean dosis bajas de estimulación.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



- Afework M., Tomlinson A., Belai A., Burnstock G. (1992) Colocalization of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in rat adrenal gland. *NeuroReport*, **3**: 893-896.
- Aitken A., Bilham T., Cohen P., Aswad D., Greengard P. (1981) A specific substrate from rabbit cerebellum for guanosine-3':5' monophosphate-dependent protein kinase. Amino acid sequences at the two phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.*, **256**: 3501-3506.
- Albillos A., Gandía L., Michelena P., Gilabert J.A., Del Valle M., Carbone E., García A.G. (1996a) The mechanism of calcium channel facilitation in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.*, **494**: 687-695.
- Albillos A., García A.G., Olivera B., Gandía L. (1996b) 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.*, **432**: 1030-1038.
- Albillos A., García A.G., Gandía L. (1993)  $\omega$ -agatoxin-IVA-sensitive calcium channels in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett.*, **336**: 259-262.
- Anderson K., Robinson P.J., Marley P.D. (1992) Cholinceptor regulation of cyclic AMP levels in bovine adrenal medullary cells. *Br. J. Pharmacol.*, **106**: 360-366.
- Antunes-Rodrigues J., Machada B.H., Andrade H.A., Mauad H., Ramalho M.J., Reis L.C., Silva-Netto C.R., Favaretto A.L.V., Gutowska J., McCann S.M. (1992) Carotid-aortic and renal baroreceptors mediate the atrial natriuretic peptide release induced by blood volume expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**: 6828-6831.
- Aparicio J.G., Applebury M.L. (1996) The photoreceptor guanylate cyclase is an autophosphorylating protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **271**: 27083-27089.
- Arancio O., Kiebler M., Lee C.J., Lev-Ram V., Tsien R.Y., Kandel E.R., Hawkins R.D. (1996) Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell*, **87**: 1025-1035.
- Artalejo A.R. (1995) Electrical properties of adrenal chromaffin cells. En *The electrophysiology of neuroendocrine cells*. (Scherübl H. y Hescheler J. eds.), CRC Press, 259-299.
- Artalejo C.R., Adams M.E., Fox A.P. (1994) Three types of  $Ca^{2+}$  channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. *Nature*, **367**: 72-76.
- Artalejo C.R., Mogul D.J., Perlman R.L., Fox A.P. (1991) Three types of bovine chromaffin cells  $Ca^{2+}$  channels: facilitation increases the open probability of a 27pS channel. *J. Physiol.*, **444**: 213-240.
- Ashman D.F., Lipton R., Melicow M.M., Price T.D. (1963) Isolation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'- monophosphate from rat urine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **11**: 330-334.
- Atkinson R.A., Saudek V., Huggins J.P., Pelton J.T. (1991)  $^1H$  NMR and circular dichroism studies of the N-terminal domain of cyclic GMP dependent protein kinase: A leucine/isoleucine zipper. *Biochemistry*, **30**: 9387-9395.
- Augustine G.J., Neher E. (1992) Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.*, **450**: 247-271.

- Aunis D., Pescheloché M., Zwiller J. (1978) Guanylate cyclase from bovine adrenal medulla: subcellular distribution and studies on the effect of lysolecithin on enzyme activity. *Neuroscience*, **3**: 83-93.
- Babinski K., Féthière J., Roy M., De Léan A., Ong H. (1992) C-type natriuretic peptide in bovine chromaffin cells: the regulation of its biosynthesis and secretion. *FEBS Lett.*, **313**: 300-302.
- Babinski K., Haddad P., Vallerand D., McNicoll N., De Léan A., Ong H. (1995) Natriuretic peptides inhibit nicotine-induced whole-cell currents and catecholamine secretion in bovine chromaffin cells: evidence for the involvement of the atrial natriuretic factor R2 receptors. *J. Neurochem.*, **64**: 1080-1087.
- Bader M.F., Hikita T., Trifaro J.M. (1985) Calcium-dependent calmodulin binding to chromaffin granule membranes: presence of a 65-kilodalton calmodulin-binding protein. *J. Neurochem.*, **44**: 526-539.
- Baehr W., Champagne M.S., Lee A.K., Pittler S.J. (1991) Complete cDNA sequences of mouse rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits, and identification of  $\beta$ '-subunit isozyme produced by alternative splicing of the  $\beta$ -subunit gene. *FEBS Lett.*, **278**: 107-114.
- Baker E.M., Cheek T.R., Burgoyne R.D. (1985) Cyclic AMP inhibits secretion from bovine adrenal cells evoked by carbamylcholine but not high  $K^+$ . *Biochim. Biophys. Acta.*, **846**: 388-393.
- Ballesta J.J., Borges R., García A.G., Hidalgo M.J. (1989) Secretory and radioligand binding studies on muscarinic receptors in bovine and feline chromaffin cells. *J. Physiol.*, **418**: 411-426.
- Bates J.N., Baker M.T., Guerra R.Jr., Harrison D.G. (1991) Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochem. Pharmacol.*, **42**: S157-S165.
- Bean B.P. (1989) Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature*, **340**: 153-156.
- Beavo J.A., Reifsnnyder D.H. (1990) Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes and the design of selective inhibitors. *Trends Pharmacol. Sci.*, **11**: 150-155.
- Beltman J., Sonnenburg W.K., Beavo J.A. (1993) The role of protein phosphorylation in the regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Mol. Cell. Biochem.*, **127/128**: 239-253.
- Biales B., Dichter M.A., Tischler A. (1976) Electrical excitability of cultured adrenal chromaffin cells. *J. Physiol.*, **262**: 743-753.
- Bogle R.G., Baydoun A.R., Moncada S., Pearson J.D., Mann G.E. (1992) L-arginine transport is increased in macrophages generating nitric oxide. *Biochem. J.*, **284**: 15-18.
- Bokoch G.M., Katada T., Northup J.K., Hewlett E.L., Gilman A.G. (1983) Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein. *J. Biol. Chem.*, **258**: 2072-2075.
- Bossu J.L., De Waard M., Feltz A. (1991) Two types of calcium channels are expressed in adult bovine chromaffin cells. *J. Physiol.*, **437**: 621-634.

- Böhme G.A., Bon C., Stutzmann J.M., Doble A., Blanchard J.C. (1991) Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur. J. Pharmacol.*, **199**: 379-381.
- Bradford H.U. (1976) Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
- Brandt B.L., Hagiwara S., Kidakoro Y., Miyazaki S. (1976) Action potentials in the rat chromaffin cells and effects of acetylcholine. *J. Physiol.*, **263**: 417-439.
- Bredt D.S., Glatt C.E., Hwang P.M., Fotuhi M., Dawson T.M., Snyder S.H. (1991a) Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localised in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron*, **7**: 615-624.
- Bredt D.S., Hwang P.M., Glatt C.E., Lowenstein C., Reed R.R., Snyder S.H. (1991b) Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, **351**: 714-718.
- Bredt D.S., Hwang P.M., Snyder S.H. (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, **347**: 768-770.
- Bredt D.S., Snyder S.H. (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**: 682-685.
- Bredt D.S., Snyder S.H. (1994) Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuron*, **13**: 301-313.
- Brenman J.E., Chao D.S., Gee S.H., McGee A.W., Craven S.E., Santillano D.R., Wu Z., Huang F., Xia H., Peters M.F., Froehner S.C., Bredt D.S. (1996) Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and  $\alpha$ 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell*, **84**: 757-767.
- Breslow M.J., Tobin J.R., Bredt D.S., Ferris C.D., Snyder S.H., Traystman R.J. (1993) Nitric oxide as a regulator of adrenal blood flow. *Am. J. Physiol.*, **264**: H464-H469.
- Brocklehurst K.W., Pollard H.B. (1988) Pertussis toxin stimulates delayed-onset Ca-dependent catecholamine release and the ADP ribosylation of a 40 kDa protein in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett.*, **234**: 439-445.
- Brown A.M., Birnbaumer L. (1990) Ionic channels and their regulation by G protein subunits. *Annu. Rev. Physiol.*, **52**: 197-213.
- Brunner F., Schmidt K., Nielsen E.B., Mayer B. (1996) Novel guanylyl cyclase inhibitor potently inhibits cyclic GMP accumulation in endothelial cells and relaxation of bovine pulmonary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **277**: 48-53.
- Brunner F., Stessel H., Kukovetz W.R. (1995) Novel guanylyl cyclase inhibitor, ODCQ reveals role of nitric oxide, but not of cyclic GMP in endothelin-1 secretion. *FEBS Lett.*, **376**: 262-266.
- Brüne B., Lapetina E.G. (1989) Activation of a cytosolic ADP-ribosyltransferase by nitric oxide-generating agents. *J. Biol. Chem.*, **264**: 8455-8458.
- Bult H., Boeckstaens G.E., Pelckmans P.A., Jordaens F.H., Van Maercke Y.M., Herman A.G. (1990) Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature*, **345**: 346-347.

- Burgoyne R.D. (1991) Control of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1071**: 174-202.
- Burgoyne R.D. Morgan A. (1993) Regulated exocytosis. *Biochem. J.*, **293**: 305-316.
- Burgoyne R.D., Cheek T.R., Morgan A., O'Sullivan A.J., Moreton R.B., Berridge M.J., Mata A., Colyer J., Lee A.G., East J.M. (1989a) Distribution of two distinct  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-like proteins and their relationships to the agonist-sensitive calcium store in adrenal chromaffin cells. *Nature*, **342**: 72-74.
- Burgoyne R.D., Morgan A., O'Sullivan A.J. (1989b) The control of cytoskeletal actin and exocytosis in intact and permeabilized chromaffin cells: role of calcium and protein kinase C. *Cell. Signal.*, **1**: 323-334.
- Burgoyne R.D., Morgan A., Robinson I., Pender N., Cheek T.R. (1993) Exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J. Anat.*, **183**: 309-314.
- Burnett A.L., Lowenstein C.J., Bredt D.S., Chang T.S.K., Snyder S.H. (1992) Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science*, **257**: 401-403.
- Butcher R.W., Sutherland E.W. (1962) Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. *J. Biol. Chem.*, **237**: 1244-1250.
- Butt E., Eigenthaler M., Geniesser H-G. (1994) (Rp)-8-pCPT-cGMPS, a novel cGMP-dependent protein kinase inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.*, **269**: 265-268.
- Butt E., Geiger J., Jarchau T., Lohmann S.M., Walter U. (1993) The cGMP-Dependent Protein Kinase- Gene, Protein, and Function. *Neurochem. Res.*, **18**: 27-42.
- Buttery L.D.K., Springall D.R., Carpenter A., Riveros-Moreno V., Moncada S., Cohen J., Polak J.M. (1993) Distinct localization of inducible nitric oxide synthase in endotoxin-treated rats. *Endothelium (suppl.)*, **1**: S27 (abstract).
- Callewaert G., Johnson R.G., Morad M. (1991) Regulation of the secretory response in bovine chromaffin cells. *Am. J. Physiol.*, **260**: C851-C860.
- Calvo S., Granja R., González-García C., Ceña V. (1995) Catecholamine secretion, calcium levels and calcium influx in response to membrane depolarization in bovine chromaffin cells. *Neuroscience*, **68**: 265-272.
- Cannon S.D., Wilson S.P., Walsh K.B. (1994) A G protein-activated  $\text{K}^+$  current in bovine adrenal chromaffin cells: possible regulatory role in exocytosis. *Mol. Pharmacol.*, **45**: 109-116.
- Casnellie J.E., Ives H.E., Janieson J.D., Greengard P. (1980) Cyclic GMP-dependent protein phosphorylation in intact medial tissue and isolated cells from vascular smooth muscle. *J. Biol. Chem.*, **255**: 3770-3776.
- Castro E., Pintor J., Miras-Portugal M.T. (1992)  $\text{Ca}^{2+}$ -stores mobilization by diadenosine tetraphosphate,  $\text{Ap}_4\text{A}$ , through a putative  $\text{P}_2\text{y}$  purinoceptor in adrenal chromaffin cells. *Br. J. Pharmacol.*, **106**: 833-837.
- Ceña V., Brocklehurst K.W., Pollard H.B., Rojas E. (1991) Pertussis toxin stimulation of catecholamine release from adrenal medullary chromaffin cells: mechanism may be by direct activation of L-type and G-type calcium channels. *J. Memb. Biol.*, **122**: 23-31.
- Charbonneau H., Beier N., Walsh K.A., Beavo J.A. (1986) Identification of conserved domain among cyclic nucleotide phosphodiesterases from diverse species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **83**: 9308-9312.

- Charbonneau H., Kumar S., Novack J.P., Blumenthal D.K., Griffin P.R., Shabanowitz J., Hunt D.F., Beavo J.A., Walsh K.A. (1991) Evidence for domain organization within the 61-kDa calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine brain. *Biochemistry*, **30**: 7931-7940.
- Charbonneau H., Prusti R.K., LeTrong H., Sonnenburg W.K., Mullaney P.J., Walsh K.A., Beavo J.A. (1990) Identification of a noncatalytic cGMP-binding domain conserved in both the cGMP-stimulated and photoreceptor cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87**: 288-292.
- Chasserot-Golaz S., Vitale N., Sagot I., Delouche B., Dirrig S., Pradel A., Henry J.P., Aunis A., Bader M.F. (1996) Annexin II in exocytosis: catecholamine secretion requires the translocation of p36 to the subplasmalemmal region in chromaffin cells. *J. Cell. Biol.*, **133**: 1217-1236.
- Cheek T.R., Burgoyne R.D. (1986) Nicotine evoked disassembly of cortical actin filaments in bovine adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett.*, **207**: 110-113.
- Cheek T.R., O'Sullivan A.J., Moreton R.B., Berridge M.J., Burgoyne R.D. (1989) Spatial localization of the stimulus-induced rise in cytosolic  $Ca^{2+}$  in bovine adrenal chromaffin cells. Distinct nicotinic and muscarinic patterns. *FEBS Lett.*, **247**: 429-434.
- Chern Y.J., Kim K.T., Slakey L.L., Westhead E.W. (1988) Adenosine receptors activate adenylate cyclase and enhance secretion from bovine adrenal chromaffin cells in the presence of forskolin. *J. Neurochem.*, **50**: 1484-1493.
- Chijiwa T., Mishima A., Hagiwara M., Sano M., Hayashi K., Inoue T., Naito K., Toshioka T., Hidaka H. (1990) Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonilamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.*, **265**: 5267-5272.
- Chinkers M., Garbers D.L., Chang M.-S., Lowe D.G., Chin H.M., Goeddel D.V., Schultz S. (1989) A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature*, **338**: 78-83.
- Chomczynski P., Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**: 156-159.
- Collins P., Griffith T.M., Henderson R.H., Lewis M.J. (1986) Endothelium-derived relaxing factor alters  $Ca^{2+}$  fluxes in rabbit aorta: A cyclic guanosine monophosphate effect. *J. Physiol.*, **381**: 427-437.
- Corbin J.D., Doskeland S.O. (1983) Studies of two different intrachain cGMP-binding sites of cGMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **258**: 11391-11397.
- Corbin J.D., Lincoln T.M. (1978) Comparison of cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, **9**: 159-170.
- Corbin J.D., Og Reid D., Miller J.P., Suva R., Jastorff S.O., Doskeland S.O. (1986) Studies of cGMP analog specificity and function of the two intrasubunit binding sites of cGMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **261**: 1208-1214.
- Cornwell T.L., Lincoln T.M. (1989) Regulation of intracellular  $Ca^{2+}$  levels in cultured vascular smooth muscle cells. Reduction of  $Ca^{2+}$  by atriopeptin and 8-bromocyclic GMP is mediated by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **264**: 1146-1155.

- Cornwell T.L., Pryzwansky K.B., Wyatt T.A., Lincoln T.M. (1991) Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cGMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.*, **40**: 923-931.
- Coste H., Grondin P. (1995) Characterization of a novel potent and specific inhibitor of type V phosphodiesterase. *Biochem. Pharmacol.*, **50**: 1577-1585.
- Coupland R.E. (1965) Electron microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla. I. The ultrastructure and organization of chromaffin cells in the normal adrenal medulla. II. Normal innervation. *J. Anat.*, **99**: 231-272.
- Coupland R.E., Pyper A.S., Hopwood D. (1964) A method for differentiating between noradrenaline- and adrenaline-storing cells in the light and electron microscope. *Nature*, **201**: 1240- 1242.
- Craviso G.L., Hemelt V.B., Waymire J.C. (1995) The transient nicotinic stimulation of tyrosine hydroxylase gene transcription in bovine adrenal chromaffin cells is independent of *c-fos* gene activation. *Mol. Brain Res.*, **29**: 233-244.
- Crepel F., Jaillard D. (1990) Protein kinases, nitric oxide, and long-term depression of synapses in the cerebellum. *NeuroReport*, **1**: 133-136.
- Criado M., Alamo L., Navarro A. (1992) Primary structure of an agonist binding subunit of the nicotinic acetylcholine receptor from bovine adrenal chromaffin cells. *Neurochem. Res.*, **17**: 281- 287.
- Currie K.P.M., Fox A.P. (1996) ATP serves as a negative feedback inhibitor of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels currents in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Neuron*, **16**: 1027-1036.
- Daniel H., Hemart N., Jaillard D., Crepel F. (1993) Long-term depression requires nitric oxide and guanosine 3':5' cyclic monophosphate production in cerebellar Purkinje cells. *Eur. J. Neurosci.*, **5**: 1079-1082.
- Dawson T.M., Bredt D.S., Fotuhi M., Hwang P.M., Snyder S.H. (1991) Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**: 7797-7801.
- DeCamilli P., Miller P.E., Levit O., Walter U. (1984) Anatomy of cerebellar Purkinje cells in the rat determined by a specific immunohistochemical marker. *Neuroscience*, **11**: 761-817.
- Deinum G., Stone J.R., Babcock G.T., Marletta M.A. (1996) Binding of nitric oxide and carbon monoxide to soluble guanylate cyclase as observed with resonance Raman spectroscopy. *Biochemistry*, **35**: 1540-1547.
- DeJonge H.R. (1981) Cyclic GMP-dependent protein kinase in intestinal brushborders. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, **14**: 315- 333.
- Derome G., Tseng R., Mercier P., Lemaire I., Lemaire S. (1981) Possible muscarinic regulation of catecholamine secretion mediated by cyclic GMP in isolated bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem. Pharmacol.*, **30**: 855-860.
- Desai K.M., Sessa W.C., Vane J.R. (1991) Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accomodate food of fluid. *Nature*, **351**: 477-479.
- Desolé M.S., Kim W.K., Rabin R.A., Laychock S.G. (1994) Nitric oxide reduces depolarization-induced calcium influx in PC12 cells by a cyclic GMP-mediated mechanism. *Neuropharmacology*, **33**: 193- 198.

- Dierks E.A., Burstyn J.N. (1996) Nitric oxide (NO<sup>\*</sup>), the only nitrogen monoxide redox form capable of activating soluble guanylyl cyclase. *Biochem. Pharmacol.*, **51**: 1593-1600.
- Dinerman J.L., Dawson T.M., Schell M.J., Snowman A., Snyder S.H. (1994) Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: Implications for synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**: 4214-4218.
- Distler M., Biel M., Flockerzi V., Hofmann F. (1994) Expression of cyclic nucleotide-gated cation channels in nonsensory tissues and cells. *Neuropharmacology*, **33**: 1275-1282.
- Dohi T., Morita K., Tsujimoto A. (1983) Effect of sodium azide on catecholamine release from isolated adrenal gland and on guanylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.*, **94**: 331-335.
- Douglas W.W., Kanno T., Sampson S.R. (1967a) 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.
- Douglas W.W., Kanno T., Sampson S.R. (1967b) 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.
- Douglas W.W., Rubin R.P. (1961) The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J. Physiol.*, **159**: 40-57.
- Doupnik C.A., Pun R.Y.K. (1994) G-protein activation mediates prepulse facilitation of Ca<sup>2+</sup> channel currents in bovine chromaffin cells. *J. Membrane. Biol.*, **140**: 47-56.
- Drewett J., Marchand G., Ziegler R., Trachte G. (1988) Atrial natriuretic factor inhibits norepinephrine release in an adrenergic clonal cell line (PC12). *Eur. J. Pharmacol.*, **150**: 175-179.
- Duarte C.B., Tome A.R., Forsberg E., Carvalho C.A.M., Carvalho A.P., Santos R.M., Rosario L.M. (1993) Neomycin blocks dihydropyridine-insensitive Ca<sup>2+</sup> influx in bovine adrenal chromaffin cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **244**: 259-267.
- Dun N.J., Dun S.L., Wu S.Y., Förstermann U. (1993) Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat superior cervical ganglia and adrenal glands. *Neurosci. Lett.*, **158**: 51-54.
- Dun N.L., Dun S.L., Förstermann U., Tseng L.F. (1992) Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat spinal cord. *Neurosci. Lett.*, **147**: 217-220.
- Dunlap K., Luebke J.I., Turner T.J. (1995) Exocytotic Ca<sup>2+</sup> channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci.*, **18**: 89-98.
- Dunn L.A., Holz R.W. (1983) Catecholamine secretion from digitonin-treated adrenal medullary chromaffin cells. *J. Biol. Chem.*, **258**: 4989-4993.
- Edelman A.M., Raese J.D., Lazar M.A., Barchas J.D. (1981) Tyrosine hydroxylase: studies on the phosphorylation of a purified preparation of the brain enzyme by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **216**: 647-653.
- Einer-Jensen N., Carter A.M. (1995) Local transfer of hormones between blood vessels within the adrenal gland may explain the functional interaction between the adrenal cortex and medulla. *Med. Hypotheses*, **44**: 471-474.

- El-Husseini A.E., Bladen C., Vincent S.R. (1995) Molecular characterization of a type II cyclic GMP-dependent protein kinase expressed in the rat brain. *J. Neurochem.*, **64**: 2814-2817.
- Elworthy P.M. (1986) An improved method for the fluorometric determination of tissue catecholamines. *Neurochem. Res.*, **11**: 753-758.
- Engisch K.L., Nowycky M.C. (1996) Calcium dependence of large dense-cored vesicle exocytosis evoked by calcium influx in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurosci.*, **16**: 1359-1369.
- Eränkö O. (1955) Distribution of fluorescing islets, adrenaline and noradrenaline from the adrenal medulla of the hamster. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, **18**: 174-179.
- Eränkö O. (1952) On the histochemistry of the adrenal medulla of the rat, with special reference to acid phosphatase. *Acta Anat.*, **16, Suppl. 17**: 1-60.
- Evinger M.J., Towle A.C., Park D.H., Lee P., Joh T.H. (1992) Glucocorticoids stimulate transcription of the rat phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) gene *in vivo* and *in vitro*. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **12**: 193-215.
- Ewald D., Williams A., Levitan I.B. (1985) Modulation of single Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel activity by protein phosphorylation. *Nature*, **315**: 503-506.
- Feldberg W., Minz B., Tsudzimura H. (1934) The mechanism of the nervous discharge of adrenaline. *J. Physiol.*, **81**: 286-304.
- Fenwick E.M., Marty A., Neher E. (1982a) A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J. Physiol.*, **331**: 577-597.
- Fenwick E.M., Marty A., Neher E. (1982b) Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.*, **331**: 599-635.
- Fernández J.M., Granja R., Izaguirre V., González-García C., Ceña V. (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.
- Field M., Graf L.H., Laird W.J., Smith P.L. (1978) Heat stable enterotoxin *Escherichia coli*: *In vitro* effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP accumulation, and ion transport in small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75**: 2800-2804.
- Finn J.T., Grunwald M.E., Yau K.W. (1996) Cyclic nucleotide-gated ion channels: an extended family with diverse functions. *Annu. Rev. Physiol.*, **8**: 395-426.
- Fleckenstein A. (1983) History of calcium antagonists. *Circ. Res.*, **52 (suppl. 1)**: 3-16.
- Folkow B., von Euler U.S. (1954) Selective activation of noradrenaline and adrenaline producing cells in the cat's adrenal gland by hypothalamic stimulation. *Circ. Res.*, **2**: 191-195.
- Fournier F., Bourinet E., Nargeot J., Charnet P. (1993) Cyclic AMP-dependent modulation of P-type calcium channels expressed in *Xenopus* oocyte. *Pflügers Arch.*, **423**: 173-180.
- Förstermann U., Closs E.I., Pollock J.S., Nakane M., Schwarz P., Gath I., Kleinert H. (1994) Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning and functions. *Hypertension*, **23**: 1121-1131.
- Förstermann U., Gorsky L.D., Pollock J.S., Ishii K., Schmidt H.H.W., Heller M., Murad F. (1990) Hormone-induced biosynthesis of endothelium-derived relaxing

- factor/nitric oxide-like material in N1E-115 neuroblastoma cells requires calcium and calmodulin. *Mol. Pharmacol.*, **38**: 7-13.
- Förstermann U., Mügge A., Alheid U., Haverich A., Frölich J.C. (1988) Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries. *Circ. Res.*, **62**: 185-190.
- Förstermann U., Pollock J.S., Schmidt H.H.W., Heller M., Murad F. (1991) Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**: 1788-1792.
- Francis S.H., Corbin J.D. (1994a) Progress in understanding the mechanism and function of cyclic GMP-dependent protein kinase. *Adv. Pharmacol.*, **26**: 115-170.
- Francis S.H., Corbin J.D. (1994b) Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu. Rev. Physiol.*, **56**: 237-272.
- Francis S.H., Smith J.A., Colbran J.L., Grimes K., Walsh K.A., Kumar S., Corbin J.D. (1996) Arginine 75 in the pseudosubstrate sequence of the type II cGMP-dependent protein kinase is critical for autoinhibition, although autophosphorylated serine 63 is outside this sequence. *J. Biol. Chem.*, **271**: 20748-20755.
- Friedman D.L., Larner J. (1963) Studies on UDPG- $\alpha$ -glucan transglucosylase III. Interconversion of two forms of muscle UDPG- $\alpha$ -glucan transglucosylase by a phosphorylation-dephosphorylation reaction sequence. *Biochemistry*, **4**: 669-675.
- Furchgott R.F., Zawadzki J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**: 373-376.
- Furuyama T., Inagaki S., Takagi H. (1993) Localizations of alpha 1 and beta 1 subunits of soluble guanylate cyclase in the rat brain. *Mol. Brain. Res.*, **20**: 335-344.
- Gamm D.M., Francis S.H., Angelotti T.P., Corbin J.D., Uhler M.D. (1995) The type II isoform of cGMP-dependent protein kinase is dimeric and possesses regulatory and catalytic properties distinct from the type I isoforms. *J. Biol. Chem.*, **270**: 27380-27388.
- Garbers D.L. (1989) Guanylate cyclase, a cell surface receptor. *J. Biol. Chem.*, **264**: 9103-9106.
- García A.G., Sala F., Reig J.A., Viniegra S., Frías J., Fonteriz R., Gandía L. (1984) Dihydropyridine BAY-K-8644 activates chromaffin cell calcium channels. *Nature*, **308**: 69-71.
- Garthwaite J. (1991) Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.*, **14**: 60-67.
- Garthwaite J., Southam E., Boulton C.L., Nielsen E.B., Schmidt K., Mayer B. (1995) Potent and selective inhibition of Nitric Oxide-sensitive Guanylyl Cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol.*, **48**: 184-188.
- Geller D.A., Lowenstein C.J., Shapiro R.A., Nussler A.K., DiSilvio M., Wang S.C., Nakayama D.K., Simmons R.L., Snyder S.H., Billiar T.R. (1993) Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase gene from human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**: 3491-3499.

- Gerzer R., Böhme E., Hofmann F., Schultz G. (1981) Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS Lett.*, **132**: 71-74.
- Gerzer R., Brash A.R., Hardman J.G. (1986) Activation of soluble guanylate cyclase by arachidonic acid and 15-lipoxygenase products. *Biochim. Biophys. Acta.*, **886**: 383-389.
- Gill G.N., Holdy K.E., Walton G.M., Kanstein C.B. (1976) Purification and characterization of cGMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **73**: 3918-3922.
- Gillis K.D., Möbner R., Neher E. (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.
- Giulli G., Scholl U., Bulle F., Guellaen G. (1992) Molecular cloning of the cDNAs coding for two subunits of the soluble guanylyl cyclase from human brain. *FEBS Lett.*, **304**: 83-88.
- Goldberg N.D., Haddox M.K. (1977) Cyclic GMP metabolism and involvement in biological regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, **46**: 823- 896.
- Gosink E.C., Forsberg E.J. (1993) Effects of ATP and bradykinin on endothelial cell  $Ca^{2+}$  homeostasis and formation of cGMP and prostacyclin. *Am. J. Physiol.*, **265**: C1620-C1629.
- Granja R., Fernández-Fernández J.M., Izaguirre V., González-García C., Ceña V. (1995)  $\omega$ -agatoxin IVA blocks nicotinic receptor channels in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett.*, **362**: 15-18.
- Grant N.J., Aunis D. (1990) Effects of phorbol esters on cytoskeletal proteins in cultured bovine chromaffin cells: induction of neurofilament phosphorylation and reorganization of actin. *Eur. J. Cell. Biol.*, **52**: 36-46.
- Greenberg S., Diecke F.P.J., Peevy K., Tanaka T.P. (1989) The endothelium modulates adrenergic neurotransmission to canine pulmonary arteries and veins. *Eur. J. Pharmacol.*, **162**: 67-80.
- Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. (1985) A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, **240**: 3440-3450.
- Grynszpan-Winograd O. (1975) Ultrastructure of the chromaffin cell. En *Handbook of Physiology: Endocrinology. Vol. VI Adrenal Gland*, (Greep R.O. y Astwood E.B. eds.), Am. Physiol. Society, 295-308, Washington D.C.
- Gualix J., Abal M., Pintor J., García-Carmona F., Miras-Portugal M.T. (1996) Nucleotide vesicular transporter of bovine chromaffin granules. Evidence for a mnemonic regulation. *J. Biol. Chem.*, **271**: 1957-1965.
- Guthmann F., Mayer B., Koesling D., Kukovetz W.R., Böhme E. (1992) Characterization of soluble platelet guanylyl cyclase with peptide antibodies. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **346**: 537-541.
- Gutierrez L.M., Ballesta J.J., Hidalgo M.J., Gandía L., García A.G., Reig J.A. (1988) A two-dimensional electrophoresis study of phosphorylation and dephosphorylation of chromaffin cell proteins in response to a secretory stimulus. *J. Neurochem.*, **51**: 1023- 1030.
- Gutman Y., Boonyaviroj P. (1979) Activation of adrenal medulla adenylate cyclase and catecholamine secretion. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **307**: 39-44.

- Guyton A.C. (1988) Tratado de fisiología médica. Interamericana McGraw-Hill, Madrid.
- Hall F.L., Braun R.K., Mihara K., Fung Y.K., Berndt N., Carbonara-Hall D.A., Vulliet P.R. (1992) Characterization of the cytoplasmic proline-directed protein kinase in proliferative cells and tissues as a heterodimer comprised of p34cdc2 and p58cyclin A. *J. Biol. Chem.*, **266**: 17430-17440.
- Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells, and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.*, **391**: 85-100.
- Hans M., Illes P., Takeda K. (1990) The blocking effects of  $\omega$ -conotoxin on Ca current in bovine chromaffin cells. *Neurosci. Lett.*, **114**: 63-68.
- Hanson P.I., Schulman H. (1992) Neuronal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin- dependent protein kinases. *Annu. Rev. Biochem.*, **61**: 559-601.
- Hardman J.G., Sutherland E.W. (1969) Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J. Biol. Chem.*, **244**: 6363- 6370.
- Harper J.F., Brooker G. (1975) Femtomole sensitive radioimmunoassay for cyclic AMP and cyclic GMP after 2'O-acetylation by acetic anhydride in aqueous solution. *J. Cyclic Nucleotide Res.*, **1**: 207-218.
- Harrison S.A., Beier N., Martins T.J., Beavo J.A. (1988) Isolation and comparison of bovine heart cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases. *Meth. Enzymol.*, **159**: 685-702.
- Harteneck C., Wedel B., Koesling D., Malkewitz J., Böhme E., Schultz G. (1991) Molecular cloning of a new  $\alpha$  subunit of soluble guanylate cyclase. Interchangeability of the  $\alpha$ -subunits of the enzyme. *FEBS Lett.*, **292**: 217-222.
- Hartzell H.C., Fischmeister R. (1986) Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on Ca<sup>2+</sup> current in single heart cells. *Nature*, **323**: 273-275.
- Haycock J.W. (1993) Multiple signaling pathways in Bovine Chromaffin Cells regulate Tyrosine Hydroxylase phosphorylation at Ser<sup>19</sup>, Ser<sup>31</sup> and Ser<sup>40</sup>. *Neurochem. Res.*, **18**: 15-26.
- Haycock J.W. (1990) Phosphorylation of tyrosine hydroxylase *in situ* at serine 8, 19, 31 and 40. *J. Biol. Chem.*, **265**: 11682- 11691.
- Haycock J.W., Ahn N.G., Cobb M.H., Krebs E.G. (1992) ERK1 and ERK2, two microtubule-associated protein 2 kinases, mediate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine-31 *in situ*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**: 2365-2369.
- Haycock J.W., Bennett W.F., George R.J., Waymire J.C. (1982) Multiple site phosphorylation of tyrosine hydroxylase. Differential regulation *in situ* by 8-bromo-cAMP and acetylcholine. *J. Biol. Chem.*, **257**: 13699-13703.
- Henry J.P., Botton D., Sagne C., Isambert M.F., Desnos C., Blanchard V., Raisman-Vozari R., Krejci E., Massoulie J., Gasnier B. (1994) Biochemistry and molecular biology of the vesicular monoamine transporter from chromaffin granules. *J. Exp. Biol.*, **196**: 251-262.
- Hess D.T., Patterson S.I., Smith D.S., Pate Skene J.H. (1993) Neuronal growth cone collapse and inhibition of protein and inhibition of protein fatty acylation by nitric oxide. *Nature*, **366**: 562-565.

- Heym C., Colombo-Benckmann M., Mayer B. (1994) Immunohistochemical demonstration of the synthesis enzyme for nitric oxide and of comediators in neurons and chromaffin cells of the human adrenal medulla. *Ann. Anat.*, **176**: 11-16.
- Hidaka H., Inakaki M., Kawamoto S., Sasaki Y. (1984) Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry*, **23**: 5036-5041.
- Hildebrand M. (1974) Anatomía y embriología de los vertebrados. Editorial Limusa, México.
- Hillarp N.A., Hökfelt B. (1955) Histochemical demonstration of noradrenaline and adrenaline in the adrenal medulla. *J. Histochem. Cytochem.*, **3**: 1-5.
- Hillyard D.R., Monje V.D., Mintz M.I., Bean B.P., Nadasdi L., Ramachandran J., Miljanich G., Azimi-Zoonooz A., McIntosh J.M., Cruz L.J., Imperial J.S., Olivera B.M. (1992) A new conus peptide ligand for mammalian presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron*, **9**: 69-77.
- Hirsch D.B., Steiner J.P., Dawson T.M., Mammen A., Hayek E., Snyder S.H. (1993) Neurotransmitter release regulated by nitric oxide in PC-12 cells and brain synaptosomes. *Curr. Biol.*, **3**: 749-754.
- Hodgkin A.L., Huxley A.F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerves. *J. Physiol.*, **177**: 500-544.
- Hohne-Zell B., Ecker A., Weller U., Gratzl M. (1994) Synaptobrevin cleavage by the tetanus toxin light chain is linked to the inhibition of exocytosis in chromaffin cells. *FEBS Lett.*, **355**: 131-134.
- Huang P.L., Dawson T.M., Brecht D.S., Snyder S.H., Fishman M.C. (1993) Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell*, **75**: 1273-1286.
- Humbert P., Niroomand F., Fischer G., Mayer B., Koesling D., Hirsch K.H., Gausepohl H., Frank R., Schultz G., Böhme E. (1990) Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method. *Eur. J. Biochem.*, **190**: 273-278.
- Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**: 9265-9269.
- Ignarro L.J., Harbison R.G., Wood K.S., Kadowitz P.J. (1986) Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **237**: 893-900.
- Inagami T., Naruse M., Hoover R. (1995) Endothelium as an endocrine organ. *Annu. Rev. Physiol.*, **57**: 171-189.
- Inoue M., Imanaga I. (1995) Mechanism of activation of nonselective cation channels by putative M4 muscarinic receptor in guinea-pig chromaffin cells. *Br. J. Pharmacol.*, **114**: 419-427.
- Ishikawa E., Ishikawa S., Davis J.W., Sutherland E.W. (1969) Determination of guanosine 3',5'-monophosphate in tissues and of guanyl cyclase in rat intestine. *J. Biol. Chem.*, **244**: 6371-6376.
- Jarchau T., Häusler C., Markert T., Pöhler D., Vandekerckhove J., De Jonge H.R., Lohmann S.M., Walter U. (1994) Cloning, expression and *in situ* localization of

- rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 9426-9430.
- Joh T.H., Park D.H., Reis D.J. (1978) Direct phosphorylation of brain tyrosine hydroxylase by cyclic AMP-dependent protein kinase: mechanism of enzymatic activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 4744-4746.
- Katz B. (1961) The transmission of impulses from nerve to muscle, and the subcellular unit of synaptic action. *Proc. Roy. Soc. London Ser.*, **B155**: 455-477.
- Kaupp U.B., Koch K.W. (1992) Role of cGMP and Ca<sup>2+</sup> in vertebrate photoreceptor excitation and adaptation. *Annu. Rev. Physiol.*, **54**: 153-175.
- Keaney J.F., Stamler J.S., Simon D.I., Jaraki O., Loscalzo J. (1993) S-Nitroso-bovine serum albumin: an NO adduct with EDRF-like properties. *J. Clin. Invest.*, **91**: 1582-1589.
- Keilbach A., Ruth P., Hofmann F. (1992) Detection of cGMP-dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur. J. Biochem.*, **208**: 467-473.
- Keith R.F., Elliot F. (1979) The preparation and use of isolated cells for metabolic studies. *Tech. Metabol. Res.*, **B204**: 1-20.
- Kidokoro Y., Ritchie A.K. (1980) Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from the rat adrenal medulla. *J. Physiol.*, **307**: 199-216.
- Kilpatrick D.L., Ledbetter F.H., Carson K.A., Kirshner A.G., Slepatis R., Kirshner N. (1980) Stability of bovine adrenal medulla cells in culture. *J. Neurochem.*, **35**: 679-692.
- Kimura H., Mittal C.K., Murad F. (1975) Activation of guanylate cyclase from rat liver and other tissues by sodium azide. *J. Biol. Chem.*, **250**: 8016-8022.
- Kimura H., Murad F. (1974) Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart. *J. Biol. Chem.*, **249**: 6910-6916.
- Kitayama S., Ohtsuki H., Morita K., Dohi T., Tsujimoto A. (1990) Bis-oxonol experiment on plasma membrane potentials of bovine adrenal chromaffin cells: depolarizing stimuli and their possible interaction. *Neurosci. Lett.*, **116**: 275-279.
- Knight D.E., Baker P.F. (1986) Observations of the muscarinic receptors of bovine adrenal medulla. *Neuroscience*, **19**: 357-366.
- Knowles R.G., Palacios M., Palmer R.M.J., Moncada S. (1989) Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 5159-5162.
- Kobayashi S., Coupland R.E. (1993) Morphological aspects of chromaffin tissue: the differential fixation of adrenaline and noradrenaline. *J. Anat.*, **183**: 223-235.
- Kobzik L., Reid M.B., Brecht D.S., Stamler J.S. (1994) Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature*, **372**: 546-548.
- Koch K.W. (1992) Biochemical mechanism of light adaptation in vertebrate photoreceptors. *Trends Biochem. Sci.*, **17**: 307-311.
- Koesling D., Hartenek Ch., Humbert P., Bosserhoff A., Frank R., Schultz G., Böhme E. (1990) The primary structure of the larger subunit of soluble guanylate cyclase from bovine lung. *FEBS Lett.*, **266**: 128-132.

- Koesling D., Herz J., Gausepohl H., Niroomand F., Hinsch K.-D., Mülsch H., Böhme E., Schultz G., Frank R. (1988) The primary structure of the 70 kDa subunit of soluble guanylate cyclase. *FEBS Lett.*, **239**: 29-34.
- Koller K.J., Lowe D.J., Bennett G.L., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H., Goeddel D.V. (1991) Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science*, **252**: 120-123.
- Komalavilas P., Lincoln T.M. (1996) Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J. Biol. Chem.*, **271**: 21933-21938.
- Kong J.Y., Thureson-Klein A., Klein R.L. (1989) Differential distribution of neuropeptides and serotonin in pig adrenal glands. *Neuroscience*, **28**: 765-775.
- Kumer S.C., Vrana K.E. (1996) Intricate regulation of Tyrosine Hydroxylase Activity and Gene Expression. *J. Neurochem.*, **67**: 443- 462.
- Kummer W., Behrends S., Schwarzlmüller T., Fischer A., Koesling D. (1996) Subunits of soluble guanylate cyclase in rat and guinea-pig sensory ganglia. *Brain Res.*, **721**: 191-195.
- Kuo J.F., Greengard P. (1970) Isolation and partial purification of a protein kinase activated by guanosine 3',5'-monophosphate. *J. Biol. Chem.*, **245**: 2493-2498.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Lafon-Cazal M., Pietri S., Culcasi M., Bockaert J. (1993) NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature*, **364**: 535-537.
- Lamas S., Marsden P.A., Li G.K., Tempst P., Michel T. (1992) Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**: 6348-6352.
- Landis D.M., Hall A.K., Weinstein L.A., Reese T.S. (1988) The organization of cytoplasm at the presynaptic active zone of a central nervous system synapse. *Neuron*, **1**: 201-209.
- Ledbetter F.H., Kirshner N. (1975) Studies of chick adrenal medulla in organ culture. *Biochem. Pharmacol.*, **24**: 967-974.
- LeDonne N.C., Coffee C.J. (1980) Evidence for calmodulin sensitive adenylate cyclase in bovine adrenal medulla. *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA.*, **27**: 402-403.
- Lee H.C. (1994) Cyclic ADP-ribose: a new member of a superfamily of signalling cyclic nucleotides. *Cell. Signal.*, **6**: 591-600.
- Lemaire S., Derome G., Tseng R., Mercier P., Lemaire I. (1981) Distinct regulations by calcium of cyclic GMP levels and catecholamine secretion in isolated bovine adrenal chromaffin cells. *Metabolism*, **30**: 462-468.
- Lemaire S., Dumont M., Mercier P., Lemaire I., Calver R. (1983) Biochemical characterization of various populations of isolated bovine adrenal chromaffin cells. *Neurochem. Int.*, **5**: 193-200.
- LeTrong H., Beier N., Sonnenburg W.K., Charbonneau H., Beavo J.A., Walsh K.A. (1990) Amino acid sequence of the cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine heart. *Biochemistry*, **29**: 10280-10288.

- Levin E.R. (1993) Natriuretic peptide C-receptor: more than a clearance receptor. *Am. J. Physiol.*, **264**: E483-E489.
- Levine W., Giuditta A., England S., Strecker H.J. (1960) Brain diaphorases. *J. Neurochem.*, **6**: 28-36.
- Levitt M., Spector S., Sjoerdsma A., Udenfriend S. (1965) Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **148**: 1-7.
- Lewis G.P. (1977) Physiological mechanisms controlling secretory activity of adrenal medulla. En *Handbook of Physiology: Endocrinology. Vol. VI Adrenal Gland*, (Greep R.O. y Astwood E.B. eds.), Am. Physiol. Society, 309-319. Washington D.C.
- Lia J., Bonaventura C., Bonaventura J., Stamler J.S. (1996) S-nitroso-haemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature*, **380**: 221-226.
- Light D.B., Corbin J.D., Stanton B.A. (1990) Dual ion-channel regulation by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase. *Nature*, **344**: 336-339.
- Lincoln T.M. (1995) Cyclic GMP receptor proteins: Role in nervous system and other tissues. En *Nitric Oxide in the Nervous System*, (Vincen S. ed.) 51-81, Academic Press, London.
- Lincoln T.M., Corbin J.D. (1977) Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate- and guanosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases: possible homologous proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 3229-3234.
- Linden D.J., Dickinson M.H., Smeyne M., Connor J.A. (1991) A long-term depression of AMPA currents in cultured cerebellar Purkinje neurons. *Neuron*, **7**: 81-89.
- Lipton S.A., Choi Y.-B., Lei S.Z., Chen H.-S.V., Loscalzo J., Stamler J.S. (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*, **364**: 626-632.
- Livett B. (1984) Adrenal Medullary Chromaffin Cells in Vitro. *Physiol. Rev.*, **64**: 1103-1161.
- Livett B.G., Kozousek V., Mizobe F., Dean D.M. (1979) Substance P inhibits nicotinic activation of chromaffin cells. *Nature*, **278**: 256-257.
- Llinas R., Sugimori M., Silver R.B. (1992) Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science*, **256**: 677-679.
- Lohmann S.M., Walter U., Miller P.E., Greengard P., DeCamilli P. (1981) Immunohistochemical localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 653-657.
- Lopez M.G., Artalejo A.R., García A.G., Neher E., García-Sancho J. (1995) Veratridine-induced oscillations of cytosolic calcium and membrane potential in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.*, **482**: 15-27.
- Lopez M.G., Fonteriz R.I., Gandía L., de la Fuente M., Villarroya M., García-Sancho J., García A.G. (1993) The nicotinic acetylcholine receptor of the bovine chromaffin cell, a new target for dihydropyridines. *Eur. J. Pharmacol.*, **247**: 199-207.
- Lopez M.G., Villarroya M., Lara B., Martínez-Sierra R., Albillos A., García A.G., Gandía L. (1994) Q- and L-type Ca<sup>2+</sup>-channels dominate the control of secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett.*, **349**: 331-337.

- Lowe D.G., Camerato T.R., Goeddel D.V. (1990) cDNA sequence of the human atrial natriuretic peptide clearance receptor. *Nucleic Acids Res.*, **18**: 3412-3418.
- Lowenstein C.J., Alley E.W., Raval P., Snowman A.M., Snyder S.H., Russell S.W., Murphy W.J. (1993) Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon  $\gamma$  and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**: 9730-9734.
- MacFarland R.T., Zelus B.D., Beavo J.A. (1991) High concentrations of a cGMP-stimulated phosphodiesterase mediate ANP-induced decreases in cAMP and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells. *J. Biol. Chem.*, **266**: 136-142.
- MacMillan-Crow L.A., Lincoln T.M. (1994) High-affinity binding and localization of the Cyclic GMP-dependent Protein Kinase with the Intermediate Filament Protein Vimentin. *Biochemistry*, **33**: 8035-8043.
- Malhotra R.K., Wakade A.R. (1987) Non-cholinergic component of rat splanchnic nerves predominates at low neuronal activity and is eliminated by naloxone. *J. Physiol.*, **383**: 639-652.
- Malinski T., Taha Z., Grunfeld S., Patton S., Kapturczak M., Tomboulion P. (1993) Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored *in situ* by porphyrinic microsensors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **193**: 1076-1082.
- Malinski T., Taha Z. (1992) Nitric oxide release from a single cell measured *in situ* by a porphyrinic-based microsensor. *Nature*, **358**: 676-678.
- Marletta M.A. (1994) Approaches toward selective-inhibition of nitric oxide synthase. *J. Med. Chem.*, **37**: 1899-1907.
- Marletta M.A. (1993) NO synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.*, **268**: 12231-12234.
- Marley P.D., McLeod J., Anderson C., Thomson K.A. (1995) Nerves containing nitric oxide synthase and their possible function in the control of catecholamine secretion in the bovine adrenal medulla. *J. Auton. Nerv. Syst.*, **54**: 184-194.
- Marley S., Prout G.I. (1965) Physiology and pharmacology of the splanchnic-adrenal medullary junction. *J. Physiol.*, **180**: 483-513.
- Marsden P.A., Antoniou H., Cheung A., Arbus A., Hall A.V. (1994) Characterization of the human neuronal nitric oxide synthase gene: Novel allelic and structural mRNA diversity. *Biochem. Mol. Biol. Nitric Oxide*, **31**: (abstract).
- Masters B.B.S., McMillan K., Sheta E.A., Nishimura J.S., Roman L.J., Martasek P. (1996) Neuronal nitric oxide synthase, a modular enzyme formed by convergent evolution: structure studies of a cysteine thiolate-liganded heme protein that hydroxylates L-arginine to produce NO<sup>•</sup> as cellular signal. *FASEB J.* **10**: 552-558.
- Mateo J., Castro E., Zwiller J., Aunis D., Miras-Portugal M.T. (1995) 5'-(N-ethylcarboxamido) adenosine inhibits Ca<sup>2+</sup> influx and activates a protein phosphatase in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.*, **64**: 77-84.
- Matsumoto T., Nakane M., Pollock J.S., Kuk J.E., Förstermann U. (1993) A correlation between soluble brain nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase activity is only seen after exposure of the tissue to fixative. *Neurosci. Lett.*, **155**: 61-64.
- Matsuoka I., Giuili G., Poyard M., Stengel D., Parma J., Guellaen G., Hanoune J. (1992) Localization of adenylyl and guanylyl cyclase in rat brain by *in situ*

- hybridization: comparison with calmodulin mRNA distribution. *J. Neurosci.*, **12**: 3350-3360.
- Mayer B., Böhme E. (1989)  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent formation of an L-arginine-derived activator of soluble guanylyl cyclase in bovine lung. *FEBS Lett.*, **256**: 211-214.
- Mayer B., John M., Böhme E. (1990) Purification of a calcium/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum: cofactor role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett.*, **277**: 215-219.
- Mayer B., Klatt P., Böhme E., Schmidt K. (1992) Regulation of neuronal nitric oxide and cyclic GMP formation by  $\text{Ca}^{2+}$ . *J. Neurochem.*, **59**: 2024-2029.
- Mayer B., Koesling D., Böhme E. (1993) Characterization of nitric oxide synthase, soluble guanylyl cyclase and  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-stimulated cGMP phosphodiesterase as components of neuronal signal transduction. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.*, **28**: 111-119.
- Mayer B., Schmidt K., Humbert P., Böhme E. (1989) Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells  $\text{Ca}^{2+}$ -dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**: 678-685.
- Mayer B., Schrammel A., Klatt P., Koesling D., Schmidt K. (1995) Peroxynitrite-induced accumulation of cyclic GMP in endothelial cells and stimulation of purified guanylyl cyclase. *J. Biol. Chem.*, **270**: 17355-17360.
- McFarland R.T., Zelus B.D., Beavo J.A. (1991) High concentrations of a cGMP-stimulated phosphodiesterase mediate ANP-induced decreases in cAMP and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells. *J. Biol. Chem.*, **266**: 136-142.
- Meacci E., Moos M., Taira M., Smith C.J., Vasta V., Degerman E., Movsesian M.A., Belfrage P., Manganiello V.C. (1991) Cloning of cDNA for a human cardiac cGMP-inhibited low Km cAMP phosphodiesterase (cGI PDE). *FASEB J.*, **5**: A454.
- Meriney S.D., Gray D.B., Pilar G.R. (1994) Somatostatin-induced inhibition of neural  $\text{Ca}^{2+}$ -current modulated by cGMP-dependent protein kinase. *Nature*, **369**: 336-339.
- Merkel L. (1993) Zaprinast: a cGMP-selective phosphodiesterase inhibitor. *Cardiovascular Drug Rev.*, **11**: 501-515.
- Mery P.F., Lohmann S.M., Walter U., Fischmeister R. (1991)  $\text{Ca}^{2+}$  current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**: 1197-1201.
- Michel T., Li G.K., Busconi L. (1993) Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**: 6252-6256.
- Miller R.J. (1990) Receptor-mediated regulation of calcium channels and neurotransmitter release. *FASEB J.*, **4**: 3291-3299.
- Miller J.P., Boswell K.M., Muneyama K., Simon M.L., Robins R.K., Shuman D.A. (1973) Synthesis and biochemical studies of various 8-substituted derivatives of guanosine 3',5'-cyclic phosphate, inosine 3',5'-cyclic phosphate and xanthine 3',5'-cyclic phosphate. *Biochem. J.*, **12**: 5310-5319.
- Miller W.H., Nicol G.D. (1979) Evidence that cyclic GMP regulates membrane potential in rod photoreceptors. *Nature*, **280**: 64-66.

- Mintz I.M., Venema V.J., Swiderek K., Lee T., Bean B.P., Adams M.E. (1992) P-type calcium channels blocked by the spider toxin  $\omega$ -Aga-IVA. *Nature*, **355**: 827-829.
- Miras-Portugal M.T., Pintor J., Castro E., Rodríguez-Pascual F., Torres M. (1994) Diadenosine polyphosphates from neurosecretory granules: the search for receptors, signals and function. En *Cell Signal Transduction*, (Municio A.M. y Miras-Portugal M.T. eds.) Plenum Press, New York, 169-186.
- Miras-Portugal M.T., Rotllán P., Aunis D. (1985) Incorporation of adenosine into nucleotides of chromaffin cells maintained in primary cultures. *Neurochem. Int.*, **7**: 89-93.
- Mitra A.K., McCarthy M.P., Stroud R.M. (1989) Three-dimensional structure of the nicotinic acetylcholine receptor, and location of the major associated 43 kDa cytoskeletal protein, determined at 22 Å by low dose electron microscopy and X-ray diffraction to 12.5 Å. *J. Cell. Biol.*, **109**: 755-774.
- Miyahara M., Ito M., Itoh H., Shiraishi T., Isaka N., Konishi T., Nakano T. (1995) Isoenzymes of cyclic nucleotide phosphodiesterase in the human aorta: characterization and the effects of E4021. *Eur. J. Pharmacol.*, **284**: 25-33.
- Mizobe F., Kozousek K., Dean D.M., Livett B.G. (1979) Pharmacological characterization of adrenal paraneurons: substance P and somatostatin as inhibitory modulators of the nicotinic response. *Brain Res.*, **178**: 555-566.
- Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, **43**: 109-142.
- Morgan A., Burgoyne R.D. (1992) Exo1 and Exo2 proteins stimulate calcium-dependent exocytosis in permeabilized adrenal chromaffin cells. *Nature*, **355**: 833-835.
- Morgan A., Burgoyne R.D. (1995) A role for soluble NSF attachment proteins (SNAPs) in regulated exocytosis in adrenal chromaffin cells. *EMBO J.*, **14**: 232-239.
- Morita K., Dohi T., Kitayama S., Tsujimoto A. (1991) Mechanism of cyclic AMP facilitation of stimulation-evoked catecholamine release in adrenal chromaffin cells. I. Evidence for enhancement of evoked increase in cytosolic free  $\text{Na}^+$  concentration by cyclic AMP elevation. II. Inhibition of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase by cyclic AMP. *Neurochem. Int.*, **19**: 71-85.
- Moro M.A., García A.G., Langley O.K. (1991) Characterization of two chromaffin cell populations isolated from bovine adrenal medulla. *J. Neurochem.*, **57**: 363-369.
- Moro M.A., López M.G., Gandía L., Michelena P., García A.G. (1990) Separation and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medulla. *Anal. Biochem.*, **185**: 243-248.
- Moro M.A., Michelena P., Sánchez-García P., Palmer R., Moncada S., García A.G. (1993) Activation of adrenal medullary L-arginine:nitric oxide pathway by stimuli which induce the release of catecholamines. *Eur. J. Pharmacol.*, **246**: 213-218.
- Moro M.A., Russell R.J., Celtek S., Lizasoain I., Su Y., Darley-Usmar V.M., Radomski M.W., Moncada S. (1996) cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 1480-1485.
- Morris R., Nosten-Bertrand M. (1996) NOS and aggression. *Trends Neurosci. Sci.*, **19**: 277-278.

- Murell W. (1879) Nitroglycerine as a remedy for angina pectoris. *Lancet*, **1**: 80-81; 113-115; 151-152; 225-227.
- Murphy S., Simmons M.L., Agulló L., García A., Feinstein D.L., Galea E., Reis D.J., Minc-Golomb D., Schwartz J.P. (1993) Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci.*, **16**: 323-328.
- Nakaki T., Sasakawa N., Yamamoto S., Kato R. (1988) Functional shift from muscarinic to nicotinic cholinergic receptors involved in inositol trisphosphate and cyclic GMP accumulation during the primary culture of adrenal chromaffin cells. *Biochem. J.*, **251**: 397-403.
- Nakane M., Arai K., Saheki S., Kuno T., Buechler W., Murad F. (1990) Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J. Biol. Chem.*, **265**: 16841-16845.
- Nakane M., Mitchell J., Förstermann U., Murad F. (1991) Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **180**: 1396-1402.
- Nakane M., Saheki S., Kuno T., Ishii K., Murad F. (1988) Molecular cloning of a cDNA coding for 70 kilodalton subunit of soluble guanylyl cyclase from rat lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**: 1139-1147.
- Nathan C.F., Hibbs J.B. (1991) Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.*, **3**: 65- 70.
- Neher E., 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.
- Neher E., Zucker R.S. (1993) Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron*, **10**: 21- 30.
- Nelson R.J., Demas G.E., Huang P.L., Fishman M.C., Dawson V.L., Dawson T.M., Snyder S.H. (1995) Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature*, **378**: 383- 386.
- Nguyen T.T., Babinski K., Ong H., De Léan A. (1990) Differential regulation of natriuretic peptide biosynthesis in bovine adrenal chromaffin cells. *Peptides*, **11**: 973-978.
- Nicholls D.G. (1994) Proteins, transmitters and synapses. Blackwell Scientific publications.
- Niggli V., Knight D.E., Baker P.E., Vigny A., Henry J.P. (1984) Tyrosine hydroxylase in "leaky" adrenal medullary cells: evidence for *in situ* phosphorylation by separate  $Ca^{2+}$  and cyclic AMP-dependent systems. *J. Neurochem.*, **43**: 646-658.
- Niina H., Kobayashi H., Yamamoto R., Yuhi T., Yanagita T., Wada A. (1996) Receptors for atrial natriuretic peptide in adrenal chromaffin cells. *Biochem. Pharmacol.*, **51**: 855-858.
- Nooney J.M., Peters J.A., Lambert J.J. (1992) A patch clamp study of the nicotinic acetylcholine receptor of bovine adrenomedullary chromaffin cells in culture. *J. Physiol.*, **454**: 129-.
- Nordstrom O., Bartfai T. (1981) 8-Br-cyclic GMP mimics activation of muscarinic autoreceptor and inhibits acetylcholine release from rat hippocampal slices. *Brain Res.*, **213**: 467-471.

- Núñez L., Fuente M.T., García A.G., García-Sancho J. (1995) Differential  $\text{Ca}^{2+}$  responses of adrenergic and noradrenergic chromaffin cells to various secretagogues. *Am. J. Physiol.*, **269**: C1540-C1546.
- O'Dell T.J., Hawkins R.D., Kandel E.R., Arancio O. (1991) Tests on the roles of two diffusible substances in LTP: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**: 11285-11289.
- Ogreid D., Ekanger R., Suva R.H., Miller J.P., Sturm P., Corbin J.D., Doskeland S.O. (1985) Activation of protein kinase isozymes by cyclic nucleotide analogs used simply or in combination. *Eur. J. Biochem.*, **150**: 219-227.
- Okabe T., Sugimoto N., Matsuda M. (1992) Calmodulin is involved in catecholamine secretion from digitonin-permeabilized bovine adrenal medullary chromaffin cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **186**: 1006-1011.
- Okazaki M., Yanagihara N., Izumi F., Nakashima Y., Kuroiwa A. (1989) Carbachol-induced cosecretion of immunoreactive atrial natriuretic peptides with catecholamines from cultured bovine adrenal medullary cells. *J. Neurochem.*, **52**: 222-228.
- Olivéra B.M., Miljanich G.P., Ramachandran J., Adams M.E. (1994) Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the  $\omega$ -conotoxins and  $\omega$ -agatoxins. *Annu. Rev. Biochem.*, **63**: 823-867.
- Olson D.R., Kon C., Beckenridge B.M. (1976) Calcium ion effects on guanylate cyclase of brain. *Life Sci.*, **18**: 935-940.
- Ong H., Lazure C., Nguyen T.T., McNicoll N., Seidah N.G., Chrétien M., De Léan A. (1987) Bovine adrenal chromaffin granules are site of synthesis of atrial natriuretic factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**: 957-963.
- Oset-Gasque M.J., Parramón M., Hortelano S., Bosca L., González M.P. (1994) Nitric oxide implication in the control of neurosecretion by chromaffin cells. *J. Neurochem.*, **63**: 1693-1700.
- O'Sullivan A.J., Burgoyne R.D. (1990) Cyclic GMP regulates nicotine-induced secretion from cultured bovine adrenal chromaffin cells: effects of 8-Bromo-cyclic GMP, atrial natriuretic peptide, and nitroprusside (nitric oxide). *J. Neurochem.*, **54**: 1805-1808.
- Palacios M., Knowles R.G., Palmer R.M.J., Moncada S. (1989) Nitric Oxide from L-arginine stimulates the soluble guanylate cyclase in adrenal glands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**: 802-809.
- Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**: 524-526.
- Parramon M., Gonzalez M.P., Oset-Gasque M.J. (1995) A reassessment of the modulatory role of cyclic AMP in catecholamine secretion by chromaffin cells. *Br. J. Pharmacol.*, **114**: 517-523.
- Parsons T.D., Coorsen J.R., Horstmann H., Almers W. (1995) Docked granules, the exocytic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells. *Neuron*, **15**: 1085-1096.
- Patel M.J., Wypij D.M., Rose D.A., Rimele T.J., Wiseman J.S. (1995) Secretion of cyclic GMP by cultured epithelial and fibroblast cell lines in response to nitric oxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **273**: 16-25.

- Peach M.J. (1972) Stimulation of release of adrenal catecholamine by cAMP and theophylline in the absence of extracellular calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **69**: 834-836.
- Pfeiffer S., Leopold E., Schmidt K., Brunner F., Mayer B. (1996) Inhibition of nitric oxide synthesis by N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine. *Br. J. Pharmacol.*, **118**: 1433-1440.
- Phillips J.H. (1982) Dynamics aspects of chromaffin granule structure. *Neuroscience*, **7**: 1595-1609.
- Pollock J.S., Förstermann U., Mitchell J.A., Warner T.D., Schmidt H.H.W., Nakane M., Murad F. (1991) Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**: 10480-10484.
- Pollock J.S., Nakane M., Buttery L.K., Martínez A., Springall D., Polak J.M., Förstermann U., Murad F. (1993) Characterization and localization of endothelial nitric oxide using specific monoclonal antibodies. *Am. J. Physiol.*, **265**: C1379-C1387.
- Potter L.R., Garbers D.L. (1992) Protein kinase C-dependent desensitization of the atrial natriuretic peptide receptor is mediated by dephosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **269**: 14636-14642.
- Pou S., Pou W.S., Bredt D.S., Snyder S.H., Rosen G.M. (1992) Generation of superoxide by purified nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, **267**: 24173-24176.
- Pruss R.M., Zamir N. (1987) Regulated expression of atrial natriuretic peptide-like immunoreactivity in cultured bovine adrenomedullary chromaffin cells. *Neurochem. Int.*, **11**: 299-304.
- Pumplin D.W., Reese T.S., Llinas R. (1981) Are the presynaptic membrane particles the calcium channels? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**: 7210-7213.
- Radi R., Beckman J.S., Busch K.M., Freeman B.A. (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, **266**: 4244-4250.
- Radomski M.W., Palmer R.M., Moncada S. (1991) Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway. *Trends Pharmacol. Sci.*, **12**: 87-88.
- Rapoport R.M., Draznin M.B., Murad F. (1982) Sodium nitroprusside-induced protein phosphorylation in intact rat is mimicked by 8-bromo cyclic GMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 6470-6474.
- Rapoport R.M., Ashraf M., Murad F. (1989) Effects of melittin on endothelium-dependent relaxation and cyclic GMP levels in rat aorta. *Circ. Res.*, **64**: 463-473.
- Rapoport R.M., Murad F. (1983) Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ. Res.*, **52**: 352-37.
- Reinecke M., David I., Loffing-Cueni D., Ablinger P., Cetin Y., Kuhn M., Forssmann W.G. (1996) Localization, expression, and characterization of guanylin in the rat adrenal medulla. *Histochem. Cell. Biol.*, **106**: 367-374.
- Reinhart P.H., Chung S.K., Martin B.L., Brautigan D.L., Levitan I.B. (1991) Modulation of calcium-activated potassium channels from rat brain by protein kinase A and phosphatase 2A. *J. Neurosci.*, **11**: 1627-1635.

- Ribeiro P., Wang Y., Citron B.A., Kaufman S. (1992) Regulation of recombinant rat tyrosine hydroxylase by dopamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**: 9593-9597.
- Robinson I.M., Finnegan J.M., Monck J.R., Wightman R.M., Fernandez J.M. (1995) Colocalization of calcium entry and exocytosis release sites in adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**: 2474-2478.
- Robison G.A., Butcher R.W., Sutherland E.W. (1968) Cyclic AMP. *Annu. Rev. Biochem.*, **37**: 149-174.
- Rogers N.E., Ignarro L.J. (1992) Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide formed from L-arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **189**: 242-249.
- Role L.W., Perlman R.L. (1980) Purification of adrenal medullary chromaffin cells by density gradient centrifugation. *J. Neurosci. Methods*, **2**: 253-265.
- Rosario L.M., Soria B., Feuerstein G., Pollard H.B. (1989) Voltage-sensitive calcium flux into bovine chromaffin cells occurs through dihydropyridine-sensitive and dihydropyridine- and  $\omega$ -conotoxin-insensitive pathways. *Neuroscience*, **29**: 735-747.
- Rosenzweig A., Seidman C.E. (1991) Atrial natriuretic factor and related peptide hormones. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**: 229-255.
- Roskoski R.Jr., Roskoski L.M. (1987) Activation of Tyrosine Hydroxylase in PC12 cells by the cyclic GMP and cyclic AMP second messenger systems. *J. Neurochem.*, **48**: 236-242.
- Roskoski R.Jr., Vulliet P.R., Glass D.B. (1987) Phosphorylation of tyrosine hydroxylase by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J. Neurochem.*, **48**: 840-845.
- Ruth P., Landgraf W., Keilbach A., May B., Egleme C., Hofmann F. (1991) The activation of expressed cGMP-dependent protein kinase isozymes I $\alpha$  and I $\beta$  is determined by the different amino-termini. *Eur. J. Biochem.*, **202**: 1339-1344.
- Saeki T., Saito I. (1993) Isolation of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes from pig aorta. *Biochem. Pharmacol.*, **46**: 833-839.
- Sarafian T., Aunis D., Bader M.F. (1987) Loss of proteins from digitonin-permeabilized adrenal chromaffin cells is essential for exocytosis. *J. Biol. Chem.*, **262**: 16671-16676.
- Sarih M., Souvannavong V., Adam A. (1993) Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **191**: 503-508.
- Schlichter D.J., Casnellie J.E., Greengard P. (1978) An endogenous substrate for cGMP-dependent protein kinase in mammalian cerebellum. *Nature*, **273**: 61-62.
- Schlichter D.J., Detre J.A., Aswad D.W., Chehrazi B., Greengard P. (1980) Localization of cyclic GMP-dependent protein kinase and substrate in mammalian cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **77**: 5537-5541.
- Schmidt H.H.H.W., Gagne G.D., Nakane M., Pollock J.S., Miller M.F., Murad F. (1992a) Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent colocalization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J. Histochem. Cytochem.*, **40**: 1439-1456.

- Schmidt H.H.W., Lohmann S.M., Walter U. (1993) The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1178**: 153-175.
- Schmidt H.H.W., Pollock J.S., Nakane M., Gorsky L.D., Förstermann U., Murad F. (1991) Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**: 365-369.
- Schmidt H.H.W., Warner T.D., Ishii K., Sheng H., Pollock J.S., Murad F. (1992b) Insulin secretion from pancreatic  $\beta$  cells caused by L-arginine-derived nitrogen oxides. *Science*, **255**: 721-723.
- Schneider A.S., Cline H.T., Lemaire S. (1979) Rapid rise in cyclic GMP accompanies catecholamine secretion in suspensions of isolated adrenal chromaffin cells. *Life Sci.*, **24**: 1389-1394.
- Schramm M., Thomas G., Towart R., Franckowiak G. (1983) Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of  $Ca^{2+}$  channels. *Nature*, **309**: 535-537.
- Schulz S., Green K.C., Green P.S.T., Garbers D.L. (1990) Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell*, **63**: 941-948.
- Schulz S., Singh S., Bellet R.E., Singh G., Tubb D.J., Chin H., Garbers D.L. (1989) The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell*, **58**: 1155-1162.
- Schuman E.M., Madison D.V. (1991) A requirement for the intracellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science*, **254**: 1503-1506.
- Sekhar K.R., Hatchett R.J., Shabb J.B., Wolfe L., Francis S.H., Wells J.W., Jastorff B., Butt E., Chakinala M.M., Corbin J.D. (1992) Relaxation of pig coronary arteries by new and potent cGMP analogs that selectively activate type I $\alpha$  compared to type I $\beta$  cGMP-dependent protein kinase. *Mol. Pharmacol.*, **42**: 103-108.
- Sena C.M., Tome A.R., Santos R.M., Rosario L.M. (1995) Protein kinase C activator inhibits voltage-sensitive  $Ca^{2+}$  channels and catecholamine secretion in adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett.*, **359**: 137-141.
- Sessa W.C., Harrison J.K., Barber C.M., Zeng D., Durieux M.E., D'Angelo D.D., Lynch K.R., Peach M.J. (1992) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, **267**: 15274-15276.
- Sharma R.K., Wang J.H. (1986) Purification and characterization of bovine lung calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. An enzyme containing calmodulin as a subunit. *J. Biol. Chem.*, **261**: 14160-14166.
- Shyjan A.W., DeSauvage F.J., Gillett N.A., Goeddel D.V., Lowe D.G. (1992) Molecular cloning of a retina-specific membrane guanylyl cyclase. *Neuron*, **9**: 727-737.
- Simard J.M., Tewari K., Kaul A., Nowicki B., Chin L.S., Singh S.K., Pérez-Polo J.R. (1996) Early signaling events by endotoxin in PC12 cells: involvement of tyrosine kinase, constitutive nitric oxide synthase, cGMP-dependent protein kinase, and  $Ca^{2+}$  channels. *J. Neurosci. Res.* **45**: 216-225.
- Simmons M.A., Hartzell H.C. (1988) Role of phosphodiesterase in regulation of calcium current in isolated cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.*, **33**: 664-671; erratum 34, 604 (1988).

- Simmons M.L., Murphy S. (1992) Induction of nitric oxide synthase in glial cells. *J. Neurochem.*, **59**: 897-905.
- Son H., Hawkins R.D., Martin K., Kiebler M., Huang P.L., Fishman M.C., Kandel E.R. (1996) Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell*, **87**: 1015-1023.
- Song D.L., Kohse K.P., Murad F. (1988) Brain natriuretic factor. Augmentation of cellular cyclic GMP, activation of particulate guanylate cyclase and receptor binding. *FEBS Lett.*, **232**: 125-129.
- Sonnenburg W.K., Mullaney P.J., Beavo J.A. (1991) Molecular cloning of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase cDNA. Identification and distribution of isozyme variants. *J. Biol. Chem.*, **266**: 17655-17661.
- Sonnenburg W.K., Seger D., Beavo J.A. (1993) Molecular cloning of a cDNA encoding the "61-kDa" calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase: Tissue-specific expression of structurally related isoforms. *J. Biol. Chem.*, **268**: 645-652.
- Southam E., Garthwaite J. (1991) Intercellular action of nitric oxide in adult rat cerebellar slices. *NeuroReport*, **2**: 658-660.
- Southan G.J., Gross S.S., Vane J.R. (1993) Amides and esters of N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine (eg L-NAME) must be hydrolyzed to become active NO synthase inhibitors. *Br. J. Pharmacol.*, **109**: 12.
- Spedding M., Paoletti R. (1992) Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharm. Rev.*, **44**: 363-376.
- Stone J.R., Marletta M.A. (1996) Spectral and kinetic studies on the activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochemistry*, **35**: 1093-1099.
- Stryer L. (1986) Cyclic GMP cascade of vision. *Ann. Rev. Neurosci.*, **9**: 87-119.
- Stuart A.E., Hudspeth A.J., Hall Z.W. (1974) Staining of specific monoamine containing cells in the leech nervous system. *Cell. Tissue Res.*, **153**: 55-61.
- Stuehr D.J., Cho H.J., Kwon N.S., Weise M.F., Nathan C.F. (1991a) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**: 7773-7777.
- Stuehr D.J., Fasehum O.A., Kwon N.S., Gross S.S., González J.A., Levi R., Nathan C.F. (1991b) Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analog. *FASEB J.*, **5**: 98.
- Stuehr D.J., Marletta M.A. (1985) Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**: 7738-7742.
- Stuehr D.J., Nathan C.F. (1989) Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.*, **169**: 1543-1545.
- Sudhof T.C. (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*, **375**: 645-653.
- Suga S.I., Itoh H., Komatsu Y., Ogawa Y., Hama N., Yoshimasa T., Nakao K. (1993) Cytokine-induced C-type natriuretic peptide (CNP) secretion from vascular endothelial cells, evidence for CNP as a novel autocrine/paracrine regulator from endothelial cells. *Endocrinology*, **133**: 3038-3041.

- Sumii K., Sperelakis N. (1995) cGMP-dependent protein kinase regulation of the L-type  $Ca^{2+}$  current in rat ventricular myocytes. *Circ. Res.*, **77**: 803-812.
- Sutherland C., Alterio J., Campbell D.G., LeBourdelle B., Mallet J., Haavik J., Cohen P. (1993) Phosphorylation and activation of human tyrosine hydroxylase *in vitro* by mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP kinase-activated kinases 1 and 2. *Eur. J. Biochem.*, **217**: 715-722.
- Sutherland E.W., Rall T.W. (1958) Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J. Biol. Chem.*, **232**: 1077-1091.
- Suzuki N., Nomura K., Ohtake H., Isaka S. (1981) Purification and the primary structure of sperm-activity peptides from the jelly coat of sea urchin eggs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **99**: 1238-1244.
- Takio K., Wade R.D., Smith S.B., Krebs E.G., Walsh K.A., Titani K. (1984) Guanosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase, a chimeric protein homologous with two separate protein families. *Biochemistry*, **23**: 4207-4218.
- Thomas S.A., Matsumoto A.M., Palmiter R.D. (1995) Noradrenaline is essential for mouse fetal development. *Nature*, **374**: 643-646.
- Thomas-Reetz A.C., De Camilli P. (1994) A role for synaptic vesicles in non-neuronal cells: clues from pancreatic  $\beta$ -cells and from chromaffin cells. *FASEB J.*, **8**: 209-216.
- Thorpe D.S., Garbers D.L. (1989) The membrane form of guanylate cyclase. Homology with a subunit of the cytoplasmic form of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, **264**: 6545-6549.
- Tischler A.S., Riseberg J.C., Hardenbrook M.A., Cherington V. (1993) Nerve growth factor is a potent inducer of proliferation and neuronal differentiation for adult rat chromaffin cells *in vitro*. *J. Neurosci.*, **13**: 1533-1542.
- Tomlinson A., Coupland R.E. (1990) The innervation of the adrenal gland. Innervation of the rat adrenal medulla from birth to old age. A descriptive and quantitative morphometric and biochemical study of the innervation of chromaffin cells and adrenal medullary neurons in Wistar rats. *J. Anat.*, **169**: 209-236.
- Torres M., Ceballos G., Rubio R. (1994) Possible role of nitric oxide in catecholamine secretion by chromaffin cells in the presence and absence of cultured endothelial cells. *J. Neurochem.*, **63**: 988-996.
- Tsien R.Y. (1981) A non-disruptive technique for loading calcium buffers and ion indicators into cells. *Nature*, **290**: 527-528.
- Tsou K., Snyder G.L., Greengard P. (1993) Nitric oxide/cGMP pathway stimulates phosphorylation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, in the substantia nigra. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**: 3462-3465.
- Unsicker K. (1993) The chromaffin cell: paradigm in cell, developmental and growth factor biology. *J. Anat.*, **183**: 207-221.
- Unsicker K., Griesser G.-H., Lindmar R., Löffelholz K., Wolf U. (1980) Establishment, characterization and fibre outgrowth of isolated bovine adrenal medullary cells in long-term cultures. *Neuroscience*, **5**: 1445-1460.
- Unsicker K., Müller T.H. (1981) Purification of bovine adrenal chromaffin cells by differential plating. *J. Neurosci. Methods*, **4**: 227-241.

- Uzunov P., Gnegy M.E., Revuelta A., Costa E. (1976) Regulation of the high Km cyclic nucleotide phosphodiesterase of adrenal medulla by the endogenous calcium-dependent protein activator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**: 132-138.
- Varner P.D., Beckman J.S. (1995) Nitric oxide toxicity in neuronal injury and degeneration. En *Nitric Oxide in the Nervous System*, (Vincen S. ed.) 191-206, Academic Press, London.
- Vatta M.S., Papouchado M.L., Bianciotti L.G., Fernández B.E. (1993) Atrial natriuretic factor inhibits noradrenaline release in the presence of angiotensin II and III in the rat hypothalamus. *Comp. Biochem. Physiol.*, **106C**: 545-548.
- Verma A., Hirsch D.J., Glatt C.E., Ronnett G.V., Snyder S.H. (1993) Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science*, **259**: 381-384.
- Vincent S.R., Kimura H. (1992) Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*, **46**: 755-784.
- Vinson G.P., Pudney J.A., Whitehouse B.J. (1985) The mammalian adrenal circulation and the relationship between adrenal flow and steroidogenesis. *J. Endocr.*, **105**: 285-294.
- Vitale M.L., Rodríguez del Castillo A., Trifaró J.M. (1992) Protein kinase C activation by phorbol esters induces chromaffin cell cortical filamentous actin disassembly and increases the initial rate of exocytosis in response to nicotinic receptor stimulation. *Neuroscience*, **51**: 463-474.
- Vitale M.L., Seward E.P., Trifaró J.M. (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.
- Vollmer R.R. (1996) Selective neural regulation of epinephrine and norepinephrine cells in the adrenal medulla. Cardiovascular implications. *Clin. Exp. Hypertens.*, **18**: 731-751.
- Vulliet P.R., Woodgett J.R., Ferrari S., Hardie D.G. (1985) Characterization of the sites phosphorylated on tyrosine hydroxylase by  $Ca^{2+}$  and phospholipid-dependent protein kinase, calmodulin-dependent protein kinase and cyclic AMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.*, **182**: 335-339.
- Wakade T.D., Blank M.A., Malhotra R.K., Pourcho R., Wakade A.R. (1991) The peptide VIP is a neurotransmitter in rat adrenal medulla: physiological role in controlling catecholamine release. *J. Physiol.*, **444**: 349-362.
- Walsh K.B., Wilson S.P., Long K.J., Lemon S.C. (1996) Stimulatory regulation of the large-conductance, calcium-activated potassium channel by G proteins in bovine adrenal chromaffin cells. *Mol. Pharmacol.*, **49**: 379-386.
- Walter U. (1981) Distribution of Cyclic-GMP-Dependent Protein Kinase in various rat tissues and cell lines determined by a sensitive and specific radioimmunoassay. *Eur. J. Biochem.*, **118**: 339-346.
- Walter U., Eigenthaler M., Geiger J., Reinhard M. (1993) Role of cyclic nucleotide-dependent protein kinases and their common substrate VASP in the regulation of human platelets. En *Mechanisms of platelet activation and control*. (K.S. Authi *et al.* eds.), 237-249, Plenum Press.
- Wang X., Robinson P.J. (1997) Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J. Neurochem.* **68**: 443-456.

- Watanabe T., Shimamoto N., Takahashi A., Fujimo M. (1995) PACAP stimulates catecholamine release from adrenal medulla: a novel non-cholinergic secretagogue. *Am. J. Physiol.*, **269**: E903-E909.
- Wernet W., Flockerzi V., Hofmann F. (1989) The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.*, **251**: 191-196.
- White A.A., Aurbach G.D. (1969) Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta.*, **191**: 686-697.
- White M.F. (1985) The transport of cationic amino acids across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, **822**: 355-374.
- Wilcox J.N., Augustine A., Goeddel D.V., Lowe D.G. (1991) Differential regional expression of three natriuretic peptide receptor genes within primate tissues. *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 3454-3462.
- Wilson S.P. (1987) Purification of adrenal chromaffin cells on Renografin gradients. *J. Neurosci. Methods*, **19**: 163-171.
- Winkler H. (1976) The composition of adrenal chromaffin granules: an assessment of controversial results. *Neuroscience*, **1**: 65-80.
- Winkler H., Carmichael S.W. (1982) The chromaffin granule. En *The secretory granule*. (Poisner y Trifaró, eds.), 3-79, Elsevier Biomedical Press.
- Wolfe L., Corbin J.D., Francis S.H. (1989) Characterization of a novel isozyme of cGMP-dependent protein kinase from bovine aorta. *J. Biol. Chem.*, **264**: 7734-7741.
- Yamada Y., Yokota M. (1996) Production of C-type natriuretic peptide in human aortic endothelial cells induced by activation of protein kinase C. *Am. J. Hypertens.*, **9**: 924-929.
- Yamamoto T., Manganiello V.C., Vaughan M. (1983) Purification and characterization of cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from calf liver. *J. Biol. Chem.*, **258**: 12526- 12533.
- Yanagihara N., Toyohira Y., Yamamoto H., Ohta Y., Tsuitsui M., Miyamoto E., Izumi F. (1994) Occurrence and activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and its endogenous substrates in bovine adrenal medullary cells. *Mol. Pharmacol.*, **46**: 423-430.
- Yoshida Y., Sun H.T., Cai J.Q., Imai S. (1991) Cyclic GMP-dependent protein kinase stimulates the plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump ATPase of vascular smooth muscle via phosphorylation of a 240-kDa protein. *J. Biol. Chem.*, **266**: 19819-19825.
- Yuen P.S.T., Potter L.R., Garbers D.L. (1990) A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney. *Biochemistry*, **29**: 10872-10878.
- Zagotta W.N. (1996) Molecular mechanisms of cyclic nucleotide-gated channels. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **28**: 269-278.
- Zhou M., Small S.A., Kandel E.R., Hawkins R.D. (1993) Nitric oxide and carbon monoxide produce long-term enhancement of synaptic transmission in the hippocampus by an activity-dependent mechanism. *Science*, **260**: 1946-1949.
- Zhou Q.Y., Quaife C.J., Palmiter R.D. (1995) Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development. *Nature*, **374**: 640-643.

- Zhou Z., Neher E. (1993) Calcium permeability of nicotinic acetylcholine receptor channels in bovine adrenal chromaffin cells. *Pflügers Arch.*, **425**: 511-517.
- Zigmond R.E., Schwarzschild M.A., Rittenhouse A.R. (1989) Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *Annu. Rev. Neurosci.*, **12**: 415-461.
- Zimmermann A.L., Yamanaka G., Eckstein F., Baylor D.A., Stryer L. (1985) Interaction of hydrolysis-resistant analogs of cyclic GMP with the phosphodiesterase and light-sensitive channel of retinal rod outer segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 8813-8817.
- Zwiller J., Ghandour M.S., Revel M.O., Basset P. (1981) Immunohistochemical localization of guanylate cyclase in rat cerebellum. *Neurosci. Lett.*, **23**: 31-36.