

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II**



**Receptores de GABA en células bovinas:  
estructura, farmacología y mecanismos de acción  
molecular**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Mónica Parramón Ponz**

**Directores**

**M<sup>a</sup> Jesús Oset Gasque**

**M<sup>a</sup> Pilar González González**

**Madrid 2005**



---

*Receptores de GABA en células cromafines  
bovinas: estructura, farmacología y  
mecanismos de acción molecular*

---

Ponente: Sr. Dr. Mónica Parramón Ponz

TRIBUNAL

Presidente: Sr. Dr. Marnet Benito de las Heras

Vocal: Sr. Dr. Valentín Ceña Callejo

Vocal: Sr. Dr. Salvador Viniegra Bover

Vocal: Sr. Dr. M<sup>ra</sup> Angeles Mena Gomez

Secretario: Sr. Dr. M<sup>ra</sup> Teresa Miras Portuga P.

Memoria presentada por Dña. **Mónica Parramón Ponz**  
para optar al grado de Doctora en Farmacia



*El presente trabajo de investigación se ha realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II e Instituto de Bioquímica (C.S.I.C.) de la Facultad de Farmacia de la U.C.M., bajo la dirección de las Dras. Dña. M<sup>a</sup> Jesús Oset Gasque y Dña. M<sup>a</sup> Pilar González González*



Este trabajo de investigación es el resultado del esfuerzo y el apoyo de muchas personas, a quienes quisiera especialmente mencionar en agradecimiento:

Al Prof. Dr. D. Manuel Ruiz Amil y a la Dra. Dña. Ana Mª Pascual Leone, directores ambos del Centro donde esta Tesis se ha realizado, por aportar el soporte necesario para que se realizara.

A mis directoras de Tesis, Dras. Dña Mª Jesús Oset Gasque y Dña. Mª Pilar González González, por sus enseñanzas y su dedicación.

A mi familia y amigos, de quienes he recibido constante apoyo y estímulo. A Julio, por su compañía en los días buenos y en los malos.

A los trabajadores de Matadero Municipal, por mostrarme que con buen humor se puede desempeñar cualquier actividad.

A los miembros de mi grupo y a todos los compañeros del Departamento, de quienes he recibido también incontables enseñanzas.

Quisiera dedicar especialmente esta Tesis Doctoral a todas las personas que en estos años han conocido la guerra.

## CONSEJOS DE AGUSTIN DE HIPONA A LA JUVENTUD DEL SIGLO IV

- Si te dedicas al estudio, debes mantenerte limpio de cuerpo y de espíritu; alimentarte de comida sana, vestirse con sencillez y no consumir superfluamente.
- A la sobriedad en las costumbres, le debe corresponder la moderación en las actitudes, la tolerancia en el trato, la honradez en el comportamiento y la exigencia para contigo mismo.
- Ten siempre presente que la obsesión por el dinero es veneno que mata toda esperanza.
- No actúes con debilidad, ni tampoco con audacia.
- Aleja de ti toda ira, o trata de controlarla, cuando corrijas las faltas de los demás.
- Sé el centinela de ti mismo: vigila tus sentimientos y tus deseos para que no te traicionen.
- Reconoce tus defectos y procura corregirlos.
- No seas excesivo en el castigo, ni tacaño en el perdón.
- Sé tolerante con los que tienden a mejorar, y precavido con los que tienden a empeorar.
- Ten como a miembros de la familia a los que están bajo tu potestad.
- Sirve a todos de tal modo que te avergüence dominar, y domina de modo que te agrade servir.
- No insistas ni molestes a los que no quieren corregirse.
- Evita cuidadosamente las enemistades, sopórtalas alegremente, terminalas inmediatamente.
- En el trato y en la conversación con los demás, sigue siempre el viejo proverbio: «no hagas a nadie lo que no quieras que te hagan a ti».
- No busques puestos de mando si no estás dispuesto a servir.
- Procura progresar siempre, no importa la edad y las circunstancias en las que te encuentres.
- Durante toda tu vida, en todo tiempo y lugar, ten amigos de verdad, o búscalos.
- Da honor a quien se lo merece, aunque él no lo desee.
- Aléjate de los soberbios; esfuérzate tú por no serlo.
- Vive con dignidad y en armonía con todo y con todos.
- Busca a Dios; que su conocimiento llene tu existencia, y su amor colme tu corazón.
- Desea la tranquilidad y el orden para desarrollar tu estudio y el de tus compañeros.
- Pide para ti y para todos, una mente sana, un espíritu sosegado y una vida llena de paz.

(Adaptación de «De Ordine», II, 8, 25).

**INDICE**

**Páginas**

**I. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA**

<b>1. La médula adrenal y las células cromafines</b>	<b>1</b>
<b>2. Secreción de CAs por las células cromafines: exocitosis</b>	<b>7</b>
2.1. Aspectos morfológicos y ultraestructurales	7
2.2. Mecanismos moleculares implicados en el proceso de exocitosis	10
2.2.1. Papel del Ca <sup>2+</sup> en la exocitosis	12
2.2.1.1. Proteínas de unión de Ca <sup>2+</sup>	16
2.2.2. Papel de nucleótidos cíclicos	20
2.2.2.1. Adenosina monofosfato cíclico y su papel en la exocitosis	20
2.2.2.2. Guanosina monofosfato cíclico y su papel en la exocitosis	29
2.2.3. Papel de la fosfolipasa A <sub>2</sub> y el ácido araquidónico	31
2.2.4. Papel de las proteínas G	33
2.2.5. Papel del citoesqueleto en la exocitosis	35
2.2.5.1. Composición y organización molecular del citoesqueleto en la célula cromafín	35
2.2.5.2. Proteínas del citoesqueleto y secreción. Influencia del Ca <sup>2+</sup> y proteína kinasas	40
2.2.6. Receptores implicados en la regulación de la secreción de CAs por las células cromafines	44
2.2.6.1. Receptores colinérgicos	44
2.2.6.2. Otros receptores	45
<b>3. El ácido <math>\gamma</math>-aminobutírico (GABA)</b>	<b>49</b>
3.1. Generalidades	49
3.2. Metabolismo del GABA	50
3.3. Rutas GABAérgicas	54
3.3.1. En el sistema nervioso central (SNC)	54
3.3.2. Presencia de GABA en el sistema nervioso periférico (SNP)	55
3.5. Receptores de GABA: clasificación y mecanismos de acción	56
3.5.1. Receptores GABA <sub>A</sub>	57
3.5.1.1. Características farmacológicas	57
3.5.1.2. Estructura molecular del receptor GABA <sub>A</sub>	58
3.5.1.3. Mecanismo de acción	63
3.5.1.4. Funciones de los receptores GABA <sub>A</sub>	64
3.5.2. Receptores GABA <sub>B</sub>	65
3.5.2.1. Características farmacológicas	65
3.5.2.2. Estructura molecular	67
3.5.2.3. Mecanismo de acción	67
3.5.2.4. Funciones de los receptores GABA <sub>B</sub>	69
3.6. Sistema GABAérgico en la médula suprarrenal bovina	70

<b>II. OBJETIVOS DEL TRABAJO</b>	<b>75</b>
----------------------------------	-----------

**III. MATERIAL Y METODOS**

<b>1. Material</b>	<b>76</b>
<b>2. Métodos</b>	<b>77</b>
2.1. Cultivo primario de células cromafines	77
2.1.1. Aislamiento de las células cromafines	77
2.1.2. Mantenimiento de las células cromafines	79
2.1.2.1. Cultivos primarios de células cromafines	79
2.1.2.2. Células cromafines en suspensión en frío	79
2.2. Medida de la liberación de CAs	80
2.2.1. En células en cultivo	80
2.2.2. En células en suspensión (monitorización continua de la secreción)	82
2.3. Medida de los niveles intracelulares de AMPc	82
2.4. Medida de los niveles intracelulares de IP <sub>3</sub>	84
2.5. Medida de los niveles intracelulares de GMPc	85
2.6. Medida del Ca <sup>2+</sup> intracelular	86
2.7. Medida del potencial de membrana	87
2.8. Preparación de las membranas de la médula adrenal y corteza cerebral y purificación del receptor GABA <sub>A</sub> /BZ por cromatografía de afinidad	88
2.8.1. Preparación de las membranas	88
2.8.2. Solubilización del receptor	89
2.8.3. Purificación del receptor GABA <sub>A</sub>	90
2.8.3.1. Purificación por cromatografía de afinidad de BZ	90
2.8.3.2. Purificación por cromatografía de inmunofinidad con anticuerpos anti-α <sub>1</sub>	92
2.9. Ensayos de unión al equilibrio de [ <sup>3</sup> H]flunitrazepam a membranas de médula adrenal	93
2.10. Inmunodetección del receptor GABA <sub>A</sub> de médula adrenal bovina	94
2.11. Métodos estadísticos y expresión de los resultados	96

**IV. RESULTADOS**

**Páginas**

<b>1. Receptores GABA<sub>A</sub></b>	<b>98</b>
1.1. Modulación farmacológica de los receptores GABA <sub>A</sub> en células cromafines bovinas	98
1.1.1. Efecto de agonistas GABA <sub>A</sub> sobre la secreción basal de CAs: curva dosis-respuesta	98
1.1.2. Efecto de fármacos moduladores del receptor GABA <sub>A</sub> sobre la secreción basal de CAs	99
1.1.3. Efecto de fármacos moduladores sobre la secreción de CAs mediada por agonistas GABA <sub>A</sub>	101
1.1.3.1. Modulación por benzodiazepinas	101
1.1.3.2. Modulación por β-carbolinas	105
1.1.3.3. Modulación por barbitúricos	108
1.1.3.4. Modulación por esteroides	109
1.1.3.5. Efecto del zinc	112
1.2. Ensayos de unión al equilibrio de benzodiazepinas	113
1.2.1. Unión específica de [ <sup>3</sup> H]flunitrazepam	113
1.2.2. Desplazamiento específico por agonistas y antagonistas de BZ	116
1.3. Análisis de la estructura del receptor GABA <sub>A</sub> expresado en la médula adrenal bovina	116
<b>2. Receptores GABA<sub>B</sub></b>	<b>122</b>
2.1. Efectos de agonistas GABA <sub>B</sub> sobre el potencial de membrana	122
2.2. Efectos de agonistas GABA <sub>B</sub> sobre el Ca <sup>2+</sup> intracelular	126
2.2.1. Curva: dosis-respuesta	126
2.2.2. Origen del Ca <sup>2+</sup> movilizado por los agonistas GABA <sub>B</sub>	129
2.2.2.1. Entrada de Ca <sup>2+</sup> del medio extracelular	129
2.2.2.2. Salida de Ca <sup>2+</sup> de los depósitos intracelulares	131
2.2.3. Producción de IP <sub>3</sub> por los agonistas GABA <sub>B</sub>	132
2.2.4. Influencia del Ca <sup>2+</sup> en las respuestas mediadas por activación del receptor GABA <sub>B</sub>	135
2.2.4.1. Sobre la secreción de CAs	135
2.2.4.2. Sobre la formación de AMPc	138
2.2.5. Efectos de los agonistas GABA <sub>B</sub> sobre el Ca <sup>2+</sup> inducido por activación de otros receptores	138
2.3. Efecto de agonistas GABA <sub>B</sub> sobre los niveles intracelulares de GMPc	141
2.4. Correlaciones estadísticas entre los niveles de mensajeros intracelulares y los efectos secretores	142
2.4.1. Correlaciones entre secreción de CAs y niveles de AMPc y Ca <sup>2+</sup> inducidos por activación de los receptores GABA <sub>B</sub>	142
2.4.2. Correlación entre la secreción de CAs y niveles intracelulares de AMPc producidos por los diferentes agentes que elevan los niveles intracelulares de AMPc	143

2.4.3. Correlación entre la secreción de CAs y los niveles de $IP_3$ producidos por activación de los receptores $GABA_B$	146
2.5. Regulación del efecto secretor de los receptores $GABA_B$ por fosforilación	
2.5.1. Regulación por PKA	146
2.5.2. Regulación por PKC	147
<b>V. DISCUSION</b>	
1. Receptores $GABA_A$ en la médula adrenal bovina: función, modulación farmacológica y estructura molecular	
1.1. Función y mecanismo de acción	151
1.2. Modulación farmacológica	153
1.3. Estructura molecular del receptor: concordancia con su modulación farmacológica	160
2. Receptores $GABA_B$ en la médula adrenal: función y mecanismo de acción molecular	
2.1. Función de los receptores $GABA_B$ en la modulación de la secreción de CAs por las células cromafines bovinas	164
2.2. Mensajeros intracelulares implicados en las respuestas funcionales de los receptores $GABA_B$ de las células cromafines bovinas	165
2.2.1. Implicación del AMPc	165
2.2.2. Implicación del $Ca^{2+}$	167
2.2.2.1. Elevación de los niveles basales y regulación del $Ca^{2+}$ inducido por otros receptores	167
2.2.2.2. Origen del $Ca^{2+}$ movilizado por agonistas $GABA_B$	169
2.2.2.3. Relaciones entre el $Ca^{2+}$ y la respuesta secretora	171
2.2.3. Interrelaciones funcionales entre los mensajeros intracelulares inducidos por activación de los receptores $GABA_B$ en las células cromafines: mecanismo de acción molecular propuesto	173
2.3. Modulación de la actividad de los receptores $GABA_B$ por fosforilación	177
2.4. Comentarios finales	177
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	179
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b>	181
<b>VIII. PUBLICACIONES</b>	203

## ABREVIATURAS

AA.....	ácido araquidónico
AC.....	adenilato ciclasa
Ach.....	acetilcolina
ADP.....	adenosina difosfato
AMPc.....	adenosina 3'-5'-monofosfato cíclico
ATP.....	adenosina trifosfato
BZ.....	benzodiazepinas
CA(s) .....	catecolamina(s)
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> .....	concentración intracelular de calcio
CaCaM.....	calcio-calmodulina
DBH.....	dopamina-β-hidroxilasa
GABA.....	ácido γ-aminobutírico
GABA-T.....	GABA transaminasa
GAD.....	ácido glutámico descarboxilasa
GMPC.....	guanosina 3'-5'-monofosfato cíclico
IP <sub>3</sub> .....	inositol 1,4,5-trifosfato
pG.....	proteínas de unión de GTP
PKA.....	proteína kinasa A ó dependiente de AMPc
PKC.....	proteína kinasa C ó dependiente de Ca <sup>2+</sup> y fosfolípidos
PLA <sub>2</sub> .....	fosfolipasa A <sub>2</sub>
PLC.....	fosfolipasa C
PLP.....	piridoxal fosfato
PNMT.....	feniletanolamina-N-metiltransferasa
SNC.....	sistema nervioso central
SNP.....	sistema nervioso periférico
SSADH.....	semialdehído succínico deshidrogenasa
TPA.....	12-o-tetradecanoilforbol-13 acetato

# ***I. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA***

---

## ***1. La médula adrenal y las células cromafines.***

La médula suprarrenal es la parte más interna de la glándula suprarrenal. Esta glándula posee distintas zonas, especializadas en la formación y liberación de diferentes compuestos químicos. Desde el exterior al interior, se encuentran tres zonas corticales: la glomerular, que segrega mineralocorticoides, fasciculada y reticular, encargadas de la secreción de glucocorticoides y andrógenos y una zona medular, especializada en la secreción de catecolaminas (CAs). La zona medular, objeto de nuestro estudio, está formada por un tejido parenquimatoso de células poligonales, arracimadas en torno a una red vascular, denominadas células cromafines. Estas células, mantienen la atención de numerosos investigadores, desde hace más de treinta años, ya que son una fuente inagotable de información acerca de los aspectos morfológicos, farmacológicos y bioquímicos de los mecanismos de liberación de hormonas y neurotransmisores. A título de ejemplo, ellas han permitido descubrir la presencia de vesículas de almacenamiento de neurotransmisores (Blaschko & Welch, 1953; Hillarp et al., 1953) o la función primordial del calcio en los mecanismos de secreción (Douglas et al., 1961). Una breve historia de la glándula adrenal se describe en la tabla 1:

- 
- 1552 - Eustaquius dibuja en planchas de cobre las glándulas adrenales
  - 1611 - Bartolino describe las glándulas adrenales huecas.
  - 1655 - Riolan asegura que las glándulas adrenales no son huecas.
  - 1656 - Whorton asocia las glándulas adrenales con el nervio plexus.
  - 1805 - Cuvier establece que la glándula adrenal es sólida.
  - 1831 - Arnol estudia la embriología de las glándulas adrenales.
  - 1836 - Nagel nombra la médula adrenal.
  - 1852 - Kölliker describe la anatomía microscópica de la médula adrenal.
  - 1856 - Fränkel describe un tumor de la médula adrenal.
  - 1892 - Jacobj muestra que la médula adrenal es un órgano endocrino.
  - 1894 - Olivier y Schafer describen el efecto de la médula adrenal sobre la presión.
  - 1896 - Cybulski Szymonowicz también describe el efecto sobre la presión arterial.
  - 1901 - La adrenalina es descubierta independientemente por Abel y Takamine.
  - 1902 - Kohn nombra las células cromafines.
  - 1906 - Friedmann publica la fórmula química de la adrenalina.
  - 1926 - Primera extracción quirúrgica de un feocromocitoma (Roux y Mayo).
  - 1939 - Blaschko determina la ruta biosintética de la adrenalina.
  - 1948 - Holtz detecta la noradrenalina en la glándula adrenal.
  - 1953 - Aislamiento de los gránulos cromafines.
  - 1955 - Lever describe la ultraestructura de la médula adrenal.
  - 1968 - Douglas acuña el término de "acoplamiento estímulo-secreción".
  - 1979 - Se miden niveles de encefalina en la médula adrenal.
  - 1982 - La médula adrenal se transplanta al cerebro humano.

---

**Tabla 1. Breve historia del estudio de la glándula adrenal (Carmichael, 1989)**

La médula adrenal posee diversos tipos celulares, unos más abundantes como las células cromafines (células adrenérgicas, noradrenérgicas y células de gránulos pequeños) y otros minoritarios, como las células simpáticas ganglionares, que se pueden considerar auténticas

## *Antecedentes*

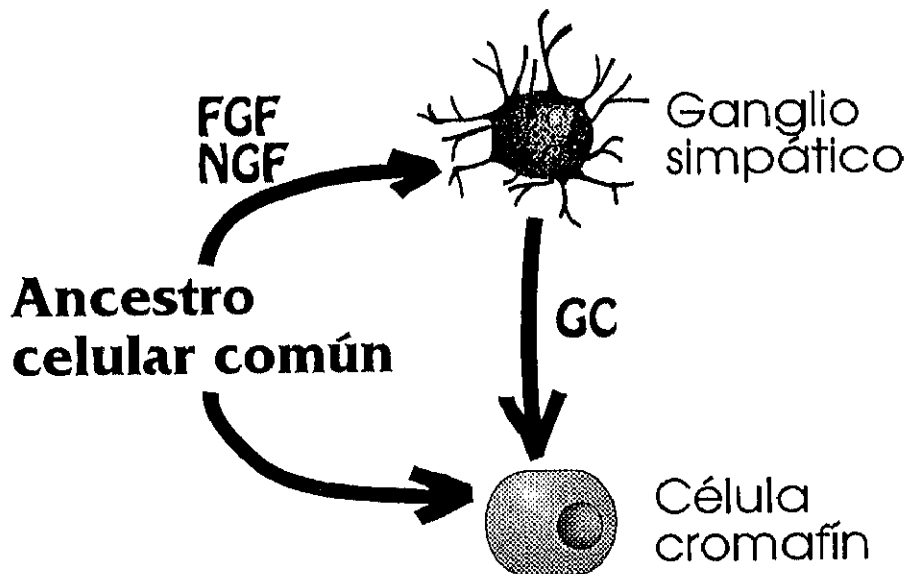
neuronas simpáticas presinápticas, y las células sustentaculares, que son consideradas como los componentes neurogliales de la médula adrenal (Fujita et al., 1988).

Las células cromafines, cuyo nombre deriva de la capacidad de las mismas para reaccionar con las sales de cromo, se caracterizan por la gran abundancia de gránulos densos repartidos por todo su citoplasma, los gránulos cromafines, donde se encuentran almacenadas las CAs. Según que la molécula neurotransmisora almacenada mayoritariamente en estos gránulos sea adrenalina o noradrenalina, estas células son de dos tipos que se denominan halocromas o radiocromas, por su distinta reacción con las sales de cromo. Sin embargo, ambos tipos son parecidos morfológicamente y por tanto difíciles de distinguir en cultivo, aunque se les puede reconocer por microscopía óptica utilizando formaldehído, que reconoce específicamente células noradrenérgicas (Falk et al., 1962; Livett et al., 1982) o por técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos específicos para la enzima metilante feniletanolamina-N-metil-transferasa (PNMT), que sintetiza adrenalina a partir de noradrenalina (Goldstein et al., 1971). Un exámen al microscopio electrónico permite también diferenciar los dos tipos celulares, por la apariencia y densidad de sus gránulos de almacenamiento (Fujita et al., 1988). Más recientemente Moro et al. (1991) han ideado un método de separación de ambos subtipos celulares basado en la utilización de gradientes discontinuos de urografina. La proporción relativa de ambos subtipos celulares depende de la especie animal: en hamster prácticamente no existen células adrenérgicas, en vaca o en hombre hasta un 60-80 % son de fenotipo adrenérgico, mientras que en el gato existen ambas en la misma proporción.

Embriológicamente, las células cromafines derivan, al igual que las neuronas, de la cresta

## Antecedentes

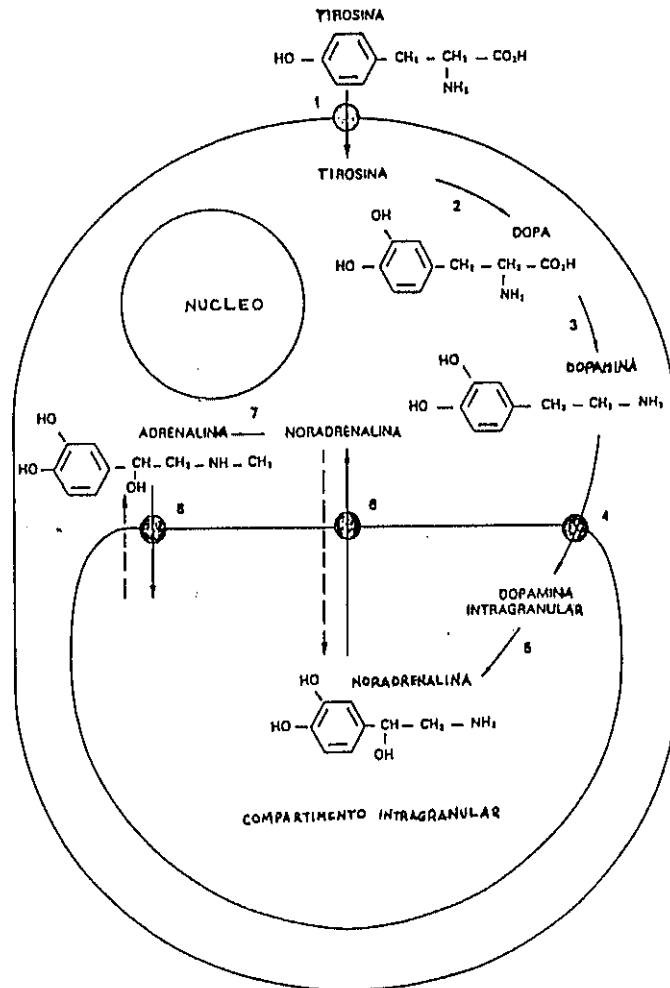
neural, un tejido de origen ectodérmico. Durante el desarrollo ontogénico parte de estas células migran ventralmente, dando lugar a las células cromafines, siendo los glucocorticoides de la glándula adrenal esenciales para que se realice esta transformación. Este origen embriológico común al de las células nerviosas (esquema 1), hace que se comporten de manera análoga a las neuronas que irán a formar los ganglios simpáticos y que sean consideradas por diversos autores como fibras nerviosas rudimentarias (Guyton, 1987), ganglios simpáticos evolucionados (Koyama et al., 1988) o paraneuronas catecolaminérgicas típicas (Fujita et al., 1988). De hecho, en su estado maduro, las células cromafines poseen diversos marcadores que se consideran específicos de neuronas como la subunidad  $\gamma$  de la enolasa y los neurofilamentos.



Esquema 1. Ontogénesis de las células cromafines. Las células cromafines tienen su origen en la cresta neural, al igual que las neuronas de los ganglios simpáticos. Los glucocorticoides (GC), que inhiben la diferenciación neural, estimulan la expresión de la PNMT, que forma adrenalina a partir de noradrenalina. NGF: factor de crecimiento nervioso. FGF: factor de crecimiento de fibroblastos.

Los gránulos cromafines

Los gránulos cromafines no son orgánulos de mero almacenamiento de sustancias químicas, sino que son activos metabólicamente, interviniendo, entre otros procesos bioquímicos, en la síntesis de noradrenalina (esquema 2) y en el procesamiento post-traducciona de precursores neuropeptídicos. La membrana de los granulos cromafines está constituida principalmente por fosfolípidos, siendo el más abundante la fosfatidiletanolamina, seguido de fosfatidilcolina (lecitina), lisofosfatidilcolina, esfingomielina y algo de fosfatidil serina y fosfatidilinositoles (Dreyfus et al., 1977). Además se caracteriza por su alto contenido en colesterol, que se distribuye de manera heterogénea por la membrana. Aparte de estos componentes lipídicos, contiene más de cuarenta polipéptidos diferentes, siendo la proteína mayoritaria una enzima reguladora de la cadena de síntesis de CAs: la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa (DBH). La membrana posee, además, una bomba de protones que proporciona la energía necesaria para la acumulación de CAs, así como un transportador de las mismas. Otras proteínas, comunes a otros gránulos de secreción, son las que constituyen las bombas de calcio y de nucleótidos. La matriz de los gránulos cromafines contiene CAs en una concentración aproximada de 0.5 M. También contiene ATP (125 mM) y otros nucleótidos (Silinski, 1975), ácido ascórbico, e iones  $\text{Ca}^{2+}$  (16 mM). Las CAs y el ATP se concentran en el gránulo gracias a la energía proporcionada por un gradiente electroquímico generado por la ATPasa dependiente de  $\text{H}^+$ , que acumula estos  $\text{H}^+$  en el gránulo a costa de hidrólisis de ATP, proceso que acidifica fuertemente el interior del gránulo y crea un gradiente de pH y una diferencia de potencial membranar.



Esquema 2. Biosíntesis de catecolaminas. La tirosina procedente del torrente sanguíneo (1) es hidroxilada por la tirosina hidroxilasa (2). El producto de la reacción, la DOPA, se transforma en dopamina (3) por la DOPA-descarboxilasa. La dopamina penetra en el gránulo (4) y sufre una hidroxilación (5) por la dopamina-β-hidroxilasa, una enzima presente exclusivamente en los gránulos. La noradrenalina resultante vuelve al citoplasma (6) y es metilada por la PNMT, para pasar a adrenalina (7). La adrenalina es recuperada rápidamente por el gránulo (8) por el mismo sistema que asegura el transporte de dopamina (Aunis & Henry, 1984).

Además de CAs y nucleótidos, los gránulos cromafines contienen en su matriz diferentes proteínas: DBH, proteínas acídicas (cromograninas), péptidos (encefalinas y sus precursores), etc.

El ciclo de síntesis de adrenalina y noradrenalina comienza en la célula cromafín desde el aminoácido tirosina, que se transforma sucesivamente en DOPA y dopamina gracias a la acción de la tirosina hidroxilasa y la dopa descarboxilasa, respectivamente. La dopamina atraviesa la membrana del gránulo y en su interior se convierte en noradrenalina por la acción de la DBH, la cual atraviesa de nuevo la membrana granular y sufre en el citoplasma la acción de la PNMT, que la transforma en adrenalina. La adrenalina vuelve a los gránulos para su almacenamiento, por el mecanismo de transporte mencionado anteriormente, ligado a una bomba de  $H^+$ , dependiente de ATP (esquema 2).

## *2. Secreción de CAs por las células cromafines: exocitosis.*

### *2.1. Aspectos morfológicos y ultraestructurales*

La célula cromafín estimulada libera los productos almacenados (CAs, péptidos, enzimas, etc.) mediante el proceso de exocitosis. El aspecto morfológico ultraestructural de este mecanismo es actualmente bien conocido. Se trata de una fusión de la membrana del gránulo con la membrana plasmática, lo que permite una continuidad entre el espacio intravesicular y extracelular y liberación consiguiente de los productos almacenados en el gránulo hacia

la circulación sanguínea. Posteriormente, la membrana del gránulo, unida a la superficie celular, debe ser retirada para evitar un aumento constante de la misma. En el año 1975, Palade (1975) describió las diferentes etapas de la exocitosis de la siguiente manera:

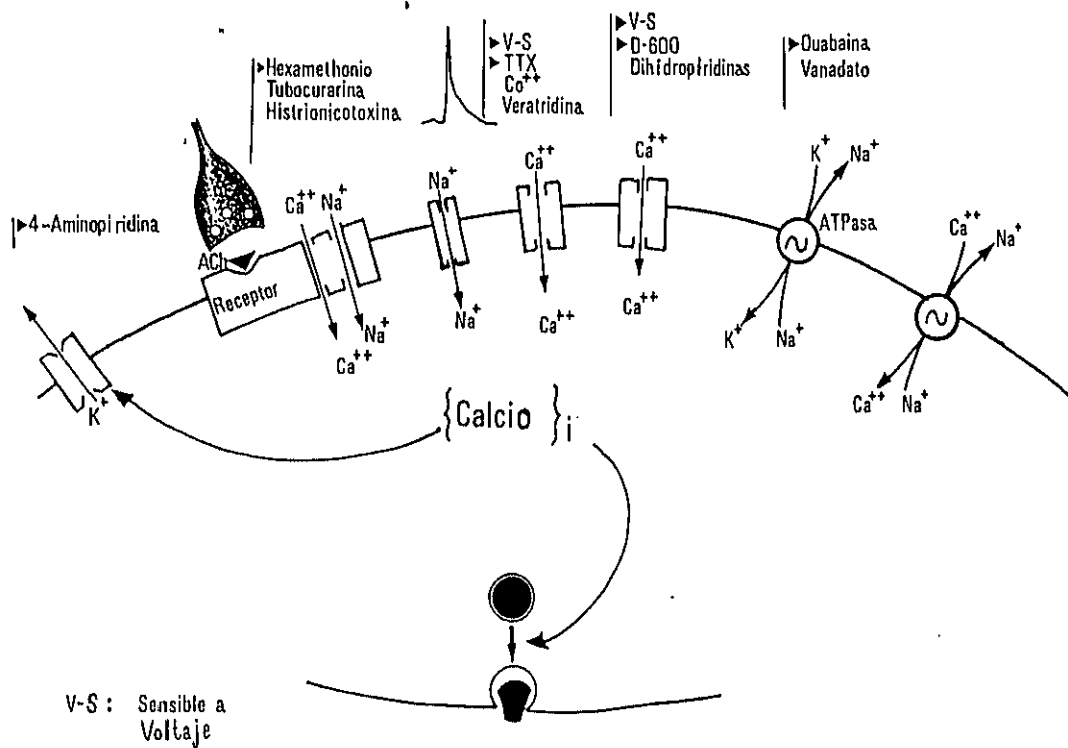
- 1) Aproximación del gránulo y fijación de su membrana a la membrana plasmática. Esta fase de pre-exocitosis permite la liberación de los lechos moleculares de agua.
- 2) Desestabilización de las membranas a nivel de la región de fijación, seguida de la fusión de porciones membranares. Con ello se forma una estructura termodinámicamente inestable.
- 3) Rotura de esta estructura. Esto supone la puesta en contacto de los compartimentos intravesicular y extracelular.
- 4) Liberación del contenido intragranular.
- 5) Endocitosis.

La descripción detallada de estas diferentes etapas, características de la exocitosis, así como las de la etapa final de endocitosis ha sido posible gracias a la utilización de distintas técnicas, entre las que se pueden destacar las de criofractura (Aunis et al., 1979; Schmidt et al., 1983), microscopía electrónica (Brooks & Carmichael, 1987) y las de patch-clamp (Neher & Marty, 1982).

La membrana de las células cromafines, además de los diferentes sistemas de receptores que describiremos más tarde, contiene numerosas proteínas, que son muy importantes en el proceso de secreción de CAs, siendo especialmente dignos de mención: (1) los numerosos transportadores acoplados a la ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , transportadores

*Antecedentes*

para CAs y antiportadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y (2) canales iónicos dependientes de voltaje (de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ ) análogos a los encontrados en neuronas centrales (esquema 3).



**Esquema 3. Movimientos iónicos a través de la membrana plasmática implicados en la excitotoxicidad.**

## ***2.2. Mecanismos moleculares implicados en el proceso de exocitosis***

Los estudios sobre la liberación de proteínas granulares, como la DBH (Ledbetter & Kirshner, 1981; Ito, 1983), de las cromograninas (Kirshner et al., 1967), y de ATP, paralelos a los de liberación de CAs, han sido muy útiles para llegar a establecer que las CAs son liberadas por la médula adrenal mayoritariamente mediante el proceso de exocitosis. En la médula adrenal confluyen fibras nerviosas simpáticas preganglionares, que vienen directamente de las astas intermediolaterales de la médula espinal a través del nervio esplénico.

El estímulo fisiológico principal de la exocitosis de CAs por las células cromafines es la acetilcolina (Ach) liberada por las terminaciones del nervio esplénico (esquema 3), si bien se conoce que las células reciben también otros tipos de inervación, tales como adrenérgica, peptidérgica (Fujita et al., 1988) y GABAérgica (Oomori et al., 1994).

La Ach se une a sus receptores nicotínico y muscarínico. Cuando se une al receptor nicotínico, que es el subtipo mayoritario en células cromafines bovinas, desencadena la entrada de  $\text{Na}^+$  del medio extracelular a través del canal de  $\text{Na}^+$  que forma el receptor, lo que conduce a la despolarización de la membrana. Esta despolarización inicial conduce a la apertura de canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, desencadenándose una serie de acontecimientos moleculares, en los que están implicados un gran número de metabolitos y proteínas. Estos acontecimientos se pueden resumir en los siguientes:

- Incrementos en la concentración del calcio citosólico.
- Fosforilación de proteínas por activación de proteínas quinasas dependientes de:
  - a) calcio y calmodulina (PKCaCaM).
  - b) de nucleótidos cíclicos como el AMPc (PKA)
  - c) de calcio y fosfolípidos (PKC)
- Activación de fosfolipasas C (PLC) y fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) y metabolismo de fosfolípidos.
- Activación de proteínas que ligan GTP o proteínas G.

Ello induce el acercamiento de los gránulos cromafines a la membrana plasmática y la fusión de ambas membranas, liberándose así, el contenido de CAs intragranular al espacio extracelular. Sin embargo, aparte de los receptores nicotínicos, las células cromafines poseen otros tipos de receptores en sus membranas, cuya función parece ser la de regular la exocitosis de estas aminas y cuyo mecanismo molecular se describirá posteriormente.

Para una mayor claridad en la exposición de los mecanismos moleculares o sistemas implicados en la exocitosis, indicamos que los hemos agrupado en los siguientes apartados:

- Papel de mensajeros intracelulares en la exocitosis:
  - \* Ca<sup>++</sup>,
  - \* Nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc)
  - \* Otros mensajeros (PIs, PLA<sub>2</sub> y proteínas G)
- Papel del citoesqueleto
- Diferentes sistemas de neurotransmisores que modulan la exocitosis

### ***2.2.1. Papel del $Ca^{2+}$ en la exocitosis***

La participación del calcio en el mecanismo molecular de la exocitosis es bien conocida desde hace tiempo (Douglas & Rubin, 1961), considerándose que en las células cromafines una elevación de la concentración citosólica de calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) es un fenómeno suficiente y necesario para dar lugar a la liberación de CAs. Este hecho se ha puesto de manifiesto usando varias aproximaciones experimentales, como tratamiento con ionóforos de calcio (Perlman et al., 1980; Carvalho et al., 1982), fusión de las células con liposomas cargados con calcio (Gutman et al., 1979) o perfusión con calcio a través de una pipeta de patch-clamp (Neher & Marty, 1982). Estudios en células permeabilizadas indican que la secreción puede ser inducida por un aumento de la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$  de entre 10 (Knigh & Baker, 1982) y 20  $\mu M$  (Bader et al., 1986b), aunque en células enteras, como se verá con posterioridad en el apartado de resultados, experimentos de medida de  $Ca^{2+}$  con sondas fluorescentes indican que la elevación de  $Ca^{2+}$  citosólica necesaria para producir la secreción es menor (0.2-0.5  $\mu M$ ) (Oset-Gasque et al., 1993).

En las células cromafines, el calcio puede incrementarse:

- A) Por la entrada desde el medio extracelular
- B) Por su liberación de los compartimentos intracelulares.

A) La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular se realiza a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (Wakade & Wakade, 1982; Fenwich et al., 1982), que se abren en respuesta a la despolarización provocada por la estimulación nicotínica o por la elevación del  $\text{K}^+$  extracelular (Kidokoro et al., 1982). Estos canales en células cromafines son mayoritariamente de tipo L, sensibles a bloqueo por dihidropiridinas (Ladona et al., 1987; Gandía et al., 1987). No obstante, la evidencia farmacológica indica la existencia de otros tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  insensibles al bloqueo por dihidropiridinas, como los N, P ó T en células cromafines (Ballesta et al., 1989; Swandulla et al., 1991), cuyas características se especifican en la tabla 2. Incluso ha sido estudiado un nuevo tipo de canal íntimamente relacionado con los procesos de secreción, el llamado facilitador, cuyo reclutamiento está favorecido por la activación de los receptores  $\text{D}_1$  de dopamina (Artalejo et al., 1991).

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células a través de estos canales origina una onda de elevación de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que empieza justo debajo de la membrana plasmática y sólo después penetra hacia el interior (O'Sullivan & Cheek, 1989; Burgoyne, 1991). A nivel ultraestructural esta entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inicial parece asociada a los sitios de contacto próximos entre los gránulos cromafines y la membrana plasmática (Burgoyne et al., 1983; Cheek et al., 1991). Esta distribución del  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol de manera no uniforme limita la interpretación de los resultados obtenidos con ciertas sondas fluorescentes, como Quin-2 (Kao & Schneider, 1986), fura-2 (O'Sullivan & Cheek, 1989) o la fotoproteína aequorina (Cobbold et al., 1987).

Canales

<u>L</u>	<u>N</u>	<u>T</u>	<u>P</u>
<b>FARMACOLOGIA</b>			
<b>Antagonistas orgánicos:</b>			
<i>DHP</i>	<i>ω-conotoxina GVI</i> <i>ω-conotoxina MVIIC</i>	<i>amiloride</i>	<i>ω-conotoxina MVIIC/D</i> <i>ω-agatoxina IVA</i>
<b>Antagonistas inorgánicos:</b>			
<i>Cd<sup>2+</sup></i>	<i>Cd<sup>2+</sup></i>	<i>Ni<sup>2+</sup></i>	<i>Cd<sup>2+</sup></i>
<b>CINETICA DE ACTIVACION</b>			
<i>alta</i>	<i>alta</i>	<i>alta</i>	<i>moderada-alta</i>

Tabla 2. Subtipos de canales de calcio con sus características más significativas. DHP: dihidropiridinas.

B) El calcio citosólico puede elevarse también por la salida del mismo de los depósitos intracelulares. En las células secretora, el calcio se almacena en diferentes compartimentos. Entre los principales se encuentra el llamado compartimento sensible a la estimulación por inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>), asociado al retículo endoplásmico. El IP<sub>3</sub> es un metabolito formado como consecuencia de la activación de la fosfolipasa C (PLC), que ejerce su acción a través de receptores específicos presentes en las membranas del retículo endoplásmico que constituyen una familia de canales de Ca<sup>2+</sup> intracelulares (Berridge et al., 1993). También

se ha descrito un compartimento diferente al retículo endoplásmico sensible a cafeína que participa en el proceso de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ -release (CICR), aunque para algunos autores este compartimento no parece estar totalmente separado del clásico sensible a  $\text{IP}_3$  (Liu et al., 1991). En la línea tumoral PC12 se ha demostrado la existencia de un lugar de almacenamiento de calcio, el calciosoma, que parece ser insensible a la acción del  $\text{IP}_3$  y que está difusamente distribuído en toda la célula (Hyun & Albanesi, 1990). También hay una cierta cantidad de calcio en los gránulos cromafines, que lo almacenan gracias a la presencia de cromogranina A, una proteína de propiedades semejantes a la calsecuestrina, del retículo sarcoplásmico del músculo. Esta proteína representa un 40 % del total de proteína soluble de la vesícula (Yoo et al., 1990). Por último, existe calcio también en las mitocondrias.

La secreción de CAs inducida por movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares ha sido muy estudiada y los resultados son algo controvertidos. Tras la estimulación con movilizadores de  $\text{Ca}^{2+}$  por formación de  $\text{IP}_3$ , como agonistas muscarínicos (Kao & Schneider, 1985), bradiquinina, angiotensina II (O'Sullivan & Burgoyne, 1989), vasopresina, etc. se produce una respuesta mucho menos acusada que la obtenida con secretagogos que inducen la entrada de calcio extracelular (Föhr et al., 1991) o nula (Burgoyne et al., 1988). En contraste otros autores afirman que la cafeína es capaz de incrementar la secreción de CAs, de manera más acusada en ausencia de iones divalentes, ya que el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado por esta sustancia depende de la concentración de  $\text{Na}^+$  en el interior celular (Sorimachi et al., 1992). Además, la cafeína inhibe la respuesta a la nicotina por bloquear su canal iónico (Xu & Fosberg, 1993). En otras células secretoras, como células mastoideas, una elevación de calcio intracelular no induce la secreción por sí misma (Penner et al., 1989). Incluso se ha

demostrado una estimulación de la secreción independiente de calcio en células permeabilizadas de insulinoma de rata de la línea RINmSF (Burgoyne, 1987).

La elevación de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólica puede ser tóxica para la célula y conducir a la muerte celular. Por ello hay distintos mecanismos que mantienen su concentración fisiológica constante, como son la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  o ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , que saca  $\text{Ca}^{2+}$  al exterior o lo mete al interior de la mitocondria o vesículas de secreción y el antiportador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  que saca  $\text{Ca}^{2+}$  y mete  $\text{Na}^+$ . Es de destacar, además, que en las células cromafines existe una inhibición de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a  $\text{IP}_3$  mediada por calcio, lo cual asegura que no se alcancen en el citoplasma unos niveles muy elevados del mismo, que serían tóxicos para la célula (Föhr et al., 1991).

El mecanismo exacto por el cual el calcio provoca la exocitosis en las células cromafines es todavía desconocido, aunque se han propuesto diversos sitios de acción, como proteínas del citoesqueleto (Burgoyne et al., 1989a), proteína kinasas (Burgoyne, 1988), calmodulina (Kenigsberg & Trifaró, 1985) y calpactina (Ali et al., 1989), además del ácido araquidónico (Frye & Holz, 1985).

#### 2.2.1.1. *Proteínas de unión de calcio*

Existen en las células cromafines una serie de proteínas fuertemente relacionadas con el calcio que tienen el nombre genérico de *anexinas* (Burgoyne & Geisow, 1989). Las anexinas son un grupo de proteínas homólogas que ligan fosfolípidos en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y

constituyen la ruta principal para la comunicación entre las membranas celulares y el citoplasma. Contienen una secuencia conservada de 70 aminoácidos repetida 4 veces y una región N-terminal variable característica de cada proteína (Burgoyne, 1991). Hay al menos cinco miembros de esta familia: *anexina II*, *p60* ó *calpactina*, que se encuentra en la cara citosólica de la membrana plasmática; *anexina I* ó *lipocortina I*, en el citosol; *anexinas IV* y *V* ó *endonexinas I* y *II*, en el citosol; *anexina VI* ó *calelectrina* (p70 y p 67), en la membrana plasmática y *anexina VII* ó *sinexina I*, en membranas y en el citosol (Drust et al., 1991; Creutz, 1992). Su función en la exocitosis la realizan en virtud de su propiedad de unir reversiblemente membranas en presencia de concentraciones de calcio del orden de  $\mu\text{M}$ , como se especifica en la tabla 3. Esto inicia el contacto y la fusión entre la membrana de la vesícula secretora y la membrana plasmática durante el proceso de exocitosis (Creutz, 1992). De ellas, han recibido una mayor atención en células cromafines la sinexina y la calpactina.

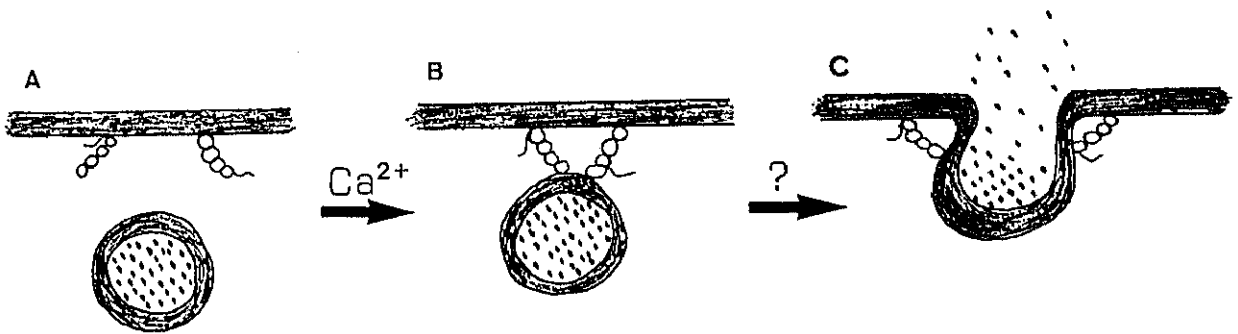
La *anexina VII* ó *sinexina*, proteína de 47 KD parece asociarse en presencia de calcio para formar unas estructuras cilíndricas huecas que constituirían un "puente hidrofóbico" entre la membrana del gránulo y la plasmática en la etapa decisiva para la fusión de ambas (Pollard et al., 1987). En la fase activa de estimulación colinérgica de la secreción, el nivel de sinexina disminuye un 33 % en el núcleo, un 23 % en el citosol y un 51 % en el area granular, sugiriendo su intervención en el proceso de exocitosis (Kuipers et al., 1992).

La *calpactina*, que puede existir como monómero de 36 KDa o como un heterotetrámero de estructura  $[\text{p}36]_2 [\text{p}10]_2$ , se localiza específicamente en la región subcortical y presenta la misma actividad agregante de gránulos cromafines que la sinexina, aunque parece ser el mejor candidato como receptor para el calcio en la exocitosis ya que es bastante más sensible

al  $\text{Ca}^{2+}$  (tabla 3). Su posible mecanismo de acción se refleja en el esquema 4. Estas proteínas podrían ejercer una función reguladora en la secreción dependiente de fosforilación (Sikdar et al., 1990).

PROTEINA	CONCENTRACION DE $\text{Ca}^{2+}$ REQUERIDA ( $\mu\text{M}$ )
Anexina I o lipocortina	4 (forma fosforilada) 20
Anexina II o calpactina	0.01 (primer componente) 5 (segundo componente)
Anexina IV o endonexina I	5.5
Anexina V o endonexina II	4
Anexina VI, calelectrina o p70	2.6
Anexina VII o sinexina	10-100

Tabla 3. Concentración de calcio requerida para la actividad de algunas anexinas en las células cromafines.



**Esquema 4. Posible implicación de la anexina II (calpactina) en la exocitosis.** En las células en reposo (A), la anexina II se localiza en la superficie interior de la membrana plasmática. Tras el incremento de  $[Ca^{2+}]_i$ , los gránulos de secreción se unen a la membrana plasmática a través de la anexina II (B), lo que conduce a la fusión de las membranas vesicular y plasmática y la consiguiente liberación del contenido intragranular (C) (Burgoyne, 1991)

## *2.2.2. Papel de nucleótidos cíclicos*

### *2.2.2.1. Adenosina monofosfato cíclico (AMPc) y su papel en la excitosis*

Puesto que este nucleótido cíclico es objeto de estudio en esta Tesis Doctoral, haremos, a continuación una breve revisión sobre él.

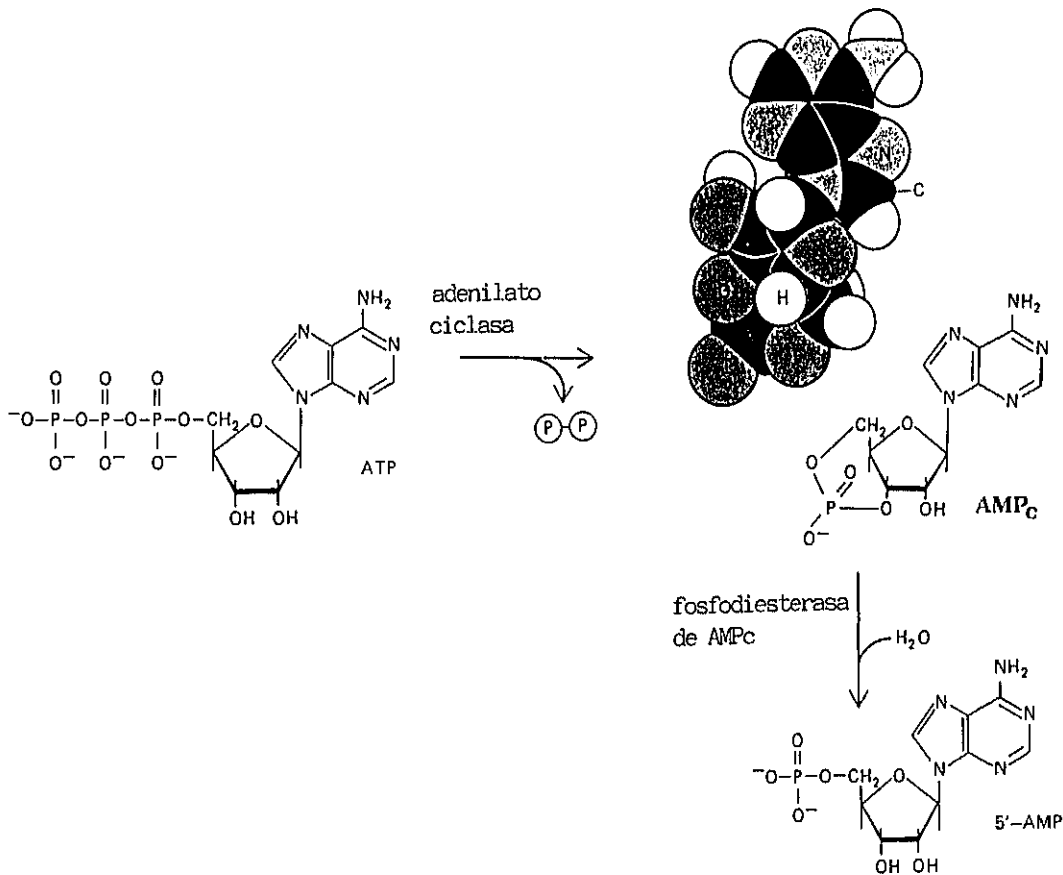
El primero en reconocer la existencia del 3',5'-adenosín monofosfato cíclico o AMPc como mediador de la acción hormonal fué E. Sutherland en 1956, quien mostró la existencia del AMPc como compuesto que mediaba la acción de las hormonas adrenalina y glucagón sobre la fosforilasa del glucógeno. Durante muchos años, la mayor parte de los bioquímicos consideraban al AMPc como una curiosidad. Sin embargo, este punto de vista ha sido alterado radicalmente, ya que se ha descrito que el AMPc actúa como segundo mensajero en la acción de más de veinte sustancias diferentes (hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento). En 1971, Sutherland fue recompensado con un Premio Nobel por su contribución, casi unipersonal, al desarrollo de este campo (Mietzler, 1981).

#### Biosíntesis

El AMPc se forma en las células gracias a la acción de la enzima adenilato ciclasa (AC), que produce un desplazamiento del átomo de fósforo interno ( $P\alpha$ ) del ATP por el grupo hidroxilo 3' del anillo de ribosa (esquema 5).

## Antecedentes

Estudios con anticuerpos monoclonales mostraron la existencia de dos isoenzimas de AC (Pittman et al., 1984): la glicoproteína encontrada predominantemente en cerebro, de 125 KDa y la aislada del corazón de 150 KDa. Actualmente se sabe que la AC forma parte de una extensa familia con ocho subtipos que difieren en su activación por calmodulina y a las subunidades  $\beta\gamma$  de las proteínas G, en las respuestas que media y en su distribución en tejidos y órganos. La AC está compuesta por dos dominios citoplasmáticos, muy conservados entre diferentes especies y que contienen sitios de unión de ATP y dos dominios membranares, que tienen cada uno 6 regiones transmembranares (Asakawa et al., 1993).

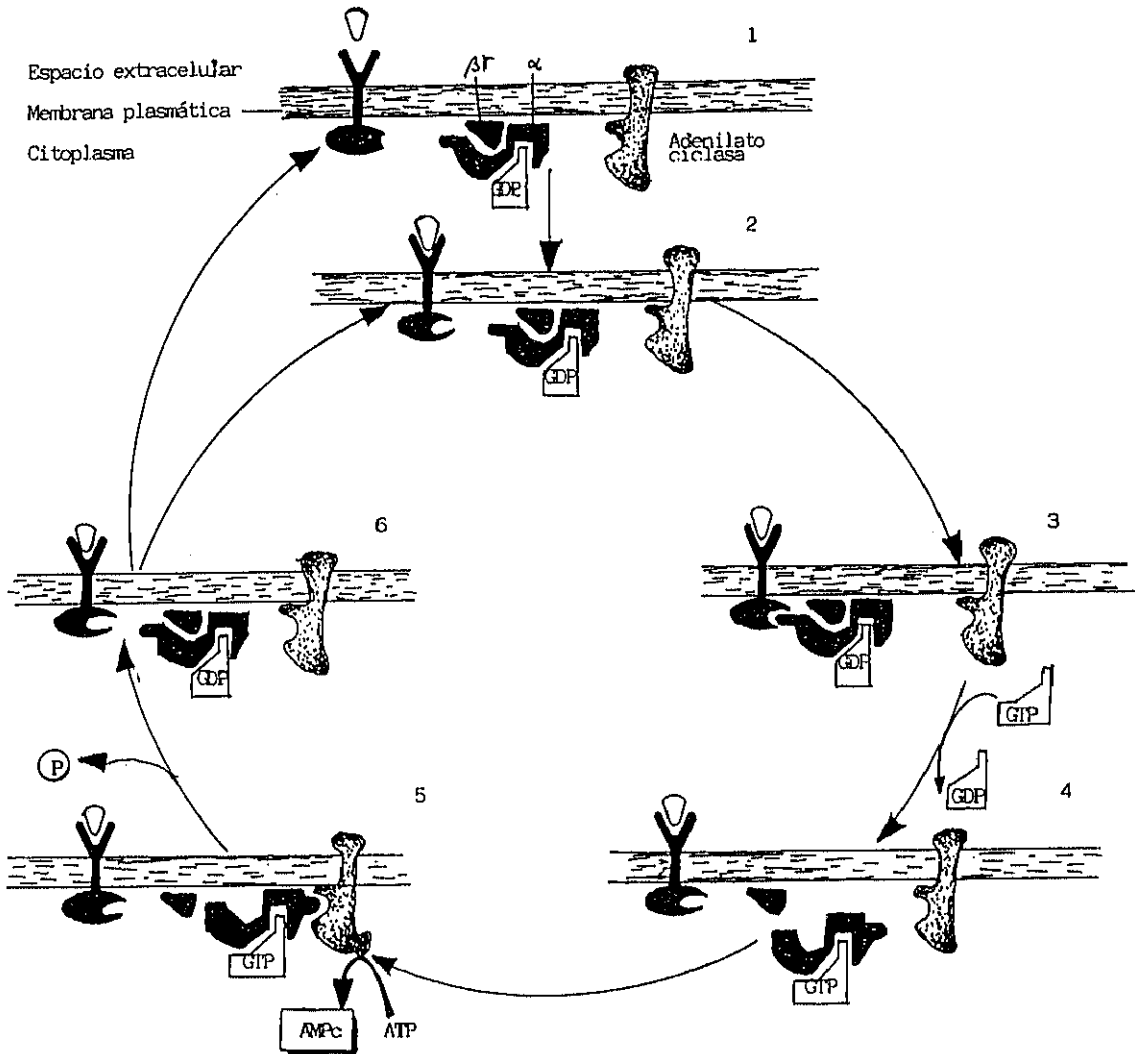


**Esquema 5. Síntesis y degradación del AMPc.** Una pirofosfatasa, la adenilato ciclasa, realiza la síntesis del AMPc mediante una reacción irreversible que libera un grupo pirofosfato (P-P). La fosfodiesterasa hidroliza el enlace fosfodiéster del AMPc, transformando éste en AMP, inactivo como mensajero intracelular (Alberts et al., 1989).

## Antecedentes

El acoplamiento de varios receptores de neurotransmisores a la AC, situada en la parte interna de la membrana plasmática, se realiza a través de dos especies de proteínas de unión de GTP o proteínas G : la  $G_s$ , estimuladora de adenilato ciclasa y la  $G_i$ , inhibidora de adenilato ciclasa (esto no ocurre en bacterias, donde los receptores y las moléculas de AC interaccionan directamente). Ambas proteínas son heterotrímeros compuestos por 3 subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y son dianas de mono-ADP ribosilación de enterotoxinas procedentes de *Vibrio cholera* (toxina colérica) y *Bordetella pertusis* (toxina pertusis), toxinas bacterianas que han contribuido a la elucidación de los mecanismos moleculares de la función de las proteínas G. La subunidad  $\alpha$  de estas proteínas ( $G\alpha_s$ ) presenta actividad GTPásica, que es estimulada por los agonistas de los receptores acoplados a proteínas G. La ADP ribosilación es una modificación covalente de las proteínas G que en el caso de la toxina colérica sobre la proteína  $G_s$  provoca una activación irreversible de la adenilato ciclasa, por bloqueo de su actividad GTPásica intrínseca, mientras que en el caso de la toxina pertusis sobre la proteína  $G_i$ , impide el acoplamiento entre el complejo ligando-receptor y la proteína  $G_i$ , lo que conduce al bloqueo de la inhibición de la adenilato ciclasa. Las otras subunidades que forman la estructura heterotrimérica completa de la proteína G son la  $\beta$  y la  $\gamma$ , que son comunes para la  $G_s$  y la  $G_i$ .

En su forma inactiva, la  $G_s$  está formada por un trímero con GDP unido a la  $G\alpha_s$ . Cuando se activa por unión al complejo hormona-receptor, el sitio de unión a nucleótidos de guanina se altera, permitiendo al GTP unirse en el lugar donde estaba unido el GDP. La unión del GTP causa la disociación de la  $G\alpha_s$  de la  $G\beta\gamma_s$ , lo que permite a la  $G\alpha_s$  unirse a la molécula de adenilato ciclasa, de cuya activación deriva un incremento del AMPc. En menos de un minuto, la  $G\alpha_s$  hidroliza su GTP unido, que pasa a GDP, causando la disociación de  $G\alpha_s$



Esquema 6. Mecanismo de acción de la proteína Gs en la activación de la adenilato ciclasa (AC). El ligando se une a su receptor (1) cambiando su conformación (2), dejando al descubierto un sitio de unión para la proteína G. La proteína G se difunde hacia el receptor por la membrana plasmática interna, formando el complejo proteína G-ligando-receptor (3), lo que promueve el intercambio de  $GDP$  por  $GTP$ . Este cambio origina la disociación de la subunidad  $\alpha$  (4), la cual se une a la adenilato ciclasa, activándola (5), produciéndose así varias moléculas de  $AMPc$ . La subunidad  $\alpha$  tiene una GTPasa intrínseca, que produce la hidrólisis del  $GTP$  a  $GDP$ , lo que hace que la AC vuelva a su conformación original (6), por tanto, inactiva. El ciclo de activación se repite (2) hasta la disociación del ligando de su receptor (7).

de la AC. Con ello vuelve a su estado basal y se recupera el complejo  $G\alpha\beta\gamma$ , que puede volver a interactuar con otro receptor, reiniciando de nuevo el ciclo (esquema 6). La energía liberada en la activación del ciclo no es debida a la unión de la hormona al receptor, sino a la hidrólisis del GTP. Desde el punto de vista energético, los receptores serían los catalizadores de la activación del ciclo. Otras teorías posteriores indican que  $G_s$  está ya unida por  $G\alpha_s$  a la AC. El complejo hormona-receptor interactúa con la proteína G y entonces  $G\beta\gamma$  se disocia y se produce la activación de la AC (Birnbaumer et al., 1987)

Existe un diterpenoide de la raíz de *Coleus forskohli*, la forskolina, que activa directamente adenilato ciclasa. La forskolina, que tiene una  $EC_{50}$  aproximada de 25  $\mu\text{M}$ , causa una elevación rápida y reversible del AMPc, elevación que puede llegar a ser de 35 veces el nivel basal del mismo. A bajas concentraciones (1  $\mu\text{M}$ ) aumenta la respuesta del AMPc generado por noradrenalina, isoproterenol, histamina, adenosina, prostaglandina  $E_2$  y VIP (Seamon et al., 1981). Hoy en día se utiliza esta molécula como activador de adenilato ciclasa, aunque se conocen otros mecanismos de acción adicionales. Por ejemplo, se conoce que la forskolina inhibe un cierto número de proteínas de transporte de membranas (como el transportador de glucosa (Laurenza et al., 1989) y proteínas de canales iónicos) por un mecanismo que no implica la producción de AMPc. Para comprobar si sus efectos implican o no la formación de AMPc, se puede usar su análogo inactivo 1,9-dideoxiforskolina, que no tiene ninguna acción sobre la adenilato ciclasa.

Hay diversas hormonas acopladas a la estimulación o inhibición de la adenilato ciclasa. Entre los efectores estimulantes podemos citar los  $\beta$ -adrenérgicos, el glucagón, la ACTH, la TSH, la vasopresina, la serotonina, la dopamina, la adenosina a través de sus receptores  $A_2$

y la prostaglandina  $E_1$ . Entre los inhibidores, los  $\alpha_2$ -adrenérgicos, adenosina a través de sus receptores  $A_1$ , los péptidos opiodes a través de su receptor  $\mu$  y la somatostatina (Levitzki, 1987).

### Catabolismo

La molécula de AMPc es termodinámicamente inestable, por lo que es susceptible de hidrolizarse rápidamente, por la acción de fosfodiesterasas, que lo transforman en AMP (esquema 5). La actividad fosfodiesterásica se ha encontrado tanto en membranas como en el citosol celular. En cerebro, por ejemplo, la actividad fosfodiesterásica específica de AMPc se encuentra en la misma proporción en la forma soluble que en la unida a la membrana.

Las fosfodiesterasas han sido clasificadas en cinco familias, las cuales tienen una alta homología entre sí, presentando dominios donde se conservan 300 residuos de aminoácidos. La designación de las familias es la siguiente: la dependiente de calcio-calmodulina, la estimulada por GMPc, la inhibida por GMPc, la específica de AMPc, y la específica de GMPc (Beavo & Reifsnnyder, 1990). Estas isoenzimas difieren en su localización, regulación y expresión en las diferentes líneas celulares, siendo objeto de investigación, actualmente, la búsqueda de sus inhibidores específicos. Recientemente se ha comprobado que la fosfodiesterasa activada por calcio-calmodulina es susceptible de regulación por la propia PKA. Así, en células de astrocitoma, se ha observado que al estimularse el receptor muscarínico y elevarse los niveles de calcio intracelular, se produce la activación de la fosfodiesterasa activada por calcio-calmodulina. Pero si ésta fosfodiesterasa es fosforilada por

la PKA, disminuye su capacidad de ser activada por la calmodulina. Ello produce una disminución de la hidrólisis de AMPc durante los picos máximos, con un incremento posterior de la hidrólisis en la interrupción de la activación hormonal de la adenilato ciclasa (Northup, 1989). Además de degradarse, el AMPc también es eliminado de la célula por un mecanismo que se ha denominado "cAMP-export", como ha sido estudiado en células cromafines bovinas en cultivo (Marley & Thompson, 1992)

### Mecanismo de acción del AMPc. Efectos como mensajero intracelular

Mientras está presente, el AMPc actúa como efector alostérico de la proteína quinasa dependiente de AMPc, denominada por ello proteína quinasa A (PKA), que cataliza reacciones de fosforilación de proteínas, por transferencia de un grupo fosfato del ATP a un grupo hidroxilo de ciertos aminoácidos presentes en las proteínas (frecuentemente la serina). Fue inicialmente aislada del músculo en forma de dímero  $\alpha_2\beta_2$ , con dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras. Estas 4 subunidades hace que se requieran 4 moléculas de AMPc para que se active la PKA. Las subunidades catalíticas permanecen inactivas hasta que se unen las reguladoras (Taylor, 1989). En cerebro existen dos subtipos de PKA, denominadas I y II. Ambas contienen subunidades catalíticas idénticas, pero difieren en las subunidades reguladoras (Northup, 1989).

Para actuar como mediador intracelular la concentración de AMPc debe ser menor o igual a  $10^{-6}$  M. Son diversas las acciones que tiene el AMPc en la célula. Metabólicamente, constituye un símbolo de agotamiento de fuentes carbonadas. En células PC12, el AMPc y

sus análogos producen el mismo efecto morfológico que el factor de crecimiento nervioso (NGF) (Chijiwa et al., 1990). Pueden ser fosforilados por aumento de los niveles de AMPc las proteínas de membrana, como receptores, transportadores o bombas; constituyentes del citoesqueleto, como los microtúbulos; orgánulos, como los ribosomas y, ciertas proteínas nucleares, como histonas nucleares, factores de transcripción específicos como el CREB (elemento de respuesta al AMPc), a través del cual este nucleótido produce la regulación de la transcripción de genes específicos. Es decir, el mismo mecanismo puede conducir a respuestas completamente diferentes en distintas células especializadas tanto a corto como a largo plazo. Nos detendremos, por relación a este trabajo en la regulación de la funcionalidad de las células cromafines y en la fosforilación de receptores.

**Modulación de la secreción de CAs en las células cromafines.** El AMPc parece modular la secreción de CAs en la células cromafines, aunque los efectos encontrados en células enteras son contradictorios. Así, la forskolina inhibe la secreción de CAs estimulada por nicotina pero no por altas concentraciones de potasio (Baker et al., 1985) y también parece incrementar la secreción conseguida con dosis submáximas de Ach (Marriot et al., 1988). En células permeabilizadas con digitonina se ha identificado la proteína Exo2 como la subunidad catalítica de la PKA, que regula la secreción dependiente de calcio (Morgan et al., 1993). Algunos autores explican el efecto inhibitorio del AMPc sobre la secreción mediada por nicotina por la inhibición que produce sobre el desensamblaje de los filamentos de la actina cortical inducido por nicotina (Burgoyne, 1991). Otras acciones del AMPc sobre el citoesqueleto se citan en el apartado I.2.2.5.

El efecto del AMPc sobre la funcionalidad de las células cromafines es objeto de esta Tesis Doctoral, por lo que será comentado en los próximos apartados de Resultados y Discusión.

**Modulación de receptores.** Diversos receptores son susceptibles de modulación por PKA por exhibir en sus estructuras residuos aminoacídicos fosforilables por esta kinasa. En concreto y relacionado con este trabajo, es el caso de los receptores nicotínico y de GABA<sub>A</sub>.

Desde hace tiempo se conoce que la exposición prolongada del receptor nicotínico a la Ach disminuye la sensibilidad del receptor a esta sustancia, proceso que se denomina desensibilización. La fosforilación del receptor por PKA y probablemente por PKC y por tirosina kinasas aumenta la tasa de desensibilización por Ach. En el receptor nicotínico son sustratos de kinasas residuos de serina de las cadenas  $\gamma$  y  $\delta$  para la PKA, residuos de serina de las cadenas  $\alpha$  y  $\delta$  para la PKC (estos  $\delta$  diferentes a los anteriores) y residuos de tirosina de las subunidades  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  para tirosina kinasas (Huganir et al., 1986).

En el caso del receptor GABA<sub>A</sub>, la secuencia consenso para el sitio de fosforilación por PKA se halla en un residuo de serina de la subunidad  $\beta$  (Harrison & Lambert, 1989). También existen sitios de fosforilación por PKC (Stelzel et al, 1988) y tirosina kinasas (Leidenheimer et al., 1991). Se ha observado que la forskolina en cultivos de neuronas corticales incrementa la tasa de desensibilización rápida del receptor GABA<sub>A</sub> (Tehrani et al., 1989), efecto que ha sido observado también en el caso del receptor nicotínico (Huganir et al., 1986). La PKA parece disminuir la frecuencia de apertura del canal sin afectar su conductancia o su tiempo de apertura (Leidenheimer et al., 1991). Recientes estudios han confirmado que la PKA inhibe el flujo de <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> estimulado por muscimol.

## *Antecedentes*

Introduciendo en las diversas células un análogo estructural del AMPc altamente permeable, el 8-Br-AMPc, se ha comprobado que una dosis 1 mM es suficiente para producir esta inhibición, en tanto que una dosis análoga de 8-Br-GMPc no produce efecto alguno (Harrison & Lambert, 1989). La inhibición del receptor en células de Purkinje del cerebelo es potenciada por activación de los receptores  $\beta_1$  adrenérgicos, que están acoplados al incremento del AMPc (Parfitt et al., 1990).

En contraste, en neuronas del hipocampo, se ha sugerido que la funcionalidad de este receptor es mayor cuando está en estado fosforilado o al menos asociado a alguna molécula reguladora. En este caso, el calcio actúa también como regulador, ya que se ha demostrado que una elevación de  $[Ca^{2+}]_i$  activa una fosfatasa dependiente de calcio-calmodulina que escindiría el grupo fosfato relacionado con la regulación de la funcionalidad de este receptor (Chen et al., 1990). También se ha observado que en ovocitos de *Xenopus* que expresan un receptor de GABA $_A$  recombinante tipo  $\alpha_1\beta_1\gamma_{2L}$ , la fosforilación por un ester de forbol inhibe la respuesta a GABA en un 70 %, y sin embargo, potencia el efecto de benzodiazepinas y barbituratos sobre la respuesta del GABA en un 200 % (Leidenheimer et al., 1993).

### 2.2.2.2. Guanosina monofosfato cíclico (GMPc) y su papel en la exocitosis

En la mayoría de las células animales, además del AMPc existe otro nucleótido cíclico, el GMPc, pero se halla presente en una concentración 10 veces inferior a la del AMPc.

## *Antecedentes*

La guanilato ciclasa, que puede ser soluble o particulada, cataliza la formación de GMPc. Este, estimula una proteína kinasa dependiente de GMPc. Existen en vertebrados dos tipos de kinasa, la soluble o GKI, con dos isoformas,  $\alpha$  y  $\beta$ , y la unida a membrana o GKII. Ambas difieren en su localización celular y en su funcionalidad. Así, GKI se encuentra en las células de Purkinje del cerebelo, músculo liso y plaquetas, controlando la concentración de calcio intracelular, mientras que la GKII se encuentra en las vellosidades del intestino delgado, regulando la absorción y secreción de Cl<sup>-</sup>. Entre las fosfodiesterasas relacionadas con el GMPc, como mencionamos anteriormente, se encuentra la tipo II, activada por GMPc, la III inhibida por GMPc y la tipo V, específica para GMPc. Estas fosfodiesterasas controlan los niveles y la duración de la acción del GMPc, siendo el propio GMPc regulador de sus actividades (Schmith et al., 1993).

Entre las diversas acciones que puede ejercer el GMPc citaremos la respuesta de la retina a la luz, la recepción olfatoria, esteroidogénesis, transporte renal e intestinal de iones, cambios en el calcio celular importantes en la agregación celular y contractilidad del corazón y músculo liso. Hoy en día tiene particular interés porque la guanilato ciclasa puede ser activada por óxido nítrico (NO), anteriormente conocido como factor relajante del endotelio (Schmith et al., 1993).

En las células cromafines se han estudiado los efectos del GMPc como consecuencia de la activación de los receptores muscarínicos (O'Sullivan & Burgoyne, 1990), Un análogo permeable del GMPc, 8-Br-GMPc, no tiene efecto sobre la secreción basal ni sobre la mediada por angiotensina II, bradiquinina o altas concentraciones de potasio, pero potencia la secreción debida a dosis bajas de nicotina (O'Sullivan & Burgoyne, 1990).

Hoy en día es objeto de estudio la regulación que ejercen los propios nucleótidos y las kinasas activadas por estos nucleótidos entre sí. Por ejemplo, la proteína kinasa dependiente de GMPc (PKG) media la reducción de calcio producida por AMPc en células musculares vasculares de ratón, ya que el AMPc causa una activación de la PKG (Lincoln et al., 1990). El hecho de que existan interacciones entre las diferentes kinasas, como la fosforilación por PKA de calcio-calmodulina kinasas o tirosina kinasas, hace que su actividad catalítica sea susceptible de regulación y hace a las kinasas más activas (Lincoln & Cornwell, 1993).

### *2.2.3. Papel de la fosfolipasa A<sub>2</sub> y del ácido araquidónico.*

Recientemente se ha confirmado que la adición externa de ácido araquidónico (AA) incrementa la liberación de CAs en ausencia y en presencia de agonistas que estimulan la secreción en células cromafines (Rindilisbacher et al., 1990). El AA se genera bien por la acción de una fosfolipasa de membrana, la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), que hidroliza fosfolípidos de membrana como fosfatidilcolina, ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, etc., o bien por la diacilglicerol lipasa, enzima que hidroliza el diacilglicerol (DAG), generando AA.

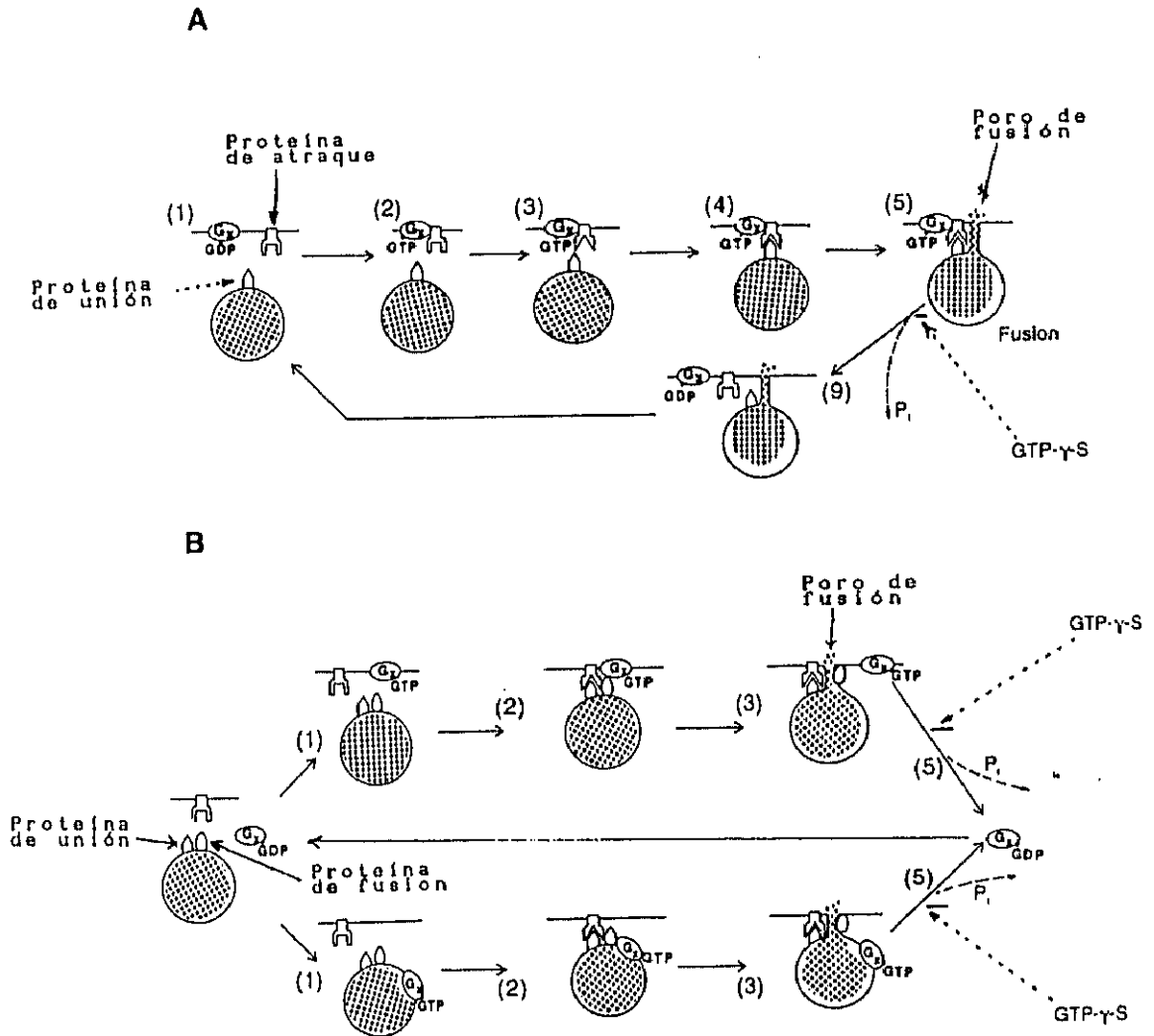
La PLA<sub>2</sub> puede ser activada por la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). El uso de inhibidores específicos de la PLA<sub>2</sub> no afecta la secreción basal ni la inducida por ouabaína (Negishi et al., 1992)

Al inhibir la DAG-lipasa con su inhibidor específico RHC 80267, se suprime la liberación de CAs, la cual es restaurada por la adición de AA. Este efecto es revertido por inhibidores

de la lipoxigenasa, una de las enzimas que degradan AA, lo cual indica que no sólo el AA, sino también alguno de sus productos de degradación por lipoxigenasa es esencial para producir la exocitosis en las células cromafines (Rindilisbacher et al., 1990). El AA parece inducir la fusión membrana-membrana entre gránulos cromafines aislados y podría estar directamente implicado en la fusión de membranas granular y plasmática (Zaks & Creuz, 1988). La liberación de AA acompaña el proceso de exocitosis dependiente de calcio en células cromafines permeabilizadas (Frye, 1985) e intactas (Frye, 1984). Según ciertos autores, el AA estimula la secreción de CAs en presencia de ouabaína por estimular el metabolismo de fosfatidilinositoles, de forma dependiente de calcio (Negishi et al., 1990). En contraste con esta afirmación, otros trabajos (Morgan & Burgoyne, 1990a) indican que el AA podría tener un papel minoritario en la regulación de la exocitosis dependiente de calcio en células cromafines bovinas permeabilizadas, o bien que tan sólo la estimulara a altas concentraciones, pues sólo a altas concentraciones es capaz de activar la PKC de tipo III, íntimamente relacionada con los procesos de síntesis y liberación de CAs (Koda et al., 1990). Por otra parte, parece ser que la calpactina y otras anexinas inhiben la PLA<sub>2</sub>, por unirse a fosfolípidos de membrana, impidiendo su actuación (Davidson et al., 1987). Al activarse la calpactina por CaCaM, se liberarían estos fosfolípidos atrapados, lo cual indica que el calcio puede ser también un regulador de esta vía: desinhibiendo la PLA<sub>2</sub> (ya que esta enzima está regulada fundamentalmente por CaCaM) o activando la calpactina. Por último, recientes trabajos indican que el AA y otros ácidos grasos son capaces de producir hiperpolarización por modular la conductancia al K<sup>+</sup> en células cromafines y PC12 (Enrenguber et al., 1993).

#### ***2.2.4. Papel de las proteínas G.***

La participación de proteínas G en el proceso de secreción es algo contradictoria, ya que si bien Knight y Baker (1985) comprobaron que en células cromafines bovinas electropermeabilizadas, el GTP $\gamma$ S tenía un marcado efecto inhibitor de la secreción inducida por elevación de la concentración de calcio intracelular, Penner y Neher (1989) observaron que el GTP $\gamma$ S no producía efecto alguno sobre la secreción en las mismas células intactas cuando este se perfundía a través de una micropipeta de "patch-clamp". Estos hallazgos contradictorios podrían ser explicados por la existencia de varios tipos de proteínas G diferentes acopladas a diversos sistemas efectores de la célula cromafín (Bader et al., 1989). Se ha observado que la activación de proteínas G por ciertos análogos de GTP pueden inducir la secreción independiente de calcio en células cromafines, efecto que puede estar desligado de la generación de AA (Morgan & Burgoyne, 1990b). Esto sugiere que la exocitosis en células cromafines puede ser estimulada a bajos niveles de calcio, activando una nueva proteína G, la G<sub>c</sub> (Gomperts et al., 1986), que podría participar de manera directa en el proceso exocitótico (Morgan & Burgoyne, 1990b). En el esquema 7 se representa el posible papel de estas proteínas en el proceso exocitótico. Dentro de este modelo cabrían dos posibilidades, que las proteínas G estén implicadas en la unión del gránulo a la membrana o bien que estas proteínas G estén relacionadas con la formación del poro de fusión. Por lo tanto parece claro que en células cromafines la exocitosis se halla controlada por proteínas G.



**Esquema 7. Posible papel de proteínas G en la etapas finales de la exocitosis. (A) Promoviendo el atraque de los gránulos en la membrana. La proteína G es necesaria para la unión del gránulo a la proteína de atraque. La activación permanente con GTP $\gamma$ S previene la disociación del complejo de unión y bloquea un nuevo ciclo de atraque y fusión. (B) Promoviendo la fusión del gránulo con la membrana. La activación de la proteína G puede estimular la proteína de fusión a formar el poro mismo. De la misma forma, si el complejo no se disocia, se produce una inhibición neta de la secreción. Estos posibles mecanismos no excluyen la posibilidad de una(s) proteína G con actividad inhibitora allí donde en el esquema se muestra una acción positiva (Knight et al., 1989).**

## *2.2.5. Papel del citoesqueleto en la exocitosis*

### *2.2.5.1. Composición y organización molecular del citoesqueleto en la célula cromafín*

El citoesqueleto de las células no musculares está compuesto por tres sistemas de filamentos diferentes: microtúbulos, filamentos intermedios (neurofilamentos de las neuronas) y microfilamentos. Estas estructuras forman una red ordenada y rígida en el citoplasma, lo que hace pensar que durante la exocitosis, el movimiento de los gránulos supone un cambio en el modo de anclaje e interacción con el citoesqueleto. Para comprender los cambios que sufre el citoesqueleto, es necesario conocer cuales son las estructuras que lo integran y cuales son los mecanismos a través de los cuales estos sistemas contribuyen al proceso de secreción. Por ello, haremos una pequeña revisión de cada uno:

#### Microtúbulos

Están formados fundamentalmente por moléculas de tubulina, que es un dímero que puede disociarse en dos subunidades denominadas  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina, de manera que la subunidad  $\beta$  de una molécula de tubulina está en contacto con la subunidad  $\alpha$  de la siguiente. La estequiometría de las cadenas suele ser 1:1. Se ha observado que las membranas de los gránulos cromafines contienen sitios de unión de alta afinidad, reversibles, para la tubulina (Bernier-Valentin et al., 1983; Bader et al., 1984). Los dímeros de tubulina se asocian dando lugar a una especie de membrana que sufre un enrollamiento y da lugar a la formación de los microtúbulos, los cuales constituyen unos auténticos "rafles" por donde

se desplazan los gránulos cromafines desde su sitio de ensamblaje, en el Golgi, hacia la periferia celular.

### Neurofilamentos

Las células cromafines poseen neurofilamentos, los cuales se consideran marcadores neuronales muy específicos. Los neurofilamentos se encuentran normalmente pobremente fosforilados (Georges et al., 1987; Grant et al, 1988), siendo su fosforilación una característica de la maduración axónica (Dahl et al., 1986; Fosher et al., 1987; Marc, 1986). No obstante, no parece existir en células cromafines una relación directa entre los neurofilamentos y el proceso secretor.

### Microfilamentos

Constituyen el sistema contráctil de la célula, debido a las fibras de actina y miosina, que se organizan de modo análogo al músculo esquelético.

La **miosina** en el músculo esquelético está formada por dos cadenas pesadas enrolladas en hélice, cada una con una cabeza que liga ATP y que se asocia a dos cadenas ligeras de miosina. Una molécula de miosina tiene dos sitios de fijación para la actina. En células cromafines, la miosina se sitúa preferentemente a nivel del espacio subplasmalemal, y puede participar en los mecanismos de secreción a través de su fosforilación por la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), formando los filamentos dipolares que dejan accesibles los sitios de unión de la actina. Con ello, la membrana plasmática experimenta un "arrugamiento" que podría afectar a los constituyentes de la membranas plasmática, entre ellos, los canales iónicos de sodio y calcio, lo que facilitaría la secreción (Friendman et al., 1986).

La **actina** puede estar en forma de monómero o actina G o bien en forma de polímero o actina F, formando una doble hélice. En este filamento formado, otra proteína de estructura helicoidal, la tropomiosina se enrolla uniendo siete moléculas de actina por cada una de miosina, y además liga en su extremo otra proteína, la troponina T, a la que se une la troponina C y la I. En presencia de calcio, la troponina C cambia de conformación, modificando la posición de la troponina I y, por lo tanto, de la troponina T, que desplaza ligeramente la tropomiosina, dejando al descubierto los sitios de unión para la miosina. La actina está presente en las células cromafines en las isoformas  $\beta$  y  $\gamma$ , principalmente en el espacio subplasmalemal, formando conexiones con la membrana plasmática y los gránulos de secreción (Thuret-Carnahan et al., 1985; Aunis et al., 1986). En una célula en reposo, la actina está polimerizada en forma de actina F impidiendo el movimiento de los orgánulos (esquema 8). Una estimulación de la célula podría modificar la organización de la actina, despolimerizándola, transformándola en actina G, con lo cual los gránulos podrían avanzar hacia las zonas de exocitosis. Ello ha sido puesto de manifiesto con diversas técnicas, como las citoquímicas, usando faloidina marcada con rodamina (Trifaró et al., 1992). La organización de los filamentos de actina F está controlada por varias proteínas que realizan tres tipos de funciones: las que impiden la polimerización de la actina G, como la profilina; las que fragmentan los filamentos de actina F, como la villina y la gelsolina, y la que forman puentes cruzados con otras estructuras (esquema 8). Comentaremos alguna de sus características.

La  $\alpha$ -actinina es una proteína de anclaje que promueve la formación de racimos de actina, haciendo que los filamentos de actina se entrecrucen de una forma determinada y sirve como punto de anclaje de estos filamentos con la membrana plasmática (Bader & Aunis, 1983). Es

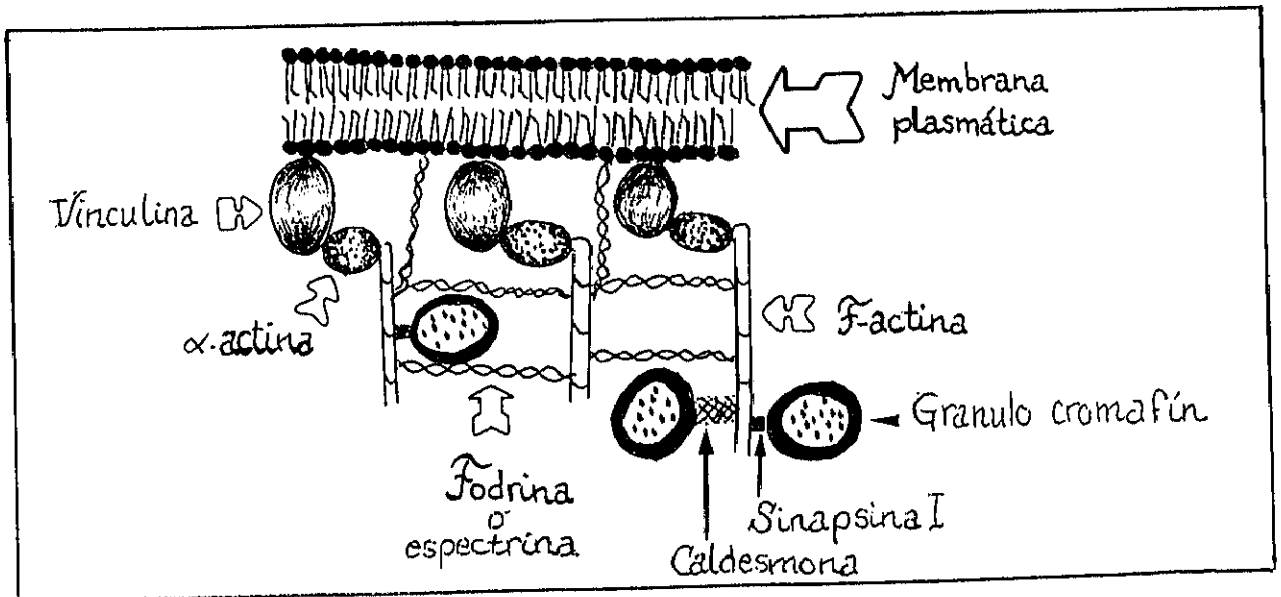
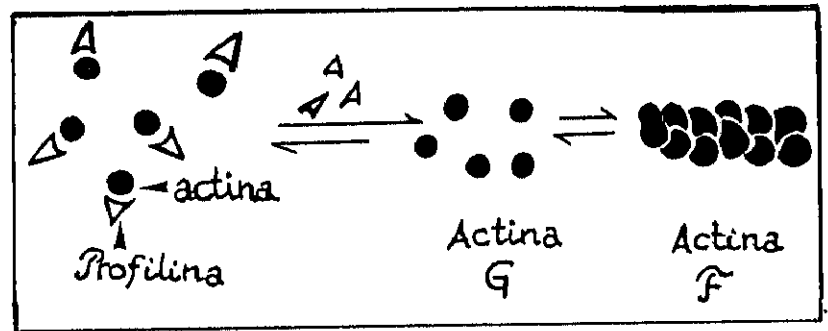
sensible al  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, de modo que cuando las concentraciones son inferiores a  $0.1 \mu\text{M}$  forma un enlace estable con la actina, que se desestabiliza a concentraciones de calcio por encima de  $0.1 \mu\text{M}$  (Burgoyne, 1984).

La espectrina o fodrina es una proteína de reticulación de la actina y puede ligar calmodulina. La fodrina parece ser responsable de la propiedad de las membranas de las células cromafines de aumentar la viscosidad de una solución de actina en ausencia de calcio (Aunis & Perrin, 1984).

La organización de la capa de fodrina cambia drásticamente tras la estimulación de las células cromafines por nicotina, por alto potasio o por ionóforos de calcio. Cuando éste ocurre, la fodrina se desliga de la F-actina (Perrin & Aunis, 1985), lo cual podría estar relacionado con el acercamiento de los gránulos secretores distantes de la membrana durante el proceso exocitótico. Probablemente interacciona con la sinapsina I, que une las vesículas a la F-actina. Al aumentar el calcio quedan libres de la actina lo que permite a las vesículas moverse hacia las zonas de exocitosis. En efecto, en condiciones de reposo, los gránulos cromafines están anclados en posiciones más o menos fijas y separadas de la membrana plasmática por una red de F actina/fodrina que impide su acceso a los sitios de exocitosis en la membrana. Una estimulación de las células iría seguida de una fluidificación de esta red, siendo entonces posible el movimiento de los gránulos hacia la membrana. En este proceso es imprescindible una elevación de calcio intracelular. La fodrina tiene un sitio de unión para el calcio, que liga de forma reversible en su subunidad  $\alpha$ .

La gelsolina es capaz bien de formar en presencia de concentraciones micromolares de

calcio y monómeros de actina G, complejos gelsolina-(calcio)<sub>x</sub>-(actina)<sub>x</sub>, que promueven la nucleación de la actina G al unirse al extremo B de la cadena de actina, o bien en presencia de las mismas concentraciones de calcio y actina F, formar complejos gelsolina-(calcio)<sub>2</sub> que fragmentan los filamentos de actina F, con lo que la viscosidad del medio disminuye (Bader et al., 1986a).



Esquema 8. Organización de algunas proteínas del citoesqueleto relacionadas con la actina.

Por ultimo, la escinderina está presente en células secretoras preferentemente en el citoplasma cortical de las células cromafines. Tras la estimulación colinérgica, hay una redistribución de la escinderina, que además produce el desensamblaje de la F actina originándose áreas subplasmalemales con la viscosidad citoplásmica reducida, lo que favorece la movilidad de los gránulos de secreción (Trifaró et al., 1992).

#### 2.2.5.2. *Proteínas del citoesqueleto y secreción. Influencia del calcio y proteína kinasas*

El  $\text{Ca}^{2+}$  interviene en el control de la exocitosis que ejercen las proteínas del citoesqueleto, a varios niveles: (1) a nivel de la fodrina, por alterar su estructura probablemente por intervención de la calmodulina, y permitiendo el acercamiento de los gránulos hacia la membrana; (2) a nivel de la  $\alpha$ -actinina, liberando los gránulos de su anclaje; (3) a nivel de la gelsolina, rompiendo la red citoesquelética de F-actina, disminuyendo su viscosidad. A través de la caldesmona, que es una proteína citosólica de 70 KDa presente en la periferia de las células cromafines (Burgoyne et al., 1986), capaz de unirse a la actina, siendo ésta unión dependiente de calcio mediada por la calmodulina. Si el calcio está en concentraciones micromolares forma un complejo caldesmona/calmodulina, pero si el calcio es nanomolar forma un complejo caldesmona/ actina F (Kakiuchi & Sobue, 1983). El aumento de la concentración intracelular de calcio puede desplazar, por tanto, la caldesmona de la actina, permitiendo su interacción con la filamina, también presente en las células cromafines (Burgoyne & Cheek, 1986) y la consecuente gelificación de la red de actina.

## *Antecedentes*

En las células cromafines la fosforilación de proteínas está estrechamente relacionada con los procesos de secreción, ya que se ha visto que una estimulación de las células provoca, en paralelo, la liberación de CAs y la incorporación de  $^{32}\text{P}$  en ciertas proteínas celulares (Amy & Kirschner, 1981). Esta regulación por fosforilación reversible de proteínas es bien conocida en otros tejidos (Nairn et al., 1985), y afecta a proteínas específicas de la membrana del gránulo cromafín, a diversas proteínas de la membrana plasmática y a proteínas del citoesqueleto. Las kinasas más importantes que intervienen en los procesos de exocitosis en células cromafines son: la activada por calcio-calmodulina (PKCaCaM); la activada por AMPc (PKA); la activada por  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfolípidos (PKC) y la activada por GMPc (PKG). Estudiaremos a continuación su participación en los mecanismos de secreción:

### Proteína quinasa dependiente de $\text{Ca}^{2+}$ y calmodulina (PKCaCaM)

La calmodulina es un candidato evidente como mediador de la acción del  $\text{Ca}^{2+}$  en las células cromafines. Treiman y col. (1983) mostraron la presencia de una quinasa dependiente de calcio-calmodulina a nivel de la membrana del gránulo cromafín. Esta quinasa puede ser activada por un aumento de la tasa intracelular de calcio y su acción podría estar en relación con la actividad secretora de la célula, ya que se ha demostrado que compuestos que antagonizan in vitro la acción de la calmodulina (Wakade & Wakade, 1984) o anticuerpos específicos anticalmodulina (Kenigsberg & Trifaro, 1985) inhiben la secreción estimulada de CAs. Según Llinas y col. (1985) la función de la PKCaCaM sería la de fosforilar la sinapsina. Esta proteína en su forma defosforilada se une a la membrana de vesículas sinápticas, impidiendo su interacción con la membrana plasmática. Su fosforilación, en cambio, impide su acción inhibitoria a nivel de las vesículas sinápticas, permitiendo así el

movimiento de las vesículas hacia las zonas activas de la exocitosis y, como consecuencia, la liberación del neurotransmisor.

No se descartan, sin embargo en las células cromafines otras posibles funciones, dado su gran espectro de acción como mediador de varias acciones del  $\text{Ca}^{2+}$ . Las células cromafines contienen, además, un tipo particular de kinasa dependiente de calcio-calmodulina: la kinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), que permite la formación de filamentos bipolares de miosina, por fosforilar sus cadenas ligeras (Serventi & Coffee, 1989). Esta fosforilación deja accesibles los sitios de fijación para la actina, dando lugar a la formación de la actomiosina. El calcio podría así modular las interacciones entre la actina y la miosina.

#### Proteína kinasa dependiente de AMPc (PKA)

Las células cromafines poseen una kinasa A a nivel de la membrana de los gránulos de secreción, lo que podría indicar su intervención a nivel de los mecanismos de secreción (Treiman et al., 1983; Burgoyne & Geisow, 1982). De hecho se ha confirmado en otros tejidos, como lactotrofos bovinos que el AMPc facilita la secreción inducida por calcio de manera sinérgica, actuando directamente en el aparato secretor, de manera independiente a la activación de la conductancia de membrana (Sikdar et al., 1990). En células cromafines permeabilizadas la PKA regula la secreción dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Morgan et al., 1993). Su acción podría discurrir a través de la despolimerización de microtúbulos, con la consiguiente fluidificación de la membrana plasmática (Kennedy et al., 1979, Cheek & Burgoyne, 1987).

Proteína kinasa C (PKC)

La PKC es activada por diacilglicerol y sus análogos estructurales, los ésteres de forbol. La utilización de células permeabilizadas ha permitido efectivamente mostrar que los ésteres de forbol disminuyen la cantidad de calcio necesaria en el medio de incubación para provocar la exocitosis (Knight & Baker, 1983; Pocotte et al., 1985). De los tres subtipos de PKC el que parece estar implicado en la exocitosis es el tipo III o  $\alpha$  (Koda et al., 1990). Grant y Aunis (1990), tratando las células cromafines en cultivo primario con el éster de forbol 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), han observado que esta sustancia induce la fosforilación de neurofilamentos. El TPA produce también la reorganización de la actina (Vitale et al., 1992), habiéndose observado que al menos dos proteínas distintas del citoesqueleto son susceptibles a la influencia de la activación de la PKC (Grant & Aunis, 1990). El estudio con ésteres de forbol sobre la secreción de las células cromafines muestra una rápida y transitoria disminución en el contenido de actina en la fracción del citoesqueleto, que implica la despolimerización de la actina 30 segundos después del tratamiento con TPA (Burgoyne et al., 1989a). El TPA produce cambios en la organización de la fodrina (Sobue et al., 1988) y la vinculina (Schiliwa et al., 1984), en otras células en cultivo. Además de la vinculina (Kawamoto et al., 1984; Werth et al., 1983), algunas otras proteínas asociadas a la actina como la miosina (Naka, 1983), filamina (Kawamoto, 1984), troponina (Katoh, 1983) y talina (Litchfield, 1986), han sido identificadas in vitro como sustratos de la PKC. La PKC produce una inmediata fosforilación de proteínas, lo que produce un aumento rápido de la secreción de CAs en células cromafines, pero además parece tener un segundo mecanismo más lento, que ocurre al cabo de varias horas y que requiere la transcripción de genes y síntesis de proteínas, que es independiente de la continua activación de la PKC (Bittner et al., 1990).

## ***2.2.6. Receptores implicados en la regulación de la secreción de CAs por las células cromafines***

### ***2.2.6.1. Receptores colinérgicos***

La secreción de CAs por las células cromafines de la médula adrenal es regulada fundamentalmente por los receptores colinérgicos, nicotínicos y muscarínicos localizados en sus membranas. La abundancia relativa de cada uno depende de la especie animal. En vaca prácticamente todos los receptores de Ach son de tipo nicotínico, mientras que en rata, cobaya o cerdo parecen predominar los muscarínicos. Las células cromafines presentan ambos tipos de receptores nicotínicos: los nicotínicos de  $\alpha$ -bungarotoxina y los funcionales nicotínicos de Ach (Geertsen et al., 1990). Los receptores nicotínicos son de alta afinidad, de tipo ganglionar, es decir, similares a los centrales y no a los neuromusculares (Miwa et al., 1993). La activación del receptor nicotínico provoca la apertura del canal catiónico para el  $\text{Na}^+$  que forma parte de este receptor y la consiguiente despolarización de la célula. Ello supone una entrada de calcio del medio extracelular, que produciría el desensamblaje de los filamentos de actina en áreas próximas a la membrana plasmática (Vitale et al., 1992), con el consiguiente incremento de la secreción.

En el caso de la estimulación muscarínica, la respuesta está mediada por un aumento del GMPc, y la generación de  $\text{IP}_3$ , que libera  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares. El efecto sobre la secreción de CAs parece ser estimulante debido a la elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular subsiguiente a la formación de  $\text{IP}_3$ , en las células donde estos receptores son los mayoritarios (Forsberg et al., 1986), como en las células cromafines porcinas (Xu et al., 1992).

## *Antecedentes*

La estimulación de estos receptores, por lo tanto, tiene como consecuencia la liberación de grandes cantidades de noradrenalina y adrenalina a la sangre circulante, llegando así a todos los tejidos de la economía. La proporción de adrenalina y noradrenalina liberada varía también según la especie animal y puede cambiar, además según las condiciones fisiológicas, como es el caso de la hipoglucemia o la asfixia, que aumentan la secreción de adrenalina por depleción de los reservorios de la médula adrenal (Hirano & Nijima, 1980). También puede variar según la naturaleza del estímulo.

Además de los receptores colinérgicos, se han encontrado otros sistemas receptores en estas células, cuya presencia podría estar relacionada con el control de la secreción, por lo que se han sido estudiado en virtud de su capacidad para modular la secreción de CAs. De los diferentes sistemas neurotransmisores presentes en las células cromafines comentaremos brevemente los adrenérgicos, los neuropeptidérgicos, los dopaminérgicos, los purinérgicos, los serotoninérgicos e histaminérgicos. Del GABA y sus receptores hablaremos detalladamente en sucesivos apartados.

### 2.2.6.2. Otros receptores

#### Receptores adrenérgicos

Ciertos estudios han mostrado la presencia de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos a nivel de la membrana plasmática de las células cromafines. Existen dos subtipos de receptores  $\alpha$ , los  $\alpha_1$ , cuyo mecanismo de acción está relacionado con la hidrólisis de fosfatidil inositoles

y los  $\alpha_2$ , relacionados con la inhibición de adenilato ciclasa a través de proteínas  $G_i$  inhibitoras. Ambos parecen inhibir la secreción de catecolaminas en respuesta a la Ach (Sakurai et al., 1983), aunque parece haberse demostrado que los receptores  $\alpha_2$  no están presentes en la médula adrenal de todas las especies animales (Molderings et al., 1993). Los receptores  $\beta$  ( $\beta_1, \beta_2$  y  $\beta_3$ ), que actúan a través de proteína  $G_s$ , activando la adenilato ciclasa y produciendo un incremento en los niveles intracelulares de AMPc, tienen un efecto estimulante sobre la secreción de CAs (Greenberg & Zinder, 1982). Por último, la imidazolina, que es un agonista de los receptores  $\alpha$  adrenérgicos, parece tener sitios de unión específicos, llamados IBS, subdivididos en  $I_1$  e  $I_2$ -IBS (Molderings et al., 1993).

### Receptores de dopamina

La dopamina es un intermediario en la síntesis de adrenalina y noradrenalina, que puede ser secretado conjuntamente con estas otras CAs. Los receptores de dopamina de las células cromafines pueden ser también estimulados por la dopamina del plasma circulante. Las células cromafines parecen poseer receptores de dopamina  $D_1$ , que actúan incrementando los niveles de AMPc, produciendo la activación de las corrientes de  $Ca^{2+}$  facilitadoras. Se cree que este incremento de la corriente de  $Ca^{2+}$  podría tener una importancia fisiológica en la estimulación de la secreción rápida de CAs en respuesta al peligro o al estrés (Artalejo et al., 1990). Los receptores  $D_1$  también parecen estar acoplados a PLC, activando PKC (Mahan et al., 1990). El otro tipo de receptor dopaminérgico,  $D_2$  no parece estar presente en las células cromafines (Bigornia et al., 1988).

### Receptores de neuropéptidos

La célula cromafín contiene péptidos opioides, encefalinas y dinorfina, que se liberan al mismo tiempo que las catecolaminas, cuando las células son estimuladas. Con agonistas específicos de los diversos receptores opioides marcados radioactivamente con [<sup>3</sup>H], se ha observado que existen sitios de unión tipo  $\mu$  con [<sup>3</sup>H]dihidromorfina,  $\delta$  con [<sup>3</sup>H][D-Ala<sup>2</sup>-D-Leu<sup>5</sup>]-encefalina,  $\kappa$  con [<sup>3</sup>H]-etilquetazocina y  $\sigma$  con [<sup>3</sup>H]-N-alilnormetazocina (Costa et al., 1983). Sin embargo no se descarta que en las células cromafines existan unos receptores opioides inusuales que reconozcan sólo unos pocos de los diferentes péptidos que se encuentran en estas células (Marley et al., 1986). Estos receptores opioides específicos podrían modular la secreción estimulada por los receptores nicotínicos. Parece ser que encefalinas, dinorfina y  $\beta$ -endorfina (Marley et al., 1986) y ligandos específicos para los diferentes receptores (Paul et al., 1993) inhiben la secreción estimulada por nicotina, en tanto que no tienen ningún efecto sobre la secreción basal. El nervio esplácnico que inerva la médula suprarrenal contiene también cantidades apreciables de sustancia P, que parece tener una acción a nivel de los mecanismos de secreción por actuar a nivel del canal de sodio acoplado al receptor nicotínico, impidiendo la despolarización de la membrana producida por Ach ; aunque también parecen proteger de la desensibilización a este receptor (Livett, 1984).

### Receptores purinérgicos

La adenosina y sus análogos son sustancias que pueden actuar como neuromoduladores en las células cromafines. El propio ATP, que se libera en el proceso excitotóxico y se degrada extracelularmente por ectonucleotidasas para formar adenosina (Miras-Portugal et al., 1990), puede por sí mismo modular la secreción de CAs. Los receptores purinérgicos

## *Antecedentes*

han sido subdivididos en  $P_1$ , sensibles a adenosina y AMP y  $P_2$ , sensibles a ADP y ATP. Los  $P_2$ , que a su vez se dividen en  $P_{2X}$  y  $P_{2Y}$  difieren en las células cromafines de los encontrados en otros tejidos, ya que no sólo no inhiben la adenilato ciclasa, sino que son capaces de estimular pequeños aumentos de AMPc a concentraciones de ATP de  $100 \mu\text{M}$  o menores (Allsup et al., 1990). Resultados recientes de Castro y col. (1994) muestran que los receptores  $P_2$  de las células cromafines son diferentes a los subtipos clásicos  $P_{2X}$  y  $P_{2Y}$  y están exclusivamente acoplados al influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ . La activación de estos receptores inhibe la secreción evocada por Ach, efecto observado para el ATP, ADP, la adenosina y los polifosfatos de diadenosina,  $\text{AP}_x\text{A}$  (Castro et al., 1990). Los polifosfatos de adenosina, que parecen actuar a nivel de receptores  $P_{2Y}$  de la membrana plasmática (Pintor et al., 1991), se sabe que se coalmacenan en los gránulos cromafines y se liberan por estimulación nerviosa (Pintor et al., 1992).

## Receptores serotoninérgicos

La serotonina fue detectada en médula adrenal por ensayos fluorimétricos (Snyder et al., 1965). Células inmunoreactivas a la serotonina se hayan difusamente distribuídas en toda la médula adrenal en tres tipos celulares, uno de los cuales es la célula cromafín (Fernández-Vivero et al., 1993). Esta amina no se sintetiza en la médula, sino que es captada de la circulación, por medio de un mecanismo de recaptación selectivo. Esta serotonina, que se co-libera junto con las CAs, podría tener un papel en la esteroidogénesis de mamíferos. Debido a que las CAs son liberadas masivamente bajo condiciones de estrés, es concebible que la serotonina participe en la estimulación de la producción de corticosteroides producida bajo estas condiciones (Delaure et al., 1988).

### Receptores histaminérgicos

La histamina es un secretagogo bien caracterizado en la células cromafines bovinas (Plevin & Boarder, 1988). La activación de sus receptores H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> produce un incremento en los niveles de AMPc, parece ser que por activación de la adenilato ciclasa por acoplamiento a proteínas Gs. La contribución más importante es debida al receptor H<sub>1</sub>, que incrementa la secreción de CAs de manera dependiente de calcio, mientras que la respuesta mediada por el receptor H<sub>2</sub> no se afecta por el calcio extracelular. El receptor H<sub>3</sub> no tiene ningún efecto sobre la secreción ni sólo ni en combinación con la estimulación de los receptores H<sub>1</sub> ó H<sub>2</sub> (Marley et al., 1991). No obstante, la secreción inducida por la histamina es mucho menor que la producida por la nicotina (Pender & Burgoyne, 1992).

## ***3. El ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA)***

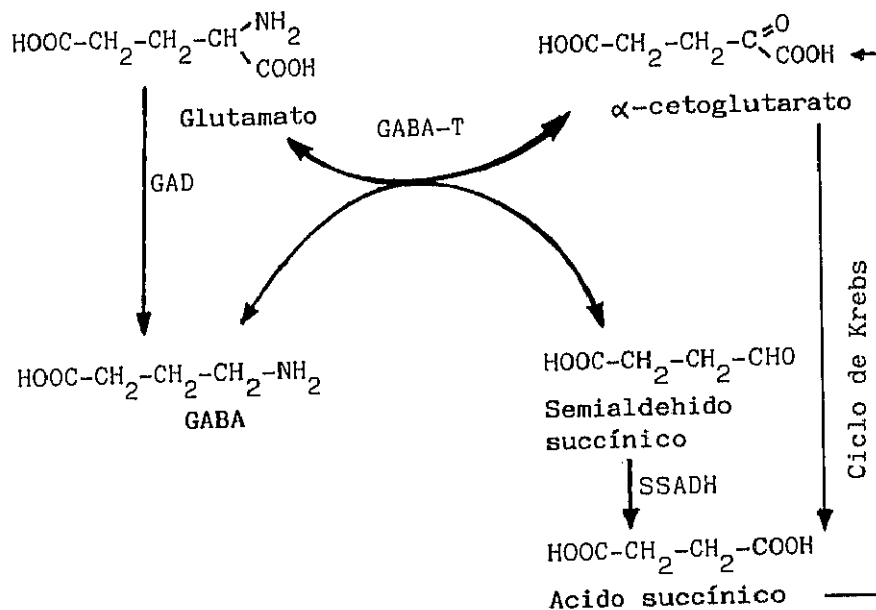
### ***3.1. Generalidades.***

Ciertas evidencias anatómicas y fisiológicas sugieren que los aminoácidos neurotransmisores son los que comunican la mayor parte de las respuestas "sí-no" o de excitación-inhibición en el Sistema Nervioso Central (SNC), mientras que otros tipos de neurotransmisores actúan como neuromoduladores más difusos. De los aminoácidos alifáticos con dos átomos de carbono, aquellos que poseen un grupo ácido y uno amino, como el GABA o la glicina, son inhibitorios; mientras que los que tienen dos grupos ácidos y sólo un  $\alpha$ -amino, como el glutamato o el aspartato, son excitatorios. Entre todos ellos, el ácido

$\gamma$ -aminobutírico o GABA ha sido uno de los más estudiados. Robers y Awapara descubrieron su presencia en el cerebro en 1950 y actualmente se ha estimado que aproximadamente un 30 % de las sinapsis centrales son GABAérgicas (Sieghart, 1989).

### 3.2. Metabolismo del GABA

La fuente fundamental de energía del cerebro, la glucosa, es el principal precursor de GABA. La síntesis se realiza a través de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) que transforma el ácido glutámico en GABA. Este es posteriormente degradado por la GABA-transaminasa (GABA-T) a semialdehído succínico, el cual pasa a ácido succínico por acción de la semialdehído succínico deshidrogenasa (SSADH) (esquema 9).



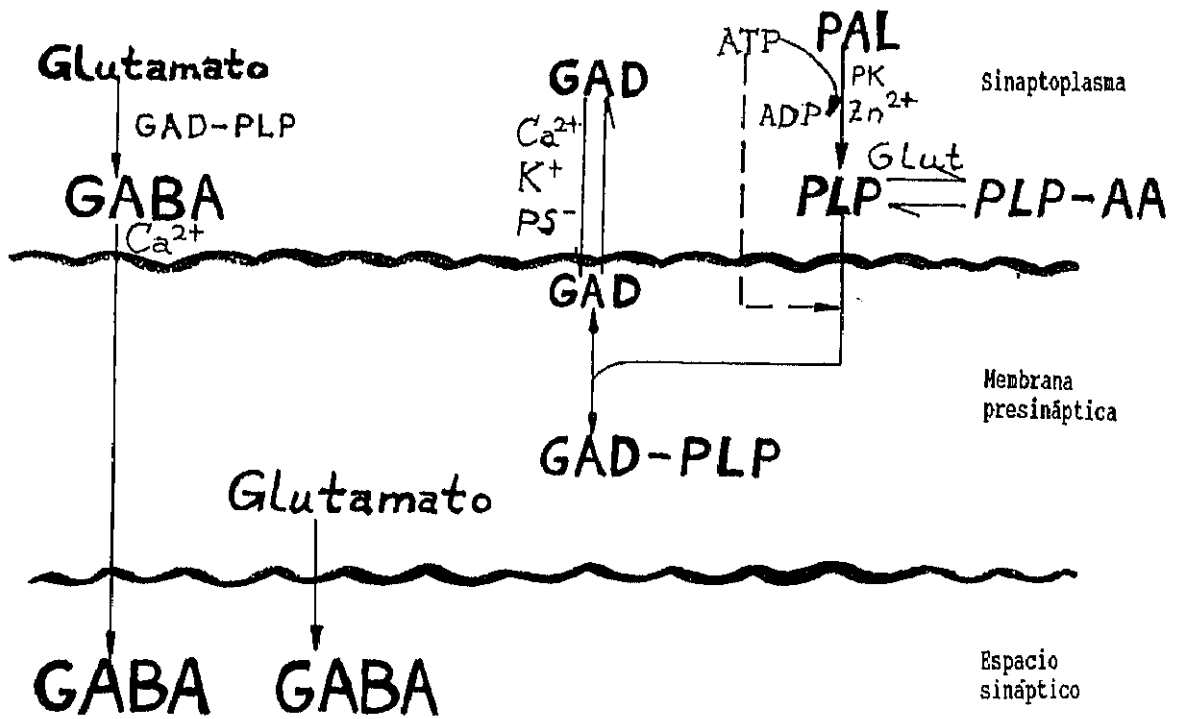
Esquema 9. Síntesis y degradación del GABA. GABA-T: GABA transaminasa, GAD: ácido glutámico descarboxilasa, SSADH: semialdehído succínico deshidrogenasa.

## *Antecedentes*

La **GAD** tiene un peso molecular de 85 KDa y requiere piridoxal fosfato como cofactor. Su  $K_m$  es del orden de mM para el glutamato y para el piridoxal fosfato, lo cual indica que la enzima está plenamente saturada por su sustrato y su cofactor en condiciones fisiológicas, dadas las elevadas concentraciones en que se encuentran en la célula. Esta enzima se encuentra fundamentalmente en neuronas GABAérgicas en el S.N.C. Se sintetiza en el pericarion neural desde donde es rápidamente transportada a las terminaciones nerviosas.

Como la síntesis de GABA en el S.N. depende de la actividad de la GAD, la regulación de esta enzima está íntimamente ligada a los mecanismos inhibitorios de S.N.C. Ya que la enzima es dependiente del piridoxal fosfato (PLP), esta molécula juega un papel muy importante en la regulación de su actividad. Parece ser que la enzima existe en dos formas, una que es dependiente de la concentración de PLP libre en el medio y por tanto es inhibida por compuestos que atrapan PLP o se unen a la enzima en el mismo sitio que el PLP, y la otra forma que liga levemente PLP y por tanto es independiente de la concentración de PLP en el medio (esquema 10). Ambas formas presentan las siguientes características:

- a) sus  $K_m$  para el glutamato son idénticas.
- b) la GAD independiente de PLP posee PLP ligado a la enzima (GAD-PLP) el cual no puede ser desplazado por análogos del PLP ni por diálisis.
- c) la relación entre las dos formas enzimáticas (GAD/GAD-P) es 2.8, lo que significa que entre el 25-30 % de la GAD corresponde a la forma GAD-PLP y entre el 70-75 % a la enzima libre (forma GAD).
- d) las dos formas de la enzima son independientes y no pueden ser interconvertibles.
- e) la GAD dependiente de PLP parece seguir una cinética aleatoria con respecto a la unión de PLP y sustrato.



Esquema 10. Regulación de la actividad de la GAD en el S.N.C. Las dos formas de la GAD no interconvertibles están separadas (GAD y GAD-PLP). La forma GAD-PLP, independiente de piridoxal fosfato (PLP) se encuentra solubilizada en el citoplasma, pudiendo sintetizar GABA en el mismo. Este GABA puede liberarse al espacio sináptico al producirse una despolarización de la membrana y aumentarse el calcio intracelular. La síntesis de PLP depende fundamentalmente de la actividad de la piridoxal kinasa (PK), una enzima localizada en el sinaptoplasma que se cree que está regulada por Zn<sup>2+</sup>. La fosforilación del piridoxal (PAL) por esta PK requiere ATP como donador de grupos fosfato (Hertz et al., 1983).

## *Antecedentes*

De los estudios llevados a cabo *in vivo* e *in vitro* se llegó a la conclusión de que la regulación de la GAD podría efectuarse como se indica en el esquema 10. La enzima PLP dependiente (GAD) está fundamentalmente unida a la membrana del sinaptosoma mediante fuerzas electrostáticas que involucran la alta concentración de  $K^+$  intracelular y/o el  $Ca^{2+}$ . Como esta GAD no es soluble el GABA producido por su acción catalítica no puede almacenarse en vesículas sino que se libera inmediatamente (liberación tónica). Por lo tanto la inhibición de esta GAD daría lugar a convulsiones como consecuencia de la disminución de GABA en la región sináptica. La GAD se ha encontrado en células cromafines (Miler et al., 1978), donde presenta características similares a la enzima del cerebro en lo que respecta sus requerimientos de PLP y su  $K_m$  para el glutamato (Fernández-Ramil et al., 1982).

La **GABA-T** es la enzima clave en el metabolismo del GABA. Esta enzima no es altamente específica y se puede encontrar en células que no sean GABAérgicas. La función de la GABA-T es la de mantener una cierta concentración de GABA en la región sináptica. La regulación de la enzima puede ser endógena o exógena. La regulación endógena está ligada a su mecanismo cinético denominado de "ping-pong", es decir, que la enzima puede oscilar entre dos estados relativamente estables, el unido a PLP y el unido a la piridoxamina fosfato. La regulación exógena se consigue con agentes externos, por lo que fármacos que inhiban la GABA-T pueden utilizarse en el tratamiento de enfermedades que causan convulsiones o en estados de ansiedad, dolor, problemas circulatorios o asociados a la regulación del apetito. La GABA-T tiene un peso molecular de 109 KDa, su  $K_m$  para el GABA es de 1.1 mM. La disponibilidad del  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG) tiene importancia en la degradación del GABA, y ello es particularmente cierto cuando la respiración cesa. Al depender el ciclo tricarboxílico del metabolismo aeróbico, los niveles de  $\alpha$ -KG declinan

durante la anoxia, con lo cual el GABA no puede ser metabolizado, aunque sí continúa siendo sintetizado, ya que la GAD es una enzima anaeróbica. Por ello hay un rápido incremento de los niveles de GABA en cerebro post-mortem, acompañado de una rápida bajada del contenido de glutamato (McGeer & McGeer, 1989).

### *3.3. Rutas GABAérgicas*

#### *3.3.1. En el Sistema Nervioso Central (SNC)*

La localización de rutas específicas GABAérgicas en el SNC, resulta extremadamente difícil dada la gran heterogeneidad neural que presentan incluso las regiones más pequeñas del cerebro. Por ello, la mayoría de los datos conocidos actualmente a este respecto se han obtenido mediante localización de su enzima de síntesis, la GAD, en las distintas regiones cerebrales por técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos anti-GAD. Los principales lugares donde el GABA realiza funciones como neurotransmisor inhibidor post-sináptico son las siguientes (Laurent, 1983):

**Cerebelo:** Interneuronas de células en cesta y células de Golgi, que son aferentes hacia las células de Purkinje (eferentes). La función de estas vías es la de controlar el movimiento y el equilibrio.

**Corteza cerebral:** Interneuronas de células en cesta, células en candelabro y células

peptidérgicas. Su misión se relaciona con la integración sensorial y motora. Son las neuronas afectadas en la epilepsia.

**Sistema límbico:** El GABA es el mediador de la inhibición local de las células en cesta del hipocampo que se proyectan sobre las neuronas piramidales. También existen neuronas GABAérgicas en la amígdala y Núcleo Accumbens. Su función se relaciona con la transmisión de las emociones, la ansiedad y el estrés.

**Ganglios basales:** Interneuronas estró-nigrales y estró-palidales. Controlan vías dopaminérgicas nigro-estriatales y su función es el control del movimiento y las estereotipias.

**Tronco encefálico:** Células del tectum, sustancia gris del periacueducto (PAG) y formación reticular. Estas vías tienen un importante papel en la mediación de sedación y estados de hipnosis y alerta, así como en la relajación muscular.

**Médula espinal:** Interneuronas responsables de los potenciales post-sinápticos inhibitorios lentos (IPSP) en las astas dorsales de la médula espinal. Intervienen en la relajación muscular y la analgesia.

### *3.3.2. Presencia de GABA en el Sistema Nervioso Periférico (SNP)*

Las primeras afirmaciones sobre la función del GABA únicamente como transmisor del SNC han sido descartadas por diversos descubrimientos. Las primeras evidencias fueron dadas por Jessen y col. (1979) por estudios bioquímicos y ensayos de autorradiografía. El GABA actúa a nivel periférico, realizando funciones neurotransmisoras, modulando sistemas endo y exocrinos, realizando acciones tróficas y morfogenéticas (como uno de los factores

neurotróficos implicados en la regulación del desarrollo neuronal), y otras funciones putativas, como la proliferación de las células del timo o modulación de la respuesta inmune (Erdö & Bowery, 1986).

Se conocen procesos de síntesis, almacenamiento y transporte de GABA (Erdö & Wolff, 1990) en:

**Neuronas del S.N. Simpático** (ganglios simpáticos y ganglios cervicales superiores), **neuronas del S.N. Parasimpático** (estructuras del sistema nervioso gastrointestinal y vejiga urinaria), y también en otros tipos de **neuronas periféricas** (fibras nerviosas de la glándula tiroides).

**Células endocrinas**, como células cromafines adrenales, pinealocitos, células  $\beta$  pancreáticas o células endocrinas de la pituitaria.

**Células exocrinas**, como las del páncreas y estómago, oviducto, hígado, riñones o la piel.

**Otros tipos de células**, como espermatozoides o células sanguíneas.

### ***3.5. Receptores de GABA: clasificación y mecanismos de acción***

Durante los últimos años, se ha puesto de manifiesto, tanto en el SNC como en tejidos del SNP, la existencia de dos poblaciones de receptores para el GABA, que son farmacológica y funcionalmente diferentes, el denominado GABA<sub>A</sub>, por ser el primero en descubrirse, y el denominado GABA<sub>B</sub>, descubierto más recientemente (Bowery, 1983).

### **3.5.1. Receptores GABA<sub>A</sub>**

#### **3.5.1.1. Características farmacológicas**

Los receptores GABA<sub>A</sub> se caracterizan farmacológicamente por ser sensibles al antagonismo competitivo por bicuculina, un alcaloide natural obtenido de la *Amanita biculens*. Los agonistas GABAérgicos clásicos son el muscimol (un compuesto isoxazólico aislado de la *Amanita muscaria*, la isoguvacina o el ácido 3-amino propanosulfónico (3APS) (Krogsgaard-Lorsen et al., 1983), etc.

Además de la bicuculina, otros compuestos como la picrotoxina (PTX) (White et al., 1985) y derivados tipo piridacínil-GABA (Desarmenien et al., 1987), son antagonistas selectivos del receptor GABA<sub>A</sub>, actuando a nivel del propio canal de Cl<sup>-</sup> que forma este receptor, impidiendo su apertura.

Es conocido que además del sitio de unión de GABA, el receptor GABA<sub>A</sub> presenta sitios de unión alostéricos para otros agentes. Uno de estos sitios es el que reconoce benzodiazepinas (BZ) ansiolíticas e hipnóticas (Guidotti et al., 1978) y β-carbolinas (ansiogénicas) (Skerit et al., 1983). Otros sitios alostéricos están implicados en el reconocimiento de convulsivantes como la PTX, la bicuculina y el butil bicilo fosforotionato (TBPS) (Olsen et al., 1981; Akaike & Oomura, 1984; White et al., 1985), barbitúricos (anticonvulsivante) (Olsen & Snowan, 1982), algunos anestésicos, como la alfaxalona o el propofol, esteroides y algunos antihelmínticos, como la avermectina o insecticidas (Sieghart, 1992) (esquema 12). Estas sustancias interaccionan de manera no competitiva con

el [<sup>3</sup>H]-GABA (Matsumoto, 1989). Todas ellas producen, al menos una parte de sus efectos farmacológicos, por su interacción con los receptores GABA<sub>A</sub> (Sieghart, 1992), aunque se ha descrito un receptor únicamente sensible a benzodiazepinas, llamado receptor BZ de tipo periférico o PBR (Canat et al., 1993) e incluso se ha clonado un receptor BZ mitocondrial (Casalotti et al., 1992). Sus mecanismos de acción serán ampliamente comentados en el apartado V (Discusión), ya que su estudio es objeto de esta Tesis Doctoral.

Si se acepta el receptor formado por dos subunidades  $\alpha$  y dos  $\beta$ , hay alrededor de veintiséis cargas positivas localizadas hacia el exterior (Barnard et al., 1987). Existen numerosas evidencias para afirmar una influencia positiva de aniones permeabilizantes en la unión de ligandos alostéricos específicos. De hecho, en este receptor se conocen al menos dos sitios de unión para aniones (Bormann, 1988).

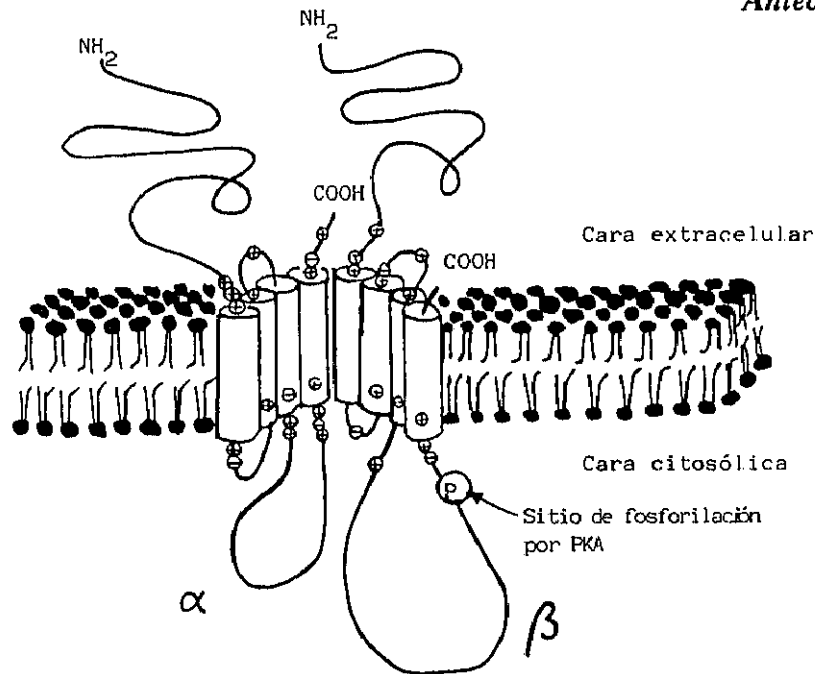
### 3.5.1.2. Estructura molecular del receptor GABA<sub>A</sub>

La estructura del receptor GABA<sub>A</sub> ha sido objeto de un intenso estudio, debido a la variedad de sitios de unión para drogas farmacológicamente útiles (esquema 12). El complejo molecular del receptor GABA<sub>A</sub> fue purificado de corteza cerebral bovina (Sigel, 1983; Sigel, 1984), y clonado (Schofield et al., 1987). Los primeros estudios indicaban la existencia de dos subunidades:  $\alpha$  y  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$ , de peso molecular 53 KDa y la  $\beta$  de 57 KDa, con estequiometría  $\alpha_2\beta_2$  (Casalotti et al., 1986) (esquema 11). Usando anticuerpos monoclonales para las diferentes subunidades se observó que la subunidad  $\alpha$  tenía afinidad por el flunitrazepam, en tanto que la  $\beta$  la tenía por el muscimol (Matsumoto et al., 1989). Por otro

lado, el grupo de Matsumoto (1989) describió la existencia de dos sitios de unión del GABA a su receptor GABA<sub>A</sub>: uno de alta afinidad, reconocido por [<sup>3</sup>H]-muscimol, y otro de baja afinidad reconocido por [<sup>3</sup>H]-bicuculina + tiocianato, asociado al sitio de reconocimiento de benzodiazepinas, relación funcional que es más marcada durante el periodo perinatal (Gruen et al., 1990).

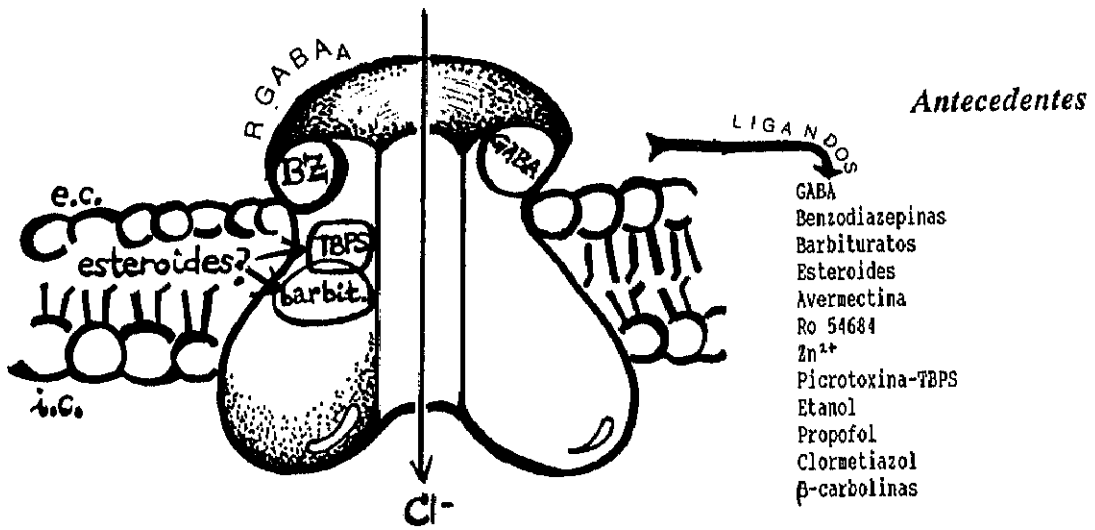
El grupo de Levitan y col. (1988) aisló el cDNA del receptor, dando a conocer la existencia de tres tipos de subunidades  $\alpha$ . Las secuencias de aminoácidos de estas nuevas subunidades presentaban un 70-80 % de homología con la previamente caracterizada subunidad  $\alpha$  (Schofield et al., 1987), pero sólo un 34 % de homología con la subunidad  $\beta$ . Si se inyectaban los RNAm correspondientes a las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor en ovocitos de *Xenopus*, no se observaba ninguna modulación de la actividad del receptor por las benzodiazepinas (Levitan et al., 1988), ni sitios de unión para estas moléculas, por lo que se suponía que las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  no eran suficientes para la reconstitución del receptor GABA-benzodiazepinas o bien que se requerían modificaciones post-traduccionales. La primera posibilidad fue confirmada por el grupo de Peter Seeburg (Pritchett et al., 1989) que clonó en cerebro otra subunidad: la subunidad  $\gamma$ , con un 40 % de homología con respecto a las  $\alpha$  y  $\beta$ . De las diferentes combinaciones de estas subunidades surgirían los distintos receptores de GABA-benzodiazepinas, teniendo cada uno de ellos diferentes propiedades de unión para las mismas.

Recientes experimentos de clonado molecular han revelado la existencia de al menos seis subunidades  $\alpha$ , cuatro  $\beta$ , tres  $\gamma$ , una  $\delta$  y una  $\rho$ . Cada una de estas subunidades presenta una distribución regional diferente en el cerebro (Doble & Martin, 1992) (esquema 12). La



**Esquema 11. Estructura de un receptor GABA<sub>A</sub>.** Se muestran los dominios transmembranares para un receptor hipotético con estequiometría 2 unidades  $\alpha$ :2 unidades  $\beta$  como inicialmente se consideraba (Scholfield, et al., 1987). Cada subunidad consta de tres regiones, una situada hacia el exterior de la célula, constituyendo el sitio de unión del ligando, una porción intermembrana y otra situada hacia el interior celular, en la que existen diversas secuencias de aminoácidos que son susceptibles de fosforilarse por PKA y PKC y por tirosina kinasas (Leidenheimer et al., 1991)

funcionalidad completa del receptor requiere al menos una subunidad  $\alpha$ , una  $\beta$  y una  $\gamma$ . La homología estructural de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor GABA<sub>A</sub> con las del receptor nicotínico de acetilcolina (Scholfield et al., 1987), sugiere que ambos podrían tener una composición similar. Ya que un receptor completo está formado muy probablemente por cinco subunidades rodeando al canal de Cl<sup>-</sup>, formando una estructura pseudosimétrica (Nayeem et al., 1994), si tenemos en cuenta la variedad de subunidades que existen, se pueden formar en torno a 500 combinaciones distintas, es decir, unos 500 receptores diferentes. Sin embargo, se sabe que sólo unos cuantos son los más probables (Burt & Kamatchi, 1991)



	SUBUNIDAD	POLIPEPTIDO (KDa)	AMINOACIDOS	PROPIEDADES
$\alpha$	$\alpha 1$	51-50-48.8	428	BZ1 - $\alpha 1\beta 2/3\gamma 2$ - Cerebelo.
	$\alpha 2$	53-55-48	423	BZ2 - Hipocampo.
	$\alpha 3$	57-60-59-52	465	BZ2- Cortex. Menos conservado
	$\alpha 4$	65-64	521	$\alpha 4\beta 2\gamma 2$ - Tálamo. 2 PKA, 1PKC
	$\alpha 5$	54-55-48.4	433	BZ2- 3 sitios PKC
	$\alpha 6$	57	434	$\alpha 6\beta 2\gamma 2$ - Cerebelo 2 PKC, 1 PKA
$\beta$	$\beta 1$	57-51.4	449	Mayor afinidad GABA que $\beta 2$
	$\beta 2$	56-52	450	mRNA más abundante que $\beta 3$
	$\beta 3$	57-52	448	
	$\beta 4$			Por splicing alternativo
$\gamma$	$\gamma 1$		430	Resp. BZ atípica, tyr-kinasa.
	$\gamma 2S$		428	
	$\gamma 2L$	49.8-43-49	436	Resp. BZ típica. Etanol. Tyr-kinasa
	$\gamma 3$			Distribución $\approx \beta 2$ . Menos abundante
$\delta$	$\delta$		433	Sitios alta afinidad BZ y GABA
$\rho$	$\rho 1$		458	
	$\rho 2$			Retina. "GABAC". 3 sitios PKC

Esquema 12. Características de las diferentes subunidades que conforman el receptor GABA<sub>A</sub> en las distintas regiones del sistema nervioso (principalmente basado en Burt & Kamatchi, 1991). Se indican diferentes ligandos alostéricos del receptor GABA<sub>A</sub>.

## Antecedentes

Expresando ciertas subunidades sólo (homooligoméricas) o combinadas (heterooligoméricas) en ovocitos de *Xenopus* se ha podido observar que algunas propiedades de estos receptores recombinantes son diferentes. Reflejamos a continuación algunas de ellas (Sieghat, 1992). La coexistencia de subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma_2$  produce un receptor cuyas corrientes de  $\text{Cl}^-$  se inhiben con bicuculina. La modulación por esteroides sólo se ha observado en receptores con canales homo o heterooligoméricos de la subunidad  $\beta_1$ . Canales formados por las subunidades  $\alpha_1$  o  $\beta_2$  sólo o ambas combinadas, son bloqueados por  $\text{Zn}^{2+}$ , en tanto que la subunidad  $\gamma_2$  sólo o combinada con otras  $\alpha$  ó  $\beta$  son insensibles a este catión. Se necesitan al menos dos subunidades, una de las cuales ha de ser  $\gamma_1$  o  $\gamma_2$  para la formación de sitios de unión para el Ro 54684. Este compuesto es inefectivo, sin embargo, cuando el canal lo forma la subunidad  $\alpha_1$  o  $\beta_1$ .

Por último, hay que destacar que los receptores  $\text{GABA}_A$  se han subdividido en BZ1 y BZ2 según sus características farmacológicas (Pritchett et al., 1989). Como se expresa en el esquema 12, se ha observado que los receptores BZ1 están formados por la subunidad  $\alpha_1$  y los BZ2 por las subunidades  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  ó  $\alpha_5$ . Las afinidades farmacológicas de estas subunidades para los ligandos son las siguientes (Lüddens & Wisden, 1991):

Flunitrazepam, diazepam, clonazepam	$\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = \alpha_5$
2-oxo-quazepam	$\alpha_1 > \alpha_2 = \alpha_3 = \alpha_5$
Zolpidem	$\alpha_1 > \alpha_2 = \alpha_3 > > \alpha_5$
Ro 15 4513	$\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = \alpha_5$
Ro 15 1788	$\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = \alpha_5$
$\beta$ -CCM y DMCM	$\alpha_1 > \alpha_2 = \alpha_3 > \alpha_5$

Estas subunidades tienen sitios de unión de proteínas kinasas, PKA, PKC y tirosina kinasas, que hacen al receptor susceptible de modulación (Leidenheimer et al., 1991) (ver apartado I.2.2.2.1. y esquema 12).

### 3.5.1.3. Mecanismo de acción

El receptor de GABA<sub>A</sub> es un receptor ionotrópico, ya que en un tiempo breve (1 mseg) la unión del GABA produce la apertura del canal de Cl<sup>-</sup> que forma el receptor. El influjo de Cl<sup>-</sup> del medio extracelular hiperpolariza la membrana de la célula postsináptica, ejerciendo una acción inhibitoria postsináptica. Existe cooperatividad en la unión de GABA a su receptor ya que los números de Hill para el GABA están próximos a 2 (Bormann & Claphan, 1985; Akaike et al., 1985). Ello hace pensar que el receptor GABA<sub>A</sub> tiene al menos dos sitios de unión para el GABA y que ambos sitios deben cooperar para que se abra el canal de Cl<sup>-</sup>. El aumento de la permeabilidad al Cl<sup>-</sup> inducido por GABA es sólo transitorio y decae tras pocos segundos de exposición al agonista. Esto ha sido atribuido a la desensibilización del receptor GABA<sub>A</sub> (Akaike & Oomura, 1984; Borman & Claphan, 1985; Harris & Allan, 1985).

El mecanismo de acción propuesto para los moduladores de este receptor es el siguiente: las benzodiazepinas estimulan la acción del GABA por aumentar la frecuencia de apertura del canal de Cl<sup>-</sup>, los barbituratos y esteroides prolongan el estado abierto de los canales. Los antagonistas bloquean o reducen la conductancia al cloro: la bicuculina disminuye la conductancia por competir con el GABA por los sitios de unión, mientras que la picrotoxina actúa directamente sobre el canal de Cl<sup>-</sup>, cerrándolo (Sieghart, 1992).

#### 3.5.1.4. Funciones de los receptores GABA<sub>A</sub>

El GABA<sub>A</sub> parece ser el responsable de los clásicos potenciales de acción inhibitorios postsinápticos. En el apartado 3.3.1. ya comentamos la función del GABA en las distintas vías GABAérgicas.

A través de su receptor GABA<sub>A</sub>, el GABA parece tener un importante papel en el comportamiento y en las enfermedades neuroafectivas y neurodegenerativas como el parkinson, donde existe una pérdida importante de GAD y receptores de GABA en la sustancia nigra, en un intento de compensar las deficiencias dopaminérgicas. La pérdida de neuronas GABAérgicas desencadena en unos casos una hiperactividad de los sistemas dopaminérgicos, como en el corea de Huntington donde hay una pérdida importante de neuronas GABAérgicas en el estriado y la sustancia nigra, y en otros casos desencadena desórdenes afectivos, como la esquizofrenia o la demencia de Alzheimer (Matsumoto, 1989). Diversos estudios han mostrado que deficiencias en el sistema GABAérgico central producen los mismos efectos que la epilepsia, la cual está asociada a una descarga neuronal excesiva, lo que desemboca en convulsiones. Por ello, la modulación alostérica del receptor GABA<sub>A</sub> por barbituratos y benzodiazepinas en el SNC es particularmente útil en casos de epilepsia y/o ansiedad. Los receptores GABA<sub>A</sub> también parecen estar relacionados con el apetito, ya que su estimulación produce una inhibición de la saciedad (Matsumoto, 1989).

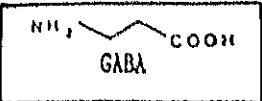

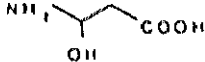
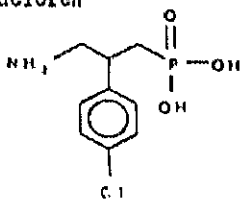
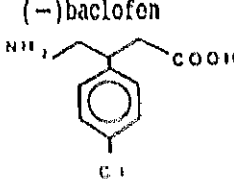
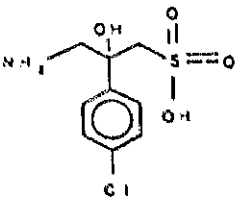
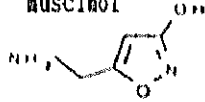
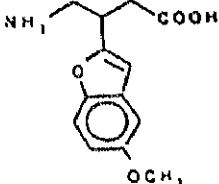
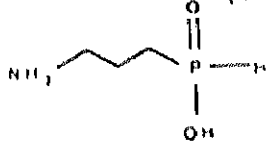
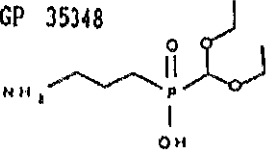
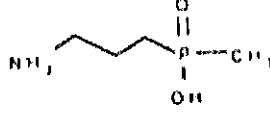
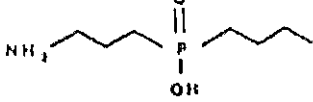
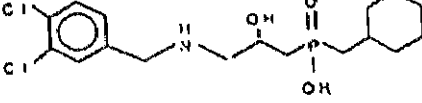
En el SNP, aumentan la actividad contráctil del intestino, disminuyen la motilidad de la vejiga urinaria y controlan la secreción de diversas hormonas, como la somatostatina (Sorenson et al., 1991), prolactina o CAs (Bowery, 1992).

### *3.5.2. Receptores GABA<sub>B</sub>*

#### *3.5.2.1. Características farmacológicas*

La otra subpoblación de receptores de GABA fue descubierta posteriormente y denominada GABA<sub>B</sub>. Estos receptores se caracterizan por ser resistentes a bicuculina y tener muy baja o nula afinidad por conocidos agonistas del receptor GABA<sub>A</sub>; sin embargo tienen una elevada afinidad por el p-cloro-fenil derivado del GABA, el baclofén (Bowery, 1980). Una de las dificultades que ofrece el estudio de este receptor es, precisamente, la escasa farmacología disponible. El análogo estructural del GABA, p-cloro-fenil-GABA o baclofén usado desde durante años como miorelajante en anestesia, resultó ser un agonista selectivo del receptor GABA<sub>B</sub>. La introducción de un heteroátomo en el grupo carboxilo de esta molécula ha dado lugar a la obtención de antagonistas específicos, como el flaclofén, saclofén, o 2-hidroxi-saclofén (esquema 13). Los laboratorios CIBA-GEIGY, que trabajan activamente en la obtención de moléculas selectivas, han obtenido agonistas específicos más potentes que el conocido baclofén, como es el CGP 27.492, también llamado ácido 3-amino propil fosfónico, 3-APPA o simplemente APPA. Su correspondiente dietoximetil derivado, el CGP 35.348 es un antagonista que muestra in vitro una potencia diez veces superior a la del flaclofén (Kerr et al., 1988). Los receptores GABA<sub>B</sub> se han considerado como de tipo presináptico o postsináptico según su sensibilidad farmacológica al flaclofén (Duttar & Nicoll, 1988), aunque esta relación no parece cumplirse en algunos casos.

La unión del GABA a los sitios de GABA<sub>B</sub> requiere la presencia de cationes divalentes como Ca<sup>2+</sup> o Mg<sup>2+</sup>, y se incrementa mediante pretratamiento de las membranas con tritón

AGONISTAS	AFINIDADES	ANTAGONISTAS	AFINIDADES
	60nM	Ac. 3-aminopropano sulfónico 	10µM
(±)β-hidroxi GABA 	1.3µM	Paclofen 	100µM
(-)-baclofen 	60nM	2-Hidroxisaclofen 	12µM
muscicol 	5.3µM	Ac. 4-amino-3-(5-metoxi-benzo(b)furan-2-il) butírico 	5.5µM 10µM
Ac. 3-aminopropil fosfínico (APPA) 	1 - 5 nM	CGP 35348 	35µM
Ac. 3-aminopropil(metil)fosfínico 	0.3nM	CGP 36742 	35 µM
		CGP 54625 	7 nM

Esquema 13. Principales agonistas y antagonistas de los receptores GABA<sub>B</sub>. Las afinidades se han calculado por ensayos de unión al equilibrio (binding) en membranas cerebrales de rata (Bowery, 1993).

X-100. Sin embargo, la unión es inhibida por guanil nucleótidos dependientes de calcio o magnesio (McGeer & McGeer, 1989). También es inhibida por  $Zn^{2+}$  a concentraciones superiores a 100  $\mu M$  (Turgeon & Albin, 1992).

### 3.5.2.2. Estructura molecular

El receptor de  $GABA_B$  aún no ha sido clonado, aunque actualmente tanto el grupo de Kuriyama en Japón como el de Bowery en Inglaterra, lo están purificando partiendo de tejidos cerebrales, por cromatografía de afinidad, en columnas de Sefarosa 6 B epoxi-activadas, a las que se ha ligado baclofén (Ohmori & Kuriyama, 1990). Recientemente se ha obtenido un anticuerpo monoclonal de 80 KDa que está siendo de gran ayuda en la purificación del receptor  $GABA_B$  por cromatografía de inmunoafinidad (Kuriyama et al, 1993). También se ha expresado su RNAm, obtenido de cerebelo de rata, en ovocitos de *Xenopus*, estudiándose las acciones que media (Taniyama et al., 1991). Sin embargo, aún no se tienen unos datos concretos sobre su estructura molecular.

### 3.5.2.3. Mecanismo de acción

El receptor  $GABA_B$  no parece estar constituido por un canal iónico en sí mismo ni es modulado por benzodiazepinas ni barbituratos. Por evidencias electrofisiológicas y bioquímicas se ha puesto de manifiesto que estos receptores regulan la conductancia del canal de calcio y/o el de potasio de membranas neuronales (Hösli et al., 1990). Por ejemplo, en

## *Antecedentes*

células piramidales del hipocampo, la activación del receptor está asociada a un incremento de la conductancia al potasio (Andrade et al., 1986) o de la conductancia de potasio dependiente de calcio (Blaxter et al., 1986; Gähwiler et al., 1985; Inove et al., 1985). La estimulación con baclofén de neuronas ganglionares de médula espinal produce una inhibición directa de la conductancia de calcio (Dolphin & Scott, 1987; Dunlap & Fischbach, 1978).

Además estos receptores parecen estar relacionados con la modulación de la actividad de la adenilato ciclasa (Wojcik & Nell, 1984; Kitamura et al., 1985; Hill, 1985; Xu et al., 1986), a través de proteínas G inhibitoras (Asano, 1985). Se ha estudiado la selectividad de los receptores de GABA<sub>B</sub> para acoplar proteínas G, por la habilidad que presentan varias proteínas G purificadas para incrementar la unión de GABA a membranas de cerebro bovino tratadas con N-etil maleinimida (NEM). El acoplamiento de proteínas G a este receptor parece estar determinado por la subunidad  $\alpha$  de estas proteínas, ya que tras la reconstitución de los receptores con las proteínas G $\alpha_0$  o G $\alpha_{12}$  con varios complejos  $\beta\gamma$  se observa un diferente acoplamiento de los receptores a estas subunidades  $\beta\gamma$  (Morishita et al., 1990).

Otros mecanismos implicados en la activación del receptor GABA<sub>B</sub> son la activación del metabolismo de fosfolípidos de membrana y la hidrólisis de fosfatidil inosoles (Bowery, 1989). Parece que los agonistas GABA<sub>B</sub> inhiben la formación de IP<sub>3</sub>, efecto que es antagonizado por baclofén, lo que indica que es una acción específica de este receptor. La toxina pertusis es capaz de bloquear el efecto inhibitorio sobre la formación de IP<sub>3</sub>.

#### 3.5.2.4. Funciones de los receptores GABA<sub>B</sub>

Los receptores de GABA<sub>B</sub> median la inhibición de la liberación de neurotransmisores como noradrenalina, glutamato, dopamina, serotonina o neuropéptidos al decrecer la entrada de calcio de las terminaciones nerviosas presinápticas (Stirling et al., 1989).

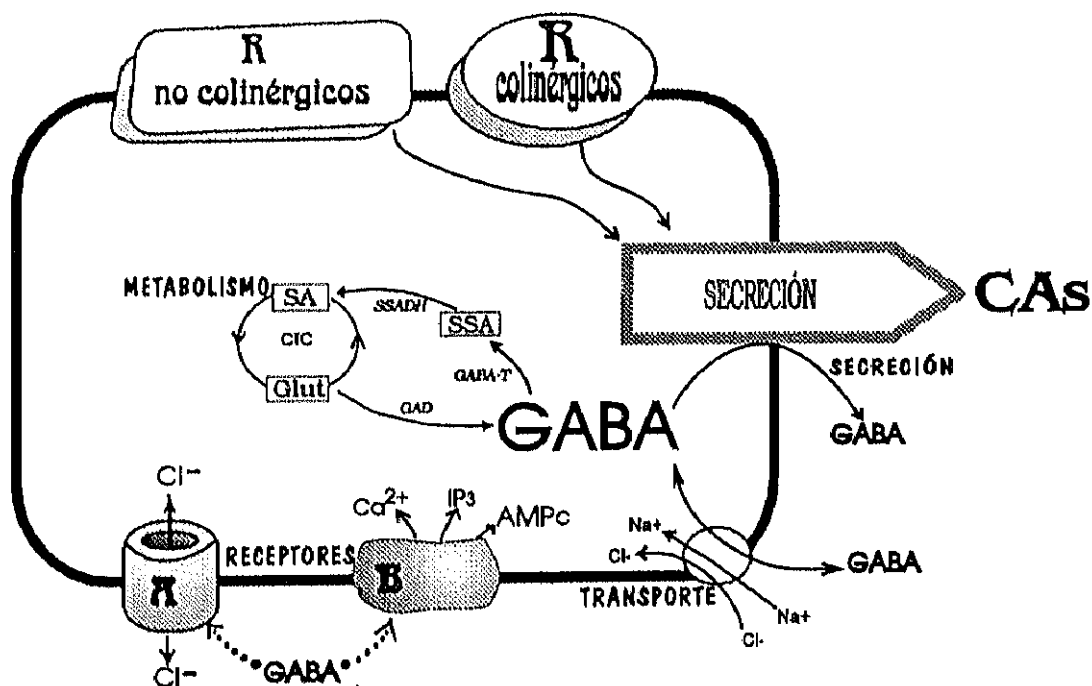
También se ha sugerido que estos receptores están implicados en el mecanismo de acción de drogas antidepresivas, con lo que se confirmaría una relación entre las teorías GABAérgicas y monoaminérgicas de la depresión. En efecto, el número de receptores de GABA<sub>B</sub> de corteza cerebral se ve reducido durante la depresión. Por ello, podría darse la posibilidad de que los antagonistas específicos tuvieran actividad antidepresiva, ya que si la activación de los receptores con agonistas suprime la liberación evocada de aminas, cabría pensar que un antagonista la aumentara (dependiendo de los niveles de agonista endógeno). De acuerdo con la teoría amínica de la depresión, esta situación sería muy ventajosa (Bowery, 1989). Parece existir en la depresión una relación de los receptores GABA<sub>B</sub> con la funcionalidad del eje pituitaria-hipotálamo-adrenal (O'Flynn & Dinnan, 1993). Otras acciones de este receptor a nivel central son las de producir antinociocepción (Hill et al., 1981) e hipotensión (Chahl & Walker, 1980). El baclofén se usa desde hace algunos años con gran éxito en el tratamiento de la espasticidad (Young & Delwaide, 1981).

A nivel periférico, disminuye la peristalsis y la motilidad de la vejiga urinaria, estimula la contracción del oviducto y útero, y disminuye el broncoespasmo anafiláctico de los pulmones (Chapman et al., 1993). También regula la secreción de hormonas: inhibe la secreción de insulina estimulada por glucosa en células β-pancreáticas (Gu et al., 1993) y

disminuye la liberación de hormona melano-estimulante (MSH) (Bowery, 1992)

### 3.6. Sistema GABAérgico en la médula suprarrenal bovina.

El grupo de investigación de González y col. demostró por primera vez la presencia de GABA y de sus enzimas de síntesis (GAD) y degradación (GABA-T y SSADH) en homogenados de médula suprarrenal bovina (Fernández-Ramil et al., 1982; Fernández-Ramil



Esquema 14. Mecanismos GABAérgicos en la médula adrenal. El GABA se sintetiza y degrada en la médula adrenal, se secreta por un mecanismo semejante a una exocitosis y por reversión de su transportador específico. Tiene sitios de unión específicos en la membrana, caracterizados farmacológicamente como los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>. El GABA ejerce funciones de modulador de la secreción en estas células. SSADH, semialdehído succínico deshidrogenasa; GABA-T, GABA transaminasa; GAD, glutámico descarboxilasa; SSA, semialdehído succínico; SA, ácido succínico; glut, glutamato; CTC, ciclo cítrico.

et al., 1983; González et al., 1986). Posteriormente se descubrió por el mismo grupo, la existencia de un transporte activo de GABA en slices de médula adrenal (Oset-Gasque et al., 1985) y en células cromafines bovinas (Oset-Gasque & Aunis, 1989), el cual es dependiente de  $\text{Na}^+$  y está acoplado al gradiente electro-químico generado por la ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Este sistema de transporte tiene dos componentes: uno de alta afinidad y otro de baja afinidad, con unas  $K_m$  de 10 y 170  $\mu\text{M}$  respectivamente (Oset-Gasque et al., 1989).

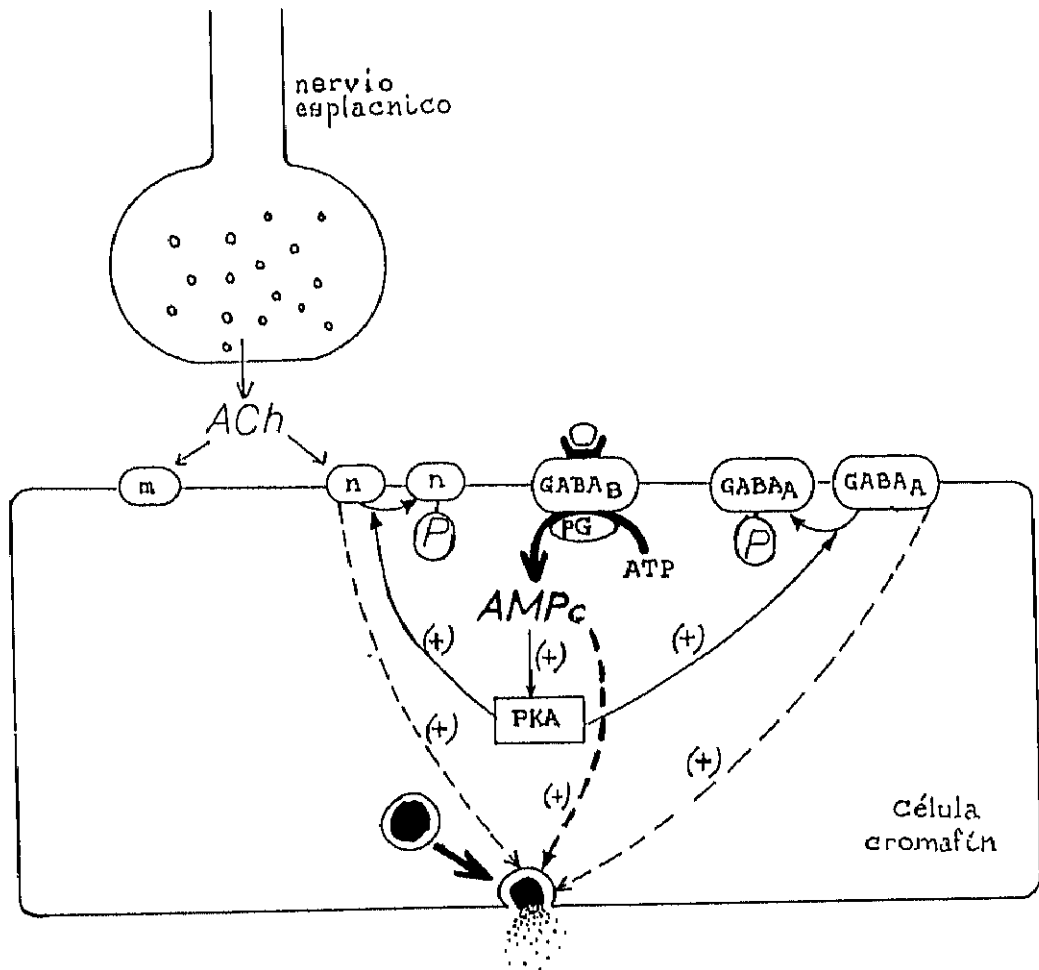
Además, el GABA puede ser específicamente liberado por la estimulación de los mismos secretagogos que liberan CAs, como la nicotina, alto potasio, veratridina o ionóforos de calcio (Oset-Gasque et al., 1990). Existen dos mecanismos de liberación: uno dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , semejante a una exocitosis y otro independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y dependiente de  $\text{Na}^+$ , que se observa en la secreción estimulada por veratridina, y que es mediado por reversión del transportador electrogénico de GABA, ya que se inhibe por bloqueantes de la recaptación del mismo (esquema 14). Recientes estudios indican que este GABA se coalmacena en gránulos que contienen noradrenalina (Oomori et al., 1993).

Usando técnicas de unión al equilibrio (binding), este grupo de investigación demostró la existencia de ambos subtipos de receptores de GABA en membranas aisladas de médula adrenal bovina (Martínez et al., 1987; Castro et al., 1988)(esquema 14). El análisis de Scatchard mostró un comportamiento bifásico, revelando la existencia de dos sitios de unión. Sin embargo, cuando se bloqueó la unión a los receptores  $\text{GABA}_A$  o  $\text{GABA}_B$  con concentraciones saturantes de muscimol o baclofén, respectivamente se obtuvo un sólo componente en la representación de Scatchard, lo que condujo a la caracterización de dos sitios de unión para el GABA: un sitio de baja afinidad ( $K_D = 139 \pm 22$  nM y  $B_{\text{max}} = 0.4$

pmol/mg proteína), correspondiente al receptor GABA<sub>A</sub> y otro de más alta afinidad ( $K_D = 41 \pm 6$  nM y  $B_{max} = 0.35 \pm 0.26$  pmol/mg proteína), correspondiente al receptor GABA<sub>B</sub>. La representación correspondiente del comportamiento del receptor GABA<sub>A</sub>, por bloqueo con baclofén, mostraba una curvatura convexa, sugiriendo una cooperatividad positiva entre estos sitios de unión, lo que se confirmó mediante el análisis de Hill de estos datos, que dió un valor estimado de  $n_H = 1.3 \pm 0.06$ , significativamente diferente a 1. En contraste con otros tejidos, sólo se encontraron sitios de baja afinidad para este receptor.

Los mecanismos de acción y las funciones de estos receptores en médula adrenal difieren ligeramente de los conocidos en tejidos centrales. Resultados de Castro y col. (1989), indican que el muscimol induce una estimulación de la secreción basal de CAs de forma dependiente de la dosis, efecto que se inhibe por bicuculina. Esta liberación debida al receptor GABA<sub>A</sub> representa aproximadamente el 70 % de la obtenida por la misma concentración de nicotina en la mismas condiciones experimentales. La liberación de CAs mediada por GABA es dependiente de calcio extracelular, que entra en las células a través de canales de calcio dependientes de voltaje tipo L.

La unión del GABA a su receptor GABA<sub>A</sub>, en condiciones basales, da lugar a una despolarización de la célula, efecto que tiene lugar con un incremento en el eflujo de Cl<sup>-</sup> a través del canal de Cl<sup>-</sup> asociado al receptor GABA<sub>A</sub>. Sin embargo, resultados recientes indican que los agonistas GABA<sub>A</sub> ejercen un efecto despolarizante (con salida de Cl<sup>-</sup>) o hiperpolarizante (con entrada de Cl<sup>-</sup>) dependiendo de que el potencial de membrana sea mayor o menor, respectivamente, que el potencial de equilibrio para el Cl<sup>-</sup> (estimado en -50 mV (González et al., 1992)). Este mecanismo de acción se traduce en un efecto estimulante



Esquema 15. Mecanismo de acción de los receptores GABA<sub>B</sub> en las células cromafines. Los receptores GABA<sub>B</sub> estimulan por sí mismos la secreción basal, efecto que puede ser debido a la estimulación de la formación de AMPc por estos receptores. El incremento de AMPc podría activar la PKA, que fosforilaría los receptores nicotínicos y GABA<sub>A</sub>, desensibilizándolos y disminuyendo el efecto de ambos sobre la secreción. m, receptor colinérgico muscarínico; n, receptor colinérgico nicotínico; ACh, acetil colina; P, grupos fosfato; pG, proteína G.

o inhibidor de estos agonistas sobre la secreción de CAs mediada por nicotina y KCl, dependiendo de que la estimulación con estos agentes se realice a dosis submáximas o máximas, respectivamente.

Los receptores GABA<sub>B</sub> estimulan la secreción basal de CAs e inhiben la mediada por nicotina y muscimol (Tesina de M. Parramón, 1991; Oset-Gasque et al., 1993). Ello se podría deber al incremento de AMPc que originan estos receptores, con la consiguiente elevación de la PKA, que podría fosforilar los receptores nicotínicos y de GABA<sub>A</sub>, desensibilizándolos o inactivándolos, y, en definitiva, disminuir su efecto sobre la secreción (esquema 15).

## ***II. OBJETIVOS DEL TRABAJO***

---

Desde que se demostró la presencia de GABA en médula adrenal (Fernández-Ramil et al., 1982), se han realizado numerosas e importantes aportaciones sobre la implicación de este neurotransmisor en la funcionalidad de las células cromafines, como ya se expuso en el apartado I.3.6. En el presente trabajo nos hemos interesado en el estudio de los mecanismos de acción y características farmacológicas y estructurales de los receptores de GABA en células cromafines de médula adrenal bovina, siendo los objetivos principales de este trabajo los que se especifican a continuación:

- 1º- Estudiar la estructura de los receptores GABA<sub>A</sub> en la médula adrenal.
- 2º- Estudiar la modulación farmacológica del receptor GABA<sub>A</sub> en las células cromafines.
- 3º- Conocer el mecanismo molecular por el que el receptor GABA<sub>B</sub> lleva a cabo su función en la médula adrenal. En este punto se ha estudiado la implicación de la activación del receptor GABA<sub>B</sub> en la generación de segundos mensajeros como el AMPc, el Ca<sup>2+</sup>, el IP<sub>3</sub> y el GMPc.
- 4º- Estudiar la participación de los diferentes segundos mensajeros relacionados con la acción de los receptores GABA<sub>B</sub> en la secreción de CAs en las células cromafines.
- 5º- Estudiar la acción reguladora de los receptores GABA<sub>B</sub> sobre otros receptores implicados en la modulación de la secreción de CAs en las células cromafines, como los colinérgicos nicotínicos y los GABA<sub>A</sub>.

### ***III.***     *MATERIAL Y METODOS*

---

## ***1. Material***

Todos los medios y soluciones fueron preparados con sales de Merck de grado analítico, en agua desionizada y bidestilada. Los productos químicos utilizados se obtuvieron de Sigma Chemical Co., salvo mención expresa. La colagenasa de *Clostridium histolyticum* (EC 3.4.4.19), así como el p-cloro-fenil-tio-AMPc (pClpAMPc) y el clorazepato fueron de Boehringer. El medio DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) y el suero fetal bovino (FCS) proceden de GIBCO. El arabinósido de citosina, la 8-fluoro-desoxiuridina y el isoproterenol eran de Aldrich. Los colorantes azul tripán y rojo neutro eran de Merk, para microscopía. El fura-2 AM se obtuvo de SIGMA. Los kits para la determinación de AMPc, IP<sub>3</sub> y GMPc, y el N-metil-[<sup>3</sup>H]-flunitrazepam, así como las anti-Ig de conejo ligadas a biotina, el complejo estreptavidina-peroxidasa ligado a biotina, el sistema de ECL para inmunotransferencia y el hiperfilm-ECL se obtuvieron de Amershan Internacional. El baclofén, 3-amino-propilfosfónico y CGP 35.348 fueron donados generosamente por CIBA-GEIGY.

Los anticuerpos contra las diferentes subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> fueron obtenidos, caracterizados y purificados en sus respectivas columnas de afinidad de Sefarosa 4B (Duggan, & Stephenson, 1989; Duggan & Stephenson, 1990; Pollard et al., 1993). Las proteínas estándares preteñidas se obtuvieron de Bethesda Research Laboratories.

## **2. Métodos**

### **2.1. Cultivo primario de células cromafines.**

#### **2.1.1. Aislamiento de las células cromafines**

Las células cromafines se obtuvieron por digestión de la médula adrenal con colagenasa. Las glándulas adrenales bovinas fueron suministradas por el Matadero Municipal de Madrid. Para el aislamiento de las células cromafines se siguieron los métodos descritos por Role y Perlman (1980), Bader y col. (1981) y Livett (1984).

Las glándulas fueron procesadas dentro de la hora siguiente al sacrificio de los animales. Todas las soluciones empleadas fueron esterilizadas por filtración a través de filtros Sterivex-GS (Millipore) de 0.22  $\mu\text{m}$  de poro, y contenían además de los componentes mencionados 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu\text{g/ml}$  estreptomina y 40  $\mu\text{g/ml}$  gentamicina. Todo el material empleado se esterilizó en autoclave a 120° C durante 30 min. Tras la digestión inicial, todas las operaciones se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar. Las glándulas, que normalmente son procesadas de 4 en 4, fueron canuladas a través de la vena adrenal y perfundidas retrógradamente con una solución salina libre de cationes divalentes (solución Locke sin  $\text{Ca}^{2+}$ ) que contiene 154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 3.6 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 5.6 mM glucosa y 5.0 mM HEPES, tamponado a pH 7.4 y mantenido a 37° C,

con el fin de eliminar los restos de sangre y permitir una mejor digestión. Tras este lavado, se cambió la solución de perfusión por un medio de digestión que contenía colagenasa de *Clostridium histolyticum* (E.C. 3.4.4.19) al 0.1 % y 1 mg/ml de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos al 0.5 %, en la misma solución Locke sin  $\text{Ca}^{2+}$ . La digestión se prolongó durante una hora por perfusión en circuito cerrado.

Las glándulas se abrieron por la mitad y el tejido medular digerido se recogió y disgregó por paso a través de una malla de nylon de 190  $\mu\text{m}$  de luz. Las células disgregadas se recogieron por centrifugación a 150 g durante 5 min. en una centrífuga de bajas revoluciones Heraeus y fueron lavadas tres veces en el medio Locke sin  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta suspensión celular cruda se filtró a través de una malla de nylon de 54  $\mu\text{m}$  de luz y se purificó por sedimentación en un gradiente de densidad de Percoll (Kilpatrick et al., 1980). Para formar el gradiente de Percoll, 20 ml de suspensión celular se mezclaron con 20 ml de Percoll isotónico y se centrifugaron a 15000 g durante 30 min. La fracción correspondiente a las células cromafines ( $d=1.05-1.07$ , Livett, 1984), fue recogida, suspendida en medio DMEM, suplementado con  $\text{NaHCO}_3$  22 mM, HEPES 10 mM y ácido ascórbico 250  $\mu\text{M}$ , además de la mezcla de antibióticos usual) y lavada tres veces con este medio. La suspensión final se diluyó en el medio DMEM hasta una concentración de  $1 \times 10^6$  ó  $5 \times 10^5$  cel./ml según su empleo posterior.

## *2.1.2. Mantenimiento de las células cromafines*

### *2.1.2.1. Cultivos primarios de células cromafines*

La suspensión celular purificada se suplementó con un 10 % de suero fetal bovino como fuente de fibronectina y factores de crecimiento y 100  $\mu\text{M}$  fluoro-desoxiuridina y 100  $\mu\text{M}$  citosina arabinósido como antimetabólicos para evitar la proliferación de los tipos celulares no neurales. La concentración celular se ajustó a  $1 \times 10^6$  cel./ml. Esta suspensión se sembró en placas Costar multipocillo, a una densidad de  $5 \times 10^5$  cel./pocillo (10 mm de diámetro). Las placas se mantuvieron en incubador a 37° C en una atmósfera de 95 % aire y 5% de CO<sub>2</sub> saturada de vapor de agua. El medio de cultivo se reemplazó cada 3 días. Las placas se utilizaron entre el 3° y 7° día después de la siembra.

### *2.1.2.2. Células cromafines en suspensión en frío*

De forma alternativa al cultivo, las células cromafines se conservaron en suspensión para las medidas de calcio y liberación de CAs en tiempo real. En este caso la suspensión en medio de cultivo no fue sembrada en placas sino que se conservó a 4° C en nevera como describen Greenberg y Zinder (1982). Previamente a su utilización, las células fueron lavadas dos veces con medio fresco e incubadas 1 hora a 37° C. La integridad, pureza y número de células de cada lote fueron ensayados rutinariamente por el método de exclusión de azul tripán e incorporación de rojo neutro para comprobar la viabilidad y la pureza de la preparación, métodos que describiremos más adelante.

Las células fueron empleadas entre el 1º y 3º día después de su obtención. Sólo se emplearon células con una viabilidad superior al 90 % y una pureza mayor del 80 %. Como prueba adicional, las células fueron sembradas en placas después de tres días conservadas en frío. Estas células se mostraron capaces de adherirse a las placas y sobrevivir, mostrando el mismo aspecto al microscopio que los cultivos sembrados el día de la obtención de las células.

## *2.2. Medida de la liberación de CAs.*

### *2.2.1. En células en cultivo*

Para estudiar la secreción acumulada durante tiempos de minutos se empleó la técnica de incubación estática de las células cromafines en cultivo primario con el secretagogo a ensayar añadido al medio sobrenadante. El medio de cultivo de las células fue sustituido por 0.5 ml de un medio Krebs-Hepes (Locke normal), que contiene 140 mM NaCl, 4.4 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5.55 mM glucosa, 10.0 mM HEPES, tamponado a pH 7.5. Las células se lavaron dos veces durante 10 minutos con este medio. Para determinar la secreción, las células se incubaron durante 10 min., a 37° C, con 0.25 ml de Locke (secreción basal) ó 0.25 ml de solución del secretagogo a ensayar disuelto en Locke.

Tras este periodo se recogió el medio y las células se lisaron en 200 µl de HClO<sub>4</sub> 0.1 M. La cantidad de CAs existentes en el lisado celular y en el sobrenadante de las incubaciones

celulares se determinó por inyección de los mismos en el sistema de perfusión acoplado a un detector electroquímico de CAs y registro de los picos producidos, en un sistema semejante al descrito por Green y Perlman (1981).

La muestra tomada en pulsos de 50  $\mu$ l, a través de un inyector de bucle Rheodyne 7010, pasa al detector electroquímico (Metrohm, modelo VA 641), realizándose la cuantificación por oxidación de las CAs sobre un ánodo de grafito (glassy carbon), lo que genera una corriente medible y proporcional a la concentración de CAs de la muestra. El voltaje de polarización fue ajustado a +500 mV para evitar interferencias y cambios en la corriente de soporte transportada por  $K^+$  y  $H_3O^+$ , mediante un electrodo de referencia Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de Au. La señal de oxidación electroquímica se siguió en un registrador de papel (LKB modelo 2210).

La señal se calibró por inyección de soluciones de noradrenalina de concentración conocida (0.5-5  $\mu$ M). La posible contribución a la señal por oxidación de los compuestos usados como secretagogos se descartó en cada caso por ensayo directo de una disolución de la sustancia en cuestión. La secreción se estimó como porcentaje de CAs liberadas al medio respecto al contenido total (sobrenadante y precipitado). Los resultados se expresaron relativos a la secreción basal en ausencia de estimulación.

### ***2.2.2. En células en suspensión (monitorización continua de la secreción)***

La secreción de CAs a partir de un lecho de células cromafines en suspensión fue monitorizada en tiempo real en un sistema de perfusión continua acoplado a un detector electroquímico. El sistema es semejante al descrito por Green & Perlman (1981). Las células cromafines fueron depositadas formando un lecho en un filtro Millex-GS (Millipore Co) de  $0.22 \mu\text{M}$  de poro y 25 mm de diámetro, que sirve como cámara de perfusión. Esta cámara fue perfundida constantemente a un ritmo de 2 ml/min, mediante una bomba peristáltica (Buchner) de baja pulsación, con el medio Locke normal, mantenido a  $37^\circ \text{C}$ . El volumen medio de la cámara de perfusión era de  $209 \pm 7 \mu\text{l}$ , con lo que el tiempo de semilavado de la cámara resultó ser del orden de 2 s (Tesis Doctoral de Enrique Castro, 1990).

La secreción de CAs en el lecho de células fue estimulada mediante secretagogos enviados a la cámara en pulsos de  $50 \mu\text{l}$  a través del inyector de bucle Rheodyne 7010. Las CAs se midieron y calibraron según se indica en el apartado III.2.2.1.

### ***2.3. Medida de los niveles intracelulares de AMPc.***

Los niveles de AMPc en las células cromafines mantenidas en cultivo y estimuladas con diversos agentes se determinaron por radioinmunoensayo, empleando el juego de reactivos suministrados por Amersham.

El medio de cultivo de las placas multipocillo ( $5 \times 10^5$  cel/pocillo) fue reemplazado por medio Locke normal, realizando varios lavados con este medio. Para realizar el ensayo se retiró el medio y se añadieron 0.25 ml de Locke con el efector correspondiente. Las células se incubaron a  $37^\circ \text{C}$  durante 10 min. Al cabo del mismo se retiró el sobrenadante y se rompieron y dispersaron las células con 200  $\mu\text{l}$  de ácido perclórico 0.1 M como anteriormente. Estas muestras fueron neutralizadas con KOH 1 M, centrifugadas y empleadas directamente en el radioinmunoensayo. El radioinmunoensayo fue llevado a cabo en cámara fría, a  $4^\circ \text{C}$ . Cada tubo contenía 25 nCi [ $^3\text{H}$ ]AMPc (aproximadamente 25 Ci/nmol), proteína de unión (proteína kinasa A purificada de músculo), 4 mM EDTA, 50 mM tampón Tris-HCl (pH 7.5), y 0-16 pmol AMPc standard en un volumen final de 200  $\mu\text{l}$ .

Los tubos se incubaron dos horas a  $4^\circ \text{C}$  y el exceso de nucleótido libre se eliminó por adsorción sobre carbón activo (150  $\mu\text{l}$ ) y centrifugación durante 5 min en una centrífuga Eppendorf. Se tomaron dos alícuotas de cada sobrenadante para determinar su radioactividad como anteriormente. La cantidad de AMPc en cada muestra se estimó por interpolación del cociente  $C_0/C_x$  correspondiente a cada muestra en la curva patrón obtenida al representar el cociente  $C_0/C_x$  para cada estándar con respecto a las diferentes concentraciones de AMPc frío, donde:

$$C_0 = \text{cpm totales} - \text{cpm blanco}$$

$$C_x = \text{cpm estándar o muestra} - \text{cpm blanco.}$$

El ensayo fue muy reproducible y los resultados se expresaron directamente en pmol/  $10^6$  células.

## 2.4. Medida de los niveles intracelulares de IP<sub>3</sub>

Los niveles de IP<sub>3</sub> se determinaron por radioinmunoensayo, empleando el juego de reactivos suministrado por Amersham. Las células fueron lavadas, estimuladas, lisadas y neutralizadas como se describe en el apartado III.2.3, para la medida de niveles de AMPc. El radioinmunoensayo fue llevado a cámara fría, a 4° C durante 15 min. Los tubos contenían la muestra a ensayar, Tris 0.1 M que contenía EDTA 4mM y 4 mg/ml de albúmina sérica bovina, H<sub>2</sub>O, [<sup>3</sup>H]IP<sub>3</sub> (aprox. 100 Ci/nmol) y la proteína de unión, hasta un volumen final de 200 µl. Para la curva patrón de IP<sub>3</sub> se usó un patrón de D-mioinositol 1,4,5-trifosfato, mezclado con las sustancias anteriores excepto los 50 µl de H<sub>2</sub>O. Los tubos fueron centrifugados, excepto el que daría el n° de cpm totales, que no contenía proteína de unión y sirvió para comprobar la integridad del test. Se decantó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en H<sub>2</sub>O. La radioactividad se midió por espectrofotometría de centelleo líquido en un contador de centelleo (LKB 1209 RACKBETA).

La cantidad de IP<sub>3</sub> en cada muestra se calculó por interpolación del porcentaje B/Bo para cada muestra en la curva patrón obtenida al representar el log de la concentración de IP<sub>3</sub> (en pmol/tubo) frente al % B/Bo para los diferentes estándares calculado según la ecuación:

$$\% \frac{B}{Bo} = \frac{\text{cpm estándar o problema} - \text{cpm no específico}}{\text{cpm blanco} - \text{cpm no específico}} \times 100$$

Bo: cpm ligadas del estándar o blanco

B: cpm ligadas de cada punto, patrón o problema

El ensayo fue muy reproducible y los resultados se expresaron en pmol/10<sup>6</sup> cel.

## ***2.5. Medida de los niveles intracelulares de GMPc***

Los niveles de GMPc se determinaron por radioinmunoensayo, empleando el juego de reactivos suministrado por Amersham. Las células fueron lavadas, estimuladas, lisadas y neutralizadas como se describe en el apartado III.2.3., para la medida de niveles de AMPc. El radioinmunoensayo fue llevado a cámara fría, a 4° C durante 90 min. Los tubos contenían la muestra a ensayar, tampón Tris/EDTA (pH=7.5), un antisuero específico para GMPc y [<sup>3</sup>H]GMPc (aproximadamente 20 Ci/nmol), hasta un volumen final de 200 µl. Para la curva patrón se usó un GMPc estándar a una concentración entre 0.5 y 8 pmol/tubo. Tras los 90 min. de incubación se añadió 1 ml de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> frío, se agitó en vortex y se centrifugó durante 5 min. Se decantó el sobrenadante y se añadió 1.1 ml de agua destilada a cada tubo, agitándose convenientemente. La radioactividad correspondiente a 1 ml de esta mezcla se midió por espectrofotometría de centelleo líquido.

Los cálculos fueron idénticos a los realizados en el caso del AMPc. El ensayo fue muy reproducible y los resultados se expresaron en pmol/10<sup>6</sup> cel.

## **2.6. Medida de $Ca^{2+}$ intracelular.**

Se empleó la técnica de monitorización continua de la fluorescencia del indicador fura-2 (Tsien, 1988). Este compuesto liga  $Ca^{2+}$  específicamente y al hacerlo aumenta su fluorescencia al mismo tiempo que el espectro de excitación se desplaza hacia el UV, cambiando el máximo de aproximadamente 380 nm hasta unos 340 nm (Tsien, 1988).

Las células cromafines en suspensión se centrifugaron 5 min a 150 g y se resuspendieron a  $1 \times 10^6$  cel./ml en medio Locke normal. Se adicionó fura-2 acetoximetil ester (fura-2 AM) disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener una concentración final  $5 \mu M$  y se incubaron las células en un baño con agitación a  $37^\circ C$ . El compuesto esterificado es liposoluble y atraviesa fácilmente la membrana plasmática. Una vez dentro de las células se hidroliza por esterasas inespecíficas formando el fura-2 activo, que es relativamente impermeable. Una vez cargadas con el fura, las células se centrifugaron y se lavaron dos veces con medio Locke normal. Finalmente  $1 \times 10^6$  células se resuspendieron en 1 ml de Locke y se dispusieron en una cubeta de cuarzo de 10 mm de paso óptico en ambas perpendiculares.

La fluorescencia celular debida al complejo fura- $Ca^{2+}$  se siguió en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50 dotado con sistema de agitación continua y termostatación a  $37^\circ C$ . La fluorescencia fue excitada alternativamente a 340 y 380 nm y leída a 510 nm. Las rendijas de excitación y emisión se fijaron a 2.5 y 10 nm respectivamente. En el haz de emisión se intercaló un filtro de paso alto de 430 nm para cortar la intensidad luminosa debida a dispersión. Los datos fueron digitalizados cada 1.6 s y exportados a un ordenador Epson AX2

acoplado en línea donde se procedió a calcular la razón de fluorescencia  $r = F_{340}/F_{380}$  en tiempo real.

Se registró el nivel basal de  $Ca^{2+}$  durante 1 min y se procedió a añadir a la cubeta el compuesto a ensayar (solución stock 100-200 veces concentrada para minimizar la dilución en la cubeta). Para calibrar la señal de fluorescencia se rompieron las células con tritón X-100 al 0.1 % a fin de saturar el fura-2 con el  $Ca^{2+}$  extracelular, obteniendo la señal máxima ( $R_{max}$ ), y posteriormente se adicionó EGTA 7.5 mM en un medio alcalinizado con Tris (pH=8.3) para quelar el  $Ca^{2+}$ , obteniendo la señal mínima ( $R_{min}$ ). La concentración de  $Ca^{2+}$  se calculó mediante la fórmula (Grynkiewicz et al., 1985):

$$[Ca^{2+}] = K_d \times \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \times \frac{F_{min\ 380}}{F_{max\ 380}}$$

donde  $F_{min}$  y  $F_{max}$  representan la fluorescencia mínima y máxima respectivamente a 380 nm. La constante de disociación ( $K_D$ ) para el complejo  $Ca^{2+}$ /fura es 224 nm.

### *2.7. Medida del potencial de membrana*

Las células lavadas como en el caso de la medida de  $Ca^{2+}$  intracelular se suspendieron en Locke normal a una concentración de  $10^6$  células/ml. 1 ml de esta suspensión se dispuso en una cubeta de cuarzo (de 10 mm de paso óptico en ambas perpendiculares) y se añadió la

sonda fluorescente bisoxonol (DiBac<sub>4</sub>(3)) 0.2-2  $\mu$ M. Se dejó esta mezcla durante 5-10 min hasta registrar una señal constante. Esta molécula es un anión lipofílico cuya distribución a través de la membrana plasmática depende del potencial de membrana. En el interior celular el bisoxonol se une a moléculas hidrofóbicas dando lugar a una señal de fluorescencia. Así, un incremento de la fluorescencia, como consecuencia de una mayor entrada de colorante aniónico al interior celular, indica que la membrana se ha despolarizado. La fluorescencia se midió a una longitud de onda de excitación de 540 nm y de emisión de 565 nm en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50 con agitación continua y termostaticado a 37° C. Los datos se expresaron como incrementos de fluorescencia en unidades arbitrarias.

## ***2.8. Preparación de las membranas de médula adrenal y corteza cerebral y purificación del receptor GABA<sub>A</sub>/BZ por cromatografía de afinidad.***

Las membranas de médula adrenal y corteza cerebral bovinas fueron preparadas según el método descrito por Stephenson et al. (1982). Detallamos, a continuación el proceso seguido.

### ***2.8.1. Preparación de las membranas***

Todo este proceso se realizó a 0-4° C. Se tomaron 40 g de médula y se cortaron y homogenizaron en HEPES 10 mM (pH=7.5), EDTA 1 mM, sacarosa 300 mM, ditioneitol 0.5 mM, clorhidrato de benzamidina 1 mM, fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF) 0.3

mM, en un volumen final 10 veces el peso del tejido (400 ml). El homogenado se centrifugó a 1.000xg durante 12 minutos y el sobrenadante obtenido se centrifugó a 27.000xg durante 35 min. El pellet se resuspendió usando un homogeneizador de vidrio-teflón en 200-300 ml del mismo medio, pero sin sacarosa ni PMSF. Tras la centrifugación a 27.000xg durante 30 min. el pellet se resuspendió en este último medio hasta un volumen aproximado de 40 ml, quedando una concentración final de proteínas de aproximadamente 12-16 mg prot./ml.

### *2.8.2. Solubilización del receptor*

Para la solubilización del receptor se añadieron 100 ml de un medio que contenía HEPES 10 mM (pH=7.4), EDTA 1 mM, clorhidrato de benzamidina 1 mM, azida sódica al 0.02 % (w/v), e inhibidores de tripsina sorbean y ovomucoide, a una concentración de 1 mg/100ml. Esta suspensión se centrifugó a 27.000xg durante 30 min. El pellet se resuspendió en homogeneizador de vidrio-teflón en un volumen tal que se tuvieran aproximadamente 10 mg prot./ml (aproximadamente 90 ml). Se agitó la suspensión con agitador magnético y se añadieron 10 mg de bacitracina y PMSF 0.3 mM, se dejó en agitación unos minutos y se añadió KCl 150 mM y 2.5 ml de desoxicolato sódico al 20 % (0.5 % de concentración final). Se dejó en agitación 10 min. y se centrifugó 75 min. a 100.000xg. El sobrenadante así obtenido contiene el receptor GABA<sub>A</sub> solubilizado. Mediante este procedimiento se ha observado que al menos el 90 % de los sitios de unión de benzodiazepinas están solubilizados. Se tomó una fracción de 1 ml para ensayo posterior (soluble) y el resto se pasó a través de una fibra de vidrio, para disponerlo a pasar por las columnas de afinidad.

### **2.8.3. Purificación del receptor GABA<sub>A</sub>**

#### **2.8.3.1. Purificación por cromatografía de afinidad de BZ**

El primer método de purificación utilizado fue la cromatografía de afinidad a través de una columna que contenía como ligando la benzodiazepina Ro 1986/1, como se indica en el esquema 16. La columna se preparó para la purificación por lavado con tres medios consecutivos, 3 horas cada uno, a un flujo de 80 ml/h:

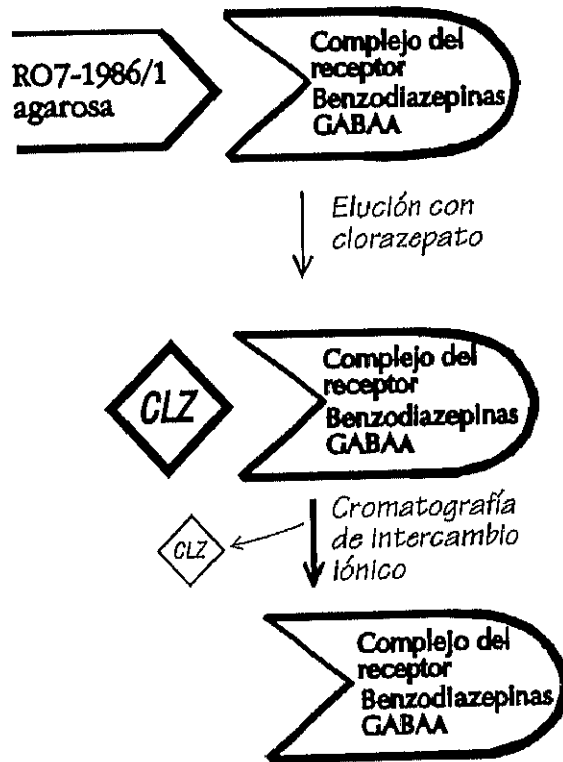
- 1) HEPES 5 mM, NaCl 0.5 M, EDTA 0.5 mM y Tritón X-100 al 2 % (v/v), pH=7.5)
- 2) Acido acético glacial 50 mM, urea 6 M, Tritón X-100 al 1 % (v/v), pH=5.5)
- 3) HEPES 5 mM, KCl 0.15 M, EDTA 0.1 mM, Tritón X-100 0.1 % (v/v) y azida sódica al 0.02 % (w/v), pH= 7.4.

Además se prelavó también con la solución de desplazamiento para asegurar que no había una posible contaminación con tejido cerebral de una anterior purificación.

La solución que contenía el receptor solubilizado se pasó varias veces a una velocidad de flujo de 60 ml/h por la columna durante 2 h, al cabo de las cuales se tomó una alícuota de 1 ml (filtrado) para comprobar que el receptor había quedado retenido convenientemente. Posteriormente la columna se lavó durante toda la noche a un flujo de 40 ml/h con 600 ml de una solución que contenía fosfato potásico 10 mM (pH=7.4), KCl 50 mM, acetato magnésico 2 mM, EGTA 0.1 mM, sacarosa 10 % (w/v), Tritón X-100 0.2 % (w/v) y finalmente con 50 ml de una solución que contenía fosfato potásico 20 mM (pH=7.4),

## Material y Métodos

acetato magnésico 2 mM, sacarosa al 10 % (w/v) y tritón X-100 al 0.2 % (w/v). El receptor fijado en esta columna se eluyó específicamente a una velocidad de flujo de 20 ml/h con fosfato potásico (pH=7.4), acetato magnésico 2 mM, sacarosa al 10 % (w/v), Tritón X-100 al 0.2 % (w/v), clorazepato 10 mM, recogiendo 12 fracciones de 5 ml, que fueron ensayadas posteriormente por unión al equilibrio (binding) de BZ y por inmunodetección.



**Esquema 16.** Purificación del receptor GABA/BZ. El receptor es retenido en la columna de agarosa que lleva unida la benzodiazepina Ro7-1986/1. Posteriormente es desplazado por la benzodiazepina hidrosoluble clorazepato. Tras una cromatografía de intercambio iónico, el receptor queda limpio del exceso de clorazepato y preparado para la experimentación (Stephenson & Barnard, 1986).

Para eliminar el exceso del ligando eluyente se realizó una cromatografía de intercambio iónico (Sigel et al, 1983) (esquema 16). Las 12 fracciones anteriormente recogidas se juntaron y se ajustó el pH a 6.5 con fosfato potásico 100 mM. Se pasaron a una velocidad de 40 ml/h a través de una columna DEAE-Sephacel (1x1.9 cm.), pre-equilibrada con fosfato potásico 20 mM, pH=6.5, acetato magnésico 2 mM, azida sódica al 0.02 % (w/v), Tritón X-100 al 0.2 % (v/v). Después del lavado con este mismo medio durante 2 horas, el receptor se eluyó a 10 ml/h con KCl 0.8 M en este medio. Se recogieron 7 fracciones de 1 ml, que fueron ensayadas posteriormente por unión de BZ e inmunodetección.

### 2.8.3.2. Purificación por cromatografía de inmunoafinidad con anticuerpos anti- $\alpha_1$

El segundo método de purificación fue por cromatografía de inmunoafinidad a través de una columna que llevaba unido el anticuerpo de oveja contra la subunidad  $\alpha_1$  (413-429) del receptor de GABA<sub>A</sub>. Se mezclaron 35 ml del receptor solubilizado preparado según lo anteriormente descrito, 31 ml de tampón de lavado (sacarosa al 10 %, KCl 0.5 mM, EGTA 1 mM, acetato magnésico 2mM , Tritón X-100 al 0.2 %, azida sódica al 0.02 %, fosfato potásico 10 mM, pH=7.4) y 4 ml de KCl 3.5 M (0.5 M de concentración final) se mezclaron y se pasaron durante toda la noche en recirculación a través de la columna pre-tratada con el tampón de elución a 10 ml/h. Se cogió una alícuota (filtrado) para comprobar que el receptor había quedado convenientemente retenido en la columna y se lavó ésta con el mismo tampón de lavado a 25 ml/h durante 2 h. El receptor se eluyó con el tampón de elución (dietilamina 50 mM, pH=11.5, KCl 0.5 M, EGTA 1 mM, acetato magnésico 2 mM,

sacarosa al 10 % (p/v), azida sódica 0.02 % y Tritón X-100 al 0.2 %) a 5 ml/h, recogiendo 8 fracciones de 1 ml sobre tubos que tenían 200  $\mu$ l de glicina 1 M. Las fracciones se ensayaron posteriormente.

La ausencia de contaminación con restos de receptor de corteza cerebral bovina se confirmó por el procesamiento de las fracciones de prelavado de todas las columnas por las técnicas de unión al equilibrio e inmunotransferencia.

Las membranas purificadas de corteza cerebral bovina se usaron como controles de los experimentos con médula adrenal. Para los ensayos con la subunidad  $\alpha_6$  se usaron membranas de cerebelo como control, única estructura donde esta subunidad está presente.

### ***2.9. Ensayos de unión al equilibrio de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam a membranas de médula adrenal***

Los ensayos de unión al equilibrio de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam a membranas de médula adrenal se realizaron por el método de la polietilenimina descrito por Duggan y Stephenson (1988). Las membranas preparadas según el apartado III.2.8.1, fueron diluidas a una concentración de 1 mg prot./ml en un tampón que contenía fosfato potásico 20 mM, EDTA 0.1 mM y Tritón X-100 al 0.1 % (p/v). 160  $\mu$ l de esta solución se incubaron con 20  $\mu$ l de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam (85 Ci/mmol) a distintas concentraciones y 20  $\mu$ l de flunitrazepam frío (en una concentración final de 100  $\mu$ M) para el cálculo del binding no específico, o bien 20  $\mu$ l

de agua para el cálculo del binding total, ambos en duplicado. Tras una incubación de 1 h a 0° C, las muestras se filtraron por filtros Whatman GF/C de fibra de vidrio tratadas con polietilenimina y lavadas 3 veces con 4 ml de una solución de fosfato potásico 20 mM a pH=7.4, con EDTA 0.1 mM. Finalmente se secaron y se cuantificaron en un contador de centelleo. La medida del binding específico se obtuvo por la diferencia entre el binding total y el no específico obtenido por desplazamiento con flunitrazepam frío 100  $\mu$ M.

### ***2.10. Inmunodetección del receptor GABA<sub>A</sub> de médula adrenal bovina***

Tras la electroforesis de las proteínas en gel de poliacrilamida al 10 % en condiciones desnaturizantes (con dodecilsulfato sódico (SDS) al 0.4 %), las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Esta membrana fue lavada en un medio tris salino, TBS (Tris-HCl 50 mM y NaCl al 0.9 % (p/v), pH=7.4) que contenía leche en polvo desnatada al 5 % (p/v), Tween 20 al 0.2 % (v/v) durante 1 h e incubada sucesivamente con el anticuerpo a ensayar (anticuerpo primario) (tabla 4) a una concentración de 5  $\mu$ g/ml y el correspondiente anticuerpo con la antiinmunoglobulina de conejo (anti-rabbit-HRP) unida a peroxidasa de rábano (1:500) (anticuerpo secundario), ambos disueltos en una solución TBS con leche en polvo desnatada al 2.5 % (p/v) y durante 1 h. Entre ambos tratamientos, las membranas fueron lavadas tres veces en periodos de 10 min. con TBS que contenía leche en polvo desnatada al 2.5 % (p/v), Tween al 0.2 % (v/v) en Tris-HCl 50 mM y NaCl al 0.9 % (p/v), pH=7.4. Finalmente se realizaron dos lavados con TBS sólo.

SUBUNIDAD	SECUENCIA	POSICION
$\alpha 1$	413-429	C-term
$\alpha 2$	414-424	C-term
$\alpha 3$	454-467	C-term
$\alpha 4$	7-10	N-term
$\alpha 5$	1-16	N-term
$\alpha 6$	1-15 cys	N-term
$\beta 1$	1-14 cys	N-term
$\beta 2/3$	Monocl.(bd17)	
$\beta 3$	379-393	C-term
$\gamma 2$	1-15 cys	N-term
$\delta$	1-11	N-term

Tabla 4. Anticuerpos usados en los ensayos de caracterización del receptor GABA<sub>A</sub> en la médula adrenal bovina. Estos anticuerpos fueron obtenidos y caracterizados según Stephenson y col. (1989 y 1990).

La reacción antígeno-anticuerpo se visualizó por quimioluminiscencia (ECL). Se mezclaron 5 ml de los dos reactivos suministrados en el kit de Amersham que constituyen la emulsión fotográfica y se dispuso la membrana tratada con los anticuerpos sobre la mezcla durante 1 min. El revelado se realizó en un cassette de autoradiografía con un tiempo de exposición que varió desde 1 seg hasta varias horas, dependiendo de la señal registrada en las primeras pruebas. En general, los resultados presentados en este trabajo no superaron los 5 min de exposición. Para demostrar la especificidad de la reacción inmune, el anticuerpo a ensayar se incubó 12 horas a 4° C con el correspondiente fragmento del péptido usado en la inmunización del animal (conejo u oveja), añadiéndose la mezcla en el paso en el que se añadiría el anticuerpo sólo. Este tratamiento impedía la visualización de la mancha característica de cada anticuerpo.

### *2.11. Metodos estadísticos y expresión de los resultados*

Los resultados presentados en este trabajo corresponden a un mínimo de tres experimentos realizados en triplicado o en duplicado y obtenidos sobre al menos dos lotes distintos de células. Los valores indicados en el texto o presentados en las gráficas representan la media  $\pm$  S.E.M. de la muestra de los valores experimentales obtenidos. Allí donde se realizó una extensa transformación de los datos actuales para obtener los parámetros significativos presentados, se estimó la S.E.M. probable de la distribución transformada a partir de un desarrollo en serie de Taylor de la transformación empleada (Tesis Doctoral de Enrique Castro, 1990).

Los ajustes de las curvas concentración-respuesta para obtener los valores de las EC<sub>50</sub> (o IC<sub>50</sub>) se realizaron bien mediante el programa estadístico PCS (Pharmacological Computer System ) o bien una rutina de ajuste por ordenador mediante regresión no lineal ponderada por mínimos cuadrados (programa ECFIT diseñado por Enrique Castro).

Las comparaciones entre grupos de medias frente a los controles definidos o entre sí se realizaron por medio de una prueba t de Student. El análisis de correlación se llevó a cabo mediante el programa de ordenador Fig P, obteniéndose la significación estadística (cálculo del coeficiente de correlación lineal de Pearson y de t(n-2)) mediante las tablas de valores críticos de t de Fisher y Yates.

El análisis de Scatchard se realizó con el programa LIGAND. El cálculo de la K<sub>i</sub> se realizó por la ecuación de Cheng y Prusoff ( $K_i = IC_{50}/(1+[L]/K_D)$ ).

*IV.*

*RESULTADOS*

---

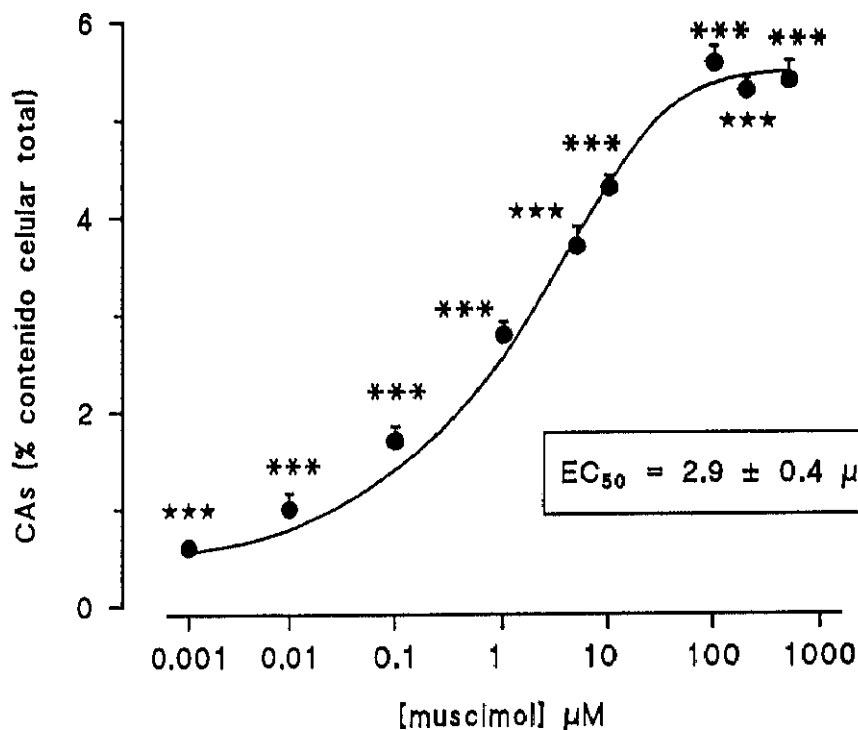
## ***1. Receptores GABA<sub>A</sub>***

Puesto que el estudio de la función de los receptores GABA<sub>A</sub> en la modulación de la secreción de CAs por las células cromafines, así como el mecanismo de acción molecular habían sido estudiados con anterioridad en la Tesis Doctoral del Dr. Enrique Castro (1990), en la presente Tesis nos hemos centrado en el estudio de la modulación farmacológica de estos receptores, así como en el análisis de la estructura molecular de los mismos.

### ***1.1. Modulación farmacológica de los receptores GABA<sub>A</sub> en células cromafines bovinas***

#### ***1.1.1. Efecto de agonistas GABA<sub>A</sub> sobre la secreción basal de CAs: curva dosis-respuesta.***

La estimulación de las células cromafines durante 10 min con muscimol, principal agonista de los receptores GABA<sub>A</sub>, produjo una elevación de la secreción de CAs de forma dependiente de la dosis. El efecto máximo se alcanzó a dosis entre 10  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  y fue de aproximadamente 2.5 veces la secreción basal de CAs ( $9.7 \pm 0.3$  % de secreción de CAs respecto al contenido celular total). La  $\text{EC}_{50}$  para este efecto fue de  $2.9 \pm 0.4$   $\mu\text{M}$  (figura 1).



**Figura 1.** Curva dosis-respuesta del efecto del agonista  $\text{GABA}_A$  muscimol sobre la secreción basal de CAs. Las células se incubaron con las dosis indicadas de agonista y se midió la secreción de CAs como se indica en **Material y Métodos**. Los resultados están expresados como porcentaje de secreción con respecto al contenido celular total de CAs, a los que se restó el dato de secreción basal ( $4.11 \pm 0.23\%$ ). Los datos representan la **media**  $\pm$  S.E.M. de 6 experimentos realizados en duplicado ( $n=12$ ).

### 1.1.2. Efecto de fármacos moduladores del receptor $\text{GABA}_A$ sobre la secreción basal de CAs

En este trabajo se incluyó el estudio de fármacos de distintos grupos terapéuticos conocidos por su actividad moduladora de la actividad de los receptores  $\text{GABA}_A$  en el cerebro. Estos fueron los siguientes:

- benzodiazepinas agonistas (flunitrazepam y diazepam) y antagonistas (Ro 15-1788 ó etil-8-FI-5,6,dihidro-5-metil-6-oxo-4H-imidazol(1,5a) (1,4) benzodiazepina-3-carboxilato)

## Resultados

y el agonista del receptor BZ periférico Ro 5-4684 ó 7-Cl-1,3,dihidro-1-metil-5-(p-clorofenil)-2H-1,4,-bezodiazepina-2-ona).

- $\beta$ -carbolinas:  $\beta$ -CCE ( $\beta$ -carbolina 3-carboxilato),  $\beta$ -CCM (metil éster de  $\beta$ -CCE) y  $\beta$ -CCP (propil éster de  $\beta$ -CCE)
- barbitúricos: pentobarbital
- esteroides: dexametasona ( $9\alpha$ -Fl-16-metil-prednisolona, prednisolona: pregnan-1,4-dieno-3,20-diona), pregnanolona ( $5\beta$ -pregnan-3-ol-20-ona), THDOC ( $5\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ ,21-diol-20-ona),  $3\alpha$ -OH-DHP ( $5\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-ona), alfaxalona ( $5\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-11,20-diona) y pregnenolona ( $5$ -pregnen-3 $\beta$ -ol-20-ona).

Como se aprecia en la tabla 1, ninguno de estos fármacos, ensayados a las dosis indicadas tuvo un efecto significativo sobre la secreción basal de CAs, con excepción de las  $\beta$ -carbolinas a muy bajas concentraciones (tabla 1).

**Tabla 1.** Efectos de los diferentes fármacos que modulan el receptor de GABA<sub>A</sub> en el cerebro sobre la secreción basal de CAs en las células cromafines. La actividad de estos fármacos se ensayó incubando las células, crecidas en multipocillo con los mismos a las dosis indicadas, y midiendo la secreción como se indica en Material y Métodos. Los datos se presentan como razón con respecto a la secreción obtenida con Locke (control=4.11±0.23 % del contenido celular total de CAs).

### A) BENZODIAZEPINAS

<u>Flunitrazepam</u>		<u>Diazepam</u>	
concentración	CAs (razón sobre C)	concentración	CAs (razón sobre C)
1 nM	0.86±0.05 ns	10 nM	1.02±0.07 ns
10 nM	0.94±0.04 ns	100 nM	1.06±0.10 ns
50 nM	0.91±0.02 ns	1 $\mu$ M	0.93±0.06 ns
100 nM	0.96±0.09 ns	10 $\mu$ M	1.08±0.11 ns
1 $\mu$ M	1.07±0.10 ns	100 $\mu$ M	1.13±0.14 ns
10 $\mu$ M	0.94±0.06 ns		
50 $\mu$ M	1.14±0.05 ns		
100 $\mu$ M	1.01±0.05 ns		
<u>Ro 15-1788</u>		<u>Ro 5-4684</u>	
concentración	CAs (razón sobre C)	concentración	CAs (razón sobre C)
100 nM	0.94±0.10 ns	100 nM	1.00±0.10 ns
1 $\mu$ M	1.16±0.15 ns	1 $\mu$ M	1.05±0.10 ns
10 $\mu$ M	1.13±0.01 ns	10 $\mu$ M	0.95±0.05 ns
100 $\mu$ M	0.94±0.06 ns	100 $\mu$ M	1.12±0.10 ns

**B)  $\beta$ -CARBOLINAS**

concentración	CAs (razón sobre C)		
	$\beta$ -CCE	$\beta$ -CCM	$\beta$ -CCP
1 nM	1.40 $\pm$ 0.14 **	1.57 $\pm$ 0.40 ***	1.84 $\pm$ 0.11 ***
10 nM	1.06 $\pm$ 0.06 ns	1.02 $\pm$ 0.10 ns	1.27 $\pm$ 0.1 *
50 nM	0.96 $\pm$ 0.21 ns	1.01 $\pm$ 0.10 ns	1.09 $\pm$ 0.05 ns
100 nM	1.04 $\pm$ 0.07 ns	1.04 $\pm$ 0.03 ns	1.02 $\pm$ 0.20 ns
1 $\mu$ M	0.96 $\pm$ 0.11 ns	0.94 $\pm$ 0.10 ns	1.06 $\pm$ 0.01 ns
10 $\mu$ M	1.01 $\pm$ 0.05 ns	1.04 $\pm$ 0.07 ns	1.04 $\pm$ 0.05 ns
100 $\mu$ M	0.88 $\pm$ 0.01 ns	0.88 $\pm$ 0.04 ns	1.09 $\pm$ 0.07 ns

**C) BARBITÚRICOS (pentobarbital)**

concentración	CAs (razón sobre C)
10 nM	1.18 $\pm$ 0.15 ns
100 nM	1.06 $\pm$ 0.15 ns
1 $\mu$ M	0.94 $\pm$ 0.15 ns
10 $\mu$ M	1.10 $\pm$ 0.01 ns
100 $\mu$ M	1.00 $\pm$ 0.15 ns

**D) ESTEROIDES**

conc	CAs (razón sobre C)					
	<u>Dexametasona</u>	<u>Pregnanolona</u>	<u>THDOC</u>	<u>3<math>\alpha</math>-OH-DHT</u>	<u>Alfaxalona</u>	<u>Pregnenolona</u>
1 nM	0.89 $\pm$ 0.09 ns	0.98 $\pm$ 0.26 ns	0.87 $\pm$ 0.01 ns	0.91 $\pm$ 0.10 ns	1.08 $\pm$ 0.08 ns	1.2 $\pm$ 0.03 ns
10 nM	1.15 $\pm$ 0.07 ns	0.99 $\pm$ 0.02 ns	1.16 $\pm$ 0.12 ns	1.11 $\pm$ 0.11 ns	0.97 $\pm$ 0.16 ns	1.2 $\pm$ 0.06 ns
100 nM	1.05 $\pm$ 0.01 ns	1.08 $\pm$ 0.14 ns	0.85 $\pm$ 0.14 ns	1.08 $\pm$ 0.10 ns	0.90 $\pm$ 0.09 ns	1.0 $\pm$ 0.05 ns
1 $\mu$ M	1.14 $\pm$ 0.05 ns	1.11 $\pm$ 0.02 ns	1.12 $\pm$ 0.06 ns	1.20 $\pm$ 0.14 ns	1.20 $\pm$ 0.20 ns	0.9 $\pm$ 0.04 ns
10 $\mu$ M	1.00 $\pm$ 0.06 ns	0.98 $\pm$ 0.20 ns	1.05 $\pm$ 0.08 ns	1.09 $\pm$ 0.16 ns	0.96 $\pm$ 0.10 ns	1.1 $\pm$ 0.13 ns
100 $\mu$ M	0.98 $\pm$ 0.26 ns	1.15 $\pm$ 0.07 ns	1.14 $\pm$ 0.18 ns	1.20 $\pm$ 0.12 ns	0.96 $\pm$ 0.1 ns	1.0 $\pm$ 0.08 ns

### 1.1.3. Efecto de fármacos moduladores sobre la secreción de CAs mediada por agonistas GABA<sub>A</sub>

#### 1.1.3.1. Modulación por benzodiazepinas

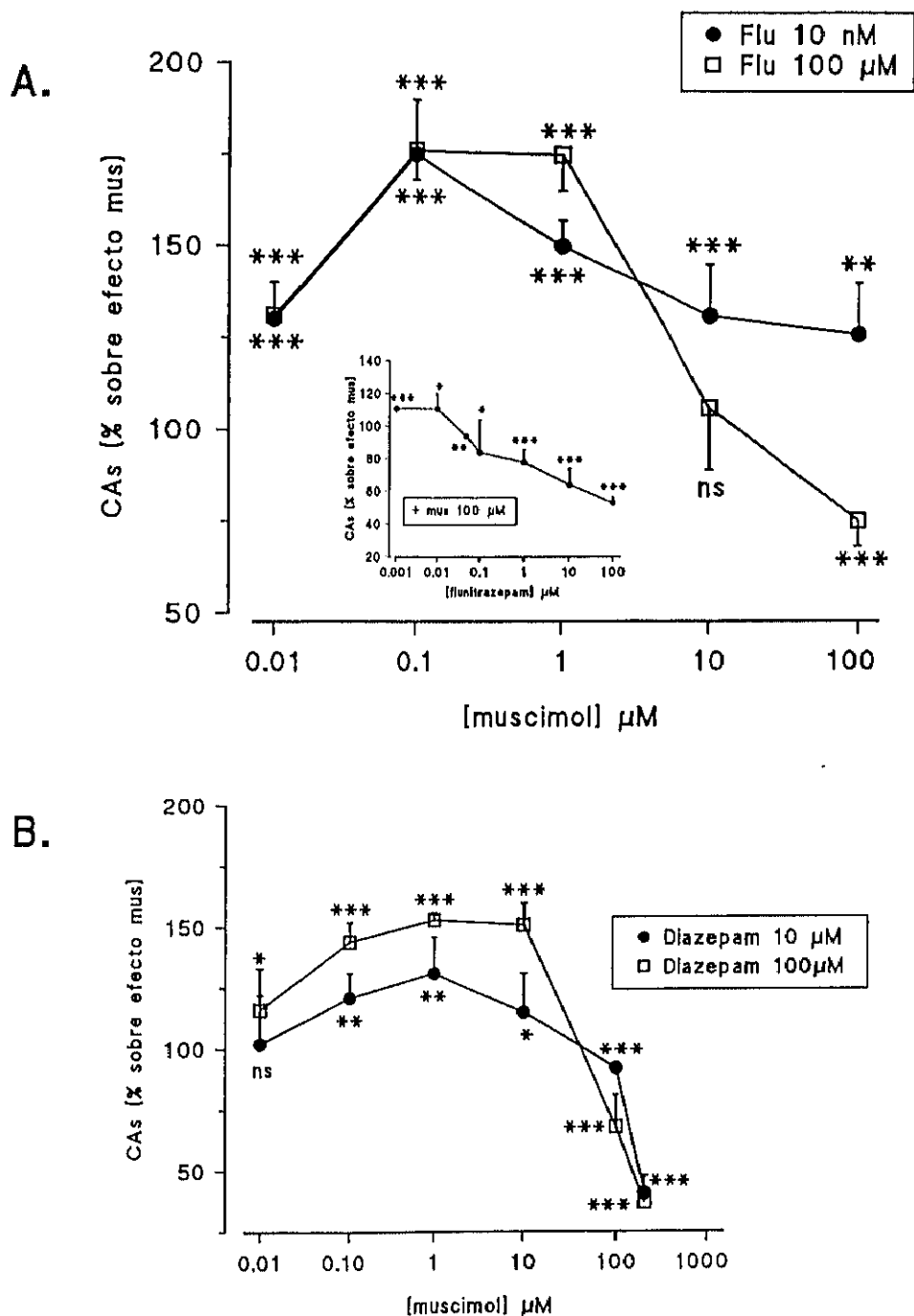
Las benzodiazepinas (BZ) son conocidos moduladores alostéricos del receptor GABA<sub>A</sub> del cerebro, cuyo mecanismo de acción consiste en aumentar la frecuencia de apertura del canal de Cl<sup>-</sup> que forma este receptor (Sieghart, 1992). En nuestro estudio, hemos ensayado las BZ flunitrazepam y diazepam, por ser las que modulan más potentemente las respuestas del receptor GABA<sub>A</sub> en el cerebro. El estudio se ha hecho realizando un pretratamiento con estas

sustancias para asegurar su máxima unión a los receptores y un posterior tratamiento con la mezcla correspondiente BZ+muscimol.

El flunitrazepam a una concentración de 10 nM potenció el efecto secretor del muscimol. El efecto máximo se alcanzó a una concentración de muscimol de 100 nM y fue de un 70 % superior al efecto del muscimol. A concentraciones superiores, el efecto potenciador fue menor, aunque siempre significativamente superior a la secreción de CAs inducida por las diferentes concentraciones de muscimol (figura 2A). En las mismas condiciones, una mayor dosis de flunitrazepam, 100  $\mu$ M, no produjo un efecto potenciador significativamente mayor; sin embargo, esta concentración causó una inhibición significativa (aproximadamente un 25 %) de la secreción inducida por concentraciones de muscimol superiores a 10  $\mu$ M (figura 2A).

Para comprobar el efecto inhibitorio del flunitrazepam sobre el efecto secretor de altas concentraciones de muscimol, realizamos la estimulación con un rango de concentraciones de flunitrazepam a una dosis fija y alta de muscimol (100  $\mu$ M). En estas condiciones observamos que conforme iba incrementándose la concentración de flunitrazepam, se producía un efecto inhibitorio mayor sobre la secreción inducida por muscimol, que llegó hasta el 40 % de inhibición a concentraciones de 100  $\mu$ M de flunitrazepam (figura 2A, inserto).

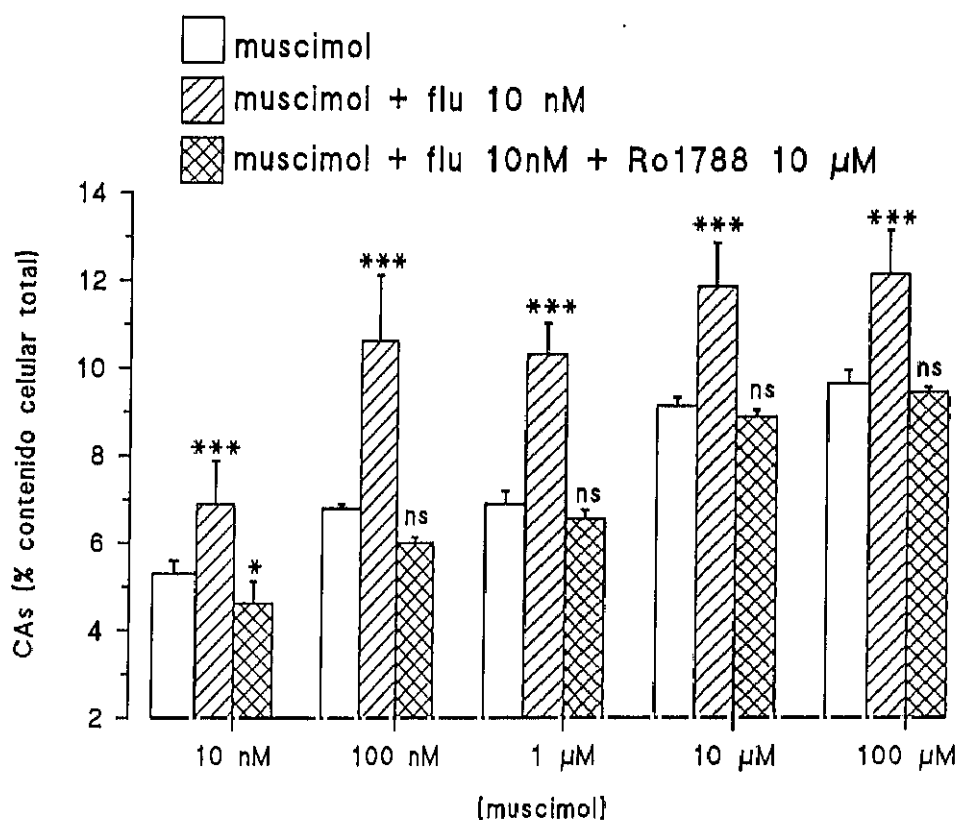
El diazepam también potenció el efecto secretor del muscimol, aunque con menos eficacia que el flunitrazepam. Diazepam 10  $\mu$ M tuvo un efecto potenciador máximo a concentraciones entre 0.1 y 1  $\mu$ M de muscimol, que fue de un 30 %, efecto que fue mayor en el caso de estimular las células con diazepam 100  $\mu$ M (un 50 %). Al igual que el flunitrazepam, el diazepam produjo un efecto inhibitorio de la secreción de CAs inducida por altas concentraciones de muscimol (a partir de 10  $\mu$ M), pero, en este caso, el efecto inhibitorio fue más acusado (aproximadamente un 60 % de inhibición a la concentración de 250  $\mu$ M de diazepam) (figura 2B).



**Figura 2.** Modulación del efecto secretor de agonistas  $\text{GABA}_A$  por benzodiazepinas en las células cromafines bovinas. Las células cromafines bovinas se pretrataron durante 15 minutos con la benzodiazepina (BZ) flunitrazepam (A) o diazepam (B) y posteriormente con la mezcla de muscimol y BZ a las concentraciones indicadas en la gráfica. La secreción se midió como se especifica en Material y Métodos. Los datos se representan como porcentaje de efecto sobre el del muscimol a cada concentración y en cada experimento. Para establecer la comparación se sugiere tomar como referencia la figura 1. En el inserto de la figura A se representa el efecto de concentraciones crecientes de flunitrazepam sobre el de una dosis fija de muscimol. Las significaciones estadísticas se refieren al efecto del muscimol sólo en cada punto. ns, no significativo; \*  $p < 0.1$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.005$ ;  $n = 8$  (test t de Student).

## Resultados

Para estudiar la especificidad de ambas acciones moduladoras de las benzodiazepinas, potenciadoras e inhibidoras de la secreción mediada por muscimol, ensayamos el efecto del flunitrazepam en presencia de un antagonista BZ central, el Ro 15-1788 ó Ro 1788, como es también conocido en la literatura científica. Como se aprecia en la figura 3, la potenciación del efecto del flunitrazepam 10 nM sobre la acción de diferentes concentraciones de muscimol, fue prevenida por la adición de Ro 1788 10  $\mu$ M a cualquier dosis de muscimol ensayada entre 10 nM y 100  $\mu$ M. También observamos la reversión del efecto con aquella dosis a la que el flunitrazepam tiene un efecto inhibitorio sobre la secreción inducida por el muscimol (muscimol 100  $\mu$ M + flunitrazepam 10  $\mu$ M) (figura 4A).

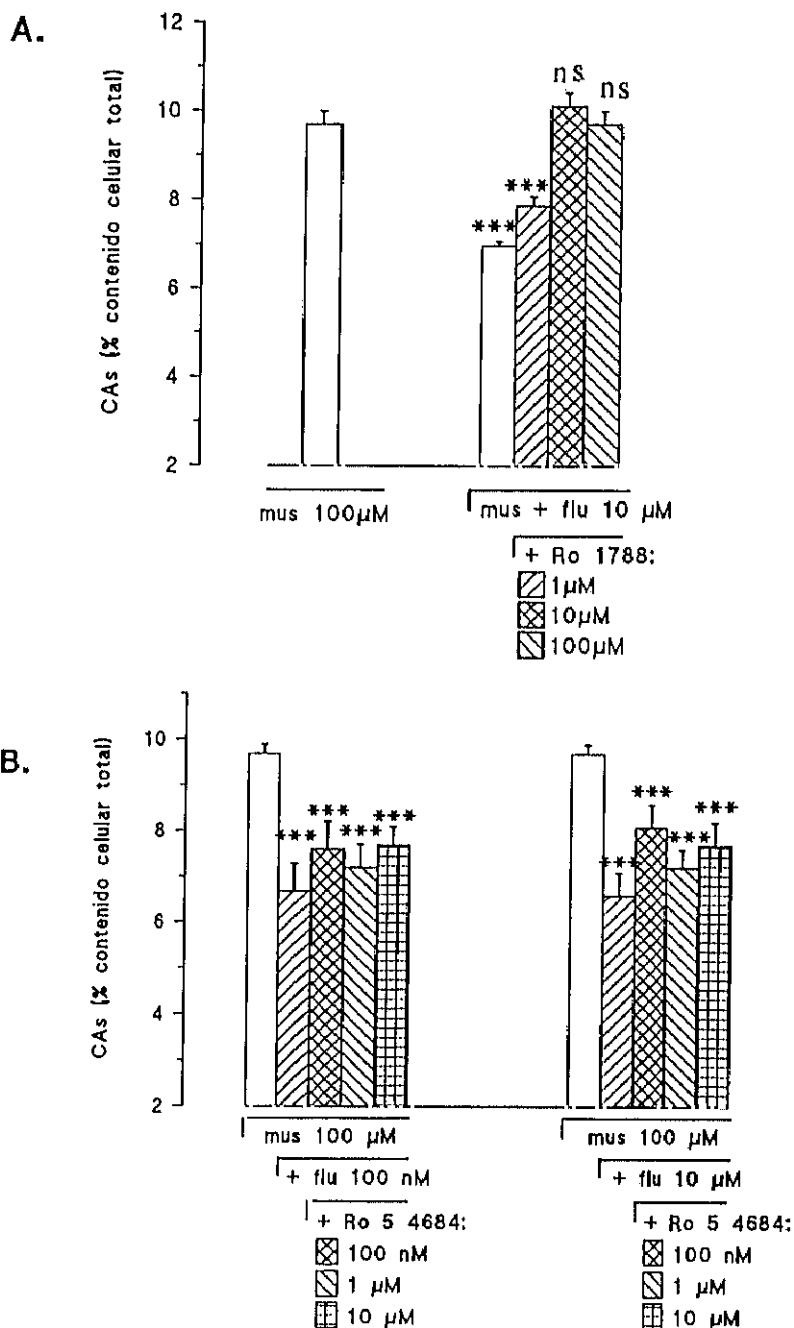


**Figura 3.** Efecto del Ro 15 1788 sobre la modulación del efecto secretor de agonistas GABA<sub>A</sub> por flunitrazepam en las células cromafines bovinas. Las células se pretrataron 15 minutos con flunitrazepam o con la mezcla de flunitrazepam y su antagonista específico Ro 15 1788 y posteriormente se realizó el tratamiento conjunto de estas sustancias y el agonista GABA<sub>A</sub> muscimol para comprobar la reversión de los efectos potenciadores del flunitrazepam por su antagonista. Se midió la secreción como se indica en Material y Métodos y se expresaron los datos como porcentaje de secreción con respecto al contenido de CAs totales. El valor del control fue  $4.11 \pm 0.23$  % de CAs respecto del contenido celular total. La significación estadística compara el efecto de las distintas mezclas con el del muscimol sólo, cuya secreción fue significativa en todos los puntos. ns no significativo; \*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.005$ ;  $n=4$  (test t de Student).

Otra BZ ensayada fue el Ro 5-4684, que a dosis inferiores bajas del orden de nM se sabe que actúa como agonista del receptor BZ periférico y a dosis de  $\mu\text{M}$  puede interactuar con el receptor  $\text{GABA}_A$  en un sitio diferente al de unión de GABA o BZ, inhibiendo la acción del GABA sobre los flujos de  $\text{Cl}^-$  (Sieghart et al., 1992). En contraste con el efecto del Ro 1788, esta sustancia no fue capaz de revertir la inhibición causada por flunitrazepam 100 nM o flunitrazepam 10  $\mu\text{M}$  sobre muscimol 100  $\mu\text{M}$  a ninguna de las dosis ensayadas (100 nM, 1  $\mu\text{M}$  o 10  $\mu\text{M}$ ) (figura 4B).

#### *1.1.3.2. Modulación por $\beta$ -carbolinas*

Las  $\beta$ -carbolinas son unas sustancias convulsivantes que se consideran "agonistas inversos" del receptor  $\text{GABA}_A$  (Stephenson, 1991). En células cromafines a una concentración fija de  $\beta\text{-CCE}$  10  $\mu\text{M}$ , se ensayó un rango de concentraciones de muscimol entre 10 nM y 100  $\mu\text{M}$ , observando un pico de inhibición del efecto a concentraciones de muscimol 1  $\mu\text{M}$ , con una posterior reversión hacia la de 100  $\mu\text{M}$  (figura 5A). A esta concentración 1  $\mu\text{M}$  de muscimol se ensayó un rango de concentraciones de diferentes  $\beta$ -carbolinas entre 1 nM y 100  $\mu\text{M}$  observando que todas ellas inhibían el efecto secretor del muscimol 1  $\mu\text{M}$  en orden de potencia:  $\beta\text{-CCE} > \beta\text{-CCP} > \beta\text{-CCM}$  (figura 5B).



**Figura 4.** Efecto del Ro 15 1788 y Ro 5 4864 sobre la modulación del efecto secretor de agonistas GABA<sub>A</sub> por flunitrazepam en las células cromafines bovinas. Las células se pretrataron 15 minutos con flunitrazepam o con la mezcla de flunitrazepam y Ro 15 1788 ó Ro 5 4864, y posteriormente se realizó el tratamiento conjunto de estas sustancias y el agonista GABA<sub>A</sub> muscimol. Se midió la secreción como se indica en Material y Métodos y se expresaron los datos como porcentaje de secreción con respecto al contenido de CAs totales. La secreción basal fue  $4.11 \pm 0.23$  % respecto al contenido celular total de CAs. La significación estadística compara el efecto de las distintas mezclas con el efecto del muscimol sólo, cuya secreción fue significativa. ns no significativo; \*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.005$ ;  $n = 4$  (test t de Student).

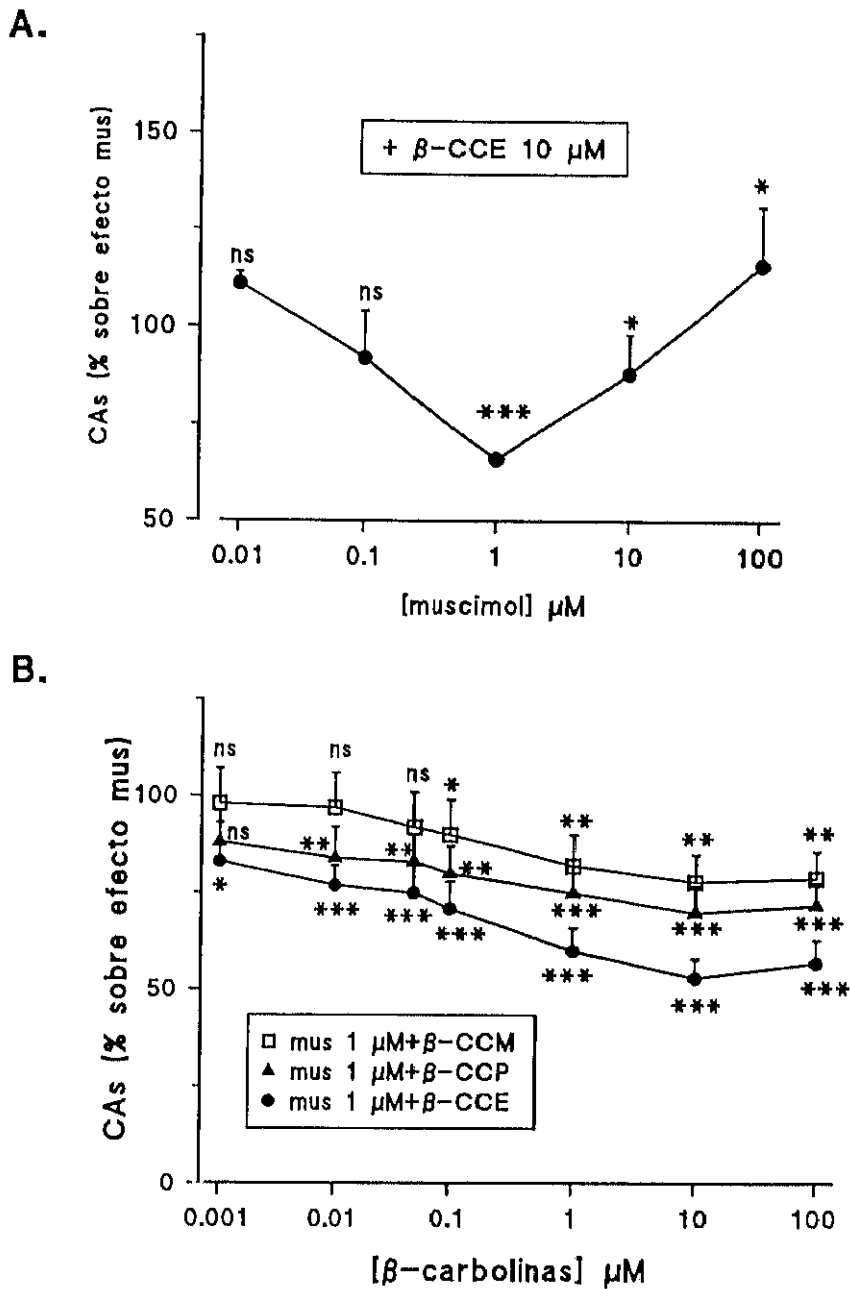


Figura 5. Modulación del efecto secretor de agonistas  $GABA_A$  por  $\beta$ -carbolinas en células cromafines bovinas. Las células se pretrataron durante 15 minutos con la etil  $\beta$ -carbolina 3-carboxilato ( $\beta$ -CCE) y posteriormente con la mezcla de  $\beta$ -CCE y muscimol a las concentraciones indicadas en la gráfica (A) o muscimol 1  $\mu$ M y las  $\beta$ -carbolinas  $\beta$ -CCE,  $\beta$ -CCM (metil éster de  $\beta$ -CCE) y  $\beta$ -CCP a distintas concentraciones (B). La secreción se midió como se especifica en Material y Métodos. Los datos se expresaron como porcentaje de efecto sobre el del muscimol a cada concentración y se representa la media  $\pm$  S.E.M. de cuatro experimentos realizados cada uno en duplicado. Las significaciones estadísticas están hechas por comparación con el efecto del muscimol en cada punto. ns no significativo; \* $p < 0.1$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.005$ ;  $n = 8$  (test t de Student).

### 1.1.3.3. Modulación por barbitúricos

En el cerebro, los barbitúricos potencian las acciones de los agonistas GABA<sub>A</sub> por aumentar el tiempo de apertura del canal de Cl<sup>-</sup> que forma el receptor (Peters et al., 1985). En las células cromafines ensayamos el efecto del pentobarbital 10 μM sobre un rango creciente de concentraciones de muscimol. Esta sustancia potenció el efecto de concentraciones bajas de muscimol con un efecto máximo de un 90 % e inhibió parcialmente el efecto de concentraciones superiores del mismo (> 10 μM) con un efecto máximo de un 50 % (figura 6).

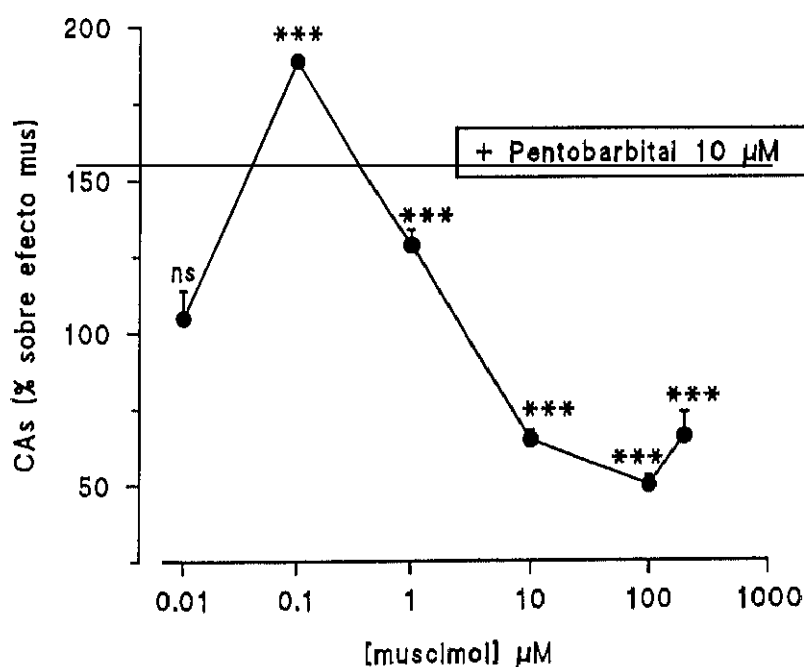


Figura 6. Modulación del efecto secretor de agonistas GABA<sub>A</sub> por pentobarbital en células cromafines bovinas. Las células se pretrataron durante 15 minutos con el barbiturato pentobarbital 10 μM y posteriormente con la mezcla pentobarbital 10 μM y muscimol a las concentraciones indicadas en la gráfica. La secreción se midió como se especifica en Material y Métodos. Los datos se expresan como porcentaje de efecto sobre el del muscimol a cada concentración y se representa la media ± S.E.M. de tres experimentos realizados por duplicado. Las significaciones estadísticas se refieren al efecto del muscimol en cada punto, ns no significativo; \*p < 0.1; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.005 (test t de Student).

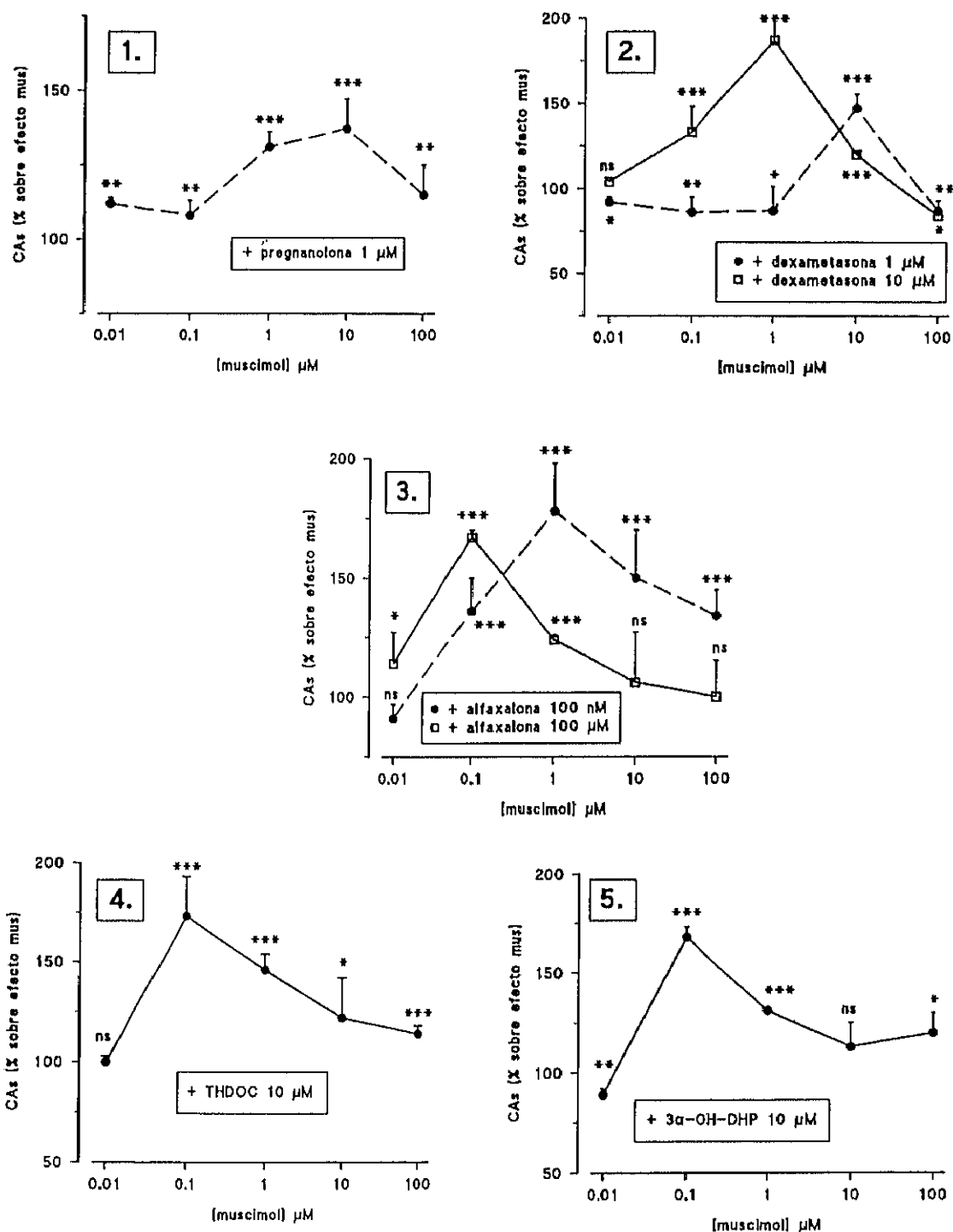
1.1.3.4. Modulación por esteroides

Para estudiar la modulación del receptor GABA<sub>A</sub> por esteroides, usamos diferentes concentraciones de 2 esteroides obtenidos por síntesis química: dexametasona y alfaxalona y 4 esteroides generados endógenamente en los seres vivos: THDOC, 3 $\alpha$ -OH-DHP, pregnanolona y pregnenolona, cuyos nombres completos detallamos anteriormente en el apartado IV.1.1.2. Todas ellas son conocidas por sus acciones moduladoras de la actividad del receptor GABA<sub>A</sub> en el cerebro (Peters et al., 1985).

La pregnanolona y la dexametasona a una dosis de 1  $\mu$ M potenciaron el efecto de muscimol de manera más acusada a una concentración de 10  $\mu$ M de muscimol (figura 7.1 y 7.2), siendo el perfil del efecto muy similar para ambas sustancias. A dosis superiores a 10  $\mu$ M de dexametasona, el pico máximo de efecto se desplazó hacia concentraciones inferiores de muscimol (1  $\mu$ M). La alfaxalona 100 nM también produjo una curva de potenciación semejante a la anterior (figura 7.3), aunque en este caso, el pico de estimulación máxima se obtuvo a concentraciones de muscimol de 1  $\mu$ M. Al igual que en el caso de la dexametasona, la estimulación con una dosis superior de alfaxalona (100  $\mu$ M) desplazó el pico de máxima potenciación a una concentración de muscimol menor (100 nM) (figura 7.3).

Los datos representados en la figura 7.2 y 7.3 parecen apuntar la idea de la existencia de una relación inversa entre la concentración de esteroide y la dosis de muscimol a la que se consigue el máximo efecto; es decir, a mayor cantidad de esteroide, menor es la dosis de muscimol necesaria para conseguir el efecto máximo.

THDOC y 3 $\alpha$ -OH-DHP 10  $\mu$ M potenciaron el efecto de muscimol de manera más acusada a una concentración de 100 nM de éste (figuras 7.4 y 7.5). El pico de máximo efecto máximo concordaba con la concentración alta de esteroide ensayada.



**Figura 7. Modulación del efecto secretor de agonistas GABA<sub>A</sub> por esteroides en células cromafines bovinas.** Las células se pretrataron durante 15 minutos con el esteroide a ensayar, y posteriormente con la mezcla de esteroide y muscimol a las concentraciones indicadas en la gráfica. Los esteroides ensayados fueron: (1) pregnanolona (5 $\beta$  pregnan-3-ol-20-ona); (2) dexametasona (9 $\alpha$ -Fl-16 $\alpha$ metil-prednisolona); (3) alfaxalona (5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-11-20-diona); (4) THDOC (5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -21-diol-20-ona); (5) 3 $\alpha$ -OH-DHP (5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-ona). La secreción se midió como se especifica en Material y Métodos. Los datos se expresan como porcentaje de efecto sobre el del muscimol a cada concentración y se representa la media  $\pm$  S.E.M. de tres experimentos realizados cada uno en duplicado. Las significaciones estadísticas están hechas por comparación con el efecto del muscimol en cada punto. ns no significativo; \* $p < 0.1$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.005$  (test t de Student).

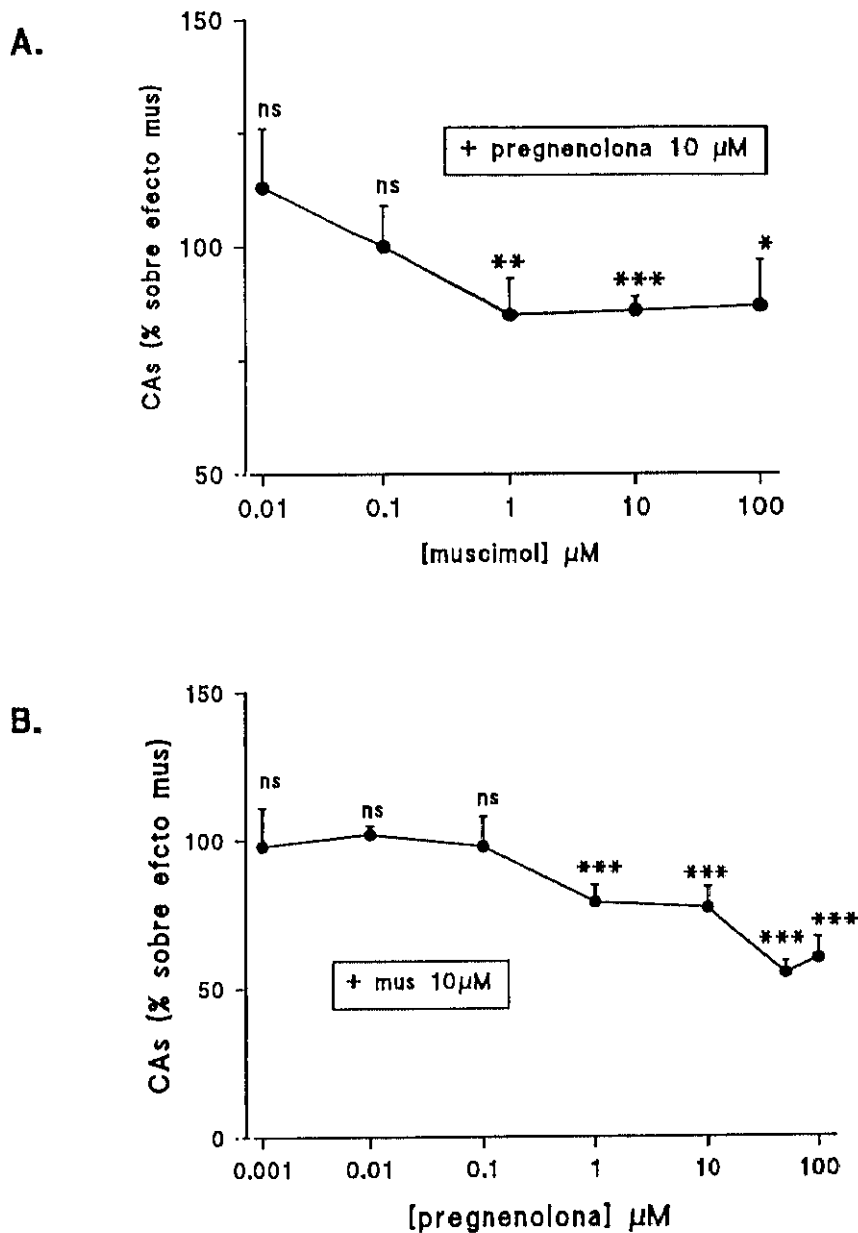


Figura 8. Modulación del efecto secretor de agonistas  $\text{GABA}_A$  en células cromafines bovinas por pregnenolona. Las células se pretrataron durante 15 minutos con el esteroide pregnenolona ( $5\beta$  pregnen- $3\beta$ -ol-20-ona) y posteriormente con la mezcla de pregnenolona  $10 \mu\text{M}$  y muscimol a las concentraciones indicadas en la gráfica (A) o con muscimol  $10 \mu\text{M}$  y posteriormente con pregnenolona a distintas concentraciones (B). La secreción se midió como se especifica en Material y Métodos. Los datos se expresan como porcentaje de efecto sobre el del muscimol a cada concentración y se representa la media  $\pm$  S.E.M. de todos ellos. Las significaciones estadísticas se refieren al efecto del muscimol en cada punto. ns no significativo; \* $p < 0.1$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.005$ ;  $n=6$  (test t de Student).

La magnitud de potenciación del efecto secretor de los agonistas GABA<sub>A</sub> por los distintos esteroides osciló entre un 40 y un 80 %, dependiendo del esteroide y de las concentraciones ensayadas. Todos ellos tuvieron acciones estimuladoras sobre efecto secretor del muscimol, a excepción de la dexametsona, que una concentración de muscimol de 100  $\mu$ M tuvo un ligero efecto inhibitorio (menos del 25 %).

Además de los esteroides citados anteriormente, todos ellos de la serie "pregnan" (sin doble enlace en posición 5), conocidos por su efecto activador sobre los receptores GABA<sub>A</sub>, se ensayó otro esteroide, la pregnenolona, que pertenece a la serie de los "pregnen", con doble enlace en la posición 5, conocido por su efecto inhibitorio o bloqueante de los efectos del receptor GABA<sub>A</sub>. Esta sustancia a una concentración de 10  $\mu$ M disminuyó significativamente el efecto secretor mediado por dosis crecientes de muscimol (figura 8A). Fijando una dosis de muscimol (10  $\mu$ M), a la que se observó el mayor efecto inhibitorio y analizando un rango de concentraciones de pregnenolona, se confirmó el efecto inhibitorio moderado (como máximo 40 %) dependiente de la dosis de este esteroide sobre el efecto secretor del muscimol (figura 8B).

### 1.1.3.5. Efecto del zinc

El Zn<sup>2+</sup> es un catión que parece modular positivamente el receptor GABA<sub>A</sub> en el cerebro cuando este receptor carece de la subunidad  $\gamma_2$  (Sieghart, 1992). En células cromafines, a una dosis de muscimol 10  $\mu$ M, el Zn<sup>2+</sup> no produjo ningún efecto significativo sobre el efecto secretor del muscimol a ninguna dosis ensayada (entre 10 nM y 200  $\mu$ M) (figura 9).

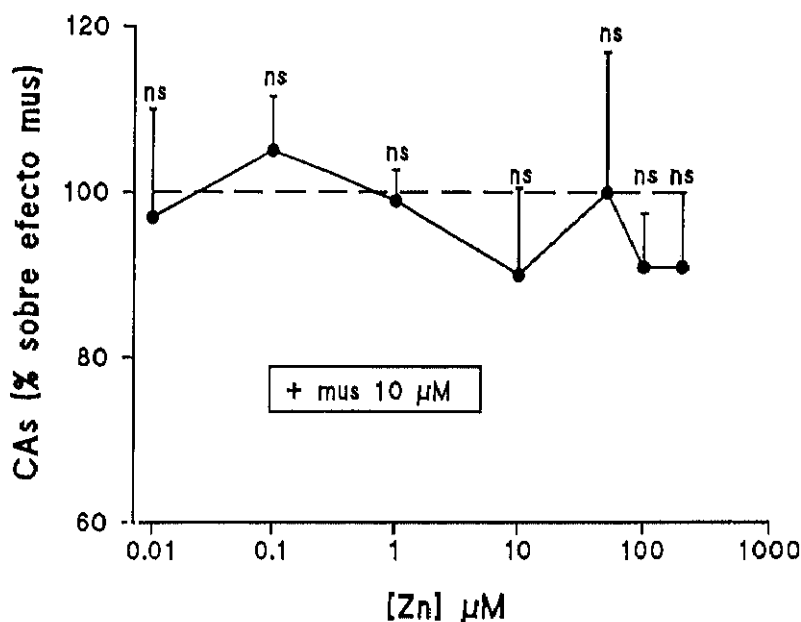


Figura 9. Modulación del efecto secretor de agonistas GABA<sub>A</sub> de células cromafines bovinas por zinc. Las células se pretrataron durante 15 minutos con Zn<sup>2+</sup> y posteriormente con una mezcla de muscimol 10 μM y Zn<sup>2+</sup> a las concentraciones indicadas en la gráfica. La secreción se midió como se especifica en Material y Métodos. Los datos se expresan como porcentaje de efecto sobre el del muscimol a cada concentración y se representa la media ± S.E.M. de cuatro experimentos realizados en duplicado. Las significaciones estadísticas se refieren al efecto del muscimol en cada punto. ns no significativo (test t de Student).

## 1.2. Ensayos de unión al equilibrio de benzodiazepinas

### 1.2.1. Unión específica de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam

El flunitrazepam se une específicamente a sitios de la membrana plasmática de la médula adrenal. En ensayos con concentraciones de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam entre 0.1 y 100 nM, utilizando una concentración de 10 μM de flunitrazepam frío para calcular la unión no específica, se

## Resultados

obtuvo una unión específica máxima de un 60 %. El gráfico del análisis de Scatchard se muestra en la figura 10. La  $K_D$  para este efecto fue de  $4 \pm 0.6$  nM y la  $B_{max} = 27 \pm 3$  fmol/mg de proteína (Parramón et al., 1994a). El desplazamiento específico de la unión de [ $^3$ H]flunitrazepam 10 nM por distintas concentraciones de flunitrazepam frío se refleja en la figura 11A. La  $EC_{50}$  para este efecto fue de  $40 \pm 5$  nM y la  $K_i$  de 16 nM.

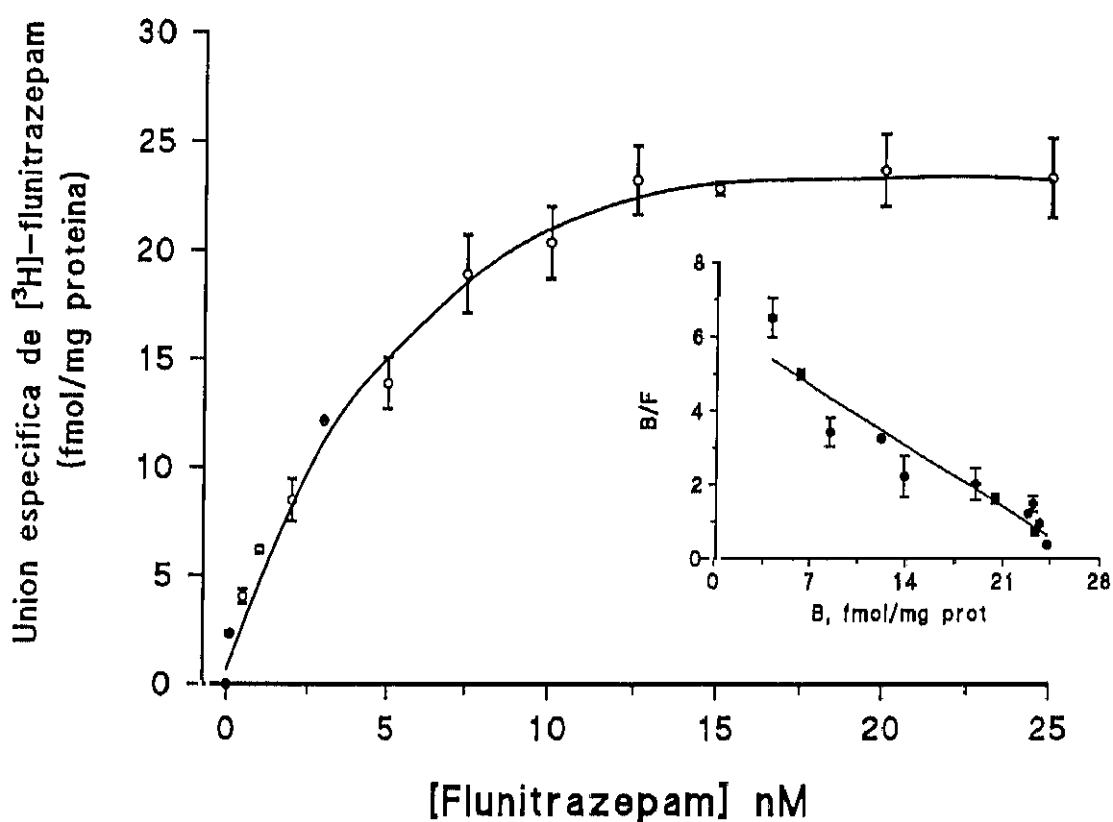


Figura 10. Unión específica de [ $^3$ H]flunitrazepam a membranas de médula adrenal bovina. El ensayo de unión al equilibrio de radioligando se realizó en membranas obtenidas de la médula adrenal bovina como se indica en Material y Métodos. Las membranas así obtenidas (1 mg proteína/ml) se incubaron con distintas concentraciones de [ $^3$ H]flunitrazepam (85 Ci/mmol) durante 1 h a  $0^\circ$  C sólo (unión total) o las mismas concentraciones mas flunitrazepam  $10 \mu$ M frío (unión no específica). Las membranas se separaron del medio de incubación por filtración a vacío y la radioactividad se midió por espectrofotometría de centelleo líquido. La unión específica se calculó por diferencia entre la unión total y la no específica. La figura representa la curva de saturación específica y el diagrama de Scatchard en el inserto. Los resultados son la media de 3 experimentos realizados en duplicado. El análisis de Scatchard se realizó con el programa LIGAND, que dió unos valores de  $K_D = 4 \pm 0.6$  nM y  $B_{max} = 27 \pm 3$  fmol/mg proteína.

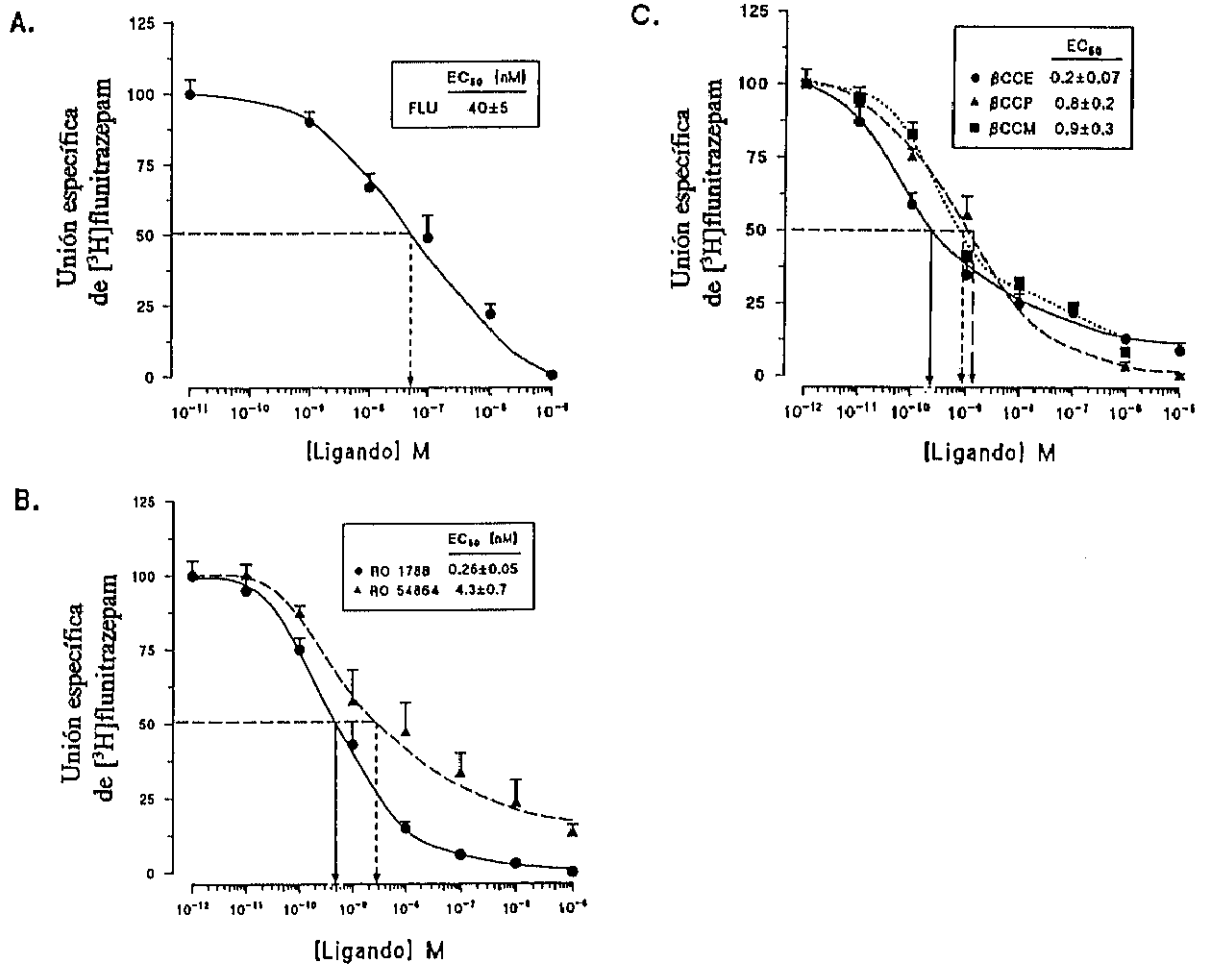


Figura 11. Desplazamiento de la unión específica de  $[^3\text{H}]$ flunitrazepam por flunitrazepam frío,  $\beta$ -carbolinas, Ro 15 1788 y Ro 5 4684 a membranas de médula adrenal bovina. El ensayo de unión del radioligando se realizó en membranas obtenidas de la médula adrenal bovina como se indica en Material y Métodos. Las membranas así obtenidas (1 mg proteína/ml) se incubaron durante 1 h a  $0^\circ\text{C}$  con  $[^3\text{H}]$ flunitrazepam (85 Ci/mmol) 10 nM y un rango de concentraciones entre 1 nM y  $10\ \mu\text{M}$  de flunitrazepam (A), Ro 15 1788 y Ro 5 4684 (B) o  $\beta$ -carbolinas (C) (unión total) o con  $[^3\text{H}]$ flunitrazepam 10 nM con estas sustancias y flunitrazepam frío  $10\ \mu\text{M}$  (unión no específica). Las membranas se separaron del medio de incubación por filtración a vacío y la radioactividad se midió por espectrofotometría de centelleo líquido. La unión específica se calculó por diferencia entre la unión total y la no específica. Los porcentajes de unión específicos se calcularon tomando como 100 % la unión específica de  $[^3\text{H}]$ flunitrazepam 10 nM. En las figuras se representa el porcentaje de desplazamiento específico producido por cada sustancia, obtenido por diferencia entre la unión total y la inespecífica. Los resultados son la media de 3 experimentos realizados en duplicado. El análisis de los datos con el programa PCS dió las  $\text{EC}_{50}$  que aparecen detalladas en cada figura.

### ***1.2.2. Desplazamiento específico por agonistas y antagonistas de BZ***

Las  $\beta$ -carbolinas desplazaron específicamente la unión de [ $^3\text{H}$ ]flunitrazepam a las membranas de la médula adrenal bovina presentando una afinidad muy alta: sus  $\text{EC}_{50}$  fueron de  $0.2 \pm 0.07$ ,  $0.8 \pm 0.2$  y  $0.9 \pm 0.3$  nM para la  $\beta$ -CCE,  $\beta$ -CCP y  $\beta$ -CCM, respectivamente (figura 11C).

El antagonista de BZ Ro 15 1788 y el Ro 5 4684 (agonista del receptor periférico sólo a bajas dosis y que a altas dosis interacciona con el receptor de  $\text{GABA}_A$ ) también desplazaron con gran eficacia la unión específica de [ $^3\text{H}$ ]flunitrazepam, siendo sus  $\text{EC}_{50}$   $0.26 \pm 0.05$  y  $4.3 \pm 0.7$  nM, respectivamente (figura 11B).

Ninguna de estas sustancias ensayadas tuvo ningún efecto sobre la unión no específica de [ $^3\text{H}$ ]flunitrazepam ensayado mediante la incubación de 10 nM del mismo con 10  $\mu\text{M}$  de flunitrazepam frío y el compuesto específico.

### ***1.3. Análisis de la estructura del receptor $\text{GABA}_A$ expresado en la médula adrenal bovina***

El análisis de la estructura del receptor  $\text{GABA}_A$  expresado en la médula adrenal bovina se realizó mediante técnicas de inmunodetección con anticuerpos específicos, tras la separación de las proteínas de las membranas de la médula adrenal por electroforesis. Los resultados (bandas) obtenidos para el receptor de la médula adrenal por esta técnica se contrastaron con las obtenidas con los mismos anticuerpos ensayados en membranas de corteza cerebral bovina y las de proteínas estándares de peso molecular conocido, con el fin de comprobar si las bandas tenían el peso molecular requerido.

## Resultados

El estudio inicial se llevó a cabo en membranas de médula adrenal crudas, donde se ensayó primero la presencia de la subunidad  $\alpha_1$ , por ser la más abundante en el cerebro. Como se aprecia en la figura 12A, se obtuvo una banda de intensidad creciente respecto a la concentración de proteína colocada en el gel, pero no era la correspondiente al peso molecular de la subunidad  $\alpha_1$  de corteza cerebral. Esto podía significar que esta subunidad no existiera en este tejido o que la preparación no fuera la adecuada. Con el fin de confirmar esta última hipótesis, más probable, iniciamos los procesos de purificación, tal como se detallan en Material y Métodos.

La primera purificación se realizó por cromatografía de afinidad utilizando una columna BZ (Ro 7 1986/1). Este tratamiento eliminó todas las bandas anteriormente obtenidas (figura 12B), lo que confirmaba que eran inespecíficas, aunque el método de purificación seguía sin ser el adecuado. Ello podía ser debido a que el ligando utilizado para desplazar el receptor de la columna, el clorazepato, siguiera unido al receptor y enmascarara la banda, al impedir la unión del receptor con el anticuerpo correspondiente. Con el fin de eliminar el exceso de clorazepato, se realizó un posterior paso de purificación, a través de una columna de intercambio iónico, lo que nos permitió visualizar, por primera vez, una banda específica que indicaba la presencia de la subunidad  $\alpha_1$  en la médula adrenal (figura 12C).

Para confirmar la presencia de esta subunidad de manera más específica, se realizó un proceso distinto de purificación a partir de membranas crudas. Estas fueron solubilizadas con desoxicolato sódico y aplicadas a una columna de inmunoafinidad que llevaba unido el anticuerpo contra la subunidad  $\alpha_1$ ,413-429, como se indica en Material y Métodos. En la figura 12D se pueden apreciar las bandas correspondientes a las distintas fracciones recogidas de esta columna, que confirmaban por este método la presencia de esta subunidad en la médula adrenal.

Una posterior y definitiva confirmación se obtuvo al bloquear la banda específica por pretratamiento del anticuerpo a ensayar con el correspondiente fragmento peptídico utilizado en la inmunización de los animales. Este tratamiento produce la unión específica del antígeno

## Resultados

y el anticuerpo, lo que impedirá la unión de este último al receptor purificado. En la figura 12E se puede observar la ausencia de la banda característica correspondiente a la subunidad  $\alpha_1$  para los dos tipos de preparaciones de las membranas, tras la incubación con el péptido correspondiente.

Todos los resultados anteriormente expuestos demuestran de una forma concluyente la presencia de la subunidad  $\alpha_1$  en el receptor GABA<sub>A</sub> de la médula adrenal bovina.

Posteriormente se ensayó la existencia de otras subunidades utilizando los anticuerpos específicos indicados en Material y Métodos, en ambos tipos de membranas purificadas. Como se aprecia en la figura 13, en la médula adrenal se pudo observar la presencia de otras subunidades que conforman el receptor GABA<sub>A</sub>. Estas subunidades son:

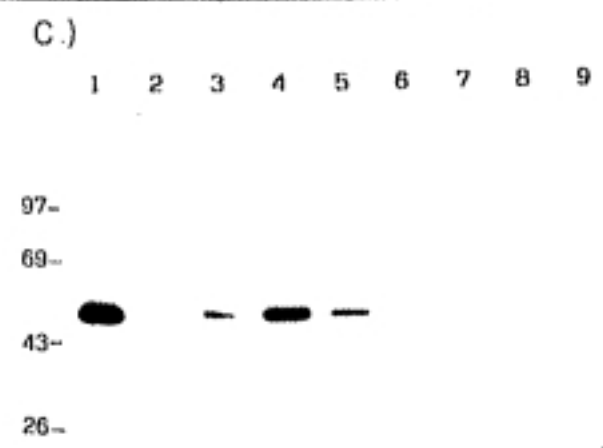
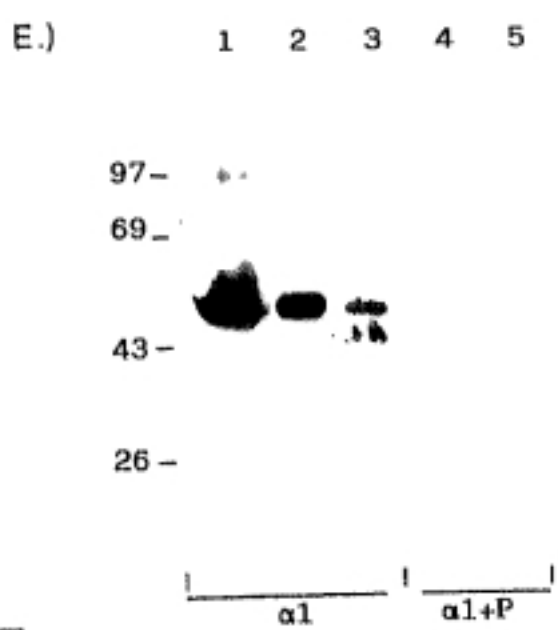
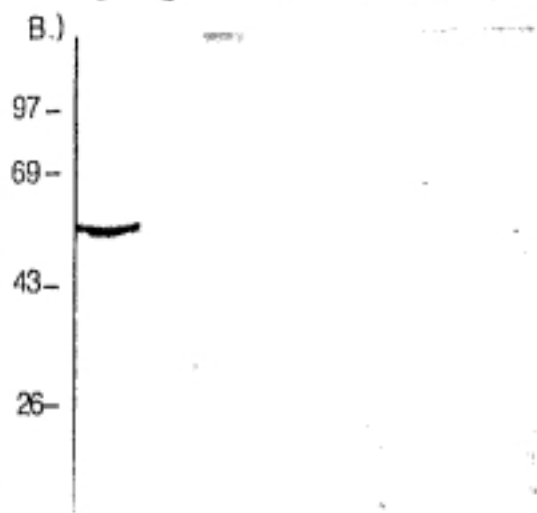
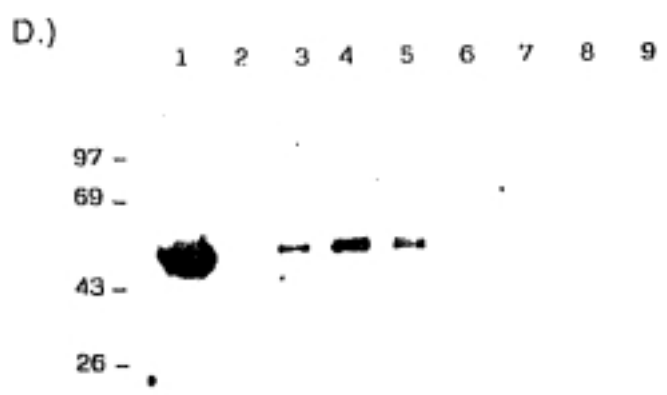
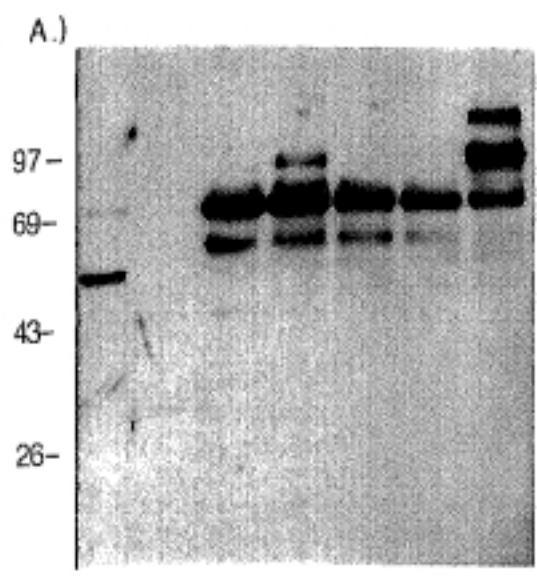
- La subunidad  $\alpha_4$ , detectada en ambos tipos de preparaciones de membranas (figura 13A),
- Las 3 subunidades  $\beta$ :  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  detectadas en membranas purificadas por la columna de BZ (figuras 13B y C). La presencia de la subunidad  $\beta_3$  se confirmó adicionalmente con el uso del péptido correspondiente (figura 13C),
- La subunidad  $\gamma_2$  se detectó en membranas purificadas por la columna de BZ (figura 13D).

Por el contrario, en la médula adrenal se demostró la ausencia de las siguientes subunidades:  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  y  $\alpha_6$  (figura 14A y B). En el caso de la detección de la subunidad  $\alpha_6$ , se utilizaron como control membranas de cerebelo, ya que es en esta estructura donde está únicamente presente esta subunidad.

Adicionalmente se ensayó la presencia de la subunidad  $\delta$  en ambos tipos de preparación de membranas, con su anticuerpo específico indicado en Material y Métodos. En este caso no se pudo demostrar ni la presencia ni la ausencia de dicha subunidad, ya que este anticuerpo fue obtenido muy recientemente y no se encuentra suficientemente caracterizado, lo cual no excluye la posible presencia de esta subunidad en la médula adrenal.

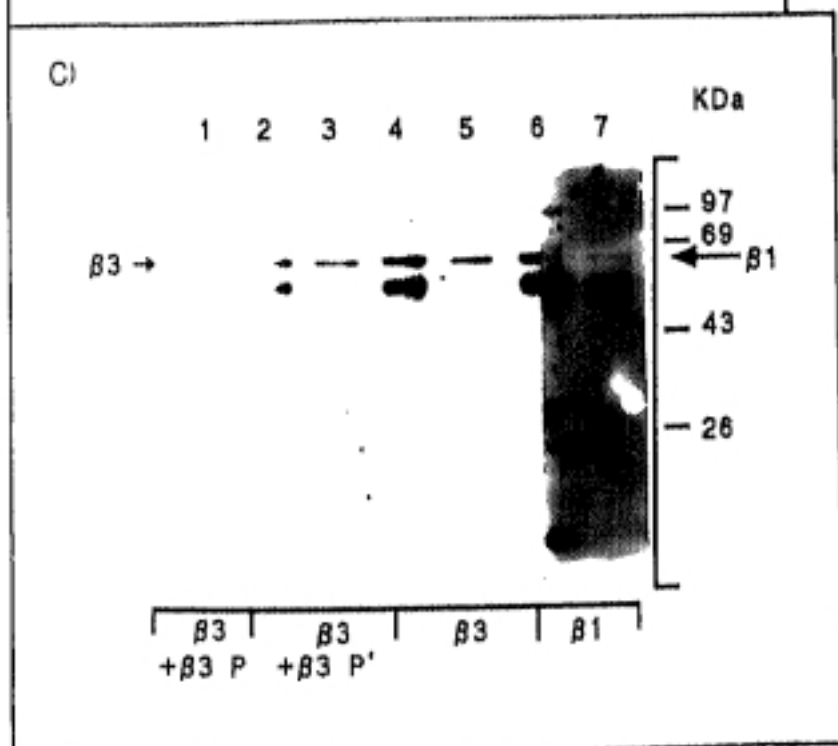
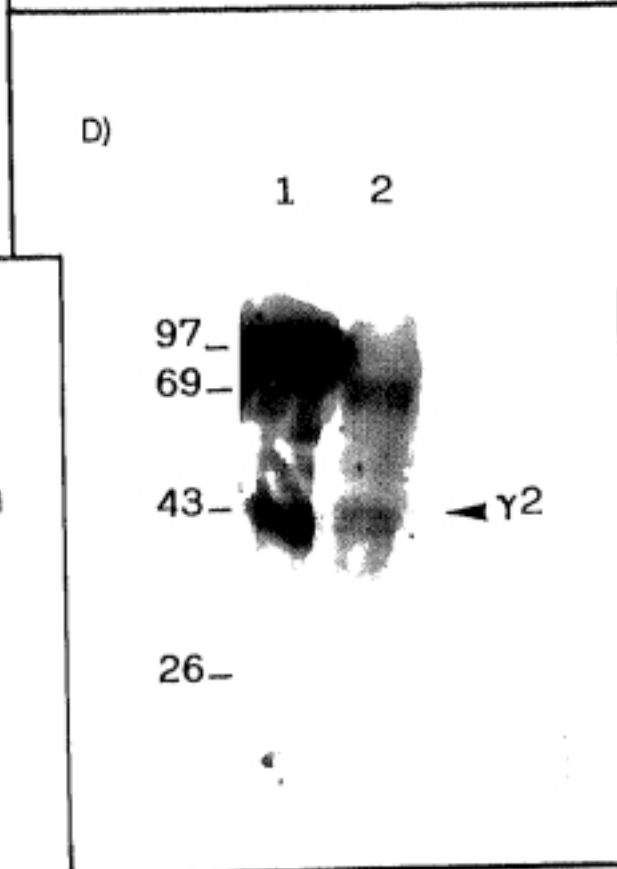
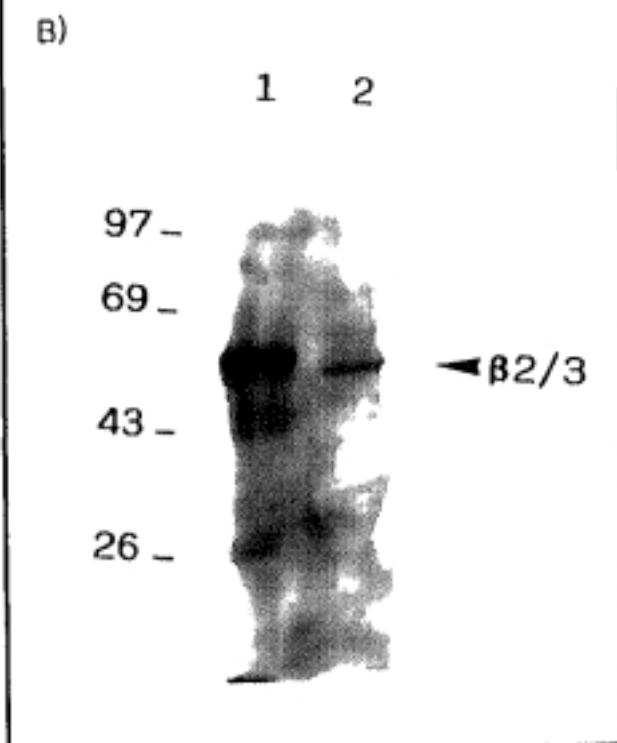
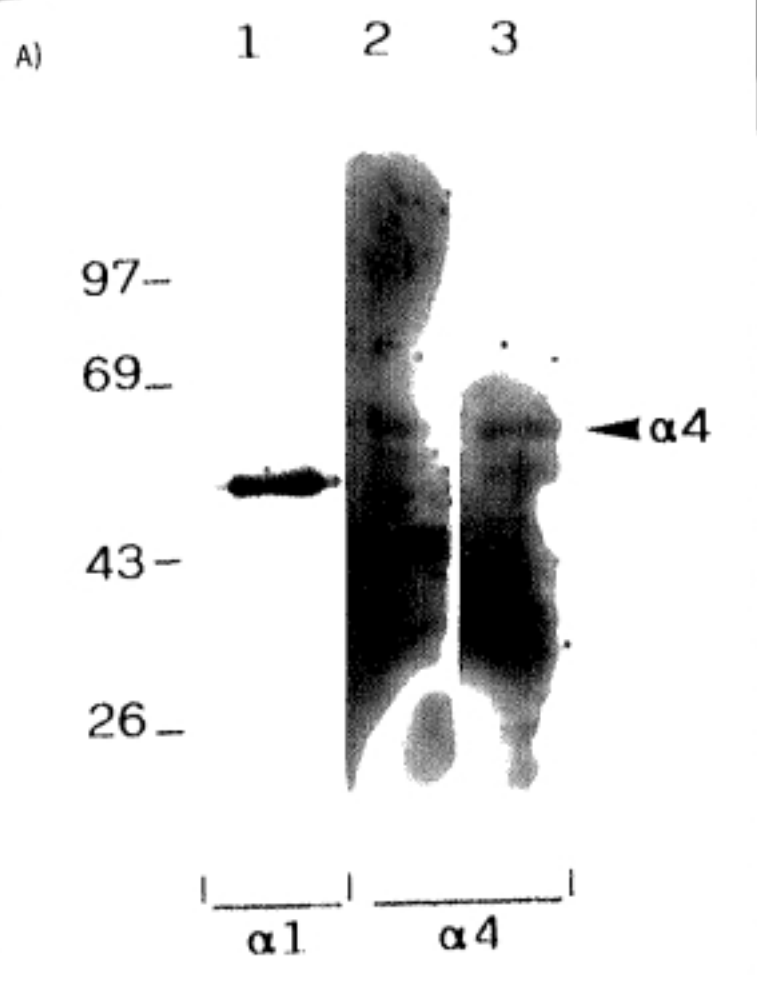


**Figura 12. Presencia de la subunidad  $\alpha_1$  en las membranas de la médula adrenal bovina.** La inmunodetección de la subunidad  $\alpha_1$  en la médula adrenal se realizó por técnicas de westernblotting o inmunotransferencia, usando el anticuerpo específico contra la subunidad  $\alpha_1$  413-429 ( $5 \mu\text{g/ml}$ ). (A) Las membranas crudas de médula adrenal obtenidas según se indica en Material y Métodos se colocaron en orden decreciente de cantidad de proteína. Los números 1 al 5 corresponden a 7.5, 6.5, 5, 3.5 y  $2 \mu\text{g}$  de proteína total, respectivamente. c, membranas de corteza cerebral bovina, usadas como control. b, tampón utilizado en la electroforesis, usado para comprobar que no hubiera señales inespecíficas. (B) Tras realizar la solubilización del receptor con desoxicolato sódico las membranas de la médula adrenal se pasaron a través de una columna que tenía la benzodiazepina Ro 7 1986/1. De la fracción 6 obtenida se tomaron alícuotas de 25, 50, 100, 150 y  $200 \mu\text{l}$  y se colocaron en los carriles 1 al 5, c corresponde al receptor BZ de corteza cerebral bovina purificado por el mismo procedimiento. b, es el tampón usado para comprobar que no hubiera señales inespecíficas. (C) Las distintas fracciones obtenidas según el procedimiento anterior se juntaron y se realizó una cromatografía de intercambio iónico. Se obtuvieron 8 fracciones de 1 ml, de las que se ensayaron alícuotas de  $50 \mu\text{l}$ . Los carriles 2 a 9 corresponden a 8 fracciones en orden de colección y 1 es el receptor BZ purificado de corteza cerebral bovina. (D) Las membranas tras la solubilización del receptor con desoxicolato se sometieron a una purificación a través de una columna de inmunoafinidad que tenía unido el anticuerpo específico contra la subunidad anti  $\alpha_1$ -413-429 del receptor GABA<sub>A</sub>. Se obtuvieron 8 fracciones de las cuales se ensayaron  $50 \mu\text{l}$  en los carriles 2 a 9. 1 es el receptor BZ de corteza cerebral bovina purificado por el mismo método. (E) Especificidad de la reacción inmune: las membranas purificadas como en el caso C (2) y como en el caso D (3) se sometieron al tratamiento con el anticuerpo contra la subunidad  $\alpha_1$  413-429 (2 y 3) o este anticuerpo y el péptido  $\alpha_1$  413-429 ( $1.25 \mu\text{g/ml}$ ) (4 y 5), que bloqueó la señal del anticuerpo. 1 es el receptor BZ purificado de corteza cerebral bovina. Para información adicional ver Material y Métodos. Los pesos moleculares (KDa) se observan en cada figura a la izquierda. Se presenta fotocopia láser de las correspondientes fotografías.





**Figura 13. Presencia de las subunidades  $\alpha_4$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  y  $\gamma_2$  en membranas purificadas de médula adrenal bovina.** (A) 1, receptor BZ purificado de corteza cerebral bovina. 2, receptor BZ de médula adrenal bovina purificado por cromatografía de afinidad de BZ seguida de cromatografía de intercambio iónico. 3, receptor de médula adrenal purificado por columna de inmunoafinidad  $\alpha_1$ . Los anticuerpos utilizados fueron anti- $\alpha_1$  413-429 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) (1) y anti- $\alpha_4$  7-10 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) (2 y 3). (B y D) 1, receptor BZ purificado de corteza cerebral bovina. 2, receptor BZ de médula adrenal purificado por cromatografía de afinidad de BZ seguida de cromatografía de intercambio iónico. El anticuerpo usado fue  $\beta_{23}$  monoclonal comercial (1,6  $\mu\text{g/ml}$ ) (1 y 2 de B) y  $\gamma_2$  1-15 cys (10  $\mu\text{g/ml}$ ) (1 y 2 de D). (C) 2, 4 y 6 membranas de corteza cerebral bovina purificadas por cromatografía de afinidad de BZ. 1, 3, 5 y 7 membranas de médula adrenal purificadas por columna de afinidad de BZ seguida de intercambio iónico. Observar que los carriles 2, 4 y 6 han sido cortados por la mitad y han sufrido dos tratamientos diferentes. Los anticuerpos usados fueron  $\beta_1$  1-14 cys (15  $\mu\text{g/ml}$ ) (6 y 7) y  $\beta_3$  379-393 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) (1-6). La especificidad de la reacción inmune para la subunidad  $\beta_3$  se puso de manifiesto mediante el uso del péptido  $\beta_3$  379-393 (100  $\mu\text{g/ml}$ , 1 y 2, ó 10  $\mu\text{g/ml}$ , 2 3 y 4). Los pesos moleculares (KDa) se observan en cada figura a la izquierda. Se presenta fotocopia láser de las correspondientes fotografías.



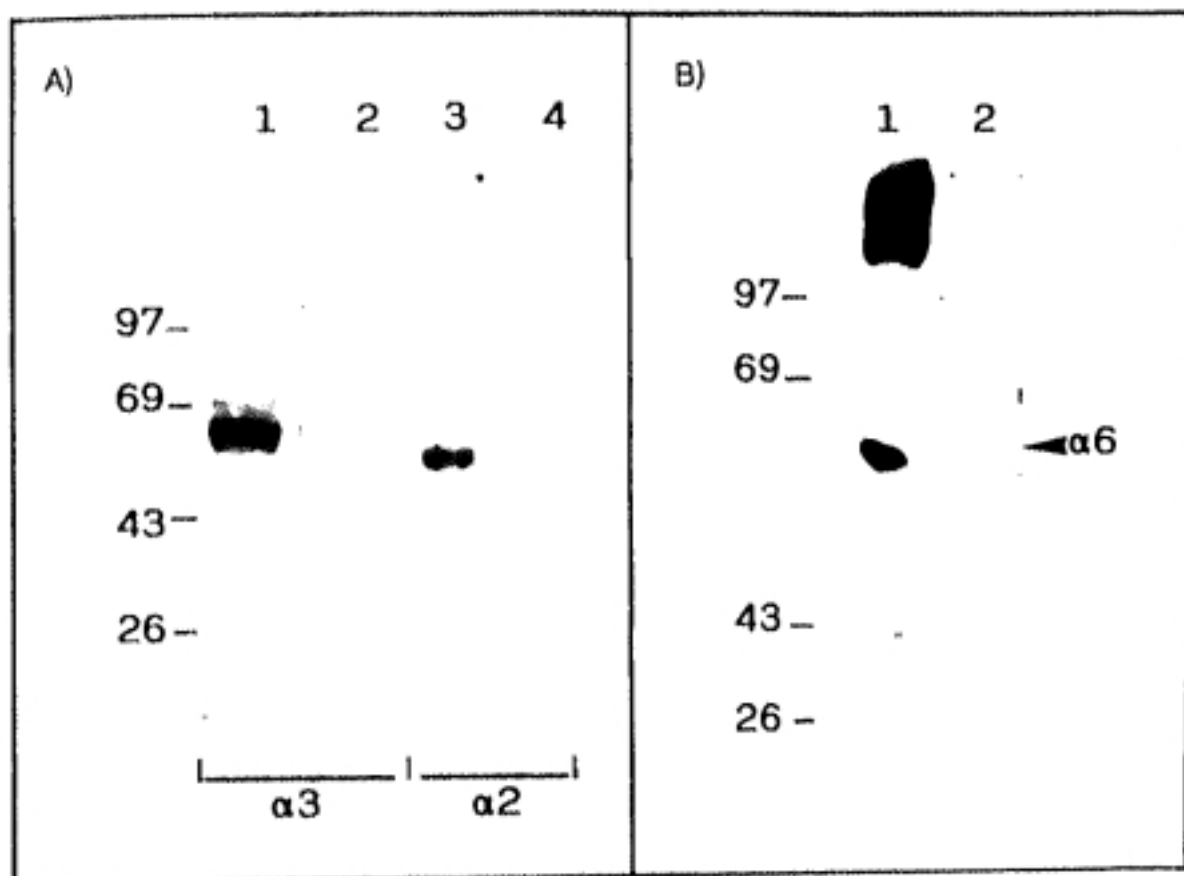


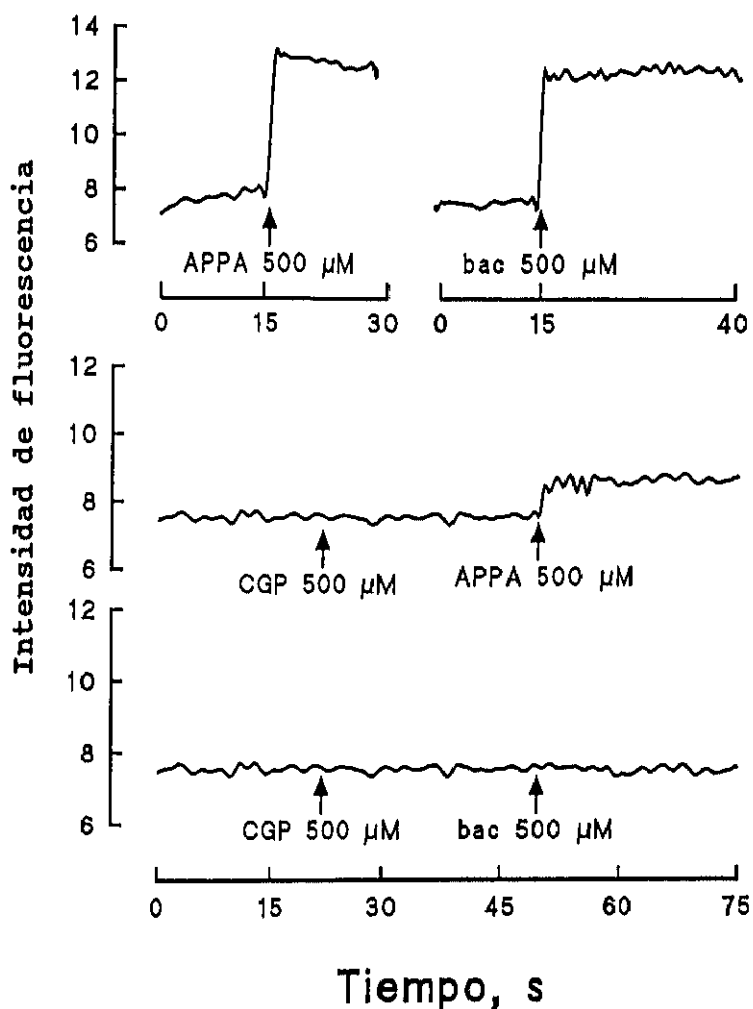
Figura 14. Ausencia de las subunidades  $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$  y  $\alpha_6$  en membranas purificadas de médula adrenal bovina. (A) 1 y 3 membranas de corteza cerebral bovina purificadas por cromatografía de afinidad de BZ. 2 y 4, membranas de médula adrenal bovina purificadas por columna de afinidad BZ seguida de intercambio iónico. Los anticuerpos usados fueron  $\alpha_3$  454-467 (2.5  $\mu\text{g/ml}$ ) (1 y 2) y  $\alpha_2$  414-424 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) (3 y 4). (B) 1, membranas crudas de cerebelo. 2, membranas de médula adrenal purificadas por cromatografía de afinidad de BZ seguidas de intercambio iónico. El anticuerpo ensayado fue  $\alpha_6$  1-15 cys (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Los pesos moleculares (KDa) se observan en cada figura a la izquierda. Se presenta fotocopia láser de las correspondientes fotografías.

## ***2. Receptores GABA<sub>B</sub>***

Como habíamos observado anteriormente y reflejado en nuestro trabajo de Tesina (M. Parramón , 1991), los receptores GABA<sub>B</sub> incrementan los niveles intracelulares de AMPc, y este parece ser el mensajero que modula su efecto sobre la secreción basal, estimulándola, y sobre la secreción mediada por los receptores nicotínico y GABA<sub>A</sub>, inhibiéndola (Oset-Gasque et al., 1993). Por ello a lo largo de todo nuestro estudio de esta Tesis Doctoral hemos efectuado en paralelo los experimentos con agonistas GABA<sub>B</sub> y con sustancias que incrementan los niveles de AMPc intracelulares, forskolina, por activación directa de la adenilato ciclasa, y pClpAMPc, un análogo permeable no hidrolizable del AMPc. Así, en los sucesivos apartados presentaremos ambos datos conjuntamente.

### ***2.1. Efectos de los agonistas GABA<sub>B</sub> sobre el potencial de membrana.***

Puesto que se había demostrado que la activación de los receptores GABA<sub>B</sub> por agonistas específicos producía un incremento de la secreción basal de CAs, era muy probable que ésta fuera debida a una despolarización de la membrana celular. Para examinar esta hipótesis utilizamos la sonda fluorescente bisoxonol, como se indica en Métodos, apartado 2.6., observando que a una dosis de 500  $\mu$ M ambos agonistas del receptor , APPA y baclofén, producían incrementos en la fluorescencia de dicha sonda, y, por consiguiente, del potencial de membrana. Los incrementos, medidos en unidades arbitrarias de fluorescencia, oscilaron entre 5 y 8 unidades en los diferentes experimentos. Este efecto despolarizante fue bloqueado por incubación previa con el antagonista CGP 35348 (figura 15), que inhibió entre un 80 y un 100 % el efecto. Usamos exclusivamente este antagonista por haber observado anteriormente que es el más efectivo en nuestras células (Oset-Gasque et al., 1993).



**Figura 15.** Los agonistas  $GABA_B$  incrementan el potencial de membrana. Ambos agonistas del receptor  $GABA_B$ , baclofen y APPA se añadieron a una suspensión de células que contenía bisoxonol  $2 \mu M$  y se registraron las variaciones de fluorescencia producidas según se indica en Material y Métodos. El incremento del potencial de membrana que ambos produjeron se bloqueó con el antagonista específico CGP 35 348 a las concentraciones y tiempos indicadas en la figura. El registro mostrado es representativo de al menos 10 experimentos realizados en diferentes lotes de células, con el mismo resultado.

## Resultados

Ya que habíamos demostrado que los agonistas GABA<sub>B</sub> inhibían la secreción inducida por nicotina y por muscimol de manera dependiente de la dosis, estos efectos debían ser paralelos a una disminución de la despolarización de la membrana inducida por estos agentes secretores. Por ello estudiamos el efecto que los agonistas GABA<sub>B</sub> podían tener sobre los incrementos en el potencial de membrana producidos por los agonistas nicotínicos y GABA<sub>A</sub>. El pretratamiento de las células con APPA y baclofén a una dosis 500  $\mu$ M bloqueó completamente la despolarización causada por nicotina 50  $\mu$ M (figura 16A) y disminuyó más de un 50 % la causada por muscimol 50  $\mu$ M (figura 16B).

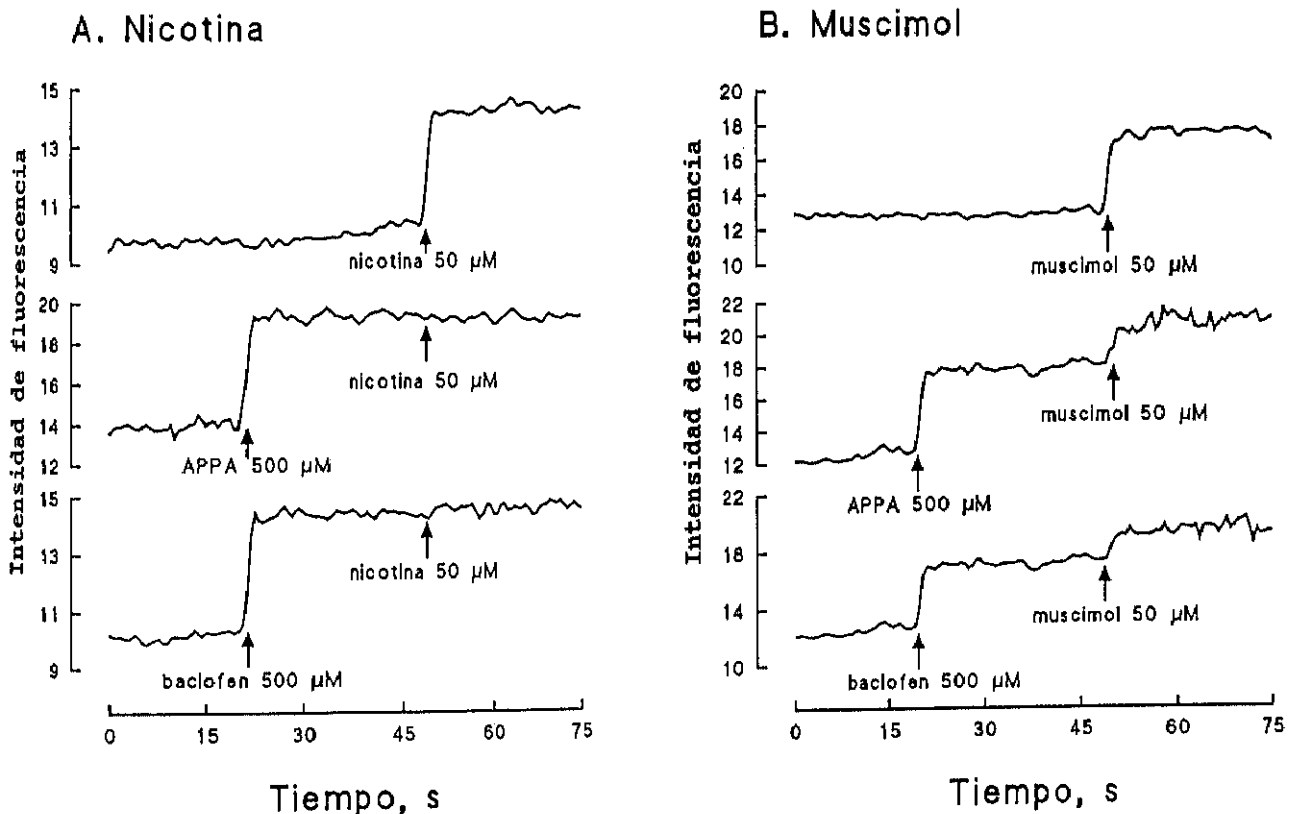
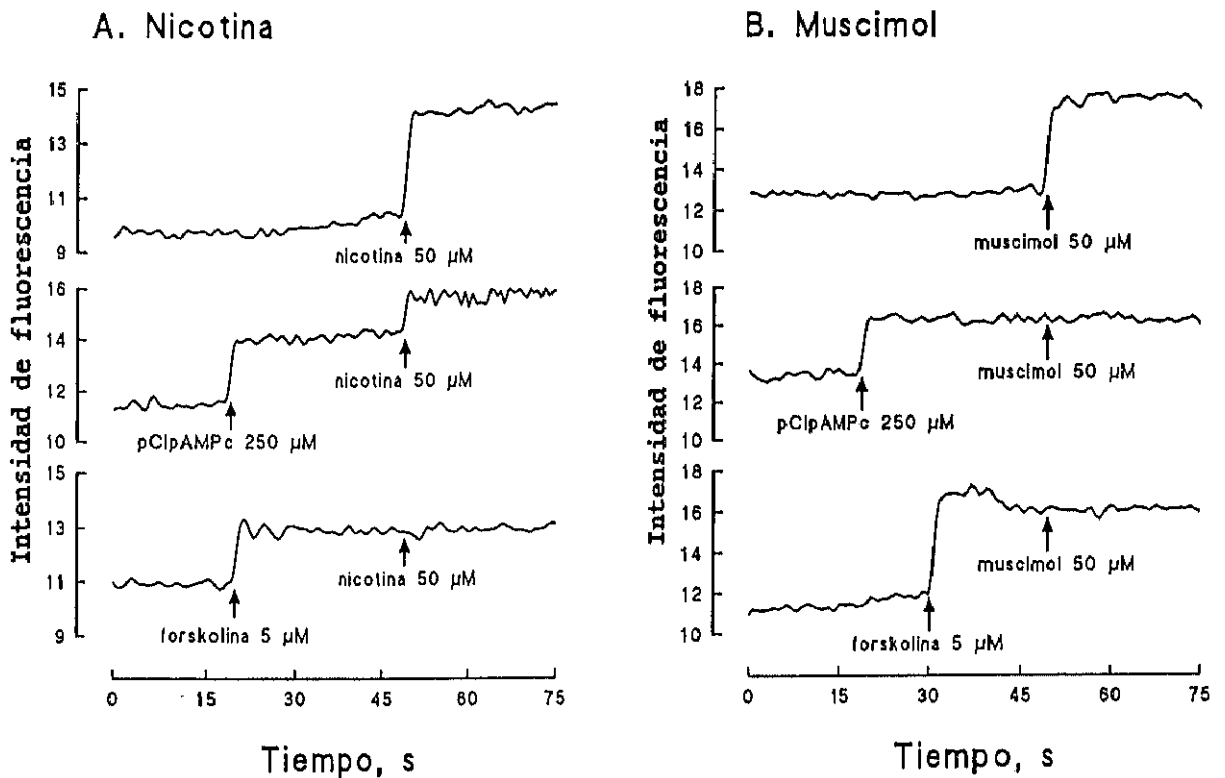


Figura 16. Los agonistas GABA<sub>B</sub> previenen el incremento del potencial de membrana inducido por los agonistas nicotínicos y de GABA<sub>A</sub>. El potencial de membrana se midió por tratamiento de las células con nicotina (A) o muscimol (B) en ausencia y en presencia de los agonistas GABA<sub>B</sub>, como se indica en Material y Métodos, a las concentraciones y tiempos indicadas en la figura. El registro es representativo de al menos 10 experimentos realizados en 3 lotes diferentes de células con el mismo resultado.

Para examinar si estos efectos sobre el potencial de membrana podían ser debidos a la estimulación de la producción de AMPc por los agonistas GABA<sub>B</sub> se realizaron experimentos paralelos con pClpAMPc 250  $\mu$ M o forskolina 5  $\mu$ M sobre el efecto de la nicotina y el muscimol. Se observó que la forskolina y el pClpAMPc, al igual que los agonistas GABA<sub>B</sub> producían una despolarización de las células. La despolarización causada por nicotina 50  $\mu$ M fue totalmente bloqueada mediante el tratamiento con forskolina 5  $\mu$ M y se inhibió un 70 % por pClpAMPc 250  $\mu$ M (figura 17A). De igual forma, la despolarización previa de las células con pClpAMPc o forskolina bloqueó totalmente la despolarización inducida por muscimol (figura 17B). Presentamos en estas figuras un registro representativo de un resultado intermedio obtenido en los diversos experimentos realizados, aunque hay que puntualizar que despolarizaciones iniciales mayores produjeron un efecto inhibitorio mayor sobre la despolarización inducida por la segunda sustancia ensayada (nicotina o muscimol).



**Figura 17. Efecto de agentes que elevan el AMPc sobre el incremento del potencial de membrana producido por los agonistas nicotínicos y de GABA<sub>B</sub>.** El potencial de membrana se midió por tratamiento de las células con nicotina (A) y muscimol (B), en ausencia o presencia de sustancias que incrementan los niveles intracelulares de AMPc, a las concentraciones indicadas en la figura, según se indica en Material y Métodos. se muestra un registro representativo de al menos 10 experimentos realizados en 3 lotes diferentes de células, con el mismo resultado.

## ***2.2. Efectos de agonistas GABA<sub>B</sub> sobre el Ca<sup>2+</sup> intracelular***

Una vez confirmado que el efecto de la activación de los receptores GABA<sub>B</sub> sobre la secreción de CAs se acompañaba de cambios paralelos en el potencial de membrana, quisimos profundizar en los mecanismos moleculares a través de los cuales los receptores GABA<sub>B</sub> ejercen dicha función. Puesto que la exocitosis de CAs es un proceso fundamentalmente dependiente de Ca<sup>2+</sup>, estudiamos, en primer lugar, el papel de este mensajero intracelular en la mediación de la acción de dichos receptores sobre la secreción de CAs.

### ***2.2.1. Curva dosis-respuesta***

Los agonistas GABA<sub>B</sub> incrementaron los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelulares de manera dependiente de la dosis. Las EC<sub>50</sub> para este efecto fueron de 25±6 μM para el APPA y 60±10 μM para el baclofén. El efecto máximo se alcanzó entre 200 y 500 μM de ambos agonistas y fue de 250 ±40 y de 225±30 nM para el APPA y el baclofen (media±S.E.M.), respectivamente (figura 18).

De forma análoga, las sustancias usadas para incrementar los niveles intracelulares de AMPc, forskolina y pClpAMPc también produjeron un incremento dependiente de la dosis en los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelulares. La forskolina produjo un efecto máximo a concentraciones entre 5 y 10 μM (210±26 nM, media±S.E.M.), con una EC<sub>50</sub> de 0.7±0.2 μM. El pClpAMPc produjo un efecto máximo a concentraciones entre 250 y 500 μM (229±38 nM, media±S.E.M.), con una EC<sub>50</sub> de 24±2 μM (figura 19).

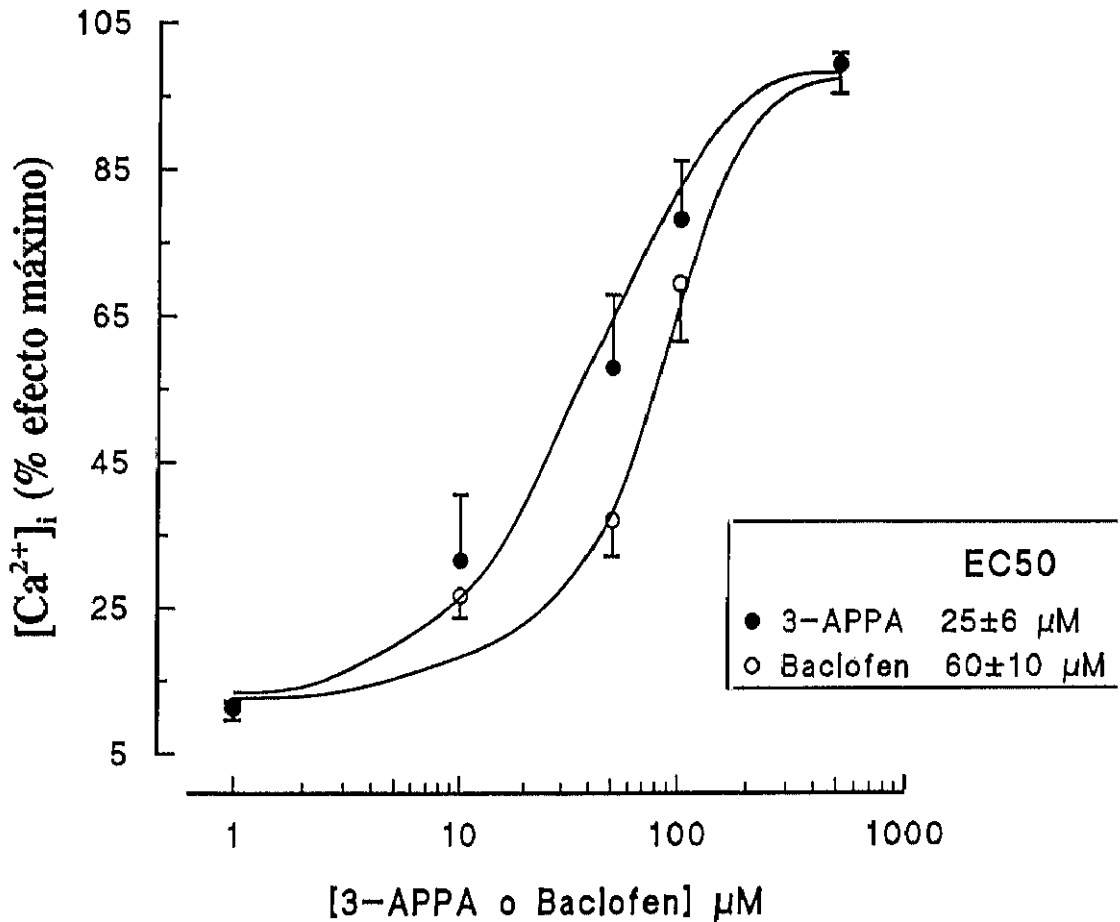


Figura 18. Curvas dosis-respuesta de la elevación de calcio intracelular producida por estimulación de los receptores GABA<sub>B</sub>. Las células fueron precargadas con fura 2 AM 5 µM, centrifugadas y lavadas como se indica en Material y Métodos. En las cubetas del espectrofluorímetro se pusieron 10<sup>6</sup> células y se estimularon con las diferentes concentraciones de agonistas GABA<sub>B</sub> indicadas. Las concentraciones de calcio se calcularon mediante la fórmula indicada en Material y Métodos. Los puntos representan los porcentajes (media ± S.E.M, n=12) de incrementos de calcio, tomando como 100 % la elevación máxima de calcio, 250 ± 40 nM y 225 ± 30 nM para APPA y baclofén, respectivamente, una vez restado el basal (175 ± 25 nM). Las EC<sub>50</sub> se calcularon mediante el programa estadístico indicado en Material y Métodos.

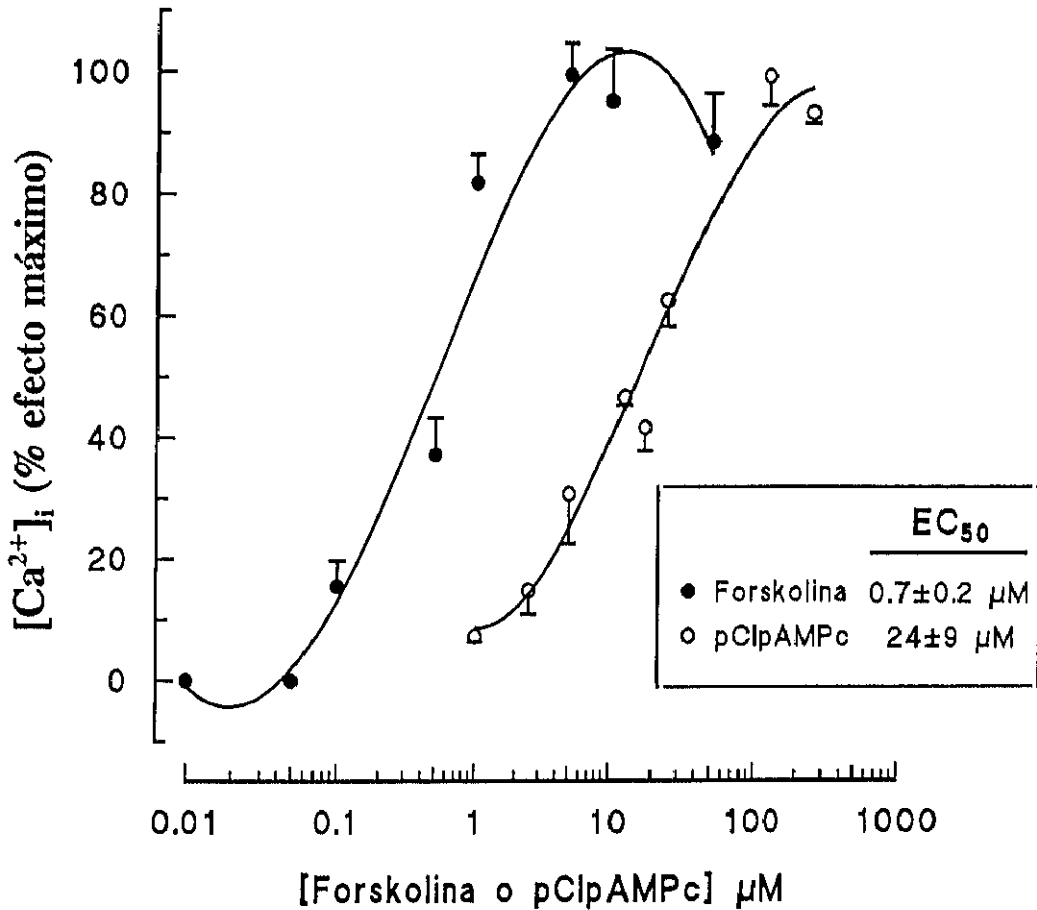


Figura 19. Curvas dosis-respuesta de la elevación de calcio intracelular producida por AMPc. Las células fueron precargadas con fura 2 AM 5 μM, centrifugadas y lavadas como se indica en Material y Métodos. En las cubetas del espectrofluorímetro se pusieron 10<sup>6</sup> células y se estimularon con las diferentes concentraciones de pClpAMPc y forskolina indicadas. Las concentraciones de calcio se obtuvieron con la fórmula indicada en Material y Métodos. Los puntos representan los porcentajes (media ± S.E.M, n=12) de incrementos de calcio, tomando como 100 % la elevación máxima de calcio, 201 ± 26 nM y 229 ± 38 nM con forskolina y pClpAMPc, respectivamente, una vez restado el basal (175 ± 25 nM).

### 2.2.2. Origen del $\text{Ca}^{2+}$ movilizado por los agonistas $\text{GABA}_B$

Puesto que los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares se pueden elevar bien como consecuencia de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de sus distintos canales (A) o de la salida del mismo de los depósitos intracelulares (B), quisimos estudiar en profundidad la contribución de cada uno de estos mecanismos al incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico tras la activación de los receptores  $\text{GABA}_B$ . Para ello, estudiamos el efecto de la ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular sobre el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico inducido por agonistas  $\text{GABA}_B$  en comparación con el inducido en presencia de 2.5 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. La reducción de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular se realizó por dos métodos: (1) mediante la quelación del mismo con EGTA o (2) la disminución del mismo a una concentración equimolar con la concentración intracelular (200 nM) utilizando para ello una mezcla adecuada EGTA/ $\text{CaCl}_2$ , como se indica en Métodos (apartado III.2.6.). En ambos casos hubo una drástica disminución en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares producidos por ambos agonistas (figura 20). El efecto fue aproximadamente 1/3 del obtenido con  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular normal (2.5 mM). Estos resultados indicaban que además de una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular mayoritaria a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, podría haber también una salida del mismo de los depósitos intracelulares. Estudiamos a continuación con detalle ambos procesos.

#### 2.2.2.1. Entrada de $\text{Ca}^{2+}$ del medio extracelular

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  del medio extracelular se realiza en su mayor parte a través de canales específicos dependientes de voltaje que se abren en respuesta a una despolarización (ver apartado I.2.2.1.). Bloqueando la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de sus canales tipo L con la dihidropiridina nifedipina 50  $\mu\text{M}$ , se consiguió una inhibición del incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (de entre un 60 y un 70 %), semejante a la obtenida mediante tratamiento con EGTA o mediante la disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a 200 nM (60-80 % de inhibición) (figura 20). Estos resultados indican que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a la activación del receptor  $\text{GABA}_B$  se realiza a través de un canal tipo L. El efecto inhibitorio de la nifedipina

## Resultados

50  $\mu\text{M}$  (60-70 %) también fue observado en el caso de la estimulación de las células con pClpAMPc 125  $\mu\text{M}$  (figura 21A) o forskolina 5  $\mu\text{M}$  (figura 21B), efecto muy semejante al obtenido por pretratamiento con EGTA (figura 21 A y B).

Para comprobar si había otro canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , además del L, implicado en estos efectos, usamos  $\omega$ -conotoxina, que bloquea los canales tipo N. Esta sustancia no produjo efecto ninguno sobre la elevación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducido por APPA o baclofén 500  $\mu\text{M}$  (figura 20), lo que indicaba que los canales tipo N no estaban implicados en el mecanismo de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  producido por activación de los receptores  $\text{GABA}_B$ .

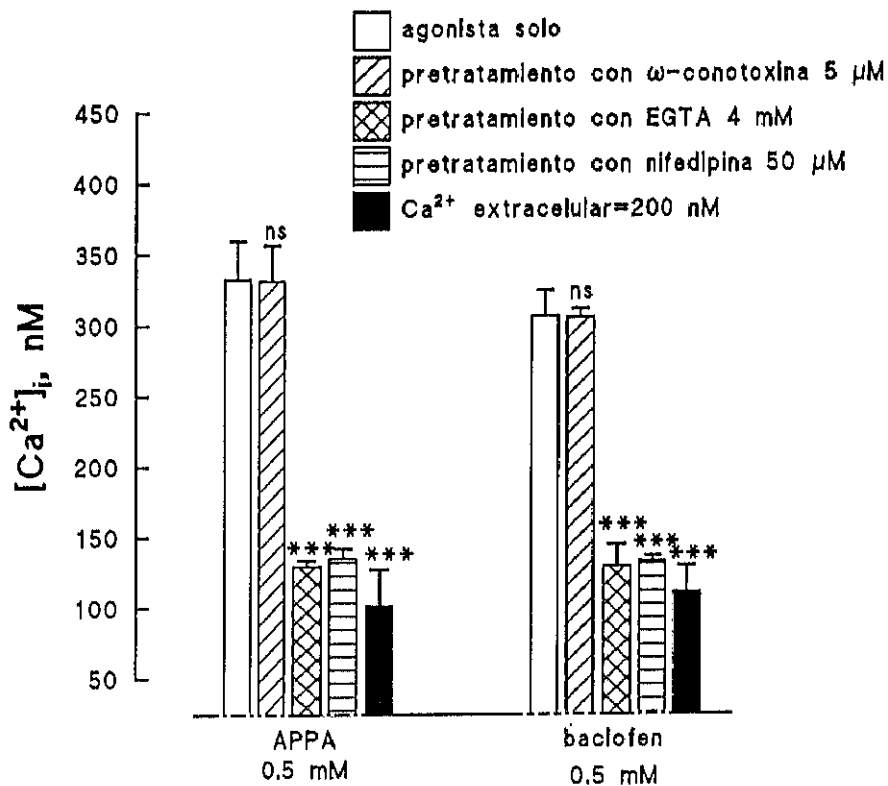


Figura 20. Origen celular del incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  producido por los agonistas  $\text{GABA}_B$ . Los agonistas  $\text{GABA}_B$  se añadieron a las células en suspensión con calcio normal sin pretratamiento ( $\square$ ) o tras pretratamiento con un quelante de calcio (EGTA 4 mM) ( $\otimes$ ), un bloqueante de canales de calcio tipo L (nifedipina 50  $\mu\text{M}$ ) ( $\equiv$ ) o un bloqueante de canales tipo N ( $\omega$ -conotoxina 5  $\mu\text{M}$ ) ( $\text{Z}$ ). También se añadieron a las células en un medio bajo en calcio, 200 nM ( $\blacksquare$ ). En la figura se indican los incrementos de calcio intracelular, medidos con la sonda fluorescente fura 2 AM, conseguidos en cada condición una vez restado el calcio basal ( $179 \pm 23$ ). Los datos son las medias  $\pm$  S.E.M. de 9 experimentos realizados en 3 lotes distintos de células. Las significaciones estadísticas se refieren al efecto del agonista sin pretratamiento ( $\square$ ). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

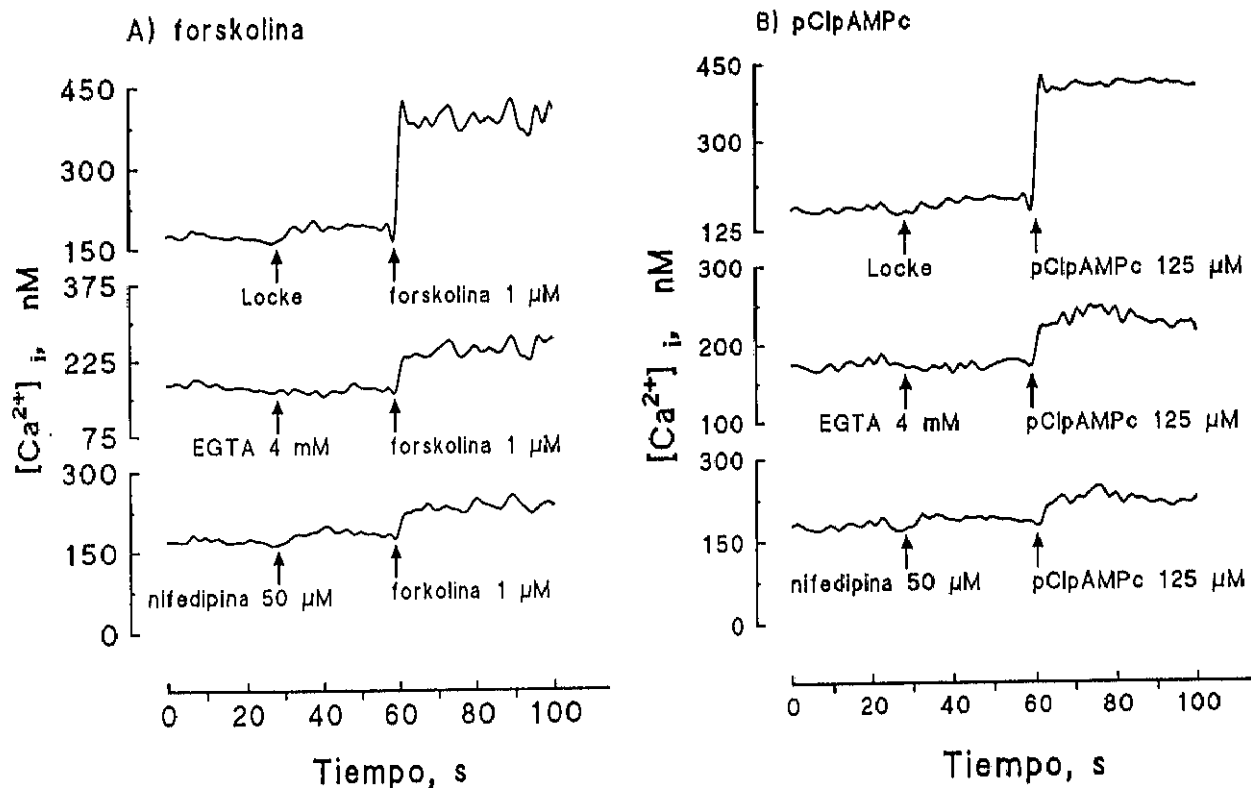


Figura 21. Origen intracelular de la elevación de  $Ca^{2+}$  citosólica producida por AMPc. Se midieron los niveles de calcio con la sonda fluorescente fura 2 AM producidos por (A) forskolina 1  $\mu$ M y (B) pClpAMPc 125  $\mu$ M. La gráfica es un registro representativo de al menos 10 experimentos de 5 lotes diferentes de células. Las sustancias fueron añadidas a los tiempos indicados por las flechas.

#### 2.2.2.2. Salida de $Ca^{2+}$ de los depósitos intracelulares

En las células cromafines existen dos grandes reservorios intracelulares de  $Ca^{2+}$ , denominados sensibles a  $IP_3$  e insensibles al mismo y sensibles a cafeína (CICR) (Burgoyne et al., 1989). Para conocer de cual de los dos depósitos intracelulares procedía el  $Ca^{2+}$  intracelular producido por activación de los receptores  $GABA_B$ , realizamos una serie de experimentos, suspendiendo las células en un medio bajo en  $Ca^{2+}$  (200 nM). En estas

## *Resultados*

condiciones, la estimulación de las células cromafines en suspensión con agonistas GABA<sub>B</sub> produjo una elevación de Ca<sup>2+</sup> de 104±13 y 110±9 nM para el APPA y el baclofén, respectivamente (figura 22A). Con angiotensina II, sustancia que produce una salida de Ca<sup>2+</sup> del compartimento del retículo endoplásmico, a una concentración de 2 μM, se obtuvo un incremento de Ca<sup>2+</sup> de 226±48 nM (figura 22B). Tras la estimulación con angiotensina II, los agonistas GABA<sub>B</sub> no incrementaron adicionalmente el Ca<sup>2+</sup> intracelular (figura 22B). La cafeína 4 mM, que estimula el compartimento insensible a IP<sub>3</sub> produjo un incremento de Ca<sup>2+</sup> de 362±30 nM (figura 22C). Tras el tratamiento con esta sustancia los agonistas GABA<sub>B</sub> si produjeron un incremento adicional de los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular (APPA=80±10 nM y baclofén 84±7 nM) (figura 22C). Este incremento fue un 15-20 % menor que el producido por el agonista sólo (figura 22A). Lo mismo sucedía si las células eran pretratadas con cafeína y luego tratadas con angiotensina II (187±80 nM, que supone un 15-25 % de reducción) (figura 22D). Sin embargo, la estimulación de las células con cafeína seguida por angiotensina II bloqueó completamente la respuesta de los agonistas GABA<sub>B</sub> (figura 22D). Todos estos resultados indican que los receptores GABA<sub>B</sub>, además de producir la entrada de Ca<sup>2+</sup> del medio extracelular, estimulan la liberación de Ca<sup>2+</sup> del compartimento intracelular sensible a IP<sub>3</sub>.

### *2.2.3. Producción de IP<sub>3</sub> por los agonistas GABA<sub>B</sub>*

La estimulación de las células cromafines durante 10 min con agonistas GABA<sub>B</sub> produjo un incremento dependiente de la dosis de los niveles de IP<sub>3</sub> (figura 23). El efecto máximo se consiguió a una concentración de 100 μM de ambos agonistas, siendo de aproximadamente 3 veces los niveles basales (7.3±0.3 pmol/10<sup>6</sup> cel).

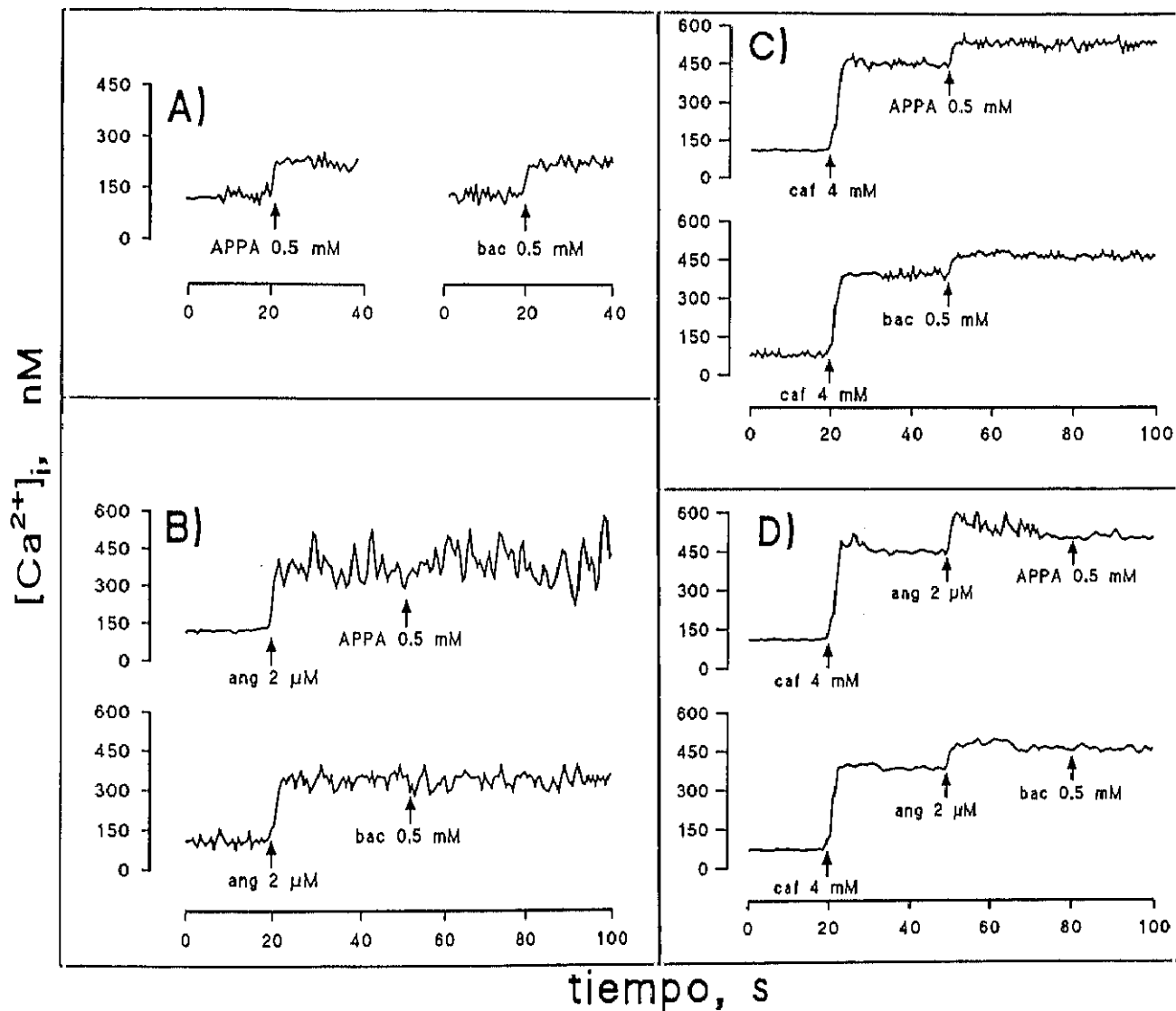


Figura 22. Movilización de  $Ca^{2+}$  de los depósitos intracelulares por los agonistas  $GABA_B$ . Las células se estimularon en un medio bajo en calcio con los agonistas  $GABA_B$  sólo (A) o previo tratamiento con angiotensina II (B), cafeína (C) o la mezcla de ambos (D) a las concentraciones y tiempos indicadas por las flechas. Las gráficas son representativas de 10 experimentos realizados en 4-5 lotes diferentes de células. bac, baclofen; ang, angiotensina II; caf, cafeína.

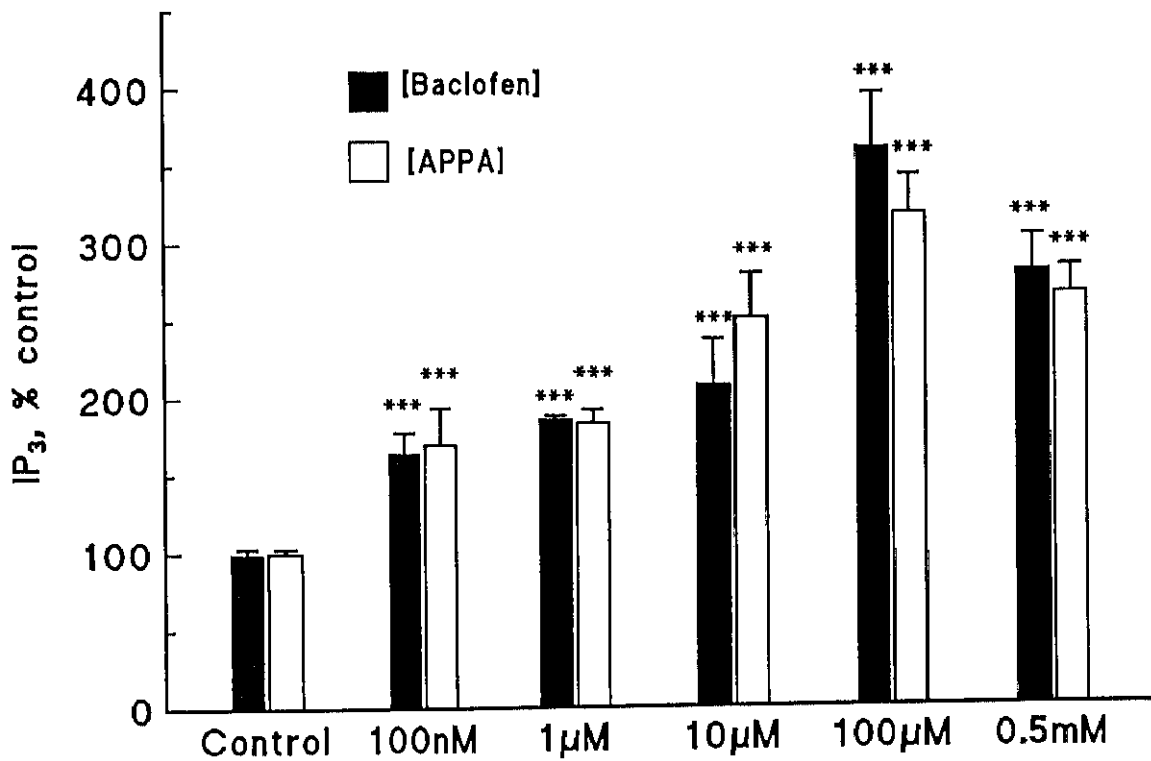


Figura 23. Efecto de los agonistas GABA<sub>B</sub> sobre los niveles intracelulares de IP<sub>3</sub>. Las células se incubaron durante 10 min con APPA o baclofén 0.5 mM y se midieron los niveles de IP<sub>3</sub> como se indica en Material y Métodos. Los resultados se expresan como porcentajes respecto al control ( $7.3 \pm 0.3$  pmol/ $10^6$  cel) y representan la media de 8 experimentos realizados en duplicado. Las comparaciones estadísticas se refieren al control. \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

## 2.2.4. Influencia del $\text{Ca}^{2+}$ en las respuestas mediadas por activación del receptor $\text{GABA}_B$

### 2.2.4.1. Sobre la secreción de CAs

El  $\text{Ca}^{2+}$  es primordial en los mecanismos que disparan y posibilitan la exocitosis. Por ello estudiamos la influencia de este catión en la secreción mediada por activación de los receptores  $\text{GABA}_B$ . Las células fueron estimuladas paralelamente con los agonistas en un medio con  $\text{Ca}^{2+}$  normal o en un medio sin  $\text{Ca}^{2+}$ , pero con  $\text{Mg}^{2+}$  para suplir los requerimientos en iones divalentes. En un tiempo de incubación de 10 min la estimulación por los agonistas produjo una inhibición de más de un 70 % de la secreción de CAs inducida por los mismos agonistas en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 24A). El efecto secretor en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  no fue estadísticamente significativo sobre el control. El mismo resultado se obtuvo midiendo la secreción estimulada por los agonistas en tiempo real, según el apartado III.2.2. En este caso ni el APPA ni el baclofén produjeron picos de secreción en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y en las mismas condiciones, la secreción fue la esperada (figura 25).

El efecto inhibitor de la secreción de CAs producido por ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular fue también observado en el caso de la estimulación de las células con adenosina y pClpAMPC. Por el contrario, la forskolina y altas concentraciones de adenosina tuvieron un efecto estimulante significativo de la secreción de CAs en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, aunque menor que el producido en presencia del mismo (figura 24B).

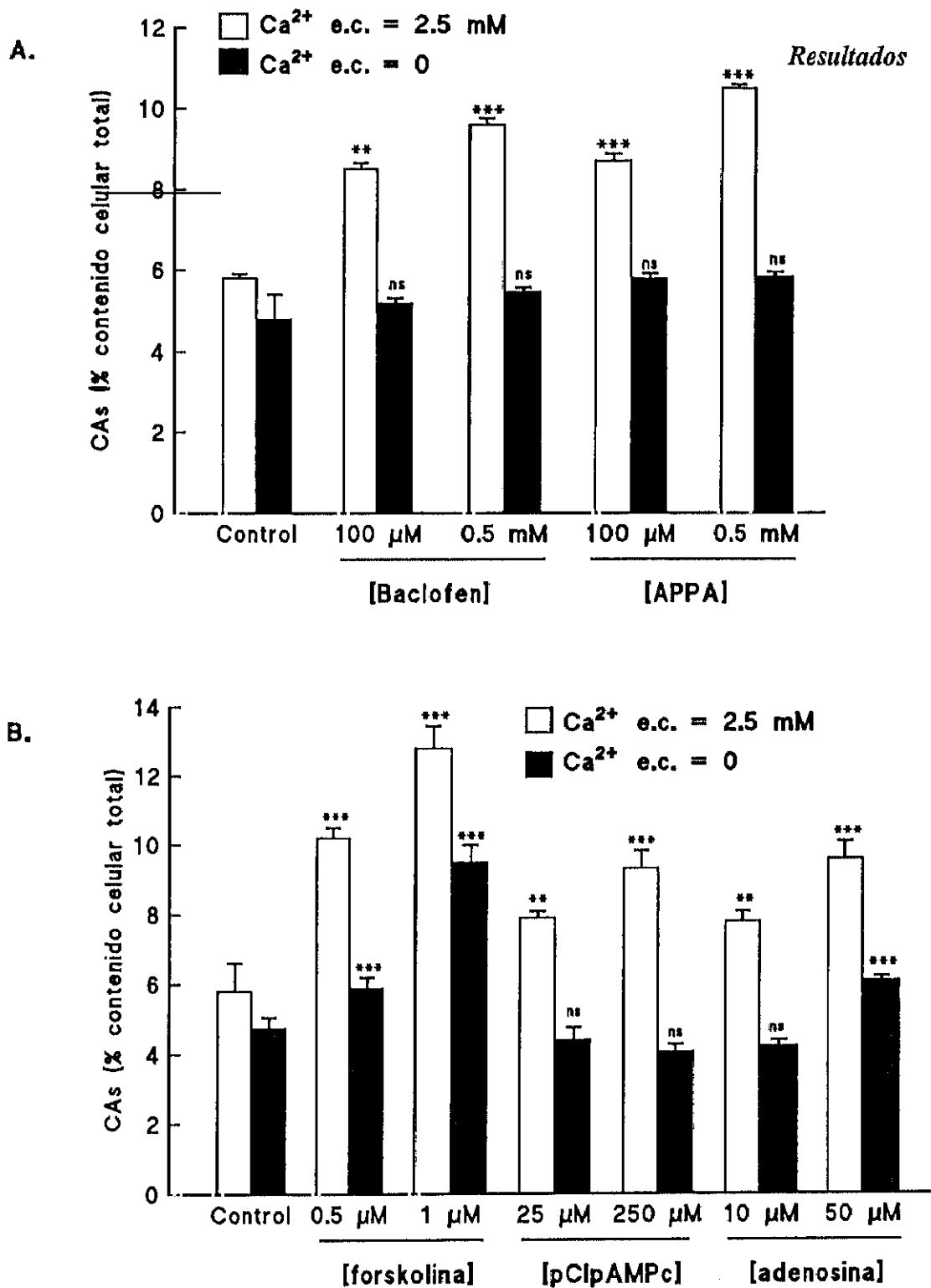


Figura 24. Efecto de agonistas GABA<sub>B</sub> y AMPc sobre la secreción de CAs en presencia y ausencia de calcio extracelular. Las células se incubaron durante 10 minutos con los agonistas GABA<sub>B</sub> (A) y diferentes sustancias que incrementan los niveles de AMPc intracelulares (B), en presencia (□) o en ausencia (■) de calcio extracelular. Los valores se presentan como porcentajes de secreción respecto al contenido de CAs totales de la célula y son la media ± S.E.M. de 3 experimentos realizados cada uno en duplicado. La estadística se refiere a los controles correspondientes, con o sin Ca<sup>2+</sup> extracelular (5.8 ± 0.7 % y 4.8 ± 0.5 %, respectivamente). ns, no significativo; \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001.

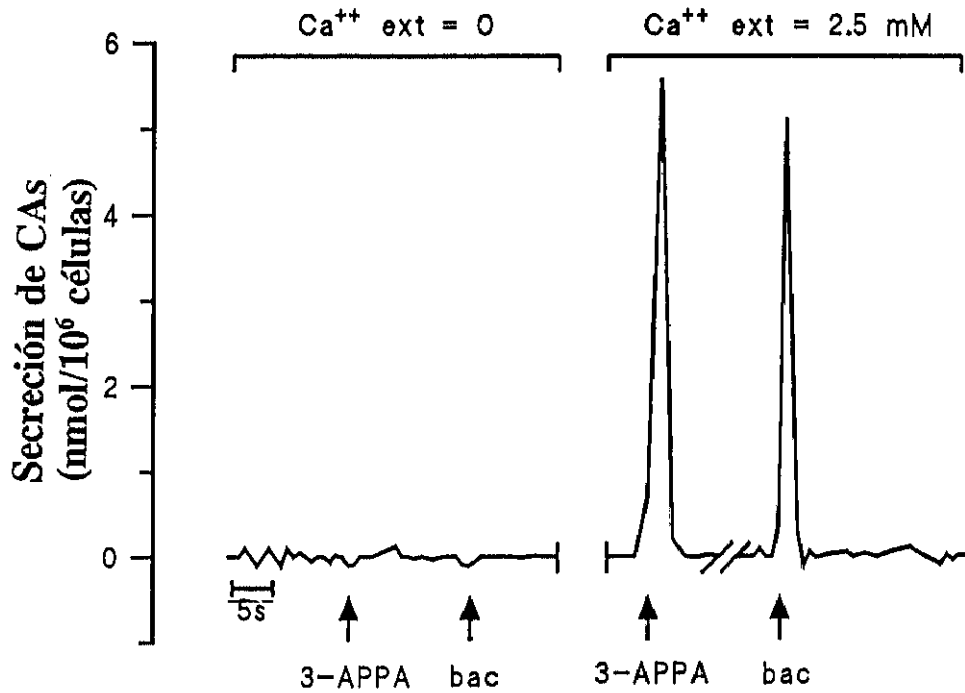


Figura 25. Efecto de los agonistas GABA<sub>B</sub> sobre la secreción de CAs medida en tiempo real. Las células adecuadamente dispuestas en un filtro como se especifica en Material y Métodos, fueron continuamente perfundidas con medio Locke con calcio normal (2.5 mM) o sin calcio y se estimularon con los agonistas a las concentraciones indicadas en la gráfica. La secreción se expresa en nmol/10<sup>6</sup> células, valor obtenido por extrapolación de los datos registrados en el detector electroquímico en una curva patrón de noradrenalina comercial. El registro es representativo de 6 experimentos realizados en 3 lotes diferentes de células.

#### *2.2.4.2. Sobre la formación de AMPc*

La incubación de las células cromafines durante 10 min en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular con agonistas  $\text{GABA}_B$  produjo unos niveles de AMPc aproximadamente un 70 % inferiores a los obtenidos en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 26A), aunque en este caso, a diferencia de la secreción, el efecto fue estadísticamente significativo sobre el control. La ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular también disminuyó los niveles de AMPc inducidos por adenosina, en tanto que la forskolina produjo mayores niveles de AMPc en ausencia de este catión (figura 26B).

#### *2.2.5. Efectos de los agonistas $\text{GABA}_B$ sobre el $\text{Ca}^{2+}$ inducido por activación de otros receptores*

El pretratamiento de las células con agonistas  $\text{GABA}_B$  produjo una inhibición prácticamente del 100 % de la elevación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular producida por estimulación de las células con nicotina 50  $\mu\text{M}$  (figura 27A) y también de la obtenida por estimulación con muscimol 200  $\mu\text{M}$  (figura 27B). Estos resultados concuerdan con el hecho de que el mismo pretratamiento bloquea la respuesta de ambos receptores sobre el potencial de membrana (figura 16).

El AMPc también produjo una disminución significativa de estas respuestas (figura 28), que también concuerda con efectos paralelos sobre el potencial de membrana (figura 17) y sobre la secreción de CAs (Parramón et al., 1994d).

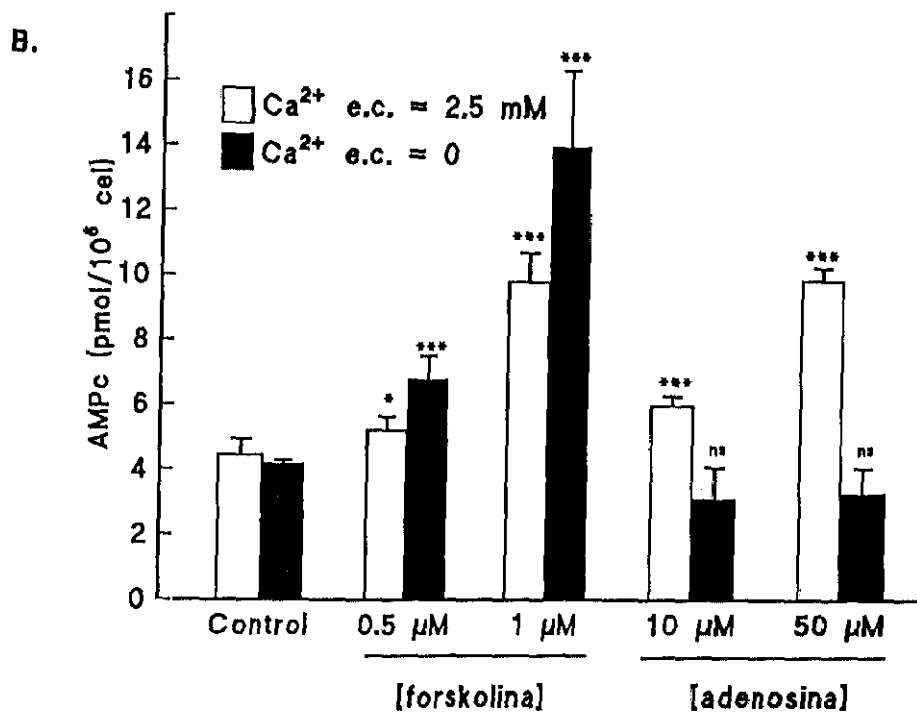
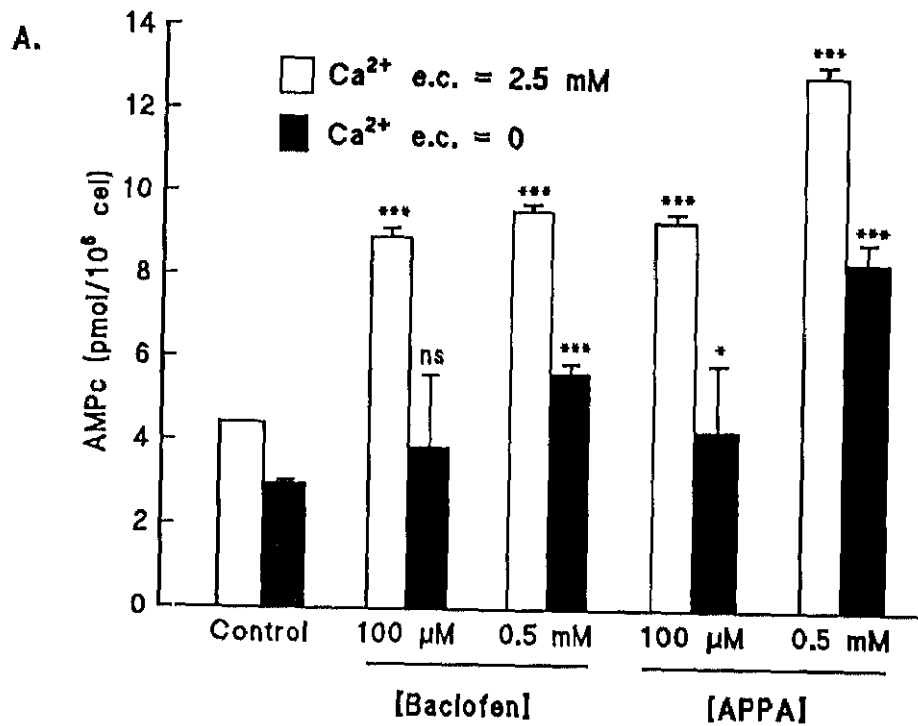
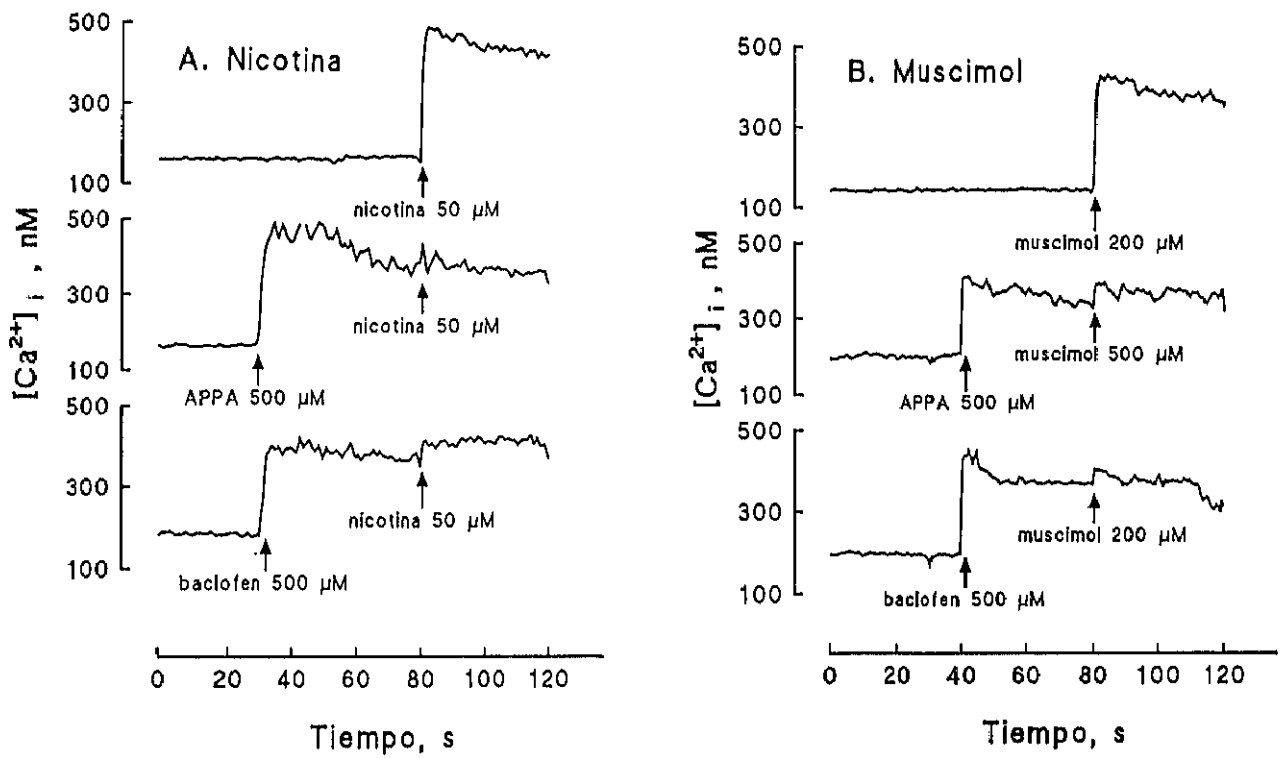
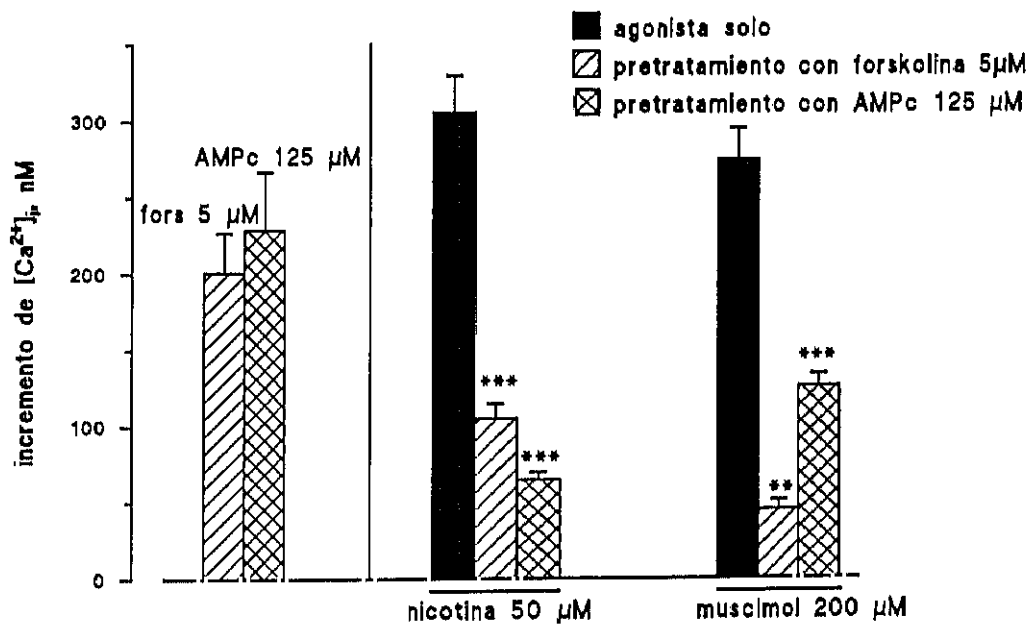


Figura 26. Efecto de agonistas GABA<sub>B</sub> y sustancias que elevan el AMPc sobre los niveles intracelulares de este mensajero, en presencia y ausencia de calcio extracelular. Las células se incubaron durante 10 minutos con los agonistas GABA<sub>B</sub> (A) y diferentes sustancias que incrementan los niveles de AMPc intracelulares (B), en presencia (□) o en ausencia (■) de calcio extracelular. Los resultados se presentan en pmol/10<sup>6</sup> cel y se representan las medias ± S.E.M. de 3 experimentos realizados cada uno en duplicado. Las comparaciones estadísticas se refieren al valor control (4.46 ± 0.01 pmol/10<sup>6</sup> cél. en presencia de calcio y 2.99 ± 0.06 pmol/10<sup>6</sup> cel. en ausencia de calcio). ns, no significativo; \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001.



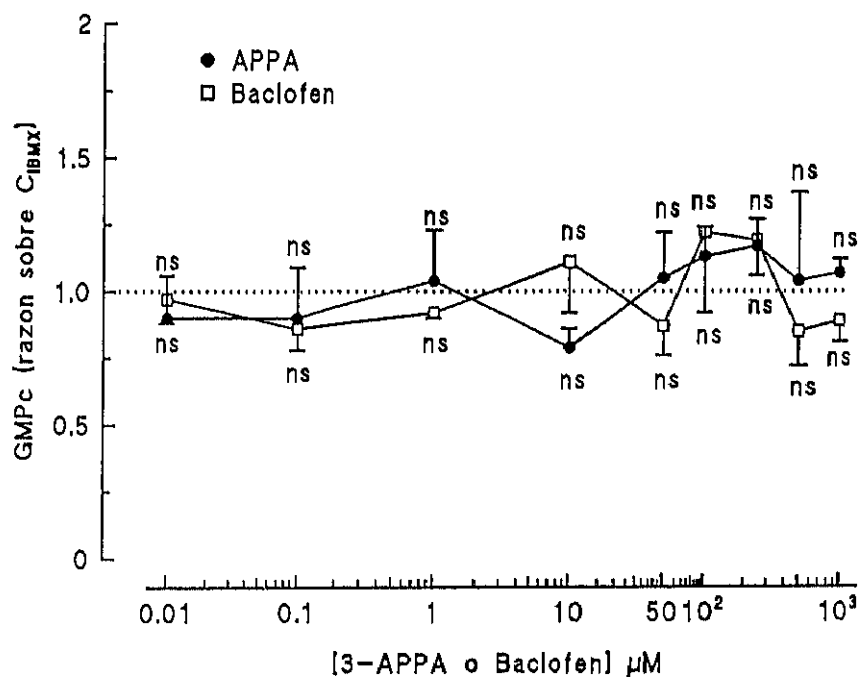
**Figura 27. Efecto de los agonistas GABA<sub>B</sub> sobre las concentraciones de calcio intracelular inducidas por nicotina y muscimol.** Incrementos de calcio intracelular obtenidos por estimulación de las células cromafines con nicotina (A) y muscimol (B) sólo o previo tratamiento con APPA y baclofén a las concentraciones y tiempos indicadas por las flechas. El registro es representativo de 9-10 experimentos realizados en al menos tres lotes diferentes de células.



**Figura 28. Efecto del AMPc sobre las concentraciones de calcio intracelular inducidas por nicotina y muscimol.** Incrementos de calcio obtenidos por estimulación de las células cromafines con nicotina y muscimol sólo o previo tratamiento con forskolina 5 µM o pClpAMPc 125 µM, cuyo efecto neto, una vez restado el basal ( $179 \pm 23$  nM), aparece en la izquierda de la figura. Los datos son la media  $\pm$  S.E.M. de 10 experimentos realizados en 3 lotes diferentes de células. La significación estadística se refiere al efecto de la nicotina o muscimol sólo (■). \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### 2.3. Efecto de agonistas GABA<sub>B</sub> sobre los niveles intracelulares de GMPC

Ya que los receptores GABA<sub>B</sub> activan la adenilato ciclasa estimulando la formación de AMPc (Tesina de M. Parramón, 1991; Oset-Gasque et al., 1993), nos interesó estudiar si la activación de estos receptores promovía la formación de otro nucleótido cíclico, el GMPC. Para ello, realizamos la estimulación de las células cromafines en cultivo con concentraciones crecientes de APPA y baclofén, como se indica en Métodos (apartado III.2.5.). Ninguno de estos agonistas a las dosis ensayadas incrementaron significativamente los niveles de GMPC (figura 29), por tanto, la activación de estos receptores no estimula la guanilato ciclasa y la formación de GMPC, siendo el efecto específico sobre la adenilato ciclasa y el AMPc.



**Figura 29.** Efecto de los agonistas GABA<sub>B</sub> sobre los niveles intracelulares de GMPC. Las células se incubaron durante 10 min con los agonistas GABA<sub>B</sub> en presencia de IBMX 0.5 mM a las concentraciones indicadas en la figura y se midieron los niveles de GMPC como se indica en Material y Métodos. Los datos son la media ± S.E.M. de 3 experimentos realizados en duplicado y se expresaron como razón sobre el control (2.02 ± 0.3 pmol/10<sup>6</sup> cel). Todos los puntos fueron no significativos (ns).

## 2.4. Correlaciones estadísticas entre los niveles de mensajeros intracelulares y los efectos secretores

### 2.4.1. Correlaciones entre la secreción de CAs y los niveles de AMPc y $Ca^{2+}$ inducidos por activación de los receptores $GABA_B$

En la figura 30 se aprecia que existe correlación lineal directa estadísticamente significativa entre los niveles de AMPc inducidos por diferentes concentraciones de los agonistas  $GABA_B$  y la secreción de CAs producida por los mismos. También existe una correlación lineal directa estadísticamente significativa entre los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelulares y la secreción de CAs inducidos por activación de los receptores  $GABA_B$ . Ello significa que estos mensajeros intracelulares pueden ser mediadores del efecto secretor producido por activación de los receptores  $GABA_B$ , que además parece responder a un proceso de verdadera exocitosis.

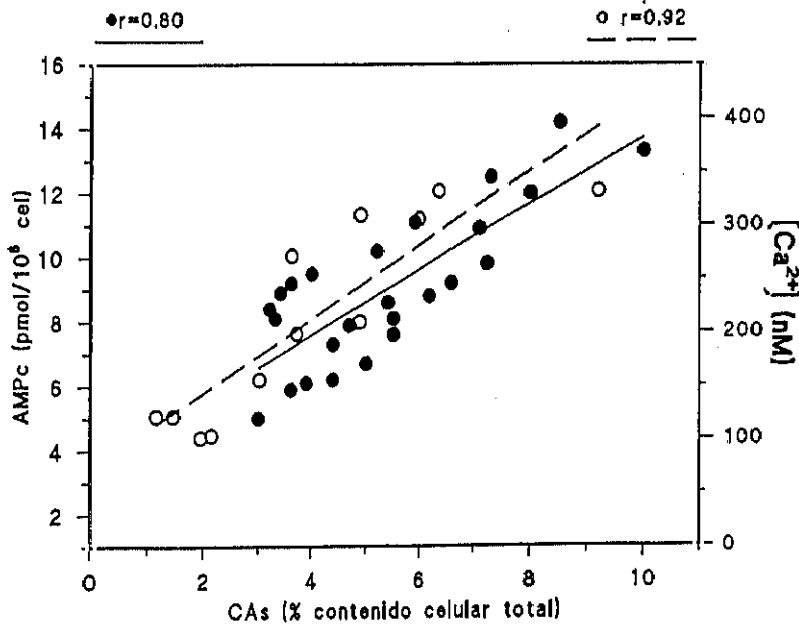


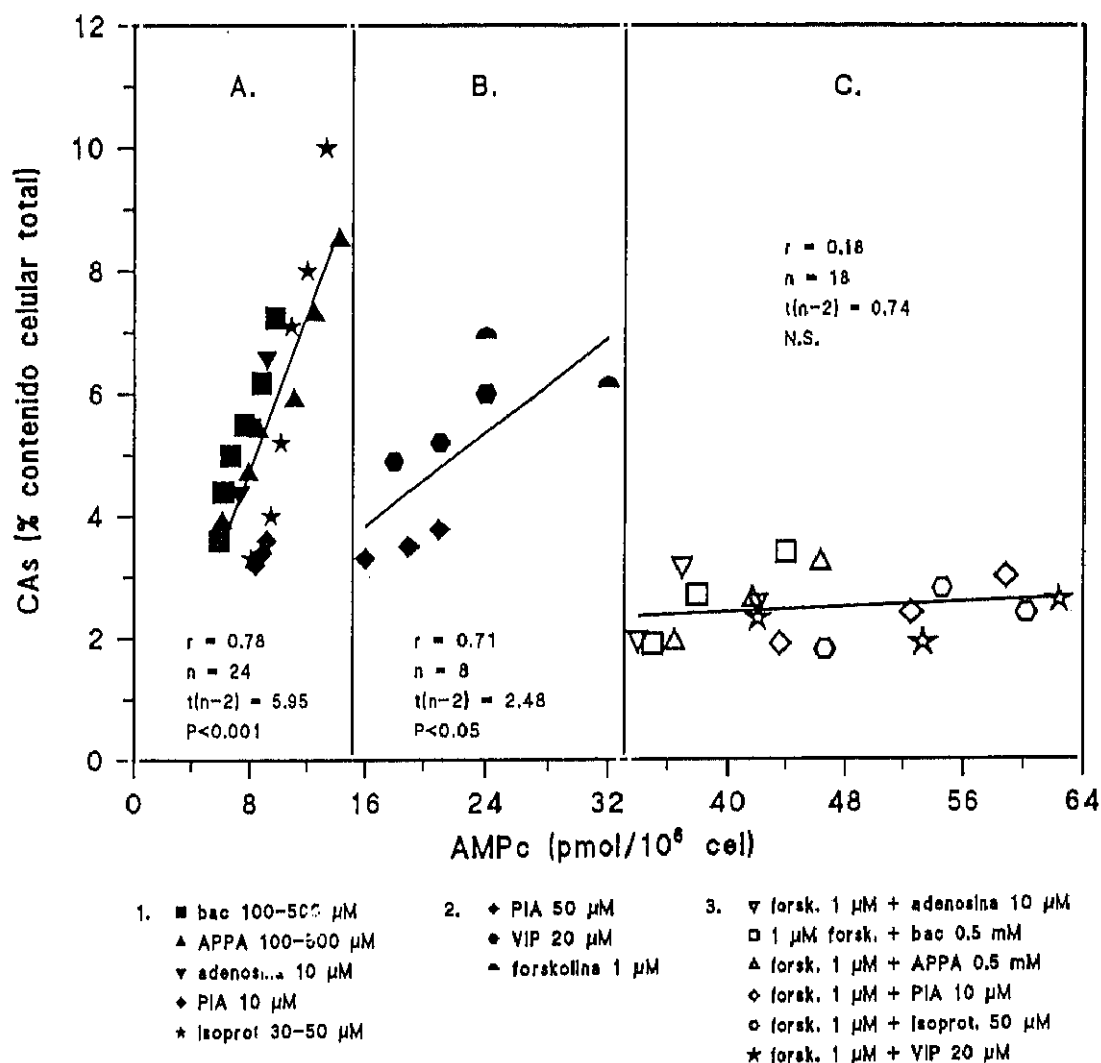
Figura 30. Correlaciones estadísticas entre los niveles de AMPc o incrementos de  $Ca^{2+}$  intracelular y la secreción de CAs inducidos por estimulación de los receptores  $GABA_B$ . Los valores de secreción de CAs están expresados en porcentajes de secreción con respecto al contenido celular total de CAs. El análisis de correlación CAs/AMPc (●) dio un coeficiente de correlación  $r=0,80$ ,  $n=25$ ,  $t(n-2)=6,46$ ,  $p<0,001$ . La correlación CAs/calcio (○) dio un  $r=0,92$ ,  $n=12$ ,  $t(n-2)=5,95$ ,  $p<0,001$ .

### ***2.4.2. Correlación entre la secreción de CAs y los niveles intracelulares de AMPc producida por los diferentes agentes que elevan los niveles intracelulares de AMPc***

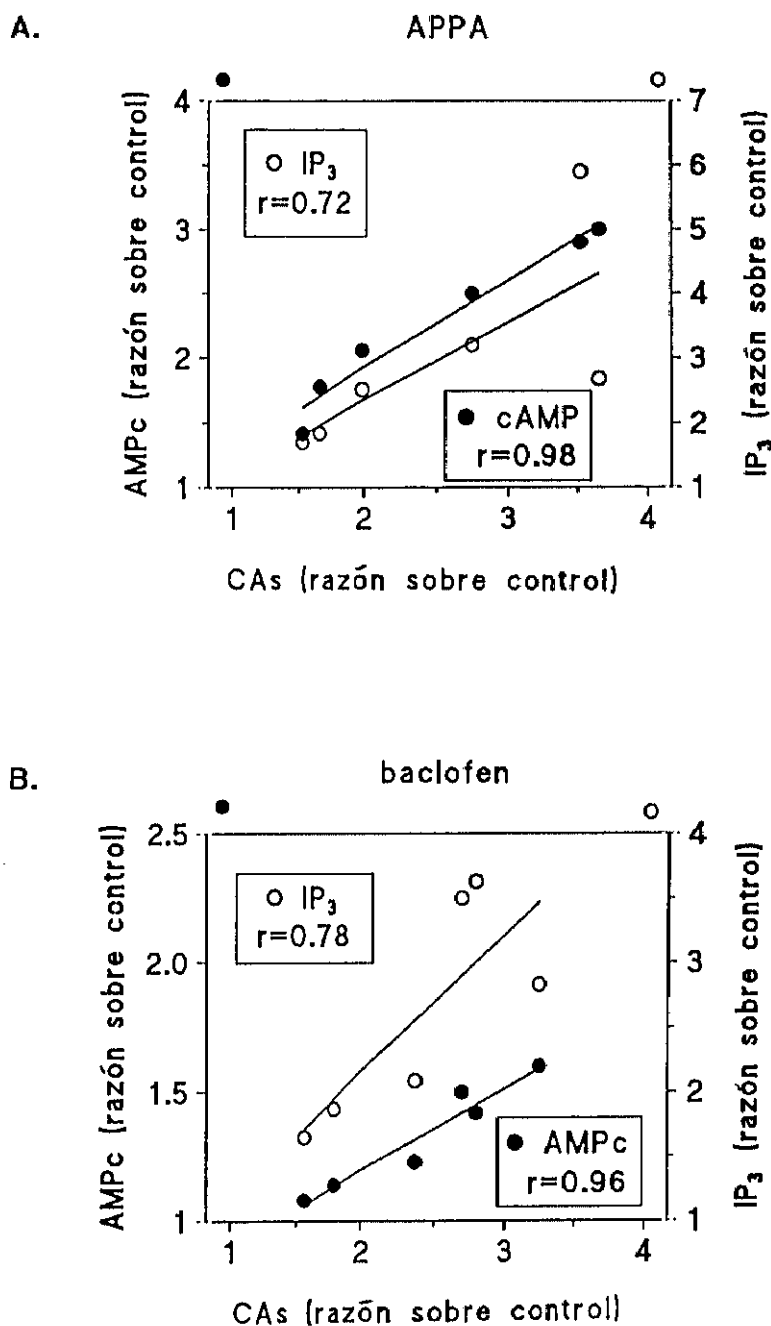
Puesto que el AMPc resultaba estar directamente relacionado con la secreción de CAs inducida por la estimulación celular con agonistas GABA<sub>B</sub>, quisimos examinar la hipótesis de si la elevación de este segundo mensajero por distintos agentes que incrementan los niveles intracelulares de AMPc estaba directamente relacionada con el efecto secretor. Para ello, relacionamos los niveles de AMPc obtenidos tras la estimulación con distintos agentes (forskolina, adenosina, isoproterenol, VIP, agonistas GABA<sub>B</sub> o mezclas de ellos con forskolina) con la secreción de CAs a la que daban lugar. En un análisis preliminar, puesto que los niveles de AMPc obtenidos en todos estos casos eran de muy distinta magnitud, esta relación no fue estadísticamente significativa. En una segunda aproximación, el análisis de correlación se llevó a cabo agrupando los datos en tres diferentes bloques, según los niveles de AMPc que inducían los diferentes efectores. Ello llevó a una triple representación (figura 31):

- (1) Correlación AMPc/CAs para agonistas que incrementaban hasta 3.5 veces los niveles basales de AMPc.
- (2) Correlación AMPc/CAs para agonistas que incrementaban entre 3.5 y 7.5 veces los niveles basales.
- (3) Correlación AMPc/CAs para mezclas de agonistas con forskolina, que incrementaban los niveles de AMPc por encima de 7.5 veces los basales.

Mediante este análisis de los datos, observamos que sólo existía una relación directa y estadísticamente significativa en el caso de niveles bajos de AMPc (figura 31.A). A más altos niveles de AMPc (entre 3.5 y 7.5 veces los niveles basales), aunque existía una correlación positiva, la pendiente de la curva disminuyó considerablemente (figura 31.B). La correlación para mezclas de agonistas con forskolina (figura 31.C) no fue estadísticamente significativa, incluso existía una correlación inversa en algunos casos.



**Figura 31.** Correlación entre la secreción de CAs y los niveles de AMPc inducidos por distintos activadores de la adenilato ciclasa. Las células cromafines se trataron durante 10 min con los agonistas sólo o en las combinaciones indicadas en la gráfica. Los puntos representan la media de varios experimentos realizados en duplicado. El análisis estadístico de la correlación se realizó agrupando los datos según se indica en el texto. En la figura se dan los coeficientes de correlación ( $r$ ), el número de datos ( $n$ ), la  $t$  de Student para el número de grados de libertad ( $t(n-2)$ ) y la significación estadística de la correlación ( $P$ ) para cada grupo de datos.



**Figura 32.** Correlación entre la secreción de CAs y los niveles de IP<sub>3</sub> inducidos por los agonistas GABA<sub>B</sub>. Comparación con la correlación AMPC/CAs. Se midieron los niveles de CAs e IP<sub>3</sub> inducidos por los receptores GABA<sub>B</sub> en las células cromafines, como se especifica en Material y Métodos. Los datos son la media de cuatro experimentos realizados en duplicado. Los datos estadísticos de las correlaciones son los siguientes: (A) APPA: (●) AMPC/CAs  $r=0.98$ ,  $n=6$ ,  $t(n-2)=10.4$ ,  $p<0.001$ ; (○) IP<sub>3</sub>/CAs  $r=0.72$ ,  $n=6$ ,  $t(n-2)=2.05$ , ns. (B) baclofen: (●) AMPC/CAs  $r=0.96$ ,  $n=6$ ,  $t(n-2)=7.3$ ,  $p<0.01$ ; (○) IP<sub>3</sub>/CAs  $r=0.78$ ,  $n=6$ ,  $t(n-2)=2.52$ , ns.

### ***2.4.3. Correlación entre la secreción de CAs y los niveles de $IP_3$ producidos por activación de los receptores $GABA_B$***

La correlación entre la secreción de CAs y los niveles de  $IP_3$  fue directa pero, según el análisis estadístico de la correlación, ésta no fue significativa. En la figura 32A y B se representan las correlaciones estadísticas entre la secreción de CAs y los niveles de  $IP_3$  para ambos agonistas  $GABA_B$ , comparadas con las del AMPc.

## ***2.5. Regulación del efecto secretor de los receptores $GABA_B$ por fosforilación***

Dada la importancia de la fosforilación de proteínas en la regulación de la actividad de numerosos receptores y el efecto notable de los receptores  $GABA_B$  sobre los niveles de AMPc, nos interesó estudiar el efecto de la implicación de dos kinasas, PKA y PKC sobre la función de estos receptores, ya que se había descrito que en el SNC estos receptores son regulados por dichas kinasas (Kamachi & Ticku, 1990).

### ***2.5.1. Regulación por PKA***

Tras la preincubación de las células durante 10 min con un rango de concentraciones crecientes del análogo permeable del AMPc, pClpAMPc entre 1  $\mu$ M y 1 mM, que elevó la secreción basal de CAs como ya conocíamos (Tesina de M. Parramón, 1991), se realizó una estimulación con agonistas  $GABA_B$  a una dosis de 0.5 mM. El pretratamiento de la células con el análogo del AMPc y posterior tratamiento con medio Locke (control) no produjo variaciones significativas en la secreción basal. Sin embargo, el pretratamiento con AMPc

inhibió muy significativamente el efecto de los agonistas GABA<sub>B</sub> sobre la secreción basal de CAs. La magnitud de este efecto inhibitorio dependió de la dosis de pClpAMPc utilizada en la preestimulación de las células y osciló entre un 80 y un 100 % en el caso del APPA y entre un 60 y un 100 % en el caso del baclofén (figura 33A).

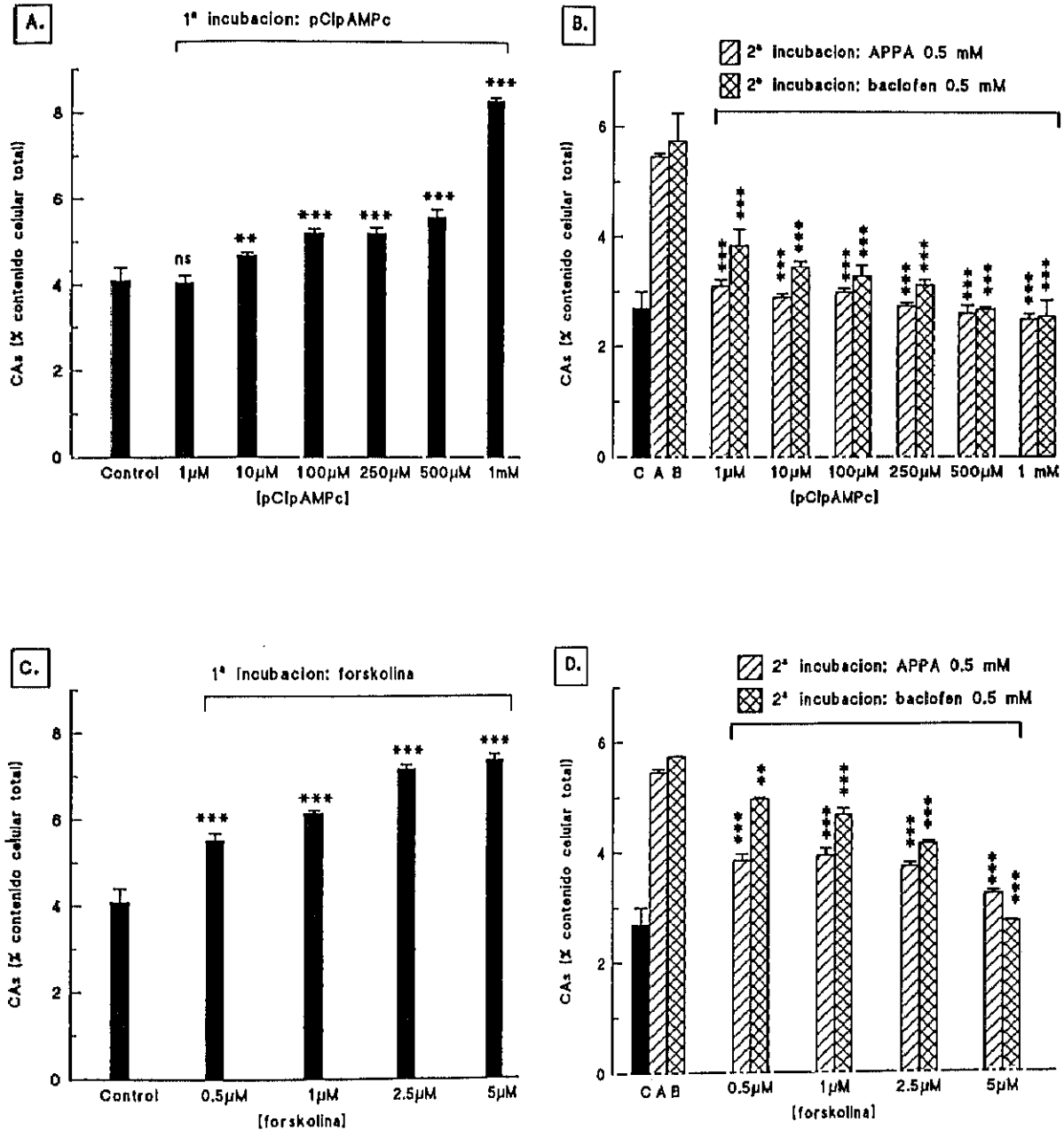
De igual manera se pretrataron las células con un rango de concentraciones de forskolina y posteriormente con los agonistas a una concentración de 0.5 mM. Análogamente al efecto del AMPc, el pretratamiento de las células con forskolina no alteró significativamente la secreción basal, pero inhibió el efecto de los agonistas GABA<sub>B</sub> sobre la secreción de CAs. El efecto inhibitorio en este caso osciló entre un 60 y un 80 % en el caso del APPA y de un 30 a un 100 % en el caso del baclofén, dependiendo de la dosis de forskolina utilizada (figura 33B).

### *2.5.2. Regulación por PKC*

Las células se pretrataron con concentraciones crecientes del éster de forbol miristato acetato (TPA) entre 1 nM y 10 μM. Esta sustancia no alteró significativamente la secreción basal de CAs (figura 34A). Sin embargo, redujo muy significativamente la secreción de CAs estimulada por APPA. El efecto inhibitorio dependió de la dosis de TPA utilizada, y osciló entre un 70 y un 100 % (figura 34B).

Para estudiar si este efecto inhibitorio era un efecto específico, bloqueamos el efecto del TPA con el antagonista específico de la PKC estaurosporina. El tratamiento simultáneo con estaurosporina (1 μg/ml) y TPA (100 nM) previno el efecto inhibitorio del TPA sobre la secreción inducida por APPA y baclofén (figura 35). No conseguimos, sin embargo, reversión con otro antagonista de PKC, el H7 (100 μg/ml) (resultado no mostrado en gráfica).

## Resultados

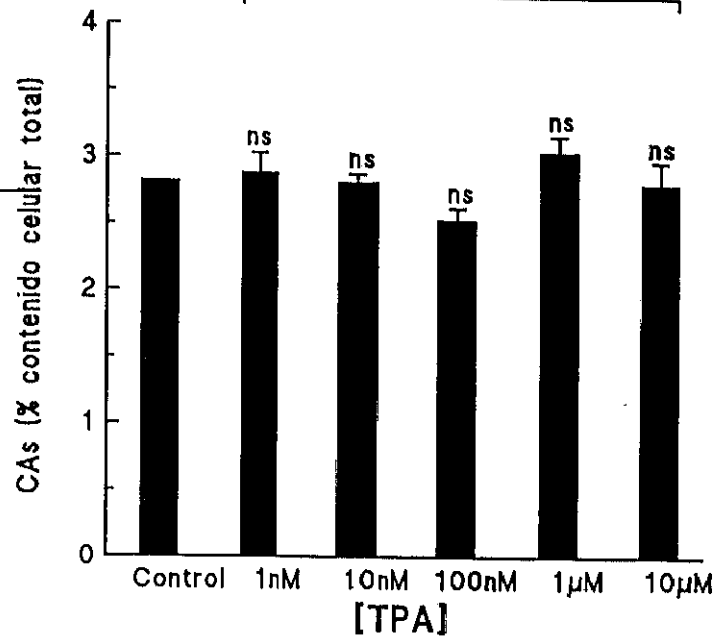


**Figura 33. Efecto del pretratamiento con AMPc sobre la funcionalidad del receptor GABA<sub>B</sub> en células cromafines bovinas.** Las células se incubaron durante 10 min con pClpAMPc o forskolina en el rango de concentraciones indicadas en la gráfica, dando lugar a la secreción representada en (A) y (C), respectivamente. Posteriormente se trataron las células con los agonistas GABA<sub>B</sub> a una concentración de 0.5 mM y se midió la secreción (B y D). Los datos son la media ± S.E.M. de 2 experimentos realizados en duplicado. La estadística se refiere al efecto del agonista GABA<sub>B</sub> correspondiente sin previo tratamiento con AMPc. ns, no significativo; \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001.

A)

1ª incubación: TPA

Resultados



B)

2ª incubación: APPA 0.5 mM

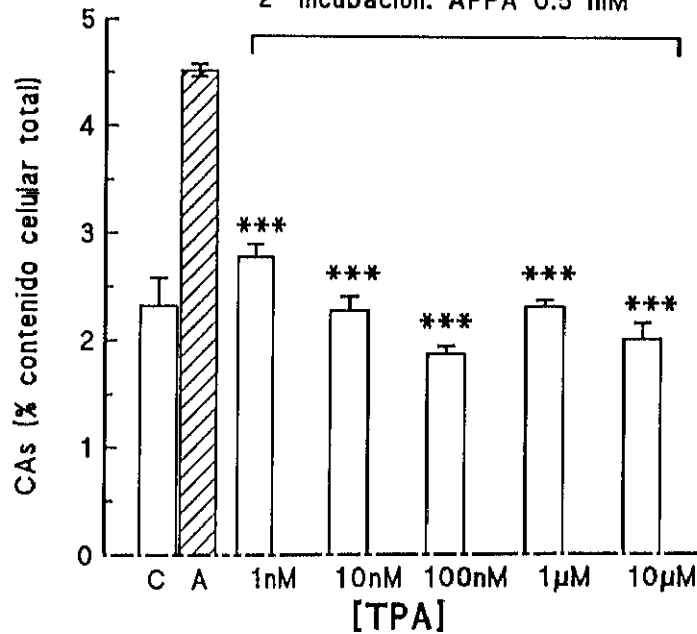
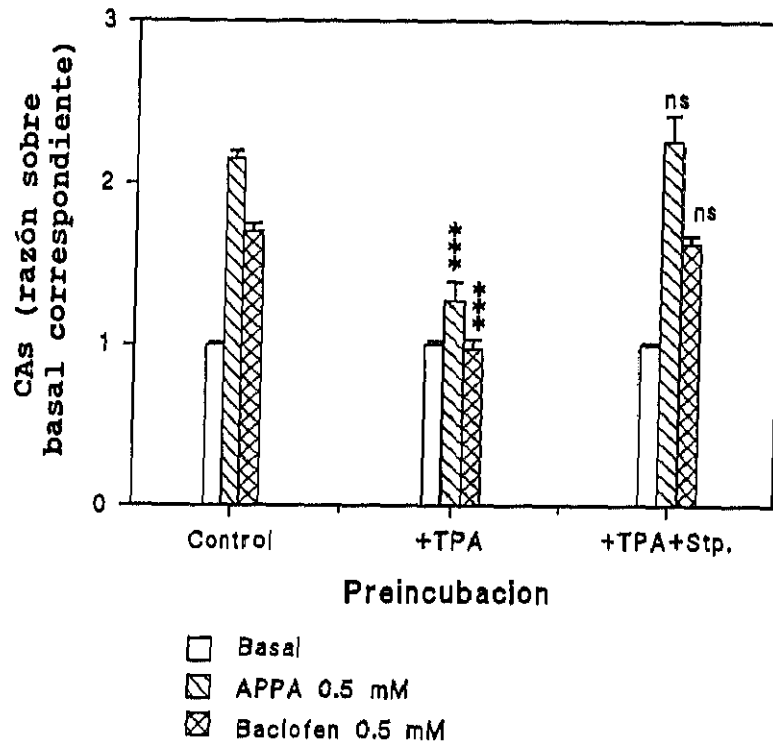


Figura 34. Efecto de los ésteres de forbol sobre la funcionalidad del receptor  $GABA_B$  en células cromafines bovinas. Las células se incubaron durante 10 min con el ester de forbol TPA en el rango de concentraciones indicadas en la gráfica, dando lugar a la secreción representada en (A). Posteriormente se trataron las células con los agonistas  $GABA_B$  a una concentración de 0.5 mM y se midió la secreción (B). Los datos son la media  $\pm$  S.E.M. de 2 experimentos realizados en duplicado. La estadística se refiere al efecto del agonista  $GABA_B$  correspondiente sin previo tratamiento con TPA. ns, no significativo; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figura 35. Especificidad del efecto de los ésteres de forbol sobre la funcionalidad del receptor GABA<sub>B</sub> en las células cromafines bovinas.** Las células se incubaron durante 10 min con el éster de forbol TPA (100 nM) o la mezcla de TPA y su antagonista específico estaurosporina (Stp) (1 µg/ml) y posteriormente con los agonistas GABA<sub>B</sub>, a las dosis indicadas en la gráfica. Los datos son la media ± S.E.M. de 2 experimentos realizados en duplicado expresados como razón sobre los basales correspondientes (sin los agonistas GABA<sub>B</sub>) que fueron tomados como la unidad (control = 2.3 ± 0.2 %, TPA = 2.65 ± 0.25 %, TPA + Stp = 1.9 ± 0.12 %). La estadística compara el efecto de los agonistas GABA<sub>B</sub> incubados con TPA o TPA + Stp con sus correspondientes controles (sin las citadas sustancias). ns, no significativo; \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001.

**V.**

***DISCUSSION***

---

## ***1. Receptores GABA<sub>A</sub> en la médula adrenal bovina: función, modulación farmacológica y estructura molecular.***

### ***1.1. Función y mecanismo de acción***

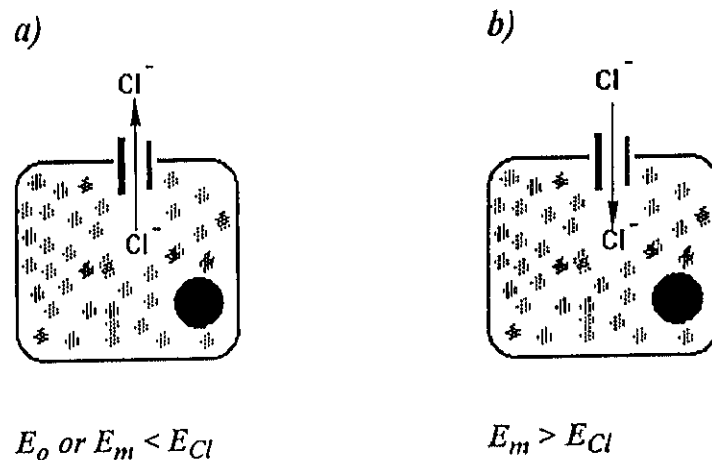
El GABA es un importante neurotransmisor inhibitorio en el S.N.C. Se estima que al menos un 30 % de las sinapsis centrales son GABAérgicas (Sieghart, 1989). Más aún, se estima que los receptores GABA<sub>A</sub> representan un 0.01-0.001 % del peso total de proteínas del cerebro (Stephenson, 1991).

Desde hace algunos años, nuestro grupo de investigación ha trabajado en la caracterización de sistemas GABAérgicos y en el estudio de la función del GABA en la médula adrenal bovina, habiendo puesto en evidencia la presencia de las enzimas de síntesis y degradación del mismo y la existencia de mecanismos de transporte y de liberación específicos, así como de ambos subtipos de receptores (GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>) en la membrana plasmática (ver apartado I.3.6.). Más recientemente se ha estudiado la funcionalidad de estos receptores en las células cromafines en cultivo.

Los receptores GABA<sub>A</sub> estimulan la secreción basal de CAs (Castro et al., 1989). El mecanismo de este efecto depende del potencial de membrana de las células en relación con el potencial de equilibrio para el Cl<sup>-</sup> (González et al., 1992). Así, en condiciones de reposo, el muscimol produce una despolarización de la célula que conduce a un incremento de la secreción basal de CAs de una forma dependiente de la dosis. De la misma forma, si las células se estimulan con muscimol en presencia de bajas concentraciones de nicotina (inferiores a 10 μM) o de KCl (concentraciones menores de 15 mM), este agonista sigue teniendo un efecto despolarizante, y, por tanto, estimulante de la secreción de CAs, aunque es de menor magnitud que el ejercido en condiciones basales. Sin embargo, la estimulación de las células con muscimol en presencia de concentraciones más altas de nicotina o KCl,

## Discusión

este agonista tiene un efecto inhibitor de la secreción de CAs. Este efecto inhibitor se debe a que en estas condiciones la membrana se ha despolarizado a un potencial de membrana superior al potencial de equilibrio para el  $\text{Cl}^-$  ( $E_{\text{Cl}} = -50 \text{ mV}$ ) y a este potencial el GABA, a través de sus receptores  $\text{GABA}_A$ , tiene un acción hiperpolarizante (González et al, 1992). Este mecanismo molecular de la respuesta de las células cromafines a la activación de sus receptores  $\text{GABA}_A$  queda reflejado en el esquema 17 (Parramón et al., 1994b).



**Esquema 17. Mecanismo de acción de los receptores  $\text{GABA}_A$  en las células cromafines bovinas.** A) La unión del GABA a su receptor  $\text{GABA}_A$  cuando la membrana de las células cromafines se encuentra en el potencial de reposo ( $E_o$ ) o a un potencial de membrana ( $E_m$ ) por debajo del potencial de equilibrio para el  $\text{Cl}^-$  ( $E_{\text{Cl}} = -51 \pm 2.1 \text{ mV}$ ), produce una salida de  $\text{Cl}^-$  y, como consecuencia, una despolarización de la membrana y una estimulación de la secreción basal de CAs. B) Cuando las células están más despolarizadas, es decir, el  $E_m$  es superior al  $E_{\text{Cl}}$  (experimentalmente conseguido por estimulación con altas concentraciones de KCl o nicotina), el GABA produce un influjo de  $\text{Cl}^-$  y, como resultado, una hiperpolarización de las células y una inhibición de la secreción de CAs.

La  $EC_{50}$  para el efecto del muscimol sobre la secreción de CAs es de  $2.9 \pm 0.4 \mu M$ , semejante a la  $K_D$  obtenida para la unión del muscimol a membranas de cerebro (Yang & Olsen, 1987), aunque mucho menor que la  $EC_{50}$  para el mismo efecto de los receptores  $GABA_B$  (Oset-Gasque et al., 1993). Ello es lógico puesto que los receptores  $GABA_B$  son mucho menos abundantes que los receptores  $GABA_A$  en las células cromafines. Hemos estimado que aproximadamente un 20 % de las células cromafines tienen estos receptores, en tanto que un 60 % de las mismas contienen receptores  $GABA_A$  (Castro y Oset-Gasque, resultados no publicados). Los receptores  $GABA_A$  tienen una actividad secretora de aproximadamente un 70 % de la respuesta producida por estimulación colinérgica nicotínica (Castro et al., 1989).

El receptor  $GABA_A$  es, por tanto, un receptor de gran importancia en la modulación de la actividad de la médula adrenal, como se ha venido sugiriendo en diversos trabajos de investigación (Castro et al., 1989; Kataoka et al., 1984; Kitayama & Tsujimoto, 1986; Peters et al., 1989). También en otras estructuras del SNP se ha observado que el GABA es excitatorio, como en la mucosa antral del estómago, donde los receptores  $GABA_A$  incrementan de manera dependiente de la dosis la secreción de gastrina (Del Tacca et al., 1990).

## *1.2. Modulación farmacológica*

En el SNC, el receptor de  $GABA_A$  tiene una gran importancia a nivel farmacológico, ya que es susceptible de modulación alostérica por un diverso número de fármacos de gran importancia terapéutica. Entre ellos se incluyen: benzodiazepinas (BZ), barbitúricos, anestésicos, esteroides, etanol y algunos iones (ver apartado I.3.5.1.1.). Por ser algunos de ellos sustancias muy utilizados clínicamente, estos fármacos han sido extensamente estudiados en la literatura científica, tanto a nivel de su funcionalidad y mecanismo de acción molecular, como en la búsqueda de ligandos más activos y específicos. En este sentido, nuestro grupo

ha colaborado también en el estudio farmacológico de una nueva serie de dihidro-pirazolo-pirrolo-diazepinas de síntesis (Vega et al., 1994).

El estudio del papel de estas drogas en la médula adrenal bien de una forma directa o como moduladores de la actividad de los receptores GABA<sub>A</sub> era muy interesante por ofrecer nuevas perspectivas funcionales de estos fármacos en la regulación de la secreción de CAs por la médula adrenal y, por tanto, como agentes moduladores terapéuticos o fisiológicos de la función de las mismas sobre el metabolismo, flujo sanguíneo y control de la presión arterial.

En nuestras manos, las benzodiazepinas ensayadas, flunitrazepam y diazepam no tuvieron ningún efecto sobre la secreción basal de CAs (tabla 1), resultado que está de acuerdo con los de Kitayama y col. (1989) para la BZ midazolam. Estos resultados parecían indicar inicialmente que en las células cromafines no existían receptores para BZ de tipo periférico, cuyos agonistas y antagonistas específicos son, respectivamente, el Ro 5 4684 y el PK 11195 (Ohara-Imaizumi, 1991). Para comprobarlo, realizamos una curva dosis-respuesta con el Ro 5 4684 (tabla 1), observando que no tenía efecto sobre la secreción basal de CAs, por lo que en las células cromafines, bien no existía el receptor BZ periférico o este era inefectivo en la activación de la secreción de CAs por las células cromafines. Este resultado negativo era lógico y de esperar, ya que esta sustancia parece actuar inhibiendo los canales de Ca<sup>2+</sup>, de forma similar a las dihidropiridinas (Ohara-Imaizumi, 1991).

Cuando ensayamos las BZ sobre el efecto secretor de agonistas GABA<sub>A</sub>, observamos, a diferencia de los resultados a nivel basal, que ambas BZ flunitrazepam y diazepam fueron capaces de potenciar la secreción mediada por muscimol, con una dependencia acusada de la concentración de muscimol y BZ utilizada (figura 2). Estas sustancias potenciaron los efectos secretores de bajas concentraciones de muscimol hasta aproximadamente un 80 %, un efecto no muy elevado, pero de la misma magnitud que el efecto descrito para un receptor recombinante expresado en ovocitos de *Xenopus* compuesto por las subunidades  $\alpha_1\beta_1\gamma_{2L}$  (Wafford et al., 1992). Por el contrario, las mismas BZ inhibían el efecto secretor producido

por concentraciones elevadas de muscimol (figura 2), efecto inhibitor que mostró ser dependiente de la dosis de flunitrazepam (figura 2, inserto). El efecto potenciador también había sido observado por el grupo de Kitayama (1989) con midazolam y clorazepam. Nosotros observamos que tanto la potenciación como la inhibición por BZ del efecto secretor de bajas dosis (figura 3) o altas dosis (figura 4A) de muscimol, respectivamente, eran efectos específicos, mediados por un receptor BZ de tipo central usando el antagonista específico de BZ central Ro 1788. Esta sustancia antagonizó tanto el efecto potenciador como el inhibitor. Sin embargo, Ro 5 4684 no parecía influir en la respuesta del flunitrazepam sobre el muscimol (figura 4B), de lo que se deducía que esta última sustancia no se comportaba como un antagonista del sitio de unión de BZ del receptor GABA<sub>A</sub> o bien que al unirse tuviera la misma o parecida eficacia inhibitoria que el flunitrazepam.

La existencia de estos sitios de unión específicos para BZ con características farmacológicas centrales se confirmó por los ensayos de unión al equilibrio (binding) del radioligando [<sup>3</sup>H]flunitrazepam, para el que se obtuvo en el análisis de Scatchard unos valores de K<sub>D</sub> de 4±0.6 nM y una B<sub>max</sub>=27±3 fmol/mg proteína (Parramón et al., 1994a). La IC<sub>50</sub> obtenida para el desplazamiento de la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam 10 nM por flunitrazepam frío fue de 40 nM y la K<sub>i</sub> de 15 nM. Estas concentraciones de flunitrazepam son de un orden de magnitud semejante al de las concentraciones de flunitrazepam necesarias para potenciar el efecto secretor de los agonistas del receptor GABA<sub>A</sub> (10 nM), en contraste con otros trabajos donde estas diferencias son de hasta 1000 veces (Edgar et al., 1992). Esto confirma la idea de que el efecto modulador de las BZ sobre el receptor GABA<sub>A</sub> es de gran especificidad y se realiza por unión de las BZ a sitios de alta afinidad. En contraste, los efectos inhibitorios de las BZ sobre el efecto secretor de altas concentraciones de muscimol se realiza probablemente por unión de las mismas a otros sitios de unión de baja afinidad, en cuyo estudio no hemos profundizado.

Asimismo, en estos estudios de unión específica de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam se observó que el Ro 1788 desplazaba con gran potencia al flunitrazepam, con una EC<sub>50</sub> de 0.26±0.05 nM,

## Discusión

lo que demostraba de nuevo que se trataba de un receptor BZ central. El Ro 5 4684 también fue capaz de desplazar la unión de [ $^3$ H]flunitrazepam, aunque con menor potencia. Este resultado, unido a los anteriores sobre la secreción, parece indicar bien que este último compuesto se comportaba como agonista débil del sitio de unión de BZ del receptor de GABA $_A$  a las dosis ensayadas o bien que existe un receptor periférico de BZ que no participa en la regulación de la secreción basal de CAs, como habíamos apuntado anteriormente, aunque pudiese participar en la regulación de la actividad secretora de otros receptores. Esta hipótesis será objeto de comprobación en trabajos futuros.

En conclusión, todos estos resultados apuntan a que el efecto modulador de BZ sobre la secreción de CAs es mediado por su unión a sitios específicos sobre el receptor GABA $_A$ , que se corresponden con un receptor GABA $_A$ /BZ o BZ central.

Las  $\beta$ -carbolinas son compuestos que se unen específicamente con alta afinidad a los sitios de unión de BZ del receptor GABA $_A$  del cerebro, actuando como agonistas inversos de los mismos y durante mucho tiempo se han considerado como sus ligandos endógenos (Schok & Mohler, 1983). En membranas de médula adrenal las EC $_{50}$  de unión para las distintas  $\beta$ -carbolinas oscilaron entre 0.2 y 0.9 nM (figura 11), lo que demuestra la alta afinidad de su unión al sitio de BZ, que es semejante a la encontrada en cerebelo o sitios de alta afinidad de corteza cerebral e hipocampo (Duggan & Stephenson, 1988). La semejanza entre los datos de unión específica de  $\beta$ -carbolinas entre las diferentes estructuras cerebrales y la médula adrenal así como con la estrecha semejanza entre las K $_D$  para el flunitrazepam, del mismo orden de magnitud en corteza ( $10 \pm 4$  nM, Sigel et al., 1983) y en médula adrenal ( $4 \pm 0.6$  nM, Parramón et al., 1994a; 9.8 nM, Kataoka et al., 1984), apuntan a que el sitio de unión para BZ en el receptor GABA $_A$  de todas estas estructuras tisulares posee una subunidad de unión de BZ muy semejante en todas ellas.

## Discusión

En los estudios de secreción de CAs en células cromafines, las  $\beta$ -carbolicinas, inhibieron la secreción inducida por bajas concentraciones de muscimol ( $1 \mu\text{M}$ ) de forma dependiente de la dosis, en un orden de potencia  $\beta\text{-CCE} > \beta\text{-CCM} > \beta\text{-CCP}$  (figura 5B). A una dosis fija de  $\beta\text{-CCE}$  y variable de muscimol, obtuvimos aproximadamente la curva inversa a la obtenida por las BZ estudiadas anteriormente (figura 5A), lo que demuestra su papel como agonistas inversos del receptor de BZ en las células cromafines y confirma un resultado similar obtenido por Kitayama y col. (1989).

Otras drogas sedantes, los **barbitúricos**, cuyo mecanismo de acción se ejerce por unión al receptor  $\text{GABA}_A$  por incremento del tiempo de apertura del canal de  $\text{Cl}^-$ , también tuvieron un efecto potenciador de la secreción inducida por muscimol, que fue máxima a una concentración de  $100 \text{ nM}$  del mismo. A concentraciones superiores de muscimol, se observó un efecto inhibitorio, al igual que en el caso de las BZ.

La potenciación ejercida por el barbitúrico pentobarbital sobre la acción del muscimol fue de un  $89 \%$ , un efecto comparable al de los esteroides a la misma dosis (comparar figuras 6 y 7). Diversos autores que han estudiado conjuntamente el efecto de esteroides y barbitúricos, han observado que ambos producen unas respuestas muy similares tanto en estudios electrofisiológicos sobre la potenciación de las corrientes de membrana inducidas por GABA aplicado exógenamente, así como de unión de  $[^3\text{H}]\text{muscimol}$  (Peters et al., 1985 y 1988). Ello es lógico si pensamos que ambas sustancias tienen el mismo mecanismo de acción sobre el receptor  $\text{GABA}_A$ , aumentando el tiempo de apertura del canal de  $\text{Cl}^-$ , aunque su sitio de unión al receptor es diferente (Sieghart et al., 1992).

En cuanto a los **esteroides**, se sabe desde hace algunos años, que aparte de sus acciones genómicas a largo plazo sobre la modulación de determinados genes de enzimas, receptores, etc. llevadas a cabo por unión específica a sus receptores intracelulares, también afectan la

## Discusión

superficie celular, alterando la permeabilidad iónica de la membrana, así como la liberación de hormonas y neurotransmisores. El interés de estas últimas acciones "rápidas" de los esteroides como moduladores alostéricos del receptor  $GABA_A$  y de otros canales iónicos activados por ligando, creció cuando estos se relacionaron con el efecto anestésico y anticonvulsivante de los mismos.

De estos esteroides con acciones rápidas denominados "neuroactivos" por su gran actividad sobre tejidos neurales, y en especial sobre el receptor  $GABA_A$ , hemos incluido en nuestro estudio el de dos compuestos naturales que se secretan por la corteza adrenal durante el estrés: el derivado natural de la progesterona,  $3\alpha$ -OH-DHP, sintetizado, además, en el cerebro, y el derivado natural de la desoxicorticosterona, THDOC, sintetizado sólo en la corteza adrenal y, por tanto, no considerado como "neuroesteroide" propiamente dicho.

También hemos ensayado las acciones de otros dos esteroides naturales, la pregnenolona, derivado natural del colesterol y precursor de todas las hormonas esteroídicas, la pregnanolona, el isómero  $5\beta$  de la  $3\alpha$ -OH-DHP, metabolito natural de la progesterona, y de dos esteroides de síntesis: la alfaxalona, derivado de la  $3\alpha$ -OH-DHP por introducción de un grupo ceto en posición 11, conocido por su gran potencia como anestésico, y la dexametasona, derivado sintético de la prednisolona, conocido por sus importantes propiedades antiinflamatorias.

En nuestro estudio sobre el efecto de estos esteroides sobre la modulación de la secreción de CAs mediada por activación de los receptores  $GABA_A$ , todos los esteroides ensayados de la serie "pregnan" potenciaron el efecto secretor del muscimol, siendo este efecto absolutamente dependiente de la concentración de muscimol utilizada.

En general, para los esteroides más activos de los dos naturales, THDOC y  $3\alpha$ -OH-DHP y el anestésico alfaxalona, ensayados a altas concentraciones, entre 10 y 100  $\mu$ M, se obtuvo un pico de potenciación a una concentración de muscimol de 100 nM. En el caso de la pregnanolona y la dexametasona, ensayados a 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M, el pico de potenciación

máxima se observó al estimular las células con concentraciones mayores de muscimol (entre 1 y 10  $\mu\text{M}$ ). Por el contrario, la pregnenolona tuvo un ligero efecto inhibitor de la acción del muscimol (figura 8), lo que está de acuerdo con la literatura, que muestra que los esteroides pregnen tienen efecto nulo o inhibitor sobre la acción del GABA (McEwen, 1991).

De nuestros resultados parece deducirse que:

(1) De los esteroides ensayados a las dosis más bajas (100nM-1 $\mu\text{M}$ ) (figuras 7.1, 7.2 y 7.3) se podría establecer el siguiente orden de potencia relativa: alfaxalona (80 %) > dexametasona (50 %) > pregnanolona (35 %). Estos datos concuerdan con la literatura, en la que está descrito que la alfaxalona tiene una gran potencia sobre las corrientes estimuladas por activación del receptor GABA<sub>A</sub>, en tanto que la pregnanolona tiene moderada eficacia sobre este receptor y la dexametasona tiene poca eficacia como esteroide neuroactivo, siendo más conocida por sus efectos antiinflamatorios a nivel genómico.

(2) De los esteroides ensayados a dosis más altas (10-100  $\mu\text{M}$ ) (figura 7.3, 7.4 y 7.5), se deduce que el THDOC, 3 $\alpha$ -OH-DHP y alfaxalona tienen un efecto máximo similar de aproximadamente un 75 % sobre la actividad basal del muscimol.

(3) En líneas generales, existe una relación inversa entre la concentración de esteroide y la de muscimol necesarias para obtener el pico de potenciación máxima: cuanto mayor es la concentración de esteroide utilizada, menor es la de muscimol requerida para observar el pico de secreción máxima.

En nuestras manos, ningún esteroide tuvo acción por sí mismo a las concentraciones ensayadas (tabla 1), lo cual está de acuerdo con lo que ocurre en SNC midiendo flujos de Cl<sup>-</sup> (McEwen, 1991), si bien para algunos esteroides como la alfaxalona a altas concentraciones (10-100  $\mu\text{M}$ ), se ha descrito en las células cromafines un efecto directo sobre la activación del canal del cloro del receptor GABA<sub>A</sub> en ausencia de GABA exógeno (Cottrell et al.,

1987), que posiblemente se deba a la potenciación del efecto del GABA endógeno, aunque nosotros no observamos este efecto. No obstante este efecto es compatible con nuestra observación de que mayores dosis de esteroides neuroactivos son capaces de potenciar el efecto secretor de menores concentraciones de muscimol.

En resumen, los receptores GABA<sub>A</sub> en las células cromafines, son modulados por una serie de fármacos, ansiolíticos, sedantes, anticonvulsivantes y anestésicos, conocidos moduladores de este receptor en el S.N.C. Es de destacar en sus efectos la acusada dependencia de la concentración de fármaco utilizada, como ha sido observado también con estos moduladores en el S.N.C. (Lin et al., 1992). El conocimiento del sistema del GABA y su modulación farmacológica en la médula adrenal ofrece además una interesante proyección farmacológica futura en el desarrollo de nuevas sustancias terapéuticas, como sedantes, anestésicos generales y anticonvulsivantes, así como un mejor conocimiento de la influencia del sistema endocrino en la función del SNC.

Ya que muchos de estos compuestos, como los esteroides naturales son sintetizados endógenamente por la corteza adrenal, principalmente en respuesta al estrés, los efectos aquí descritos pueden tener importancia no sólo farmacológica, sino también fisiológica, ya que estos esteroides podrían actuar como moduladores endógenos del receptor GABA<sub>A</sub> y contribuir así a la modulación de la secreción de CAs por la médula adrenal durante el estrés.

### ***1.3. Estructura molecular del receptor: concordancia con su modulación farmacológica***

Nuestros resultados sobre la estructura de los receptores GABA<sub>A</sub> en la médula adrenal indican que están compuestos por las siguientes subunidades:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_4$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma_2$  y no contienen las subunidades  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_6$  (figuras 12-14).

Los receptores GABA<sub>A</sub>/BZ se han clasificado en BZ1 y BZ2 según las subunidades  $\alpha$  por las que están formados (Schofield, 1989; Sieghart, 1989). Por contener la subunidad  $\alpha_1$ , los receptores GABA<sub>A</sub> de la médula adrenal son del tipo BZ1. Ello les confiere unas características farmacológicas específicas, como tener una alta afinidad para las  $\beta$ -carbolicinas (Sieghart, 1992), como hemos observado para el receptor GABA<sub>A</sub> de la médula adrenal (figura 11C). El otro subtipo se denomina BZ2 y corresponde a un receptor que contiene las subunidades  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  ó  $\alpha_5$  (Sato et al., 1989). Nosotros hemos demostrado que, al menos, las subunidades  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  no están presentes en el receptor de la médula adrenal (ver figura 14). Estos resultados (presencia de la subunidad  $\alpha_1$  y ausencia de  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ ) confirman los de Ymer y col. (1989) sobre la presencia y ausencia, respectivamente, de sus correspondientes RNA mensajeros (RNAm) en la médula adrenal.

La completa caracterización llevada a cabo con la subunidad  $\alpha_1$ , nos había llevado a concluir anteriormente que el receptor de la médula adrenal era homogéneo en cuanto a su composición de subunidades  $\alpha$  (Parramón et al., 1994a). Sin embargo, la demostración posterior, aunque de manera preliminar, de la presencia de la subunidad  $\alpha_4$ , parece apuntar la posible existencia de receptores formados por varias subunidades  $\alpha$  diferentes (receptores heterogéneos) como ha sido observado en otros tejidos (Lüdens et al., 1991). Esta afirmación requiere, sin embargo, experimentación adicional.

Si bien las subunidades  $\alpha$  son a las que se unen las BZ y marcan su clasificación farmacológica, las subunidades  $\beta$  son a las que se une el GABA y marcan el grado de afinidad de este neurotransmisor por su receptor. Entre estas subunidades, las  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  parecen estar presentes en médula adrenal, resultado que confirma los anteriores sobre la presencia de sus RNAm correspondientes (Ymer et al., 1989). La presencia de estas subunidades  $\beta$  sólo o en combinación con otras subunidades  $\alpha$  o  $\gamma$  les confieren la propiedad de ser moduladas por corticosteroides (McEwen, 1991), como hemos confirmado en nuestros resultados. Las subunidades  $\beta$  contienen sitios de fosforilación por PKA en residuos de serina (Burt et al, 1991). En nuestro caso hemos observado que el receptor GABA<sub>A</sub> se regula negativamente cuando incrementamos los niveles de AMPc, tanto por activación del receptor

GABA<sub>B</sub> (Oset-Gasque et al., 1993), como por forkolina o análogos no hidrolizables del AMPc (Parramón et al., 1994d).

Por último, la presencia de la subunidad  $\gamma_2$  (Parramón et al., 1993) indica que el receptor de la médula adrenal es susceptible de modulación por BZ, como hemos observado, ya que un receptor funcionalmente completo necesita la presencia de al menos una subunidad  $\alpha$ , una  $\beta$  y una  $\gamma$  (Sigel et al., 1992). Además, la presencia de esta subunidad condiciona su insensibilidad al  $Zn^{2+}$  (Sieghar, 1992) ya que un receptor con la subunidad  $\gamma_2$  es insensible a este catión, como confirman nuestros resultados (figura 9).

Según se ha descrito, la coexpresión de las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$  y  $\gamma_2$  produce un receptor de alta afinidad para la unión de BZ en el que éstas potencian (los agonistas), reducen (los agonistas inversos) o no afectan (los antagonistas) las corrientes de  $Cl^-$  inducidas por GABA (Schofield, 1989). En nuestro caso, también se trata de un receptor de alta afinidad para las BZ, ya que su  $K_D$  es del orden de 4 nM (Parramón et al., 1994a).

La asociación de las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\beta_{2/3}$ ,  $\gamma_2$  es muy frecuente en los receptores del cerebro, lo que sugiere que esta combinación tiene una gran relevancia fisiológica (Benke et al., 1991). Además esta combinación de subunidades conforma un receptor modulado por ligandos benzodiazepínicos como es el caso del receptor de la médula adrenal. Por el contrario, un receptor formado por las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma_2$  presentaría una  $EC_{50}$  para el GABA 100 veces superior a la normal y baja cooperatividad (Sigel et al., 1992).

Según el completo estudio de Araki y Toluyama (1992) la composición de nuestro receptor en médula adrenal sería comparable a la de las siguientes estructuras cerebrales murinas: capa granular del núcleo dentado del hipocampo, túnica recta del Septum y área ventrolateral del tálamo. Esto concuerda con los datos de afinidad de  $\beta$ -carbolicinas, que eran muy próximos a las de cerebelo, corteza cerebral e hipocampo bovinos (Duggan & Stephenson, 1988). Pasando por alto las diferencias entre especies, ya que el receptor GABA<sub>A</sub> es un receptor altamente conservado en la evolución (Lasham et al., 1991), podríamos concluir de estas

## *Discusión*

comparaciones que el receptor GABA<sub>A</sub> de la médula adrenal podría ser muy similar al del hipocampo. Esta conclusión parece confirmarse con datos fisiológicos que indican que el GABA parece tener un efecto excitatorio en el hipocampo (Fiszman et al., 1990) al igual que en las células cromafines. Puesto que el GABA, además del hipocampo, tiene efecto despolarizante en otras regiones del cerebro anterior, como en el núcleo estriado (Mercuri et al., 1991), de manera más general podríamos concluir que el receptor GABA<sub>A</sub> de las células cromafines es muy parecido al de las estructuras del cerebro anterior.

Haciendo un análisis global, si observamos que en la médula adrenal parecen estar presentes dos subunidades  $\alpha$ , tres  $\beta$  y una  $\gamma$  y que la estructura cuaternaria de un receptor de GABA se asume que es pentamérica (Nayeem et al., 1994), serían posibles varias combinaciones diferentes para un receptor GABA<sub>A</sub> en la médula adrenal. Ello conduce a pensar que puedan existir diferentes isoformas del receptor, y que éstas puedan estar presentes en distintos subtipos celulares, por ejemplo adrenérgicos y noradrenérgicos. Por tanto, el efecto final del GABA dependerá de cual sea el subtipo de receptor más abundante, y esto podría explicar la variabilidad observada, a veces, en las respuestas del GABA través de su receptor GABA<sub>A</sub> en diferentes cultivos celulares. Por otro lado, la posible heterogeneidad de estos receptores con respecto a las subunidades  $\alpha$ , comentada anteriormente, podría explicar que los efectos potenciadores e inhibidores de las BZ sobre la secreción de CAs inducida por muscimol fueran mediados por subtipos de receptores, con distinta afinidad para las BZ: alta (efectos potenciadores) y baja (efectos inhibidores).

## ***2. Receptores GABA<sub>B</sub> en la médula adrenal: función y mecanismo de acción molecular.***

### ***2.1. Función de los receptores GABA<sub>B</sub> en la modulación de la secreción de CAs por las células cromafines bovinas***

En nuestro trabajo anterior presentado como Tesina (Tesina de M. Parramón, 1991), habíamos puesto en evidencia que la activación de los receptores GABA<sub>B</sub> de las células cromafines por agonistas específicos inducía una estimulación de la secreción basal de CAs, así como una inhibición de los efectos secretores inducidos por la activación de otros receptores específicos, como los colinérgicos nicotínicos y los de GABA<sub>A</sub>.

El efecto estimulador de la secreción basal de CAs era dependiente de Ca<sup>2+</sup> extracelular y paralelo a la liberación de otros componentes granulares, como la DBH, por lo que la secreción debida a la activación de los receptores GABA<sub>B</sub> parecía tratarse de una verdadera exocitosis. Además, según se demuestra en esta Tesis; esta acción estimuladora es consecuencia de su efecto despolarizante de la membrana (figura 15), efecto específico, ya que es revertido por el antagonista CGP 35.348 (figura 15), lo que daría lugar a la activación de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje, entrada de Ca<sup>2+</sup> al citosol, y, en consecuencia, vertido de las CAs contenidas en los gránulos al exterior celular.

El efecto inhibitor del receptor GABA<sub>B</sub> de estas células sobre la secreción de CAs inducida por activación de los receptores nicotínicos y GABA<sub>A</sub> es también apoyado por un efecto inhibitorio paralelo del potencial de membrana y de los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular inducidos por estos agonistas (figura 16).

El receptor GABA<sub>B</sub>, por consiguiente, parece ser un receptor que participa en la función de la células cromafines teniendo efectos propio y modulando la actividad de otros

receptores. Estudiaremos, a continuación, los mecanismos de acción por los que estos receptores ejercen su función.

## ***2.2. Mensajeros intracelulares implicados en las respuestas funcionales de los receptores GABA<sub>B</sub> de las células cromafines bovinas***

### ***2.2.1. Implicación del AMPc***

Tras numerosos ensayos desde diferentes abordajes, hemos podido constatar la implicación del AMPc en los efectos secretores de los agonistas GABA<sub>B</sub>. Esta afirmación se basa en las siguientes evidencias experimentales:

- 1) Los agonistas GABA<sub>B</sub> inducen una elevación dependiente de la dosis de este nucleótido cíclico (Tesina de M. Parramón, 1991; Oset-Gasque et al., 1993). El incremento de AMPc parece ser debido a una estimulación directa de la proteína G<sub>s</sub>, activadora de la adenilato ciclasa (A.C.), ya que las toxinas bacterianas pertusis (que inhibe la proteína G<sub>i</sub>, inhibidora de A.C.) y colérica (activadora de la proteína G<sub>s</sub>) potencian o no afectan, respectivamente, la acción de los receptores GABA<sub>B</sub> sobre la secreción (Tesina de M. Parramón, 1991, Oset-Gasque et al., 1993). La activación de otras ciclasas, como la guanilato ciclasa, no parecen, sin embargo estar implicadas (figura 29).
- 2) Existe una correlación directa muy significativa entre los niveles de AMPc y la secreción de CAs inducidos por la acción de los agonistas GABA<sub>B</sub> (Figura 30).
- 3) Sustancias que elevan los niveles intracelulares de AMPc, como la forskolina, análogos no hidrolizables del AMPc y diversos agonistas que estimulan la adenilato ciclasa, producen un efecto similar al de los agonistas GABA<sub>B</sub> sobre la secreción de CAs (Tesina

## Discusión

de M. Parramón, 1991; Parramón et al., 1994d), así como sobre la despolarización de la membrana plasmática (figura 17) y la elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (figura 19)

Por las evidencias previas de la implicación de este nucleótido cíclico en el mecanismo de acción de los receptores  $\text{GABA}_B$  (reflejadas en la Tesina de M. Parramón), desde el inicio de los trabajos de investigación destinados a la elaboración de esta Tesis hemos realizado siempre en paralelo el estudio de los efectos de diversas sustancias que elevan los niveles intracelulares de AMPc junto al de los agonistas  $\text{GABA}_B$ , como se puede apreciar en el apartado de resultados (IV), por lo que en el presente apartado aparecerán muchas veces comentadas conjuntamente.

Este estudio conjunto nos llevó incluso a plantearnos la hipótesis del posible papel funcional del AMPc como mensajero intracelular implicado en la exocitosis de CAs en la médula adrenal, tema que quedaba sin resolver en la literatura existente. Para este estudio realizamos una serie de estimulaciones con sustancias que elevan los niveles de AMPc por estimulación de un receptor extracelular (VIP, agonistas adenosinérgico y  $\beta$ -adrenérgicos,  $\text{GABA}_B$ ) sólo o coestimulaciones de los mismos junto con la forskolina, que, como se ha indicado anteriormente produce una estimulación directa de la adenilato ciclasa. Al establecer los diagramas de correlación entre la secreción de CAs y los niveles de AMPc producidos en estas condiciones, observamos que el AMPc incrementaba la secreción de CAs de manera directa y acusada únicamente cuando sus niveles intracelulares no exceden de 3-4 veces los niveles basales (figura 31), como correspondería a una estimulación con agonistas  $\text{GABA}_B$ . Sin embargo, niveles superiores hacen que la correlación disminuya, hasta hacerse no significativa cuando los niveles de AMPc alcanzados exceden de 7 veces los basales (figura 31). De ello se deduce que el AMPc es un mensajero intracelular regulador de la secreción de CAs por las células cromafines, que ejerce sus acciones de forma dependiente de los niveles en los que se encuentre en ellas, como muy recientemente han observado también Morgan y col. (1993), quienes muestran que el AMPc tiene un efecto bifásico sobre la secreción en células permeabilizadas dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , produciendo un pico de secreción a concentraciones en torno a  $1 \mu\text{M}$  y volviendo a los niveles control a concentraciones de 1

mM. Ello podría estar relacionado con procesos de fosforilación-defosforilación, que compiten entre sí en su acción sobre canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje o proteínas del citoesqueleto implicadas en la secreción de CAs (Amstrong, 1989). Nuestros resultados podrían justificar también la alta variabilidad de resultados encontrados por los diferentes autores en las respuestas del AMPc en las células cromafines (Baker et al., 1985; Tsujimoto et al., 1986; Cheek & Burgoyne, 1987; Marriot et al., 1988; Morita et al., 1987a y b; Bott et al., 1991), lo que nos llevó a plantear este trabajo de investigación (Parramón et al., 1994d). No obstante, pese a todas las controversias, en la literatura encontramos trabajos en los que se ha observado que el uso de ciertas sustancias que producen AMPc, como el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Wilson et al., 1988) o el péptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria (PACAP) (Isobe et al., 1993) parecen incrementar la secreción de CAs en las células cromafines, como nosotros afirmamos.

### *2.2.2. Implicación del $\text{Ca}^{2+}$*

#### *2.2.2.1. Elevación de los niveles basales y regulación del $\text{Ca}^{2+}$ inducido por otros receptores*

La activación de los receptores  $\text{GABA}_B$  produce un incremento dependiente de la dosis de los niveles de intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . La  $\text{EC}_{50}$  de este efecto es de  $25 \pm 6 \mu\text{M}$  (APPA) o de  $60 \pm 10 \mu\text{M}$  (baclofén) (figura 18), concentraciones menores a las observadas para producir su efecto sobre la secreción de CAs. Esta diferencia podría explicarse porque se necesitaran mayores concentraciones de agonista para observar el efecto fisiológico, la secreción de CAs que para elevar el  $\text{Ca}^{2+}$ , por ser éste un primer eslabón del proceso que conduce a la exocitosis, o dicho de otra manera, que se necesite una determinada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y, por tanto, una dosis alta de agonista que lo incremente, para producir la secreción de CAs. Por esta razón, en nuestros experimentos usamos una dosis máxima de agonista ( $500 \mu\text{M}$ ) para asegurar un incremento máximo de  $\text{Ca}^{2+}$ .

El incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por activación de los receptores  $\text{GABA}_B$  es muy novedoso en la literatura, puesto que estos receptores se han ligado siempre a efectos fisiológicos inhibitorios, y en particular a una disminución de la conductancia del  $\text{Ca}^{2+}$  (Höslí et al., 1990). No obstante, recientes trabajos muestran que los receptores  $\text{GABA}_B$  incrementan los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos tipo I (Nilsson et al., 1993) o en las células granulosas del cerebelo (Erausquin et al., 1992).

Además de este incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , la activación de los receptores  $\text{GABA}_B$  así como la estimulación de las células con pClpAMPC o forskolina (que también originaron un incremento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , figuras 18 y 19), causaron una disminución en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por la activación de otros receptores, como nicotinos (figuras 27A y 28) y  $\text{GABA}_A$  (figura 27B y 28). Este resultado, junto con el de la misma inhibición paralela del potencial de membrana (figuras 16 y 17) confirma la idea de que los receptores  $\text{GABA}_B$  modulan la actividad de los receptores nicotínicos y  $\text{GABA}_A$  por fosforilación, idea reflejada en el esquema 15, apartado I.3.6.

Puesto que en el proceso de liberación de CAs están implicados una serie de acontecimientos, en los cuales el  $\text{Ca}^{2+}$  tiene un papel fundamental, quisimos realizar un estudio más profundo del origen de la elevación de  $\text{Ca}^{2+}$  producido por activación de los receptores  $\text{GABA}_B$  y, en paralelo, estudiar si el AMPC tenía unos efectos semejantes, lo que confirmaría nuestra hipótesis de que las acciones del receptor  $\text{GABA}_B$  discurren por la formación de este nucleótido cíclico.

### 2.2.2.2. Origen del $Ca^{2+}$ movilizado por agonistas $GABA_B$

Para estudiar si la elevación de  $[Ca^{2+}]_i$  producida por los agonistas  $GABA_B$  se debía a su entrada del medio extracelular o a su liberación de los depósitos intracelulares, procedimos a bloquear la entrada de  $Ca^{2+}$  del medio extracelular por diferentes estrategias experimentales. La primera fue adicionar EGTA 4 mM al medio, suficiente para quelar el  $Ca^{2+}$  extracelular y la segunda fue disminuir el  $Ca^{2+}$  extracelular a una concentración equimolar a la intracelular con una mezcla adecuada EGTA/ $CaCl_2$ . En ambos casos se observó una notable disminución de los niveles de  $Ca^{2+}$  inducidos por estas sustancias, lo que indicaba que la mayor parte del  $Ca^{2+}$  movilizado por los agonistas  $GABA_B$ , aproximadamente un 70 %, procedía del medio extracelular y el 30 % restante procedía de la liberación desde compartimentos intracelulares, por lo que procedimos a estudiar con detenimiento ambas contribuciones.

Para determinar la vía de entrada del  $Ca^{2+}$  a partir del medio extracelular, procedimos a bloquear su paso a través de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje mediante el uso de antagonistas específicos, nifedipina, para bloquear la entrada a través de los canales tipo L, y  $\omega$ -conotoxina, para bloquear la entrada a través de los de tipo N. El pretratamiento con nifedipina produjo una disminución de las concentraciones de  $Ca^{2+}$  intracelular semejante a la observada al quelar el  $Ca^{2+}$  extracelular con EGTA, mientras que con  $\omega$ -conotoxina no se observó una disminución significativa de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular, lo que indicaba que la entrada de  $Ca^{2+}$  producida por activación de los receptores  $GABA_B$  se realiza a través de un canal de  $Ca^{2+}$  dependiente de voltaje tipo L, mientras que el tipo N no interviene en la actividad de estos receptores. Este resultado contrasta con los de otros trabajos que afirman que los receptores  $GABA_B$  en el SNC interaccionan con los canales N (Huston et al., 1990), T (Scott et al., 1990) o P (Mintz & Bean, 1993) y no con los L, y con otros que afirman que el efecto de los agonistas  $GABA_B$  es aditivo con el de la nifedipina (Bowery et al., 1989). Sin embargo, concuerda con la idea de que el AMPc estimula la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de canales tipo L, como se ha demostrado en células  $\beta$ -pancreáticas (Ammala et al., 1993).

Además de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  del medio extracelular, nuestros resultados indicaban que existía también una cierta cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  que parecía proceder de la movilización de los depósitos intracelulares, y que era aproximadamente un tercio del total de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por activación del receptor  $\text{GABA}_B$ , que estudiamos a continuación.

Como habíamos indicado anteriormente, en las células cromafines adrenales, existen dos grandes compartimentos intracelulares que almacenan  $\text{Ca}^{2+}$ : uno de ellos es sensible a  $\text{IP}_3$ , asociado clásicamente al retículo endoplásmico, y el otro es el denominado sensible a cafeína, que participa en el mecanismo de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  o calcium-induced-calcium-release (CICR) (O'Sullivan & Burgoyne, 1989).

Para estudiar la contribución de cada uno de estos dos compartimentos intracelulares a la elevación de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  producida por agonistas  $\text{GABA}_B$ , procedimos a medir los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por los agonistas  $\text{GABA}_B$  en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, y tras la depleción del  $\text{Ca}^{2+}$  de depósitos intracelulares bien con la angiotensina II, clásico agente productor de  $\text{IP}_3$ , y por tanto movilizador del  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico, o con cafeína, que moviliza el  $\text{Ca}^{2+}$  del compartimento insensible a  $\text{IP}_3$ . Cada una de estas sustancias en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular fueron capaces de incrementar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares en diferente cuantía, siendo la cafeína algo más potente que angiotensina II (figuras 22B y C) y ambos más que los agonistas  $\text{GABA}_B$  (figura 22A). El pretratamiento con angiotensina II bloqueó totalmente la respuesta del APPA y del baclofén (figura 22B), mientras que el pretratamiento con cafeína no afectó la respuesta de estos agonistas, observando sólo una muy ligera disminución no significativa con respecto al efecto de los agonistas sin tratamiento previo con esta xantina (figura 22C). Esta pequeña disminución también fue observada sobre la respuesta de la angiotensina II al realizar el mismo pretratamiento (figura 22D), lo que apoya la idea de que en las células cromafines podría existir un compartimento mixto, sensible a la vez a cafeína y a  $\text{IP}_3$  (Pruss et al, 1991). La combinación de angiotensina II y cafeína, como era de esperar, bloqueó totalmente la respuesta del receptor  $\text{GABA}_B$  (figura 22C).

Por lo tanto, nuestros resultados indican que la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares producida por activación de los receptores  $\text{GABA}_B$  se realiza a partir del compartimento sensible a  $\text{IP}_3$ , resultado que ha sido confirmado por el hecho de que tanto el APPA como el baclofén fueron capaces de incrementar los niveles de  $\text{IP}_3$  de forma dependiente de la dosis (figura 23).

### 2.2.2.3. Relaciones entre el $\text{Ca}^{2+}$ y la respuesta secretora

Para estudiar la implicación del  $\text{Ca}^{2+}$  en la secreción de CAs inducida por activación de los receptores  $\text{GABA}_B$ , estudiamos la secreción de CAs producida por APPA y baclofén en presencia y en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. El efecto secretor se estudió tanto a tiempo real ( $t$ =segundos) como a tiempos más largos de estimulación ( $t$ =minutos), como se indica en Material y Métodos.

En medidas de secreción de CAs a tiempo real y en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular 2.5 mM, los agonistas incrementaron muy significativamente la secreción de CAs, pero en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  la secreción de CAs fue nula (figura 25), de lo que se deduce que el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular es absolutamente necesario para que se produzca la secreción. A tiempos más largos de incubación ( $t$  = 10 minutos) y en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, los agonistas  $\text{GABA}_B$  produjeron, un efecto secretor dependiente de la dosis (Oset-Gasque et al., 1993). Sin embargo, en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular la secreción fue muy pequeña, en torno a un 30 % de la obtenida en presencia del mismo (figura 24) y estadísticamente no significativa.

La diferencia entre los resultados sobre la secreción en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular obtenida a tiempo real o en periodos más largos de incubación se podría explicar por el modelo de exocitosis propuesto por Neher y Zucker (1993). Según estos autores, las vesículas de almacenamiento de CAs se dividen en tres diferentes grupos según su proximidad a la membrana plasmática. Así, las vesículas más alejadas producirán una

## Discusión

secreción más retardada, puesto que tienen que pasar sucesivamente por las diferentes "estaciones" de vesículas. Por ello pensamos que la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares en el caso de la estimulación a tiempos largos podría promover el movimiento de estas vesículas más lejanas, que irían aproximándose a la membrana plasmática y producirían finalmente una pequeña secreción. No obstante, en nuestro caso, la contribución de la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares no se puede considerar como importante en la respuesta secretora a la que dan lugar los receptores  $\text{GABA}_B$ , y esto lo demuestra el hecho de que no sea estadísticamente significativa y de que la correlación entre los valores de  $\text{IP}_3$  (responsable de la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$ ) y la secreción de CAs inducida por la activación de estos receptores tampoco sea significativa ni para el APPA (figura 31A) ni para el baclofén (figura 31B).

También otros autores han observado en células cromafines porcinas que la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducida por activación de los receptores muscarínicos, en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular disminuye aproximadamente 2/3 respecto a la conseguida en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (Xu et al., 1991) y este tratamiento disminuye la secreción un 70 % (Xu et al., 1992), resultados que son plenamente concordantes con los obtenidos en nuestro laboratorio (Parramón et al., 1994c). El Dr. N. Bowery, quien por primera vez mencionó la existencia de los receptores  $\text{GABA}_B$ , afirma que el receptor del SNC es comparable a los receptores  $A_1$  adenosinérgicos (Bowery, 1993). Nosotros hemos observado, sin embargo, una gran analogía entre las acciones mediadas por los receptores  $\text{GABA}_B$  en las células cromafines bovinas y las del receptor muscarínico de diversas especies (porcina, canina, felina) en lo que respecta a la dependencia del  $\text{Ca}^{2+}$  en la secreción de CAs (Xu et al., 1992; Ohtsuki et al., 1992) e incluso en su capacidad de despolarizar las células (Uceda et al., 1992).

Otra respuesta del receptor  $\text{GABA}_B$  estudiada paralelamente en ausencia y en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular fue la formación de AMPc. La ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular disminuyó notablemente la formación de AMPc inducido por agonistas  $\text{GABA}_B$ , lo que sugiere la existencia de una estrecha relación entre ambos segundos mensajeros. Esta relación se podría establecer a varios niveles, como comentamos a continuación.

### ***2.2.3. Interrelaciones funcionales entre los mensajeros intracelulares inducidos por activación de los receptores GABA<sub>B</sub> en las células cromafines: mecanismo de acción molecular propuesto.***

Los resultados de esta Tesis apuntan a que tanto el  $\text{Ca}^{2+}$  como el AMPc parecen ser los segundos mensajeros que median la respuesta de los receptores GABA<sub>B</sub> sobre la secreción de CAs y que existe una correlación directa entre la secreción de CAs tanto con los niveles de AMPc, como con las elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular promovidos por los agonistas GABA<sub>B</sub>, (figura 30). Las relaciones entre ambos segundos mensajeros han sido ampliamente discutidas en la literatura científica. Hemos intentado recoger aquí algunos de los niveles en los que estos mensajeros se relacionan o entrecruzan sus mecanismos.

En cuanto al AMPc, está descrito que este segundo mensajero puede fosforilar, por activación de la PKA, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (Chern et al., 1988). De hecho, en células  $\beta$ -pancreáticas se ha visto que el AMPc estimula el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales tipo L (Ammala et al., 1993). No obstante, algunos autores sugieren que esta fosforilación puede no ser suficiente para abrirlos. Ya que los canales son activados fisiológicamente por cambios en el voltaje, es lógico pensar que haya una despolarización previa a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los mismos. Esta despolarización podría ocurrir por un incremento en la concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular, debido a que la PKA puede fosforilar la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, inhibiéndola (Lingham & Sen, 1982; Morita et al., 1991b). El aumento de  $\text{Na}^+$  intracelular podría promover, además, la inversión del transportador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , con el consiguiente incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Morita et al., 1991a). Estos mecanismos apoyan nuestro resultado de que el AMPc es capaz de producir por sí mismo incrementos en el potencial de membrana, incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, y, como consecuencia, estimulación de la secreción de CAs. Sin embargo, Morita y col. no observan que el AMPc tenga efecto alguno sobre la secreción basal de CAs (Morita et al., 1987a).

## *Discusión*

El AMPc, por activación de la PKA también podría activar otros canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que no fueran dependientes de voltaje, como los canales tipo G (Ceña et al., 1991), los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  "facilitadores", que contribuyen al incremento de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Artalejo et al., 1990), facilitando los procesos celulares dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , como la exocitosis u otros canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados directamente por AMPc similares a los del bulbo olfatorio (Kurahashi, 1990), aunque la presencia de estos últimos canales no se ha estudiado todavía en las células cromafines.

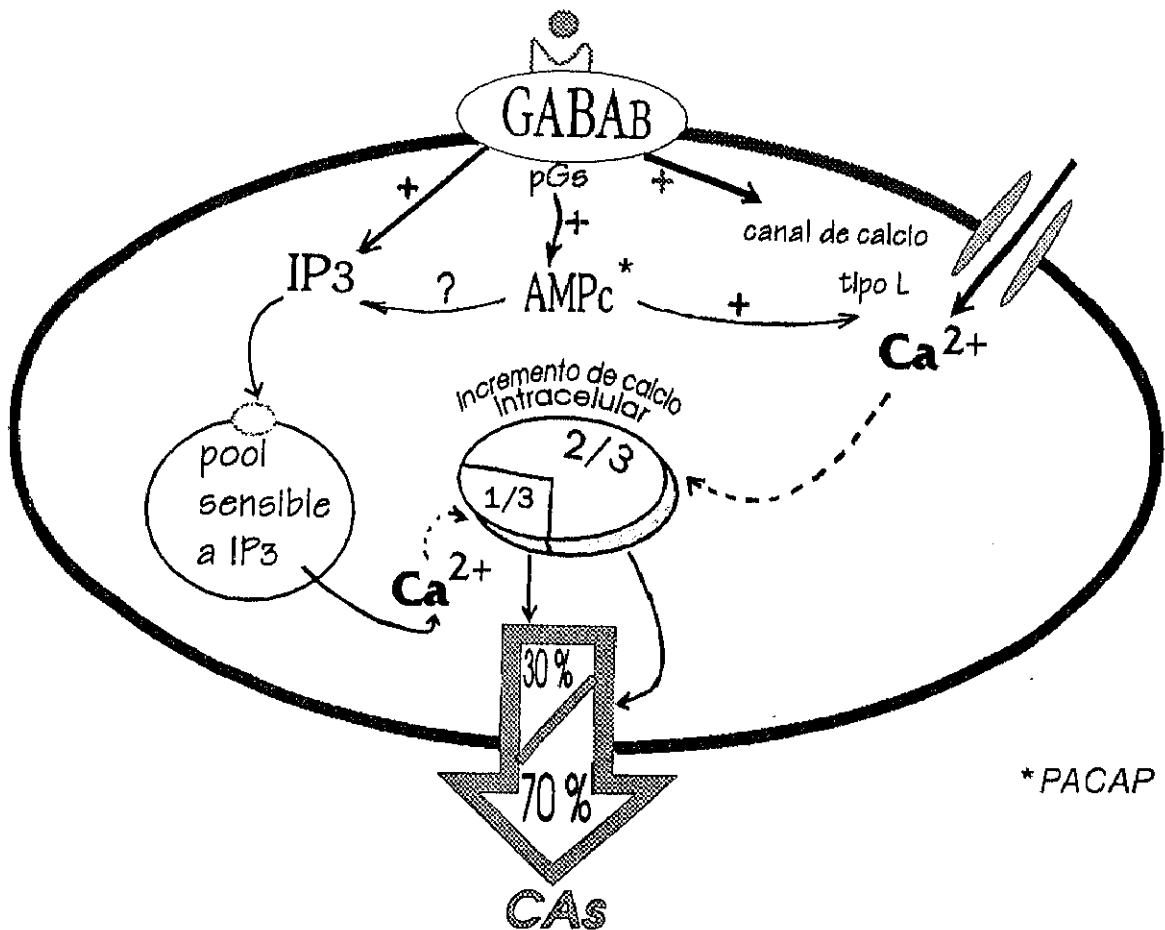
Por último, los efectos del AMPc podrán relacionarse con el bloqueo de los canales de  $\text{K}^+$  implicados en el mantenimiento del potencial de reposo de las membrana, lo que conduciría a una activación inmediata de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. Este mecanismo ha sido demostrado recientemente por González y col. (1993), que observan cómo el bloqueo de la corriente de salida del  $\text{K}^+$  con tetraetilamonio produce una despolarización de la membrana de la célula cromafín, elevación sustancial de  $[\text{Ca}^{2+}]$  citosólica e incremento dependiente de la dosis de la secreción de CAs, siendo estos efectos bloqueados parcialmente por nifedipina y mejorados por BAY K 8644.

Además de estos mecanismos tempranos, la fosforilación de proteínas por PKA podría afectar algunas proteínas del citoesqueleto implicadas en la exocitosis de las CAs en un eslabón posterior a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y ayudar así a mantener un conjunto de gránulos de liberación rápida, probablemente por afectar directamente su movilización o su fusión con la membrana plasmática, contribuyendo a la amplificación de la exocitosis dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células cromafines. Estos mecanismos podrían estar relacionados con la despolimerización de la red de actina que podría permitir la aproximación de los gránulos a los sitios de anclaje en la membrana plasmática o la separación de proteínas similares a la sinapsina de la membrana vesicular de su anclaje a los microfilamentos de actina que unen los gránulos al citoesqueleto (Llinás et al., 1991).

Por su parte, el  $\text{Ca}^{2+}$  podría también incrementar la producción de AMPc, por activación de una isoenzima de la adenilato ciclasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, (Keogh & Marley,

1991), ya que estos autores han observado que el  $\text{Ca}^{2+}$  no inhibe la degradación del AMPc ni su salida de la célula. En nuestro caso, observamos este efecto cuando impedimos la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, y obtenemos un incremento menor en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por activación de los receptores  $\text{GABA}_B$ . En estas circunstancias, el AMPc también sufre un menor incremento respecto al obtenido en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , pero curiosamente, se mantiene la misma proporción de disminución en el AMPc y en el  $\text{Ca}^{2+}$ . Por ello pensamos que los incrementos en el AMPc y en el  $\text{Ca}^{2+}$  no son acontecimientos aislados, y que uno y otro se entrecruzan a diferentes niveles y se potencian; de hecho, como hemos comentado anteriormente existe una correlación estadísticamente significativa entre el AMPc y el  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 30).

Si quisieramos establecer un orden de acontecimientos, según nuestros datos, el AMPc iniciaría los pasos necesarios para producir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, que sería el máximo responsable de la secreción. Por su parte, el  $\text{Ca}^{2+}$  elevado podría: activar la PLC, ya que es una enzima dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , producir la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares y estimular la adenilato ciclasa dependiente de  $\text{CaCaM}$  produciendo un incremento adicional del AMPc, lo que tendría una contribución adicional pequeña a la secreción. El mecanismo por el cual el AMPc produciría la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares sería por un incremento del  $\text{IP}_3$ , ya que aunque el receptor de  $\text{IP}_3$  tiene un sitio de fosforilación inactivante por PKA, se ha visto que diferentes sistemas acoplados a proteínas Gs, lo están también a proteínas G relacionadas con la fosfolipasa C (Delporte et al., 1993). Más aún, se conoce que el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP), que incrementa los valores de AMPc en células cromafines porcinas, produce además un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, procedente tanto del medio extracelular como de compartimentos intracelulares y un incremento en los valores de  $\text{IP}_3$  (Isobe et al., 1993). Todos estos mecanismos se reflejan en el esquema 18.



**Esquema 18.** Modelo del mecanismo de acción propuesto para los receptores GABA<sub>B</sub> en las células cromafines bovinas y su relación con la secreción. La activación de los receptores GABA<sub>B</sub> produce la apertura de los canales de Ca<sup>2+</sup> dependiente de voltaje tipo L y una salida de los depósitos intracelulares sensibles a IP<sub>3</sub>, cuya contribución respectiva es 2/3 y 1/3 del total del Ca<sup>2+</sup> incrementado por los agonistas GABA<sub>B</sub>. La activación de estos receptores produce además la formación de AMPc por activación de las proteínas Gs que activan la adenilato ciclasa. El AMPc produce también una entrada de Ca<sup>2+</sup> por los mismos canales tipo L. Todo ello conduce a una elevación de la secreción de CAS, en los porcentajes que se detallan en la figura. Acciones similares se han descrito para el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria (PACAP) (Isobe et al., 1993). Esquema tomado de Parramón et al., 1994b.

### ***2.3. Modulación de la actividad de los receptores GABA<sub>B</sub> por fosforilación***

Los receptores GABA<sub>B</sub> parecen ser modulados por fosforilación por PKA y PKC en el SNC (Kamatchi et al., 1990), disminuyendo su actividad. Nuestros resultados parecen confirmar que también la fosforilación de los receptores GABA<sub>B</sub> en las células cromafines tanto por la PKA (figura 33) como por la PKC (figura 34) es capaz de inhibir su acción. La inhibición por PKC comprobamos que era específica, ya que la estaurosporina, un inhibidor de la PKC previno el efecto inhibitorio del TPA (activador de la PKC) sobre la acción secretora de los agonistas GABA<sub>B</sub> (figura 35).

Estos resultados indican que, a pesar de las diferencias encontradas entre los receptores GABA<sub>B</sub> de las células cromafines y los de otros tipos celulares con respecto a su mecanismo de acción, la regulación de estos receptores parece ser común. Si se tiene en cuenta que los receptores adrenales incrementan los niveles de AMPc, surge la interesante posibilidad de que estos receptores se puedan autorregular.

### ***2.4. Comentarios finales***

El receptor GABA<sub>B</sub> de las células cromafines de la médula adrenal no había sido anteriormente muy estudiado en la literatura. En los últimos años, tras la confirmación de su presencia en la médula adrenal (Martínez et al., 1987; Castro et al., 1988) y su posible funcionalidad (Castro et al., 1989), tan sólo ha aparecido un trabajo de Doroshenko y Neher (1991) en el que se estudiaban los efectos de la activación de los receptores GABA<sub>B</sub> sobre las corrientes de Ca<sup>2+</sup> por técnicas de patch-clamp, cuyos resultados coincidían con los nuestros en cuanto a que la activación de estos receptores disminuye la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducida (Oset-Gasque et al., 1993), en su caso por K<sup>+</sup> (Doroshenko & Neher, 1991).

## *Discusión*

El mecanismo de acción de los receptores GABA<sub>B</sub> de la médula adrenal es, como hemos detallado, diferente del observado para los mismos receptores en el SNC. Sin embargo, las respuestas de este receptor son muy variables de unos tejidos a otros, y se han justificado reiteradamente en la literatura por la heterogeneidad de receptores GABA<sub>B</sub> existente (Bonnano & Raiteri, 1993). Hasta el momento, no se ha podido profundizar en el estudio de su estructura, ya que sólo se ha comenzado la purificación por inmutofinidat de los receptores de la corteza cerebral, disponiéndose actualmente de anticuerpos monoclonales específicos que podrán permitir la mejor caracterización de la estructura del receptor (Nakayasu et al., 1993; Kuriyama et al., 1993). El uso de las herramientas que ofrece la Biología Molecular será sin duda de gran ayuda en el futuro para esclarecer la heterogeneidad de los receptores GABA<sub>B</sub> tanto del SNC como del SNP, así como la diversidad de respuestas funcionales de los mismos.

## ***VI. CONCLUSIONES***

---

El presente estudio de los mecanismos de acción y características de los receptores de GABA (GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>) en las células cromafines de médula adrenal bovina ha dado lugar a las siguientes conclusiones:

1º.- Los receptores GABA<sub>A</sub> de las células cromafines de la médula adrenal bovina estimulan la secreción basal de CAs. Esta función es modificada por diversos fármacos conocidos moduladores de la actividad de los mismos receptores en el SNC, como son las benzodiazepinas (BZ),  $\beta$ -carbolinas, barbitúricos y esteroides neuroactivos, no teniendo ninguno de estos compuestos por sí mismo efecto sobre la secreción basal. Los efectos moduladores son potenciadores o, en algunos casos, inhibidores, dependiendo de la concentración de muscimol utilizada.

2º.- Los ensayos de unión al equilibrio de BZ y  $\beta$ -carbolinas indican que estas sustancias se unen específicamente con una alta afinidad a membranas de médula adrenal, con  $K_D$  similares a las del cerebro. Estos resultados junto a los de secreción muestran que se trata de un receptor de BZ de tipo central, sin descartarse la posible existencia de un receptor de BZ de tipo periférico, aunque éste no parece participar en la regulación de la secreción basal de CAs.

3º.- El receptor GABA<sub>A</sub> de la médula adrenal está compuesto estructuralmente por las siguientes subunidades:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_4$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma_2$  y carece de las subunidades  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  y  $\alpha_6$ . Esta estructura molecular le confiere unas ciertas características farmacológicas teóricas que coinciden con las encontradas experimentalmente. Por contener la subunidad  $\alpha_1$  es un receptor de tipo BZ1, con alta afinidad por las  $\beta$ -carbolinas. La presencia de dos tipos distintos de subunidades  $\alpha$ , tres  $\beta$  y una  $\gamma$ , hace pensar la posible existencia de receptores heterogéneos en las células cromafines, que podrían estar presentes en los distintos tipos celulares cromafines.

## Conclusiones

4º.- El receptor GABA<sub>B</sub> de las células cromafines de la médula adrenal bovina modula específicamente la secreción basal de CAs en dichas células, así como la respuesta secretora y la funcionalidad de otros receptores como los colinérgicos nicotínicos y los de GABA<sub>A</sub>. El mecanismo de acción molecular por el que lleva a cabo su función está relacionado con la generación de los segundos mensajeros: AMPc y Ca<sup>2+</sup>, cuyos incrementos se correlacionan directamente con los efectos secretores producidos por estimulación de las células con agonistas GABA<sub>B</sub>. Ambos mensajeros intracelulares interaccionan entre sí para producir la respuesta secretora. La elevación de Ca<sup>2+</sup> intracelular llevada a cabo por los agonistas GABA<sub>B</sub> se ejerce principalmente por influjo del mismo a través de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje de tipo L y por una pequeña movilización de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico, causado por el incremento en los niveles de IP<sub>3</sub> que producen estos agonistas. El IP<sub>3</sub> no parece relacionarse con la respuesta secretora. Otro mensajero intracelular, el GMPc, no parece intervenir en la acción de los receptores GABA<sub>B</sub>.

5ª.- El AMPc tiene por sí mismo un efecto activador de la secreción basal de CAs en células cromafines bovinas y un efecto inhibitor de la secreción inducida por activación de receptores colinérgicos nicotínicos y de GABA<sub>A</sub>. El efecto secretor del AMPc depende estrechamente de los niveles intracelulares del mismo, siendo positivo sólo en los casos en los que se eleva hasta 3-4 veces sus niveles basales. Esto podría explicar los resultados conflictivos existentes en la literatura sobre este tema.

6º.- Los receptores GABA<sub>B</sub> parecen regularse por fosforilación por PKA y PKC.

***VII.***

***BIBLIOGRAFIA***

---

- Akaike, N. & Oomura, Y. (1984).** GABA activated chloride channels in internally perfused dorsal root ganglion cell. *Biomed. Res.*, 5(Supp):115-132.
- Akaike, N.; Hattori, K.; Inomata, N. & Oomura, Y. (1985).**  $\gamma$ -aminobutyric acid and pentobarbitone gated chloride currents in internally perfused frog sensory neurone. *J. Physiol.*, 360:367-386.
- Alberts, B.; Deunis, B.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D. (1989)** *Molecular Biology of the Cell.* Garland Publishing, Inc., New York & London. Robertson, ed. Pag 695.
- Albuquerque, E.X.; Deshpande, S.S.; Aravaca, Y. Alkondon, M. & Daly, J.W. (1986).** *FEBS lett.*, 199:113-120.
- Ali, S.M.; Geisow, M.J. & Burgoyne, R.D. (1989).** A role for calpactin in calcium-dependent exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Nature*, 340:313-315.
- Allsup, D.J. & Boarder, M.R. (1990).** Comparison of  $P_2$  purinergic receptors of aortic endothelial cells with those of adrenal medulla: evidence for heterogeneity of receptor subtype and inositol phosphate response. *Mol. Pharmacol.*, 38:84-91.
- Ammala, C.; Ashcroft, F.M. & Rorsman, P. (1993)** Calcium-independent potentiation of insulin release by cyclic AMP in single beta-cells. *Nature*, 363(6427):356-358.
- Armstrong, D.L. (1989)** Calcium channel regulation by calcineurin, a calcium-activated phosphatase in mammalian brain. *Trends in Neurosci.*, 12:117-122.
- Amy, C.M. & Kirshner, N. (1981).** Phosphorylation of adrenal medulla cell proteins in conjunction with stimulation of catecholamine secretion. *J. Neurochem.*, 36:847-854.
- Andrade, R.; Malenka, R.C. & Nicoll, R.A. (1986).** A G protein couples serotonin and GABA<sub>B</sub> receptors to the same channels in hippocampus. *Science*, 234:1261-1265.
- Araki, T. & Toluyama, M. (1992)** Region-specific expression of GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha_3$  and  $\alpha_5$  subunit mRNAs in the rat brain. *Molec. Brain Res.*, 12:293-314.
- Artalejo, C.; Ariano, M.A.; Perlman, R.L. & Fox, A.P. (1990).** Activation of facilitation calcium channels in chromaffin cells by D<sub>1</sub> dopamine receptors through a cAMP/protein kinase A-dependent mechanism. *Nature*, 348:239-242.
- Artalejo, C.R.; Dahmer, M.K.; Perlman, R.L.; Fox, A.P. (1991).** Two types of Ca<sup>2+</sup> currents are found in bovine chromaffin cells: facilitation is due to the recruitment of one type. *J. of Physiol.*, 432:681-707.
- Asakawa, T; Enomoto, K & Takano, M. (1993)** Structure of adenylate cyclase and the coupling with the receptor-G protein system. *Nippon- Yakurigaku-Zasshi*, 101(2):59-68.
- Asano, T.; Ui, M. & Ogasawara, N. (1985).** Prevention of the agonist binding to  $\gamma$ -aminobutyric acid B receptors by guanine nucleotides and islet-activating protein, pertussis toxin, in bovine cerebral cortex. *J. Biol. Chem.*, 260:12653-12658.
- Aunis, D.; Hesketh, J.E. & Devilliers, G. (1979).** Freeze-fracture study of the chromaffin cell during exocytosis: evidence for connections between the plasma membrane and secretory granules and for movements of plasma membrane-associated particles. *Cell Tiss. Res.*, 197:433-441.

## *Bibliografía*

- Aunis, D. & Perrin, D. (1984).** Chromaffin granule membrane F-actin interactions and spectrin-like protein of subcellular organelles: a possible relationship. *J. Neurochem.*, 42:1558-1569.
- Aunis, D.; Perrin, D. & Langley, O.K. (1986).** Stimulus-secretion coupling in chromaffin cells. Rosenberg, K., Kelkes, P., eds. CRC. Press Boca Ratón USA.
- Bader, M.F.; Ciesielski-Treska, J.; Thierse, D.; Hesketch, J.E. & Aunis, D. (1981).** Immunocytochemical study of microtubules in chromaffin cells in culture and evidence that tubulin is not an integral protein of the chromaffin granule membranes. *J. Neurochem.*, 37:917-933.
- Bader, M.F. & Aunis, D. (1983).** The 97-kD- $\alpha$ -actinin-like protein in chromaffin granule membranes from adrenal medulla: evidence for location on the cytoplasmic surface and for binding to actin filaments. *Neuroscience*, 8:165-182.
- Bader, M.F.; Georges, E.; Mushynski, W.E. & Trifaró, J.M. (1984).** Neurofilament proteins in cultured chromaffin cells. *J. Neurochem.*, 43:1180-1193.
- Bader, M.F.; Trifaro, J.M.; Langley, O.K.; Thierse, D. & Aunis, D. (1986a).** Secretory cell actin binding proteins: identification of a gelsolin-like protein in chromaffin cells. *J. Cell Biol.*, 102:636-646.
- Bader, M.F.; Thierse, D.; Aunis, D.; Ahnert-Hilger, G. & Gratzl, M. (1986b).** Characterization of hormone and protein release from  $\alpha$ -toxin-permeabilized chromaffin cells in primary culture. *J. Biol. Chem.*, 261:5777-5783.
- Bader, M.F.; Sontag, J.M.; Thierse, D. & Aunis, D. (1989).** A reassessment of guanine nucleotide effects on catecholamine secretion from permeabilized adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.*, 264 (28):16426-16434.
- Baker, E.M.; Cheek, T.R. & Burgoyne, R.D. (1985)** cAMP inhibits secretion from bovine adrenal chromaffin cells evoked by carbamylcholine but not by high  $K^+$ . *Biochim. Biophys. Acta*, 846:388-393.
- Ballesta, J.J.; Palmero, M.; Hidalgo, M.J.; Gutierrez, L.M.; Reig, J.A.; Viniagra, S. & Garcia, A.G. (1989).** Separate binding and functional sites for  $\omega$ -conotoxin and nitrendipine suggest two types of calcium channels in bovine chromaffin cells. *J. Neurochem.*, 53:1050-1056.
- Barnard, E.A.; Darlinson, M.G. & Seeburg, P. (1987).** Molecular biology of the GABA<sub>A</sub> receptor: the receptor/channel superfamily. *Trends Neurosci.*, 10:502-508.
- Beavo, J.A. & Reifsnyder, D.H. (1990).** Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. *Trends in Pharmacol. Sci.*, 11:150-155.
- Benke, D.; Mertens, S.; Treciak, A.; Gillesse, D.; Mohler, H. (1991)** Identification and immunohistochemical mapping of GABA<sub>A</sub> receptor subtypes containing the  $\delta$ -subunit in rat brain. *FEBS*, 283(1):145-149.
- Bernier-Valentin, F.; Aunis, D. & Rousse, B. (1983).** Evidence of tubulin-binding sites on cellular membranes: Plasma membranes, mitochondrial membranes and secretory granule membranes. *J. Cell Biol.*, 97:209-216.
- Berridge, M.J. (1993)** Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361:315-325.

## *Bibliografia*

- Bigornia, L.**; Snozzo, M.; Ryan, K.A. & Schneider, A.S. (1988). Dopamine receptors on adrenal chromaffin cells modulate calcium uptake and catecholamine release. *J. Neurochem.*, 51:999-1006.
- Birnbaumer, L.**; Cadina, J.; Mattera, R.; Yatani, A.; Schierer, N.; Toro, M.J. & Brown, A.M. (1987) "Signal trasduction by G-proteins" *Kidney Int.*, 32:514-539.
- Blaschko, H.** & Welc, A.D. (1953). *Naunyn-Schmiederbergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 219:17-22.
- Bittner, M.A.** & Holz, R.W. (1990). Phorbol esters enhance exocytosis from chromaffin cells by two mechanisms. *J. Neurochem.*, 54:205-210.
- Blaxter, T.J.**; Carlen, P.L.; Davies, M.F. & Kujtan, P.W. (1986).  $\gamma$ -aminobutyric acid hyperpolarizes rat hippocampal pyramidal cells through a calcium-dependent potassium conductance. *J. Physiol.*, 373:181-194.
- Bonanno, G.** & Raiteri, M. (1993) Gamma-aminobutyric acid (GABA) autoreceptors in rat cerebral cortex and spinal cord represent pharmacologically distinct subtypes of the GABA<sub>B</sub> receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 265(2): 765-770.
- Bormann, J.** (1988). Electrophysiology of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor subtypes. *Trends Neurosci.*, 11:112-116.
- Bormann, J.** & Clapham, D.E. (1985).  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor channels in adrenal chromaffin cells: a patch clamp study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:2118-2122.
- Bott, M.**; Chern, Y.J. & Westhead, E.W. (1991). cAMP is not an intermediate in the inhibition of chromaffin cell secretion by cholera toxin. 6<sup>th</sup> International Symposium on chromaffin cell Biology. Marburg, Alemania.
- Bowery, N.G.**; Hill, D.R.; Hudson, A.L.; Doble, A.; Middlemiss, D.N.; Shaw, J.S. & Turnbull, M.J. (1980). (-)Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature*, 283:92-94.
- Bowery, N.G.** (1983). Clasification of the GABA receptors. En: "The GABA receptors" (S.J. Enna, Ed.). pag 177-213. The Human Press, Clifton, New Jersey.
- Bowery, N.G.** (1989). GABA<sub>B</sub> receptors and their significance in mammalian pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.*, 10:401-407.
- Bowery, N.G.**; Hill, D.R.; Moratlla, R.; Price, G.W. & Williams, L.C. (1989) GABA receptor characterization in mammalian brain. In GABA<sub>B</sub>: basic research and clinical applications. N.G. Bowery, ed. Nisticó, pp 24-58. Rome: Pythagora.
- Bowery, N.G.** (1992). GABA receptors inside and outside the brain. En: GABA outside the CNS. S. Erdő (ed). Springer-Verlag. Printed in USA. Pags: 215-232.
- Bowery, N.G.** GABA<sub>B</sub> receptor pharmacology (1993) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 33:109-147.
- Brooks, J.C.** & Carmichael, S.W. (1987) Ultrastructural demonstration of exocytosis in intact and saponi-permeabilized cultured bovine chromaffin cells. *Am. J. Anat.*, 178:85-89.

## *Bibliografía*

- Burgoyne, R.D. & Geisow, M.J. (1982).** Phosphoproteins of the adrenal chromaffin granule membrane. *J. Neurochem.*, 39:1387-1396.
- Burgoyne, R.D.; Barrow, J. & Geisow, M.J. (1983).** Cytochemical localization of calcium binding sites in adrenal chromaffin cells and their relation to secretion. *Cell Tiss. Res.*, 229:207-217.
- Burgoyne, R.D. (1984).** Mechanisms of secretion from adrenal chromaffin cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 779:201-216.
- Burgoyne, R.D. & Cheek, T.R. (1986).** Third Int. Symp. Chromaffin Cell Biol., Coolfont, West Virginia USA. pS18.
- Burgoyne, R.D.; Cheek, T.R. & Norman, K.M. (1986).** Identification of a secretory granule-binding protein as caldesmon. *Nature*, 319:68-70.
- Burgoyne, R.D. (1987).** G-proteins. Control of exocytosis. *Nature*, 328:112-113.
- Burgoyne, R.D. (1988).** Calpactin in exocytosis?. *Nature*, 331:20.
- Burgoyne, R.D.; Morgan, A. & O'Sullivan, A.J. (1988).** A major role for protein kinase C in calcium activated exocytosis in permeabilized adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett.*, 238:151-155.
- Burgoyne, R.D. & Geisow, M.J. (1989).** The annexin family of calcium-binding proteins. *Cell Calcium*, 10:1-10.
- Burgoyne, R.D.; Morgan, A. & O'Sullivan, A.J. (1989a).** The control of cytoskeletal actin and exocytosis in intact and permeabilized adrenal chromaffin cells: Role of calcium and protein kinase C. *Cell Signalling*, 1:323-334.
- Burgoyne, R.D.; Morgan, A. & O'Sullivan, A.J.; Moreton, R.D.; Berridge, M.J.; Mata, A.M.; Colyer, J.; Lee, A.G.; East, J.M. (1989b).** Distribution of two distinct  $Ca^{2+}$ -ATP-ase-like proteins and their relationships to the agonist-sensitive calcium store in adrenal chromaffin cells. *Nature (London)*, 342:72-74.
- Burgoyne, R.D. (1991).** Control of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1071:174-202.
- Burt, D.R. & Kamatchi, G.L. (1991)** GABA<sub>A</sub> receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *FASEB J.*, 5:2916-2923.
- Canat, X.; Carayon, P.; Bouaboula, M.; Cahard, D.; Shire, D.; Roque, C.; Le-Fur, G. & Casellas, P. (1993)** Distribution profile and properties of peripheral-type benzodiazepine receptors on human hemopoietic cells. *Life Sci.*, 52(1):30-34.
- Carmichael, S.W. (1989)** The histoty of the adrenal medulla. *Reviews in the Neurosci.*, 2(2):83-99.
- Carvalho, M.H.; Prat, J.C.; Garcia, A.G. & Kirpekar, S.M. (1982).** Ionomycin stimulates secretion of catecholamines from cat adrenal gland and spleen. *Am. J. Physiol.*, 42:E137-E145.
- Casalotti, S.O.; Stephenson, F.A. & Barnard, E.A. (1986).** Separate subunits for agonist and benzodiazepine binding in the  $\gamma$ -aminobutyric acid A receptors. *J. Biol. Chem.*, 261:15013-15016.

## Bibliografía

- Casalotti, S.O.**; Pelaia, G.; Yakovlev, A.G.; Csikos, T.; Grayson, D.R. & Krueger, K.E. (1992) Structure of the rat gene encoding the mitochondrial benzodiazepine receptor. *Gene*, 121(2):377-382.
- Castro, E.**; Oset-Gasque, M.J.; Cañadas, S.; Giménez, A. & González, M.P. (1988). GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> sites in bovine adrenal medulla membranes. *J. Neurosci. Res.*, 20:241-245.
- Castro, E.**; Oset-Gasque, M.J. & González, M.P. (1989). GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors are functionally active in regulation of catecholamine secretion by bovine chromaffin cells. *J. Neurosci. Res.*, 23:290-296.
- Castro, E.**; Torres, M.; Miras-Portugal, M.T. & González, M.P. (1990). Effect of diadenosine polyphosphates on catecholamine secretion from isolated chromaffin cells. *Br. J. Pharmacol.*, 100:360-364.
- Castro, E.** (1990). Mecanismos de modulación GABAérgica en células cromafines bovinas. Memoria para optar al grado de Doctor en Farmacia. Facultad de Farmacia. Madrid.
- Castro, E.**; Tomé, A.R.; Miras-Portugal, M.T. & Rosário, L.M. (1994) Single-cell fura-2 microfluorometry reveals different purinceptor subtypes coupled to Ca<sup>2+</sup> influx and intracellular Ca<sup>2+</sup> release in bovine adrenal chromaffin and endothelial cells. *Eur. J. Physiol.*, 426:524-533.
- 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 a direct activation of L-type and G-type calcium channels. *J. Membrane Biol.*, 122:23-31.
- Chahl, L.A.** & Walker, S.B. (1980). The effect of baclofen on the cardiovascular system of the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 69:631-637.
- Chapman, R.W.**; Hey, J.A.; Rizzo, C.A. & Bolser, D.C. (1993) GABA<sub>B</sub> receptors in the lung. *Trends Pharmacol. Sci.*, 14(1):26-29.
- Cheek, T.R.** & Burgoyne, R.D. (1987) Cyclic AMP inhibits both nicotine-induced actin disassembly and catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.*, 262:11663-11666.
- Cheek, T.R.**; Burgoyne, R.D. & Berridge, M.J. (1991) in *Methodological Surveys in Biochemistry and Analysis*, Vol. 20 (Reid, E. Cook, G.M.W. and Luzio, J.P., eds.), Royal Society of Chemistry.
- Chen, Q.X.**; Stelzer, A.; Kay, A.R. & Wong, R.K.S. (1990). GABA<sub>A</sub> receptor function is regulated by phosphorylation in acutely dissociated quinea-pig hippocampus neurones. *J. Physiol.*, 420:207-221.
- 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-isoquinilinsulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.*, 265(9):5267-5272.
- Cobbold, P.H.**; Cheek, T.R.; Cuthbertson, K.S.R. & Burgoyne, R.D. (1987). Calcium transients in single adrenal chromaffin cells detected with aequorin. *FEBS Lett.*, 211:44-48.

## ***Bibliografia***

- Cohen, P.** (1982). The role of protein phosphorylation in the neural and hormonal control of cellular activity. *Nature*, 296:613-620.
- Costa, E.; Gudotti, A.; Hanbauer, I. & Saiani, L.** (1983). Modulation of nicotinic receptor function by opiate recognition sites highly selective for met 5-enkephalin[Arg 6 Phe 7]. *Federation Proc.*, 42:2946-2952.
- Cottrell, G. A.; Lambert, J.J. & Peters, J.A.** (1987) Modulation of GABA<sub>A</sub> receptor activity by alphaxalone. *Br. J. Pharmacol.*, 90:491-500.
- Creutz, C.E.** (1992) The annexins and exocytosis. *Science*, 258:924-931.
- Dahl, D.; Bignami, A.** (1986). Neurofilament phosphorylation in development. A sign of axonal maturation. *Expl. Cell Res.*, 162:220-230.
- Davidson, F.F.; Dennis, E.A.; Powell, M. & Glenney, J.R.** (1987). Inhibition of phospholipase A<sub>2</sub> by lipocortins and calpactin. *J. Biol. Chem.*, 262:1698-1705.
- Delporte, C.; Praet, A.; Herchuelz, A.; Winnand, J. & Christophe, J.** (1993) Contrasting effects of PACAP and carbachol on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and inositol phosphates in human neuroblastoma NB-OK-1 cells. *Peptides*, 14:1111-1118.
- Delaure, C.; Lebulenger, F.; Morra, M.; Hiry, F.; Verhofstad, A.S.; Berod, A.; Denoroy, L.; Pelletier, G. & Vaudry, H.** (1988). Immunohistochemical and biochemical evidence for the presence of serotonin in amphibian adrenal chromaffin cells. *Brain Res.*, 459:17-26.
- Del Tacca, M.; Blandizzi, C. & Bernatini, M.C.** (1990) Central GABA<sub>A</sub> excitatory and GABA<sub>B</sub> inhibitory receptors regulate gastric acid secretion in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 177:189-194.
- Desarmenien, M.; Desaaules, E.; Feltz, P. & Hamann, M.** (1987). Electrophysiological study of SR42641, a novel aminopyridazine derivative of GABA: antagonist properties and receptor selectivity of GABA<sub>A</sub> versus GABA<sub>B</sub> responses. *Br. J. Pharmacol.*, 90:287-298.
- Dipolo, R. & Beaugé, L.** (1988). Ca<sup>2+</sup> transport in nerve fibers. *Biochim. Biophys. Acta*, 947:549-569.
- Doble, A. & Martin, J.L.** (1992) Multiple benzodiazepine receptors: no reason for anxiety. *Trends Pharmacol. Sci.*, 13:76-81.
- Dohi, T.; Morita, K.; Kitayama, S. & Tsujimoto, A.** (1986). Forskolin enhancement of acetylcholine-evoked cyclic AMP formation and catecholamine release in perfused dog adrenals. *J. Neural. Transm.*, 67:57-66.
- Dolphin, A.C. & Scott, R.H.** (1987). Calcium channel currents and their inhibition by (-)baclofen in rat sensory neurones: modulation by guanine nucleotides. *J. Physiol.*, 386:1-17.
- Doroshenko, P. & Neher, E.** (1991) Pertussis-toxin-sensitive inhibition by (-)baclofen of Ca signals in bovine chromaffin cells. *Pflügers Arch.*, 419:444-449.
- 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.
- Dreyfus, H.; Aunis, D.; Harth, S. & Mandel, P.** (1977). *Biochem. Biophys. Acta*, 489:89-97.

- Drust, D.S. & Creutz, C.E.** (1991). Differential subcellular distribution of p36 (the heavy chain calpactin I) and other annexins in adrenal medulla. *J. Neurochem.*, 56:469-478.
- Duggan, M.J. & Stephenson, F.A.** (1988) Benzodiazepine binding site heterogeneity in the purified GABA<sub>A</sub> receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, 154:293-298.
- Duggan, M.J. & Stephenson, F.A.** (1989). Bovine  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor: Identification of two epitopes which are recognised in both native and denatured  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptors. *J. Neurochem.*, 53:132-139.
- Duggan, M.J. & Stephenson, F.A.** (1990). Biochemical evidence for the existence of  $\gamma$ -aminobutyrate acid<sub>A</sub> receptor iso-oligomers. *J. Biol. Chem.*, 265:3831-3835.
- Dunlap, K. & Fischbach, G.D.** (1978). Neurotransmitters decrease the calcium component of sensory neurone action potentials. *Nature*, 276:831-839.
- Dutar, P. & Nicoll, R.A.** (1988). A physiological role for GABA<sub>B</sub> receptors in the central nervous system. *Nature*, 332:156-158.
- Edgar, P.P. & Schwartz, R.D.** (1992) Functionally relevant  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptors: equivalence between receptor affinity ( $K_D$ ) and potency ( $EC_{50}$ )?, *Mol. Pharmacol.*, 41:1124-1129.
- Ehrengruber, M.U.; Deranleau, D.A.; Kempf, C.; Zahler, P; Lanzrein, M** (1993) Arachidonic acid and other unsaturated fatty acids alter membrane potential in PC12 and bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.*, 60(1):282-288.
- Erausquin, G.; Brooker, G.; Costa, E. & Wojcik, W.J.** (1992) Stimulation of high affinity  $\gamma$ -aminobutyric B receptors potentiates the depolarization-induced increase of intraneuronal ionized calcium content in cerebellar granule neurons. *Molec. Pharmacol.*, 42:407-414.
- Erdö, S.L. & Bowery N.G.** (Eds.) (1986). GABAergic mechanisms in the mammalian periphery. Raven Press, New York.
- Erdö, S.L. & Wolff, J.R.** (1990).  $\gamma$ -aminobutyric acid outside the mammalian brain. *J. Neurochem.*, 54(2):336-372.
- Falck, N.A., Hillarp, G., Thieme, G. & Torp, A.** (1962). *J. Histochem. Cytochem.*, 10:348-354.
- Fenwick, E.M., Marty, A. & Neher, E.** (1982). Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.*, 331:599-635.
- Fernández-Ramil, J.M.; Sánchez-Prieto, J. & González, M.P.** (1982). Presence of glutamate decarboxylase in bovine adrenal medullary cells. *Rev. Esp. Fisiol.*, 28:91-96.
- Fernández-Ramil, J.M.; Sánchez-Prieto, J.; Cañadas, S. & González, M.P.** (1983). GABA-T in bovine adrenal medulla cells. Kinetic properties and comparison with GABA-T from other tissues. *Rev. Esp. Fisiol.*, 39:299-304.
- Fernández-Viviero, J.; Rodríguez-Sánchez, F. & Verastegui, C.** (1993) Immunocytochemical distribution of serotonin and neuropeptide Y (NPY) in mouse adrenal gland. *Histol. Histopathol.*, 8(3):509-520.

## **Bibliografía**

- Fiszman, M.L.;** Novotny, E.A.; Lange, G.D.; Barker, J.L. (1990) Embryonic and early postnatal hippocampal cells respond to nanomolar concentrations of muscimol. *Dev. Brain Res.*, 53:186-193.
- Föhr, K.J.;** Ahnert-Higer, G.; Stecher, B.; Scott, J. & Gratzl, M. (1991). GTP and  $Ca^{2+}$  modulate the inositol 1,4,5-trisphosphate dependent  $Ca^{2+}$  release in streptolysin O-permeabilized bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.*, 56:665-670.
- Forsberg, E.J.;** Rojas, E. & Pollard, H.B. (1986). Muscarinic receptor enhancement of nicotine-induced catecholamine secretion may be mediated by phosphoinositide metabolism in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.*, 261:4915-4920.
- Foster, G.A.;** Dahl, D. & Lee, V.M.Y. (1987) Temporal and topographic relationships between the phosphorylated and nonphosphorylated epitopes of the 200 KDa neurofilament protein during development in vitro. *J. Neurosci.*, 7:2651-2663.
- Friedman, J.E.;** Leikes, P.I.; Rosenheck, K. & Oplatka, A. (1986) Control of stimulus-secretion coupling in adrenal medullary chromaffin cells by microfilament-specific macromolecules. *J. Biol. Chem.*, 261:5745-5770.
- Frye, R.A. & Holz, R.W.** (1984). The relationship between arachidonic acid release and catecholamine secretion from cultured bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.*, 43:146-150.
- Frye, R.A. & Holz, R.W.** (1985). Arachidonic acid release and catecholamine secretion from digitonin-treated chromaffin cells: effects of micromolar calcium, phorbol ester and protein alkylating agents. *J. Neurochem.*, 44:265-273.
- Fujita, T.** (1988). In "The paraneuron". Fujita, T; Kanno, T & Kobayashi, S. (eds.) Springer Verlag, Tokio, pp 135-144.
- Gandía, L.;** López, M.G.; Fonteriz, R.I.; Artalejo, C.R. & García, A.G. (1987). Relative sensitivities of chromaffin cell calcium channels to organic and inorganic calcium antagonists. *Neurosci. Lett.*, 77:333-338.
- Gawhwiler, B. & Brown, D.A.** (1985). GABA<sub>B</sub> receptor-activated  $K^+$  current in voltage-clamped CA3 pyramidal cells in hippocampal cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:1558-1562.
- Geertsen, S.;** Afar, R.; Trifaró, J.M. & Quik, M. (1990). Phorbol esters and d-tubocurarine up-regulate  $\alpha$ -bungarotoxine sites in chromaffin cells in culture via distinct mechanism. *Neurosci.*, 34(2):441-450.
- Georges, E.;** Trifaró, J.M.; Mushynsky, W.E. (1987). Hypophosphorylated neurofilament subunits in the cytoskeletal and soluble fractions of cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Neuroscience*, 22:753-763.
- Goldstein, M.;** Fixe, K.; Hökfet, T. & Joh, T.H. (1971). Immunohistochemical studies on phenylethanolamine N -methyltransferase, dopadecarboxylase, and dopamine  $\beta$ -hydroxylase. *Experientia*, 27:951-952.
- Gomperts, B.D.;** Barrowman, M.M. & Cockroft, S. (1986). Dual role for guanine nucleotides in stimulus-secretion coupling. *Fed. Proc.*, 45:2156-2161.

## **Bibliografía**

- González, M.P.**; Oset-Gasque, M.J.; Giménez, A. & Cañadas, S. (1986). Succinic semialdehyde dehydrogenase activity in, bovine adrenal medulla and blood platelets: a comparative study with brain enzyme. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 86:489-492.
- González, M.P.**; Oset-Gasque, M.J.; Bugada, J.; Arce, C.; Castro, E. & Parramón, M. (1992). GABA<sub>A</sub> receptor modulates catecholamine secretion from bovine chromaffin cells depending on the membrane potential. *Neuroscience*, 47(2):497-494.
- González, C.**; Ceña, V.; Keisser, H.R. & Rojas, E. (1993) Catecholamine secretion induced by tetraethylammonium from cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem. Biophys. Acta*, 1177 (1):98-105.
- Grant, N.J.**; Demeneix, B.; Aunis, D.; Langley, O.K. (1988). Induction of neurofilament phosphorylation in cultured chromaffin cells. *Neuroscience*, 27:717-726.
- Grant, N.** & Aunis, D. (1990). Effects of phorbol esters on cytoskeletal proteins in cultured bovine chromaffin cells: induction of neurofilament phosphorylation and reorganization of actin. *European J. of Cell Biol.*, 52:36-46.
- Gray, R.** & Jonston, D. (1987). Noradrenaline and  $\beta$ -adrenoceptor agonist increase activity of voltage-dependent calcium channels in hippocampal neurons. *Nature*, 327:620-622.
- Green, A.** & Perlman, R.L. (1981). On-line measurement of catecholamine secretion. *Anal. Biochem.*, 110:270-276.
- Greenberg, A.** & Zinder, O. (1982).  $\alpha$ - and  $\beta$ -receptor control of catecholamine secretion from isolated adrenal medulla cells. *Cell Tiss. Res.*, 266:655-665.
- Gruen, R.J.**; Esworth, J.D. & Roth, R.H. (1990). Regionally specific alterations in the low affinity GABA<sub>A</sub> receptor following perinatal exposure to diazepam. *Brain Res.*, 514:151-154.
- Geertsen, S.**; Afar, R.; Trifaro, J.M. & Quik, M. (1990). Phorbol esters and d-tubocurarine up-regulate  $\alpha$ -bungarotoxin sites in chromaffin cells in culture via distinct mechanisms. *Neurosci.*, 34(2):441-450.
- Grynkiewicz, G.**; Poenie, M. & Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 260:3440-3450.
- Gu, X.H.**; Kurose, T.; Kato, S.; Masuda, K.; Tsuka, K.; Ishide, H. & Seino, Y. (1993) Suppressive effect of GABA on insulin secretion from the pancreatic beta-cells in the rat. *Life Sci.*, 52:687-694.
- Guidotti, A.**; Toffano, G. & Costa, E. (1978). An endogenous protein modulates the affinity of GABA and benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature*, 275:553-555.
- Gutman, Y.**; Lichtenberg, D.; Cohen, J. & Boonyaviroj, P. (1979). Increase catecholamine release from adrenal medulla by liposomes loaded with sodium or calcium ions. *Biochem. Pharmacol.*, 28:1209-1211.
- Guyton, A.C.** (1987). Sistema Nervioso Autónomo; médula suprarrenal, Pag. 845-859. *Tratado de fisiología médica*. McGraw-Hill, ed. Interamericana. Madrid.

- Harris, R.A. & Allan, A.M.** (1985). Functional coupling of  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors to chloride channels in rat brain membranes. *Science*, 228:1108-1110.
- Harrison, N.L. & Lambert, N.A.** (1989). Modification of GABA<sub>A</sub> receptor function by an analog of cyclic AMP. *Neurosci. lett.*, 105:137-142.
- Hertz, L.; Kuamme, E. McGeer, E. & Schousboe, A.** (eds) Regulation of glutamate decarboxylase activity, en "Glutamine, glutamate and GABA in the Central Nervous System" (1983) Alan R. Liss, New York. pp 113-123.
- Hill, R.C.; Maurer, R.; Buescher, H.H. & Roemer, D.** (1981). Analgesic properties of the GABA-mimetic THIP. *Eur.J. Pharmacol.*, 69:221-224.
- Hill, D.R.** (1985). GABA<sub>B</sub> receptor modulation of adenylate cyclase activity in rat brain slices. *Br J. Pharmacol.*, 84:249-257.
- Hillarp, N.A.; Lagersted, S. & Nilson, B.** (1953). *Acta Physiol. Scand.*, 29:251-263.
- Hirano, T. & Nijima, A.** (1980). Two populations of nerve fibers in the adrenal nerve. *J. of the Anatom. Nerv. Sist.*, 2:81-86.
- Holz, R.W., Senter, R.A. & Frye, R.A.** (1982). *J. Neurochem.*, 39:635-645.
- Hoshi, T. & Smith, S.J.** (1987). Large depolarization induces long opening of voltage-dependent calcium channels in adrenal chromaffin cells. *J. Neurosci.*, 7:571-580.
- Hösli, L.; Hösli, E.; Redle, S.; Rojas, J. & Schramek, H.** (1990). Action of baclofen, GABA and antagonists on the membrane potential of cultured astrocytes of rat spinal cord. *Neurosci. lett.*, 117:307-312.
- Huganir, R.L.; Delcour, A.H.; Greengard, P. & Hess, G.P.** (1986). Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor regulates its rate of desensitization. *Nature*, 321:774-776.
- Huston, E.; Seott, R.H. & Dolphin, A.C.** (1990). A comparison of the effect of calcium channel ligands and GABA<sub>B</sub> agonist and antagonist on transmitter release and somatic calcium channel currents in cultured neurons. *Neuroscience*, 38 (3):721-729.
- Hyun, S. & Albanesi, J.P.** (1990) Inositol 1,4,5-trisphosphate-triggered Ca<sup>2+</sup> release from bovine adrenal medullary secretory vesicles. *J. Biol. Chemistry*, 265(23):13446-13448.
- Inoue, M.; Matsuo, T. & Ogata, N.** (1985). Possible involvement of K<sup>+</sup>-conductance in the action of  $\gamma$ -aminobutyric acid in the guinea-pig hippocampus. *Br.J. Pharmacol.*, 86:515-524.
- Ito, S.** (1983). Time course of release of catecholamine and other granular contents from perfused adrenal chromaffin cells of guinea pig. *J. Physiol.*, 341:153-167.
- Isobe, K.; Nakai, T. & Takuwa, Y.** (1993) Ca<sup>2+</sup>-dependent stimulatory effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on catecholamine secretion from cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells. *Endocrinology*, 132(4):1757-1765.
- Jessen, K.R.; Mirsky, R.; Dennison, M.E. & Burnstock, G.** (1979). GABA may be a neurotransmitter in the vertebrate peripheral nervous system. *Nature*, 281:71-74.

## ***Bibliografía***

- Kakiuchi, S. & Sobue, K. (1983).** control of the cytoskeleton by calmodulin and calmodulin-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 8:59-62.
- Kamatchi, G.L. & Ticku, M.K. (1990)** The activation of GABA<sub>B</sub> receptors is modulated by both PKA and PKC systems. *Molec. Pharmacol.*, 38:342-347.
- Kao, L.S. & Scheneider, A.S. (1985).** Muscarinic receptors on bovine chromaffin cells mediate a rise in cytosolic calcium that is independent of extracellular calcium. *J. Biol. Chem.*, 260:2019-2022.
- Kao, L.S. & Schneider, A.S. (1986).** Calcium mobilization and catecholamine secretion in adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.*, 261:4881-4888.
- Kataoka, Y.; Gutman, Y.; Guidotti, A.; Panula, P.; Wroblewski, J.; Costenza-Murphy, D.; Wu, J.Y. & Costa, E. (1984)** Intrinsic GABAergic system of adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3218-3222.
- Katoh, N.; Wise, B.C.; Kuo, J.F.(1983).** Phosphorylation of cardiac troponin inhibitory subunit (troponin I) and tropomyosin-binding subunit (troponin T) by cardiac phospholipid-sensitive, Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase. *Biochem. J.*, 209:189-195.
- Kawamoto, S.; Hidaka, H. (1984).** Ca<sup>2+</sup>-activated, phospholipid-dependent protein catalyzes the phosphorylation of actin-binding proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 118:736-742.
- Kennedy, M.S. & Insel, P.A. (1979).** Inhibitors of microtubule assembly enhance beta-adrenergic and prostaglandin E<sub>1</sub>-stimulated cyclic AMP accumulation in S49 lymphoma cells. *Mol. Pharmacol.*, 16:215-223.
- Kenigsberg, R.L. & Trifaró, J.M. (1980).** Presence of a high affinity uptake system for catecholamines in cultured adrenal chromaffin cells. *Neuroscience*, 5:1547-1556.
- Kenigsberg, R.L. & Trifaró, J.M. (1985).** Microinjection of calmodulin antibodies into cultured chromaffin cells blocks catecholamine release in response to stimulation. *Neuroscience*, 14:335-347.
- Keogh, R. & Marley, P.D. (1991)** Regulation of cyclic AMP levels by calcium in bovine adrenal medullary cells. *J. Neurochem.*, 57:1721-1728.
- Kerr, D.I.B.; Ong, J.; Johnston, G.A.R.; Abbenante, J. & Prager, R.H. (1988).** 2-hydroxy-saclofen: an improved antagonist at central and peripheral GABA<sub>B</sub> receptors *Neurosci. Lett.*, 92:92-96.
- Kidokoro, Y.; Miyazaki, S. & Ozawa, S. (1982).** Acetylcholine induced membrane depolarization and potential fluctuation in the rat adrenal chromaffin cell. *J. Physiol.*, 324:203-220.
- Kilpatrick, D.L.; Lewis, R.V.; Stein, S. & Udenfriend, S. (1980).** Release of enkephalins and enkephalin-containing polypeptides from perfused beef adrenal glands. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 77:7473-7475.
- Kirshner, N.; Sage, H.J.; Smith, W.J. & Kirshner, A.G. (1967).** Mechanism of secretion from the adrenal medulla. 2. Release of catecholamines and storage vesicle protein in response to chemical stimulation. *Molec. Pharmacol.*, 3:254-265.

## *Bibliografía*

- Kitamura, Y.; Nomura, Y. & Segawa, T. (1985).** Possible involvement of inhibitory GTP binding regulatory protein in  $\alpha$  adrenoceptor mediated inhibition of adenylate cyclase activity in cerebral cortical membranes of rats. *J. Neurochem.*, 45:1504-1508.
- Kitayama, S. & Tsujimoto, A. (1986).** Involvement of GABA-ergic mechanisms in the catecholamine secretion from adrenal medulla. En "GABAergic mechanisms in the mammalian periphery" (S.L. Erdö & N.G. Bowery, Eds.), pag 1249-259. Raven Press, New York.
- Kitayama, S.; Morita, K.; Dohi, T. & Tsujimoto, A. (1989)** Benzodiazepines facilitate the stimulatory action of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) on basal and veratridine-evoked catecholamine release from cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 300:254-264.
- Knight, D.E. & Baker, P.F. (1982).** Calcium-dependence of catecholamine release from bovine adrenal medullary cells after exposure to intense electric fields. *J. Membrane Biol.*, 68:107-140.
- Knight, D.E. & Baker, P.F. (1983).** The phorbol ester TPA increases the affinity of exocytosis for calcium in the 'leaky' adrenal medullary cells. *FEBS Lett.*, 160S:98-100.
- Knight, D.E. & Baker, P.F. (1985).** Guanine nucleotides and  $Ca^{2+}$ -dependent exocytosis. *FEBS Lett.*, 189:345-349.
- Knight, D.E.; Gafenstein, H. & Athayde, C.M. (1989).** Calcium-dependent and calcium-independent exocytosis. *Trends in Neurosci.*, 12(11):541-458.
- Koda, Y.; Kobayashi, H.; Mizuki, T.; Okazaki, M.; Uezono, Y.; Yanagihara, N.; Wada, A. & Izumi, F. (1990).** Protein kinase C subtypes in tissues derived from neural crest. *Brain Res.*, 518:334-336.
- Koyama, Y.; Kitayama, S.; Dihi, T. & Tsujimoto, A. (1988).** Evidence that prostaglandins activate calcium channels to enhance basal and stimulation evoked catecholamine release from bovine adrenal chromaffin cells in culture. *Biochem. Pharmacol.*, 37:1725-1730.
- Krogsgaard-Larsen, P.; Jacobsen, P. & Falch, E. (1983).** Structure-activity requirements of the GABA receptors. En: "The GABA receptors" (S.J. Enna, Ed.), pag 149-176. The Human Press, Clifton, New Jersey.
- Kuijpers, G.A.; Lee, G. & Pollard, H.B. (1992)** Immunolocalization of synexin (annexin VII) in adrenal chromaffin granules and chromaffin cells: evidence for a dynamic role in the secretory process. *Cell Tissue Res.*, 269(2):323-330.
- Kurahashi, T. (1990)** The response induced by intracellular cyclic AMP in isolated olfactory receptor cells of the newt. *J. Physiol. (London)*, 430:355-371.
- Kuriyama, K.; Nakayasu, H.; Mizutami, H.; Narihara, R. & Ichida, T. (1993)** Cerebral GABA<sub>B</sub> receptor: proposed mechanisms of action and purification procedures. *Neurochem. Res.*, 18(4):377-383.
- Ladona, M.G.; Aunis, D.; Gandía, L. & García, A.G. (1987).** Dihydropyridine modulation of the chromaffin cell secretory response. *J. Neurochem.*, 48:483-490.
- Lasham, A.; Vreugdenhil, E.; Bateson, A.N.; Barnard, E.A. & Darcison, M.G. (1991)** Conserved organization of  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor genes: cloning and analysis of the chicken  $\beta_4$ -subunit gene. *J. Neurochem.*, 57:352-355.

- Laurent, J.P.** (1983). L'acide gamma-aminobutyrique. *Confrontations psychiatriques*, 22:97-154.
- Laurenza, A.; McHugh, E. & Seamon, K.B.** (1989). Forskolin: a specific stimulator of adenylyl cyclase or a diterpene with a multiple sites of action. *Trends in Pharmacol. Sci.*, 10:442-447.
- Ledbetter, F.H. & Kirshner, N.** (1981). Quantitative correlation between secretion and cellular content of catecholamines and dopamine  $\beta$ -hydroxylase in cultures of adrenal medulla cells. *Biochem. Pharmacol.*, 30:3246-3249.
- Leidenheimer, N.J.; Browning, M.D. & Harris, R.A.** (1991). GABA<sub>A</sub> receptor phosphorylation: multiple sites, actions and artifacts. *Trends in Pharmacol. Sci.*, 12:84-87.
- Leidenheimer, N.J.; Whiting, P.J.; Harris, R.A.** (1993) Activation of calcium-phospholipid-dependent protein kinase enhances benzodiazepine and barbiturate potentiation of the GABA<sub>A</sub> receptor. *J. Neurochem.*, 60(5):1972-5.
- Levitan, E.S.; Schofield, P.R.; Burt, D.R.; Rhee, L.M.; Wisden, W.; Kohler, M.; Fujita, N.; Rodriguez, H.F.; Stephenson, A.; Darlinson, M.G.; Barnard, E.A. & Seeburg, P.H.** (1988). Structural and functional basis for GABA<sub>A</sub> receptor heterogeneity. *Nature*, 335:76-79.
- Levitzki, A.** (1987). Regulation of hormone-sensitive adenylyl cyclase. *Trends in Pharmacol. Sci.*, 8:299-303.
- Lin, L.H.; Chen, L.L.; Zirrolli, J.A. & Harris, R.R.** (1992) General anesthetics potentiate gamma-aminobutyric acid actions on gamma-aminobutyric acid<sub>A</sub> receptors expressed in *Xenopus* oocytes: lack of involvement of intracellular calcium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 263(2):569-578.
- Lin, L.F.; Kim, K.T. & Westhead, E.W.** (1993) Protein phosphorylation at a postreceptor site can block desensitization and induce potentiation of secretion in chromaffin cells. *J. Neurochem.*, 60:1491-1497.
- Lincoln, T.; Cornwell, T.R. & Taylor, A.E.** (1990). cGMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca<sup>2+</sup> by cAMP in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.*, 258:c399-c407.
- Lincoln, T. & Cornwell, T.R.** (1993) Intracellular cyclic cGMP receptor proteins. *FASEB J.*, 7:328-338.
- Lingham, R.B. & Sen, A.K.** (1982). Regulation of rat brain (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase activity by cyclic AMP. *Biochim. Biophys. Acta*, 688:475-485.
- Litchfield, D.W., Ball, E.H.** (1986). Phosphorylation of the cytoskeletal protein talin by protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 134:1276-1283.
- Liu, P.S.; Lin, Y.J.; Kao, L.S.** (1991). Caffeine-sensitive calcium stores in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.*, 56:172-177.
- Livett, R.; Day, R.; Elde, R.P. & Howe, P.R.C.** (1982). *Neuroscience*, 7:1323-1332.
- Livett, B.G.** (1984). Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol. Rev.*, 64:1103-1161.
- Llinás, R.; McGuinness, T.L.; Leonard, C.S.; Sugimori, M. & Greengard, P.** (1985). Intraterminal injection of synapsin I or calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alters neurotransmitter release at the squid giant synapse. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 82:3035-3039.

- Llinás, R.;** Gruner J.A; Sugimori, M.; McGuinness, T.L. & Greengard, P. (1991) Regulation by synapsin I and Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase II of transmitter release in squid giant synapse. *J. Physiol.*, 436:257-282.
- Lüdens, H. & Wisden, W.** (1991) Function and pharmacology of multiple GABA<sub>A</sub> receptor subunits. *Trends Pharmacol. Sci.*, 12:49-51.
- Mahan, L.C.;** Monsma, R.M. & Sibley, D.R. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:2196-2200.
- Marc, G.;** Clavel, M.C. & Rabie, A. (1986). Nonphosphorylated and phosphorylated neurofilaments in the cerebellum of rat: an immunocytochemical study using monoclonal antibodies. Development in normal and thyroid-deficient animals. *Dev. Brain. Res.*, 26:249-260.
- Marley, P.D.;** Mitchelhill, K.I. & Livett, B.G. (1986). Effects of opioid peptides containing sequence of met-5-enkephalin or Leu-5-enkephalin on nicotine-induced secretion from bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.*, 46:1-11.
- Marley, P.D.;** Thompson, K.A.; Jachno, K.; Johnston, M.J. (1991) Histamine-induced increases cyclic AMP levels in bovine adrenal medullary cells. *Br. J. Pharmacol.*, 104:836-849.
- Marley, P.D. & Thompson, K.A.** (1992) Regulation of cyclic AMP metabolism in bovine adrenal medullary cells. *Biochem. Pharmacol.*, 44(11):2105-2110.
- Marriot, D.;** Adams, M. & Boarder, M.R. (1988). Effect of forskolin and prostaglandin E<sub>1</sub> on stimulus secretion coupling in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.*, 50:616-623.
- Martínez, P.M.;** Giménez, A.; Castro, E.; Oset-Gasque, M.J.; Cañadas, S. & González, M.P. (1987). GABA binding to adrenal medulla membranes is sensitive to baclofen. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 88:155-157.
- Matsumoto, R.R.** (1989). GABA receptors: are cellular differences reflected in function. *Brain Res. Reviews*, 14:203-225.
- Mayanif, C.S.K. & Baquer, N.Z.** (1985). Kinetics of mechanism of action of monoamine oxidase in the regulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat brain. *J. Neurochem.*, 44:25-30.
- McEwen, B.S.** (1991) Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends in Pharmacol. Sci.*, 12:141-147.
- McGeer, P.L. & McGeer, E.G.** (1989). Aminoacids neurotransmitters. *Basic neurochemistry*. Siegel, G., Agranoff, B., Alberts, R.W., Molinoff, P., eds. Raven Press. New York.
- Mercuri, N.B.;** Calabresi, P.; Stephani, A.; Stratta, F. & Bernardi, G. (1991) GABA depolarizes neurons in the rat striatum: an in vitro study. *Synapse*, 8:38-40.
- Merrill, A.H. & Stevens, V.L.** (1989). Modulation of protein kinase C and diverse cell functions by sphingosine-a pharmacologically interesting compound linking sphingolipids and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta*, 1010:131-139.
- Mietzler, D.E.** (1981). *Las reacciones químicas en las células vivas*. Omega, ed. Barcelona.

## *Bibliografía*

- Miller, L.P.; Martin, L.; Mazumder, A. & Walters, J.R. (1978)** Studies on the regulation of GABA synthesis: substrate-promoted dissociation of pyridoxal-5'-phosphate from GAD. *J. Neurochem.*, 30:361-370.
- Mintz, I.M. & Bean, B.P. (1993)** GABA<sub>B</sub> receptor inhibition of P-type Ca<sup>2+</sup> channel in central neurons. *Neuron*, 10(5):889-898.
- Miras-Portugal, M.T.; Pintor, J.; Rotllán, P. & Torres, M. (1990)** Characterization of ectonucleotidases in chromaffin cells. Reprinted from *Biological actions of extracellular ATP*. New York Acad. Sci., 603:523-526.
- Miwa, S.; Lee, K.; Narumiya, S. (1993)** Pharmacological properties of nicotinic acetylcholine receptors on adrenal chromaffin cells and their modification by hypoxic exposure. *Yakubutsu Seishin Kodo*, 13(3):119-128.
- Molderings, G.J.; Moura, D.; Fink, K.; Bonisch, H. Gothert, M. (1993)** Binding of <sup>3</sup>H-clonidine to I<sub>1</sub>-imidazoline sites in bovine adrenal medullary membranes. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 348(1):70-76.
- Morgan, A. & Burgoyne, R. (1990a)** Relationship between arachidonic acid release and Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis in digitonin-permeabilized bovine adrenal chromaffin cells. *Bioch. J.*, 271:571-574.
- Morgan, A. & Burgoyne, R. (1990b)** Stimulation of Ca<sup>2+</sup>-independent catecholamine secretion from digitonin-permeabilized bovine adrenal chromaffin cells by guanine nucleotide analogues. *Biochem.J.*, 269:521-526.
- Morgan, A.; Wilkinson, M. & Burgoyne, R.D. (1993)** Identification of Exo2 as the catalytic subunit of protein kinase A reveals a role for cyclic AMP in Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis in chromaffin cells. *EMBO J.*, 12(10):3747-3752.
- Morishita, R.; Kato, K. & Asano, T. (1990)** GABA<sub>B</sub> receptor coupled to G proteins Go, Go<sup>\*</sup> and Gi<sub>1</sub> but not Gi<sub>2</sub>. *FEBS lett.*, 271(1-2):231-235.
- Morita, K.; Dohi, T.; Kitayama, S.; Koyama, Y. & Tsujimoto, A. (1987a)** Enhancement of stimulation-evoked catecholamine release from cultured bovine adrenal chromaffin cells by forskolin. *J. Neurochem.*, 48:243-247.
- Morita, K.; Dohi, T.; Kitayama, S.; Koyama, Y. & Tsujimoto, A. (1987b)** Stimulation-evoked Ca<sup>2+</sup> fluxes in cultured bovine adrenal chromaffin cells are enhanced by forskolin. *J. Neurochem.*, 48:248-252.
- Morita, K.; Dohi, T.; Minami, N.; Kitayama, S. & Tsujimoto, A. (1991a)** Mechanism of cyclic AMP facilitation of stimulation-evoked catecholamine release in adrenal chromaffin cells. *Neurochem. Int.*, 19(1-2):81-85.
- Morita, K.; Dohi, T.; Kitayama, S. & Tsujimoto, A. (1991b)** Mechanism of cyclic AMP facilitation of stimulation-evoked catecholamine release in adrenal chromaffin cells. Evidence for enhancement of evoked increase in cytosolic free Na<sup>+</sup> concentration by cyclic AMP elevation. *Neurochem. Int.*, 19(1-2):71-79.
- 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.

## *Bibliografia*

- Nairn, A.C.; Hemmings, H.C. & Greengard, P. (1985).** Protein kinases in the brain. *Annu. Rev. Biochem.*, 54:931-976.
- Naka, M.M.; Nishikasa, R.S.; Adelstein, R.S. & Hidaka, H. (1983).** Phorbol ester-induced activation of human platelets is associated with protein kinase C phosphorylation of myosin light chains. *Nature*, 306:490-492.
- Nakayasu, H.; Nishikawa, M.; Mizutani, H.; Kimura, H. & Kuriyama, K. (1993)** Immunoaffinity purification and characterization of gammaaminobutyric acid (GABA)<sub>B</sub> receptor from bovine cerebral cortex. *J. Biol. Chem.*, 268(12):8658-8664.
- Nayeem, N.; Green, T.P.; Martin, I.L. & Barnard, E.A. (1994)** quaternary structure of native GABA<sub>A</sub> receptor determined by electron microscopy image analysis. *J. Neurochem.*, 62:815-818.
- Negishi, N.; Ito, S. & Hayashi, O. (1990).** Arachidonic acid stimulates phosphoinositide metabolism and catecholamine release from bovine adrenal chromaffin cells. *Bioch. and Biophys. Res. Commun.*, 169:773-779.
- Negishi, M. & Ito, S. (1992)** Prostaglandin E<sub>2</sub>-induced arachidonic acid release and catecholamine secretion from cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem. Pharmacol.*, 44(12):2315-2321.
- 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 process related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron*, 10:21-30.
- Nilsson, M.; Eriksson, P.S.; Ronnback, L. & Hansson, E. (1993)** GABA induces Ca<sup>2+</sup> transients in astrocytes. *Neurosci.*, 54(3):605-614.
- Northup, J.K. (1989).** Regulation of cyclic nucleotides in the nervous system. *Basic Neurochemistry*. Siegel, G., Agranoff, B., Alberts, R.W., Molinoff, P., eds. Raven Press. New York.
- O'Flynn, K. & Dinan, T.G. (1993)** Baclofen-induced growth hormone release in major depression: relationship to dexametasone suppression test result. *Am. J. Psychiatry*, 150(11):1728-1730.
- Ohara-Imaizumi, M.; Nakazaka, K.; Obama, T.; Fijimori, K.; Tanaka, A. & Inoue, K. (1991)** Inhibitory action of peripheral-type benzodiazepines on dopamine release from PC12 pheochromocytoma cells. *J. Pharmacol. & Exp. Therapeutics*, 259:484-489.
- Ohmori, Y. & Kuriyama, K. (1990).** Solubilization and partial purification of GABA<sub>B</sub> receptor from bovine brain. *Bioch. and Biophys. Res. Comm.*, 172:22-27.
- Ohtsuki, H.; Morita, K.; Minami, N.; Suemitsu, T.; Tsujimoto, A & Dohi, T. (1992)** Involvement of Ca<sup>2+</sup> entry and inositol trisphosphate-induced internal Ca<sup>2+</sup> mobilization in muscarinic-receptor-mediated catecholamine release in dog adrenal chromaffin cells. *Neurochem. Int.*, 21(2):259-267.
- Olsen, R.W. (1981).** The GABA postsynaptic membrane receptor-ionophore complex: site of action of convulsant and anticonvulsant drugs. *Mol. Cell Biochem.*, 39:261-279.
- Olsen, R.W. & Snowman, A.M. (1982).** Chloride dependent enhancement by barbiturates of GABA receptor binding. *J. Neurosci.*, 2:1812-1823.

## ***Bibliografía***

- Oomori, Y., Iuchi, H.; Nakaya, K.; Tanaka, H.; Ishikawa, K. & Satoh, K. (1993)**  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) immunoreactivity in mouse adrenal gland. *Histochemistry*, 100:203-213.
- Oset-Gasque, M.J.; Cañadas Correas, S.; Massó Córdoba, J.M. & González, M.P. (1985)**. Uptake of GABA by bovine adrenal medulla slices. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*, 329:372-375.
- Oset-Gasque, M.J. & Aunis, D. (1989)**.  $\gamma$ -Aminobutyric acid uptake in bovine chromaffin cells in culture. *Biochem. Pharmacol*, 38:2227-2232.
- Oset-Gasque, M.J.; Castro, E. & González, M.P. (1990)**. Mechanism of [ $^3$  H]- $\gamma$ -aminobutyric acid release by chromaffin cells in primary culture. *J. Neurosci. Res.*, 26:181-187.
- Oset-Gasque, Parramón, M. & González, M.P. (1993)** GABA<sub>B</sub> receptors modulate catecholamine secretion by a mechanism involving cAMP formation. *Br. J. Pharmacol.*, 110:1586-1592.
- O'Sullivan, A.J. & Burgoyne, R.D. (1989)**. A comparison of bradykinin, angiotensin II and muscarinic stimulation of cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Biosci. Rep.*, 9:243-252.
- O'Sullivan, A.J.; Cheek, T.R.; Moreton, R.B.; Berridge, M.J. & Burgoyne, R.D. (1989)**. Localization and heterogeneity of agonist-induced changes in cytosolic calcium concentration in single bovine adrenal chromaffin cells from video-imaging of fura-2. *EMBO J.*, 8:401-411.
- O'Sullivan, A.J. & Burgoyne, R.D. (1990)** Cyclic GMP regulates nicotine-induced secretion from cultured bovine adrenal chromaffin cells. Effects of 8-Br-cyclic GMP, atrial natriuretic peptide and nitroprusside (nitric oxide). *J. Neurochem.*, 54:1805-1808.
- Palade, G.E. (1975)**. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, 189:347-358.
- Parfitt, K.D.; Hoffer, B.J. & Bickford-Wimer, P.C. (1990)**. *Neuropharmacol.*, 29:909-916.
- Parramón, M. (1991)** Receptores GABA<sub>B</sub> en células cromafines bovinas: función y mecanismos de acción. Memoria para optar al grado de licenciada en Farmacia.
- Parramón, M.; Oset-Gasque, M.J.; González, M.P. & Stephenson, F.A. (1993)** Subunit composition of GABA<sub>A</sub> receptor from bovine adrenal medulla. 16th Annu. Meeting Eur. Neurosci. Assoc., Madrid, Spain. Suppl. 6 *Eur. J. Neurosci. Abstr.* 862.
- Parramón, M.; Oset-Gasque, M.J.; González, M.P. & Stephenson, F.A. (1994a)** Identification of GABA<sub>A</sub> receptor subunits expressed in bovine adrenal medulla. *Neurosci. lett.*, 168:243-246.
- Parramón, M.; Oset-Gasque, M.J.; González, M.T. & Herrero, M.T. (1994b)** Mechanism of GABAergic regulation of neurosecretion in chromaffin cells. In: "Cell signal transduction, second messengers and protein phosphorylation in health and disease". Municio, M. & Miras-Portugal, M.T. (eds) Plenum Publishing Corp. London, U.K.
- Parramón, M.; Oset-Gasque, M.J.; Herrero, M.T. & González, M.P. (1994c)** GABA<sub>B</sub> receptors increase intracellular calcium concentrations in chromaffin cells through two different pathways. Their role in catecholamine secretion. *J. Neurosci. Res.*, en prensa.
- Parramón, M.; Oset-Gasque, M.J.; González, M.P. (1994d)** A reassessment of the modulatory role of cAMP on catecholamine secretion by chromaffin cells. *Br. J. Pharmacol.*, en prensa.

## ***Bibliografía***

- Paul, I. A.; Basile, A.S. Rojas, E. Youdin, M.B. De Costa, B.; Skolnick, P. Pollard, H.B. (1993)** Sigma receptors modulate nicotinic receptor function in adrenal chromaffin cells. *FASEB J.*, 7(2):1171-1178.
- Pender, N.; Burgoyne, R.D. (1992)** Histamine stimulates exocytosis in a subpopulation of bovine adrenal chromaffin cells. *Neurosci. lett.*, 144(1-2):207-210.
- Penner, R. & Neher, E. (1989).** The patch clamp technique in the study of secretion. *Trends Neurosci.*, 12:159-163.
- Perlman, R.L.; Cossi, A.F. & Role, L.W. (1980).** Mechanism of ionophore-induced catecholamine secretion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 213:241-246.
- Perrin, D. & Aunis, D. (1985).** Reorganization of  $\alpha$ -fodrin induced by stimulation in secretory cells. *Nature*, 315:589-592.
- Peters, J.A.; Kirkness, E.F.; Callahan, H.; Lamber, J.J.; Turner, A.J. (1985)** Modulation of the GABA<sub>A</sub> receptor by depressant barbiturates and pregnane steroids. *Br. J. Pharmacol.*, 94:1257-1269.
- Peters, J.A.; Lambert, J.J. & Cottrell, G.A. (1989)** An electrophysiological investigation of the characteristics and function of GABA<sub>A</sub> receptors in adrenomedullary chromaffin cells. *Pflügers Arch.*, 415:95-103.
- Pintor, J.; Torres, M.; Castro, E. & Miras-Potugal, M.T. (1991).** Characterization of diadenosine tetraphosphate (AP<sub>4</sub>A) binding sites in culture chromaffin cells: evidence for a P<sub>2</sub> site. *Br. J. Pharmacol.*, 103:1980-1984.
- Pintor, J.; Rotllán, P.; Torres, M. & Miras-Potugal, M.T. (1992)** Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release. *Analytical Biochem.*, 200:296-300.
- Plevin, R. & Boarder, M.R. (1988)** Stimulation of formation of inositol phosphate in cultures of bovine adrenal chromaffin cells by angiotensin II, histamine, bradikinin and carbachol. *J. Neurochem.*, 51:634-641.
- Pocotte, S.L.; Frye, R.A.; Senter, R.A.; Terbush, D.R.; Lee, S.A. & Holz, R.W. (1985).** Effects of phorbol ester on catecholamine secretion and protein phosphorylation in adrenal medullary cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:930-934.
- Pollard, H.B.; Rojas, E. & Burns, A.L. (1987).** Synexin and chromaffin granule membrane fusion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 493:524.
- Pollard, S.; Duggan, M.J. & Stephenson, F.A. (1993)** Further evidence for the existence of  $\alpha$  subunit heterogeneity within discrete  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor subpopulations. *J. Biol. Chem.* 268:3753-3757.
- Pritchett, D.B.; Shivers, B.D.; Sontheimer, H.; Ymer, S.; Kettenmann, H.; Schofield, P.R. & Seeburg, P.H. (1989).** Importance of a novel GABA<sub>A</sub> receptor subunit for the benzodiazepine pharmacology. *Nature*, 338:582-585.
- Pruss, R.M.; Staudermann, K.A.; Wilburn, J.K.; Murausky, M.M. (1991)** The ins and outs of histamine-stimulated Ca<sup>2+</sup> responses in bovine adrenal chromaffin cells. 6th International Symposium on Chromaffin Cell Biology. Marburg, Germany.

## ***Bibliografia***

**Rindilisbacher, B.; Sidlar, M.A.; Galatioto, L.E. & Zahler, P. (1990).** Arachidonic acid liberated by diacylglycerol lipase is essential for the release mechanism in chromaffin cells from bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.*, 54:1247-1252.

**Role, L.W. & Perlman, R.L. (1980).** Purification of adrenal medullary cells by density gradient centrifugation. *J. Neurosci. Methods*, 2:253-265.

**Sakurai, S.; Wada, A.; Izumi, F.; Kobayashi, H. & Yanagihara, N. (1983)** Inhibition by  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonists of the secretion of catecholamines from isolated adrenal medullary cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 324:15-19.

**Sato, T.N. & Neale, J.H. (1989).** Type I and Type II  $\gamma$ -aminobutyric acid/ benzodiazepine receptors: purification and analysis of novel receptor complex from neonatal cortex. *J. Neurochem.*, 52:1114-1126.

**Schliwa, M.T.; Nakamura, T.; Porter, K.R.; Euteneuer, U. (1984).** A tumour promoter induces rapid and coordinated reorganization of actin and vinculin in cultured cells. *J. Cell Biol.*, 99:1045-1059.

**Schmidt, W.; Patzak, A.; Lingg, G.; Winkler, H. & Plattner, H. (1983).** Membrane events in adrenal chromaffin cells during exocytosis: a freeze-etching analysis after rapid cryofixation *Eur. J. Cell Biol.*, 32:31-37.

**Schmith, H.H.W.; Lohmann, S.M. & Walter, V. (1993)** The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1178:153-175.

**Schofield, P.R.; Darlison, M.G.; Fujita, N.; Burt, D.R.; Stephenson, F.A.; Rodriguez, H.; Rhee, L.M.; Ramachandran, V.R.; Glencorse, T.A.; Seeburg, P.H. & Barnard, E.A. (1987).** Sequence and functional expression of the GABA<sub>A</sub> receptor shows a ligand-gated receptor super family. *Nature*, 328:221-227.

**Schofield, P.R. (1989)** The GABA<sub>A</sub> receptor: molecular biology reveals a complex picture. *Trends in Pharmacol. Sci.*, 10:476-478.

**Schon, P. & Mohler, H. (1983)** Purified benzodiazepine receptor retains modulation by GABA. *Eur. J. Pharmacol.*, 95:323.

**Scott, R.H.; Wootton, J.F.; Dolphin, A. C. (1990)** Modulation of neuronal T-type calcium channel currents by photoactivation of intracellular guanosine 5'-o(3-thio)-trisphosphate. *Neurosci.*, 38: 285-294.

**Seamon, K.B.; Padgett, W. & Daly, J.W. (1981).** Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78(6):3363-3367.

**Serventi, I.M. & Coffee, C.J. (1989).** Characterization of myosin light-chain kinase from bovine adrenal medulla. *Arch. Biochem. Biophys.*, 245:379-388.

**Sieghart, W. (1989).** Multiplicity of GABA<sub>A</sub>/benzodiazepine receptor. *Trends Pharmacol. Sci.*, 10:407-411.

**Sieghart, W. (1992)** GABA<sub>A</sub> receptors: ligand-gated Cl<sup>-</sup> ion channels modulated by multiple drug-binding sites. *Trends Pharmacol. Sci.*, 13:446-450.

## ***Bibliografia***

- Sigel, E.;** Stephenson, F.A.; Mamalaki, C. & Barnard, E.A. (1983). A  $\gamma$ -aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex from bovine cerebral cortex. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.*, 258:6965-6971.
- Sigel, E. & Barnard, E.A.** (1984). A  $\gamma$ -aminobutyric acid/ benzodiazepine receptor complex from bovine cerebral cortex. *J. Biol. Chem.*, 259:7219-7223.
- Sigel, E.;** Baur, R.; Kellenburger, S.; Malherbe, P. (1992) Point mutations affecting antagonist affinity and agonist dependent gating of GABA<sub>A</sub> receptor channels. *EMBO J.*, 11(6):2017-2023.
- Sikdar, S.K.;** Zorec, R. & Mason, W.T. (1990). cAPM directly facilitates Ca<sup>2+</sup>-induced exocytosis in bovine lactotrophs. *FEBS lett.*, 273(1-2):150-154.
- Silinski, E.M.** (1975). On the association between transmitter secretion and the release of adenine nucleotides from mammalian motor nerve terminals. *J. Physiol.*, 247:145-162.
- Skerrit, J.H.;** Johnston, G.A.R. & Bastrup, C. (1983). Modulation of GABA binding to rat membranes by alkyl  $\beta$ -carboline-3-carboxylate esters. *Eur. J. Pharmacol.*, 86:229-301.
- Smart, T.G.;** Moss, S.S.; Xie, X. & Haganir, R. (1991) GABA<sub>A</sub> receptors are differentially sensitive to zinc:dependence on subunit composition. *Br. J. Pharmacol.*, 103:1837-1839.
- Snyder, S.H.;** Axelrod, J. & Zweig, M. (1965). A sensitive and specific fluorescence assay for tissue preparation. *Bioch. Pharmacol.*, 14:831-835.
- Sobue, K.;** Fujio, Y.; Kanda, K. (1988). Tumor promoter induces reorganization of actin filaments and caldesmon (fodrin or nonerythroid spectrin) in 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:482-486.
- Soreton, R.L.;** Garry, D.G. & Brelic, C. (1991) Structural and functional considerations of GABA in islets of Langerhans. *Diabetes*, 40:1365-1374.
- Sorimachi, M.;** Yamagami, K.; Nishimura, S. & Kuramoto, K. (1992) Possible regulation of caffeine-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization by intracellular free Na<sup>+</sup>. *J. Neurochem.*, 59(6):2271-2277.
- Stelzer, A.;** Kay, A.R. & Wong, R.K.S. (1988). GABA<sub>A</sub> receptor function in hippocampal cells is maintained by phosphorylation factors. *Science*, 241:339-341.
- Stephenson, F.A.;** Watkins, A.E. & Olsen, R.W. (1982). Physicochemical characterization of detergent-solubilized  $\gamma$ -aminobutyric acid and benzodiazepine receptor proteins from bovine brain. *Eur. J. Biochem.*, 123:291-298.
- Stephenson, F.A. & Barnard, E.A.** (1986). Purification and characterization of the brain GABA/benzodiazepine receptor. *Benzodiazepine/GABA receptors and chloride channels: Structural and functional properties*, pags. 261-274. Alan R. Liss, ed.
- Stephenson, F.A.** (1988). Understanding the GABA<sub>A</sub> receptor: a chemically gated ion channel. *Biochem. J.*, 249:21-32.
- Stephenson, F.A.** (1991) the GABA<sub>A</sub> receptors: Structure and function. *Current aspects in neurosciences*. N. N. Osborne, ed. McMillan Press, New York. Pags: 177-193.

## Bibliografía

- Stirling J.M.**; Cross, A.J.; Robinson, T.N. & Green, A.R. (1989). The effects of GABA<sub>B</sub> receptor agonists and antagonists on potassium-stimulated [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in rat synaptosomes. *Neuropharmacology*, 228:699-704.
- Swandula, D.**; Carbone, E. & Lux, H.D. (1991) Do calcium channel classifications account for neuronal calcium channel diversity?. *Trends in Neurochem. Sci.*, 14(2):46-51.
- Taniyama, K.**; Takeda, K.; Ando, H.; Kuno, T. & Tanaka, C. (1991). Expression of the GABA<sub>B</sub> receptor in *Xenopus* oocytes and inhibition of the response by activation of protein kinase C. *FEBS*, 278(2):222-224.
- Taylor, S.S.** (1989) cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 264(15):8443-8446.
- Tehrani, M.H.J.**; Hablitz, J.J. & Barnes, E.M. (1989). *Synapse*, 4:126-131.
- Thuret-Carnahan, J.**; Bossu, J.L.; Feltz, A.; Langley, O.K. & Aunis, D. (1985). Effect of taxol on secretory cells: functional, pharmacological and electrophysiological correlates. *J. Cell Biol.*, 100:1863-1874.
- Treiman, M.**; Weber, W. & Gratzl, M. (1983). 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate- and Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent endogenous protein phosphorylation activity in membranes of the bovine chromaffin secretory vesicles: Identification of two phosphorylated components as tyrosine hydroxylase and protein kinase regulatory subunit type II. *J. Neurochem.*, 40:661-669.
- Trifaró, J.M.**; Rodríguez del Castillo, A. & Vitale, M. (1992) Dynamic changes in chromaffin cell cytoskeletons as prelude to exocytosis. *Mol Neurobiol.* 6(4):339-358.
- Tsien, R.Y.** (1988). Fluorescence measurements and photochemical manipulation of cytosolic free calcium. *Trends Neurosci.*, 11:419-424.
- Tsujimoto, A.**; Morita, K.; Kitayama, S. & Dohi, T. (1986). facilitation of acetylcholine-evoked catecholamine release by cyclic AMP on isolated perfused dog adrenal glands. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 279:304-313.
- Turgeon, S.M.** & Albin, R.L. (1992) Zinc modulates GABA<sub>B</sub> binding in rat brain. *Brain Res.*, 596(1-2):30-34.
- Uceda, G.**; Artalejo, A.R.; López, M.G.; Neher, E & García, A. G. (1992) Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels modulate muscarinic secretion in cat chromaffin cells. *J. Physiol. London*, 454:213-230.
- Vega, S.**; Gil, M. S.; Darías, V.; Sánchez Mateo, C. C.; Expósito, M. A. ; Oset-Gasque, M. J.; Parramón, M. González, M.P. (1994) 5,6-Dihidro-1H-pirazolo[4,3-f]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepines. Synthesis and pharmacological evaluation. *Eur. J. Med. Chem*, 29:233-239.
- Vitale, M.**; Rodríguez del Castillo, A & Trifaró, J.M. (1992) Protein kinase C activation by phorbol esters induces chromaffin cell exocytosis in response to nicotinic receptor stimulation. *Neurosci.*, 51(2):463-474.
- Wafford, K.A.**; Whiting, P.J.; Kemp, J.A: (1992) Differences in affinity and efficacy of benzodiazepine receptor ligands and recombinant  $\alpha$ -aminobutyric acid  $\lambda$  receptor subunits. *Molec. Pharmacol.*, 43:240-244.

## ***Bibliografia***

- Wakade, A.R. & Wakade, T.D.** (1982). Secretion of catecholamines from adrenal gland by a single electrical shock: Electrotonic depolarization of medullary cell membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:3071-3074.
- Wakade, A.R. & Wakade, T.D.** (1984). Effects of desipramine, trifluoperazine and other inhibitors of calmodulin on the secretion of catecholamines from the adrenal medulla and postganglionic sympathetic nerves of the salivary gland. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 325:320-327.
- Werth, D.K.; Niedel, J.E.; Pastan, I.** (1983). Vinculin, a cytoskeletal substrate of protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, 258:11423-11426.
- White, W.F.; Snodgrass, S.R. & Ditcher, M.A.** (1985). The picrotoxinin binding site and its relationship to the GABA receptor complex. *J. Neurochem.*, 44:812-817.
- Wilson, S.P.** (1988). Vasoactive intestinal peptide elevates cyclic AMP levels and potentiates secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Neuropeptides*, 11:17-21.
- Wojcik, W.J. & Nell, N.H.** (1984).  $\gamma$ -aminobutyric acid B receptors are negatively coupled to adenylate cyclase in brain and in the cerebellum these receptors may be associated with granule cells. *Mol. Pharmacol.*, 25:24-28.
- Xu, J. & Wojcik, W.J.** (1986). Gamma aminobutyric acid B receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase in cultured cerebellar granule cells: blockade by islet-activating protein. *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 239:568-573.
- Xu, Y.; Duarte, E.P.; Fosberg, E.J.** (1991) Calcium dependency of muscarinic and nicotinic agonist-induced ATP and catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.*, 56:1889-1896.
- Xu, Y.; Duarte, E.P.; Fosberg, E.J.** (1992) Role of thapsigargin-sensitive intracellular  $Ca^{2+}$  pools in secretion induced by muscarinic agonists in porcine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.*, 59:2224-2229.
- Xu, Y.; Fosberg, E.J.** (1993) Effects of caffeine on cholinergic agonist-and  $K^{+}$ -induced cytosolic  $Ca^{2+}$  signals and secretion in porcine adrenal chromaffin cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264(2):770-775.
- Yang, J.S.J.; Olsen, R.W.** (1987)  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor binding in fresh mouse membranes at 22° C: ligand-induced changes in affinity. *Molec. Pharmacol.*, 32:266-277.
- Ymer, S.; Schofield, R.; Draghun, A.; Werner, P.; Köhler, M. & Seeburg, P.H.** (1989) GABA<sub>A</sub> receptor  $\beta$  subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNAs. *EMBO J.*, 8:1665-1670.
- Yoo, S.H. & Albanesi, J.P.** (1990). Inositol 1,4,5-trisphosphate-triggered  $Ca^{2+}$  release from bovine adrenal medullary secretory vesicles. *J. Biol. Chem.*, 265:13446-13448.
- Young, R.R. & Delwaide, P.J.** (1981) Spasticity. *N. Engl. J. Med.*, 304:28-33, 96-99.
- Zaks, W.J.; Creutz, C.E.** (1988) In "Molecular mechanism of membrane fusion". Ohki, s.; Doyle, D.; Flanagan, T.D.; Hui, S.W. & Mayhew, E., eds. Plenum Publishing Co. New York, pp. 325-340.

***VIII.***

***PUBLICACIONES***

---

## MECHANISM THROUGH WHICH GABA<sub>A</sub> RECEPTOR MODULATES CATECHOLAMINE SECRETION FROM BOVINE CHROMAFFIN CELLS

M. P. GONZALEZ,\* M. J. OSET-GASQUE, E. CASTRO, J. BUGEDA, C. ARCE and M. PARRAMON  
Instituto de Bioquímica, Centro mixto C.S.I.C.-U.C.M., Fac. de Farmacia, Universidad Complutense,  
28040 Madrid, Spain

**Abstract**—The actions and mechanism of GABAergic modulation of catecholamine secretion from isolated bovine chromaffin cells were investigated. The GABA<sub>A</sub> receptor agonist muscimol induced a fast rise in cytosolic [Ca<sup>2+</sup>]. The mean peak increase was 290 ± 30 nM over basal levels. The increase in cytosolic [Ca<sup>2+</sup>] was abolished in the absence of extracellular [Ca<sup>2+</sup>] and was blocked by the GABA<sub>A</sub> antagonist bicuculline and the dihydropyridine nifedipine. Muscimol also elicited the release of catecholamines and increased the bisoxonol fluorescence indicating a cell depolarization. The [Ca<sup>2+</sup>] entry was well correlated with muscimol-evoked catecholamine secretion. When cells were treated with muscimol and a second secretagogue, a biphasic behavior was revealed. Muscimol enhanced the catecholamine release evoked by low concentrations of nicotine or K<sup>+</sup>, whereas release obtained at high concentrations of nicotine or K<sup>+</sup> was actually inhibited. When the muscimol effect on membrane potential was studied in the presence of low K<sup>+</sup> or nicotine concentrations, an enhancement of the bisoxonol fluorescence was observed. This effect was reversed at high concentrations of both K<sup>+</sup> and nicotine. Measurement of <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> fluxes showed an increase in membrane permeability to Cl<sup>-</sup> during muscimol stimulation. The influx or efflux in Cl<sup>-</sup> was dependent on membrane potential. In normal conditions, with a K<sup>+</sup> concentration of 5.4 mM, a Cl<sup>-</sup> efflux was observed by both radiometric techniques, with <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> and by the use of the chloride-sensitive fluorescent probe 6-methoxy-*N*-(3-sulphopropyl)quinolinium, as indicator of intracellular Cl<sup>-</sup>. At high nicotine (20 mM) or K<sup>+</sup> concentrations (105 mM) a Cl<sup>-</sup> influx was observed using 6-methoxy-*N*-(3-sulphopropyl)quinolinium. Equilibrium potential for Cl<sup>-</sup> was placed at -51.4 ± 2.1 mV by independent estimation of <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> distribution across membrane.

These results suggest a dual, modulatory role for GABA in the adrenal medulla. Its probable mechanism and implications are discussed.

GABA, the main inhibitory neurotransmitter in the brain, is also present in peripheral tissues, where it can have a functional role in the regulation of hormone secretion.<sup>12</sup> GABA and GABA-related enzymes have been localized in the adrenal medulla<sup>13,16,19</sup> and in chromaffin cells,<sup>23</sup> and GABAergic nerve fibers have been described in canine and bovine adrenals.<sup>22,24</sup>

Sangiah *et al.*<sup>39</sup> reported for the first time that GABA elicited catecholamine (CA) release from isolated bovine adrenals and more recently this stimulatory action of GABA has been confirmed in isolated chromaffin cells.<sup>7,25,28</sup> However, GABA action on the whole adrenal gland has proved more complex. GABA increases the basal secretion of CAs,<sup>1,24,29</sup> while it reduces the secretory response elicited by electrical stimulation of the gland.<sup>18,24</sup>

Recently, we described the presence of two populations of GABA receptors in bovine adrenal medullary membranes, namely GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors.<sup>6,32</sup> Each one exerts opposite effects on CA release, one activating and the other inhibiting the secretion of CAs.<sup>7</sup> In the present study we investigated whether GABA<sub>A</sub> receptor-mediated actions, provide a dual, modulatory role for GABA<sub>A</sub> receptors in chromaffin cells. This GABA effect could be activator or inhibitor, depending on membrane potential. Part of these results has been presented in preliminary form.<sup>33</sup>

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

#### Materials

FURA 2AM bis-[1,3-diethylthiobarbiturate]trimethine-oxonol (bisoxonol) and 6-methoxy-*N*-(3-sulphopropyl)quinolinium (SPQ) were purchased from Molecular Probes. Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) and fetal calf serum were from GIBCO. Collagenase (EC 3.4.4.19) was obtained from Boehringer. Muscimol, bicuculline, picrotoxin, nifedipine, 4,4-diisothiocyanatostilben-2,2-disulphonic acid (DIDS) and furosemide were from Sigma Chemicals; [U-<sup>14</sup>C]Sucrose and <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> were purchased from Amersham Int.; <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O was from Packard. All other chemicals were reagent grade products from Merck.

\*To whom correspondence should be addressed.

**Abbreviations:** bisoxonol, bis-[1,3-diethylthiobarbiturate]trimethine-oxonol; CA, catecholamine; [Ca<sup>2+</sup>], intracellular calcium concentration; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DIDS, 4,4-diisothiocyanatostilben-2,2-disulphonic acid; E<sub>Cl</sub>, equilibrium potential of Cl<sup>-</sup>; EGTA, ethyleneglycolbis(aminoethylether)tetracetate; SPQ, 6-methoxy-*N*-(3-sulphopropyl)quinolinium.

### Cell isolation

Bovine adrenal glands supplied by the local slaughterhouse were immediately placed on ice-cold physiological saline and processed within 1 h following the death of the animals. Glands were digested by retroperfusion with collagenase as described by Bader *et al.*<sup>2</sup> with minor modifications. Chromaffin cells purified in Percoll gradients were suspended at  $1 \times 10^6$  cells/ml in DMEM containing 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 40 µg/ml gentamycin. Cytostatics, 100 µM fluorouracil and 100 µM cytosine arabinoside, were added to prevent overgrowth of contaminating endothelial cells.

This suspension was kept at 4°C and used during the three days following isolation, as described Greenberg and Zinder.<sup>11</sup> Under these conditions, cells were able to attach on to plastic Petri dishes in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub> air at 37°C.

Alternatively, cells were maintained as monolayer cultures on 24-well Costar plates at a density of  $5 \times 10^5$  cells/well. These cultures were used on the 3rd to 5th day after plating.

Cell viability was checked by Trypan Blue exclusion. Purity of the preparation was assayed by specific incorporation of Neutral Red to chromaffin cells. Both parameters were routinely higher than 90%.

### Calcium [ $Ca^{2+}$ ] measurements

Changes in intracellular calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) were monitored by measuring FURA 2AM fluorescence.<sup>12</sup> Cells were washed with Locke medium (140 mM NaCl, 4.4 mM KCl, 2.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5.5 mM glucose, 0.58 mM ascorbic acid and 10 mM HEPES, adjusted to pH 7.5) and incubated with 5 µM FURA 2AM for 45 min at 37°C. Excess dye was removed by washing the cells twice with fresh Locke and suspending in this medium at  $10^6$  cells/ml.

Fluorescence (excitation wavelength = 380 nm, emission = 480 nm) was monitored at 37°C in a well-stirred cuvette containing 1 ml of this suspension with a Perkin-Elmer LS 50 spectrofluorometer (slit, 5 nm exc., 10 nm em.). At the end of each experiment, 1% Triton X-100 was added to permeabilize the cells, allowing the dye to gain access to the extracellular  $[Ca^{2+}]_o$  (1 mM). This concentration of  $[Ca^{2+}]_o$  saturated the dye and provided a measure of the maximum fluorescence signal ( $F_{max}$ ). To determine the intensity of the minimum fluorescence signals ( $F_{min}$ ) 20 mM Tris base was added to raise the pH above 8.2 followed by 5 mM EGTA which reduced the  $[Ca^{2+}]_o$  to less than 1 nM. The  $[Ca^{2+}]_i$  intracellular was calculated using the equation:

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

being the equilibrium dissociation constant ( $K_d$ ) for  $[Ca^{2+}]_i$  FURA of 224 nM.

### Membrane fluorescence measurements

Changes in the membrane potential of chromaffin cells were monitored with the fluorescent dye bisoxonol. This is a lipophilic anion and its distribution across the membrane is dependent upon the membrane potential. Thus, an increase in bisoxonol fluorescence indicates that the membrane potential has depolarized, allowing more of this negatively charged dye to enter the cells.<sup>13</sup> Cells washed as in the case of  $[Ca^{2+}]_i$  measures, were suspended in Locke medium with  $10^6$  cells/ml. To 1 ml of cell suspension, 0.2 µM of bisoxonol was added. This mixture was placed in a fluorimeter as in the case for  $[Ca^{2+}]_i$  and fluorescence measured at wavelengths of 540 nm exc. and 565 nm em. was monitored at 37°C in a well-stirred cuvette in a Perkin-

Elmer spectrofluorometer. Effectors were added at indicated concentrations. Controls were performed using Locke medium in spite of effector. Fluorescence intensity is reported in arbitrary units.

### 6-Methoxy-N-(3-sulphopropyl)quinolinium fluorescence measurement

Cells in suspension were washed with normal Locke and then loaded with 10 mM SPQ dissolved in Locke for 45 min at 37°C. Cells were washed twice with Locke and suspended in this medium. The fluorescence was monitored using a Perkin-Elmer LS 50 fluorescence spectrophotometer (350 nm exc., 445 nm em.) after addition of 10 µM DIDS and 1 mM furosemide dissolved in dimethylsulphoxide. These were added in order to prevent Cl<sup>-</sup> fluxes through the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> cotransporter and the HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup> exchange mechanisms, respectively.<sup>3</sup> The effect of muscimol on the chloride fluxes were recorded under the conditions indicated in each experiment. A magnetic stirring was used to ascertain the rapid and even distribution of the added components. Under these conditions an increase in fluorescence suggests a decrease in intracellular Cl<sup>-</sup> due to a Cl<sup>-</sup> efflux from the cells.<sup>14</sup>

### Catecholamine secretion

The release of catecholamines evoked by muscimol, nicotine or high K<sup>+</sup> solution was determined on-line, essentially as described by Castro *et al.*<sup>3</sup> About 10<sup>6</sup> cells were placed in a Millex filter and perfused continuously with Locke medium at 2 ml/min. The effluent from the cells was directed to a Metrohm VA 641 electrochemical detector for the continuous monitoring of CA released. Secretagogues were delivered in 50-µl pulses through a Rheodyne 7010 loop injector.

### Chloride equilibrium potential and fluxes

Equilibrium potential for Cl<sup>-</sup> was estimated from the Nernst equation, measuring distribution of <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> across the membrane. 10<sup>6</sup> cells were incubated in 250 µl of Locke with <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> (2.5 µCi/ml) and <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O (0.2 µCi/ml) for 2 h to allow equilibrium distribution. Cells were pelleted, the supernatants collected and pellets dissolved in 0.5% Triton X-100. Both portions were counted and the ratio <sup>36</sup>Cl/<sup>3</sup>H calculated for each tube. In parallel experiments cells were double marked with [<sup>3</sup>H]<sub>2</sub>O and [U-<sup>14</sup>C]sucrose (0.5 µCi/ml) to estimate the extracellular medium trapped in the pellets. The β-counter was calibrated with quenched standards from Beckman using the method of the displacement of Compton spectrum inflexion point.

<sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> efflux was determined from plated cells ( $5 \times 10^5$  cells/well) preloaded for 2 h in Locke medium containing 2 µCi/ml <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup>. Each well was washed twice for 10 s, then 250 µl of fresh Locke was added and incubated for 15 s. This medium was collected and the cells lysed into 250 µl of 0.1 M HClO<sub>4</sub>. Radioactivity of both portions was counted and <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> efflux expressed as percentage in the medium with respect to cell content.

## RESULTS

### Effects of muscimol on intracellular calcium concentration

When chromaffin cells were challenged with muscimol, a selective GABA<sub>A</sub> receptor agonist, we could observe a fast rise in free  $[Ca^{2+}]_i$  as revealed by FURA 2 fluorescence, presented in Fig. 1. The mean peak increase evoked by 50 µM muscimol was  $290 \pm 30$  nM. Muscimol effect was eliminated by the

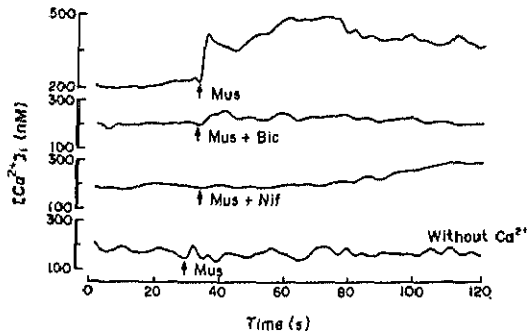


Fig. 1. Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  transients elicited by stimulation of chromaffin cells with muscimol. Superimposed records from different cell samples are traced. Muscimol (Mus),  $50 \mu\text{M}$ , was added at the arrow. Drugs were added 1 min before. Bic, bicuculline  $25 \mu\text{M}$ ; Nif, nifedipine  $10 \mu\text{M}$ . External  $[\text{Ca}^{2+}]$  was  $2.5 \text{ mM}$  except in the trace labeled without  $\text{Ca}^{2+}$ . Similar records were obtained from different samples in three cell batches.

GABA<sub>A</sub> antagonist bicuculline. This rise in internal  $[\text{Ca}^{2+}]$  was dependent on extracellular calcium, and was blocked by the L-type calcium channel blocker nifedipine.

Muscimol alone induced a significant CA release from chromaffin cells, showing a good correlation between the extent of the  $[\text{Ca}^{2+}]$  increase and the amount of secretion (Table 1).

#### Effects of muscimol on evoked catecholamine release

Challenging chromaffin cells with short pulses of nicotine resulted in peaks of elevated CA secretion, amounting to about  $1.97 \pm 0.27\%$  of total cell CA content for a maximal  $20 \mu\text{M}$  concentration of nicotine. Muscimol affected the release of CAs evoked by nicotine in different ways depending on the dose of nicotine used, as can be seen in Fig. 2. When muscimol was delivered to the cells together with a relatively low dose of nicotine we observed an almost additive enhancement of secretion. However, at high concentrations of nicotine, muscimol was not enhancing, but actually decreased the CA release.

This dual action was better observed when high  $\text{K}^+$  solutions were used to evoke secretion, as in Fig. 3. Muscimol again showed an opposite effect, it induced an enhancement of CA release at low  $\text{K}^+$  concentrations and clearly inhibited the  $\text{K}^+$ -evoked secretion at higher  $\text{K}^+$  concentrations.

Table 1. Effect of different muscimol concentrations on catecholamine secretion and  $\text{Ca}^{2+}$  entry in adrenal chromaffin cells

Conditions	CA secretion (pmol/ $10^6$ cells)	$\text{Ca}^{2+}$ (nM)
Muscimol ( $\mu\text{M}$ )		
0	—	$196 \pm 31$
1	$7.5 \pm 3.5$	$143 \pm 9$
10	$15.2 \pm 2.5$	$227 \pm 26$
50	$35.2 \pm 6.1$	$283 \pm 30$

$\text{Ca}^{2+}$  values for 1–50  $\mu\text{M}$  muscimol are referred as increment in respect to basal  $\text{Ca}^{2+}$ .

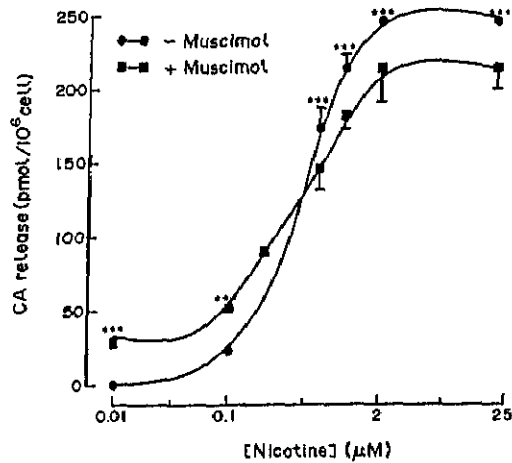


Fig. 2. Muscimol effect on the nicotine-evoked CA secretion. Cells were challenged with pulses of increasing concentrations of nicotine alone (●—●) or together with  $21 \mu\text{M}$  muscimol (■—■). Averaged peak height  $\pm$  S.E.M. of three independent determinations are shown.  $***P < 0.001$ .

#### Effect of muscimol on bisoxonol fluorescence

Muscimol added to a cell suspension at concentrations between 1 and  $3 \mu\text{M}$  increased bisoxonol fluorescence in a dose-dependent way (Fig. 4a). When  $\text{K}^+$  concentration was  $15.4 \text{ mM}$  muscimol did not produce any effect on bisoxonol fluorescence (Fig. 4b) and at a  $\text{K}^+$  concentration of  $55 \text{ mM}$ , muscimol decreased this fluorescence (Fig. 4c). Nicotine ( $10 \mu\text{M}$ ) increased bisoxonol fluorescence and muscimol decreased nicotine-evoked bisoxonol fluorescence (Fig. 4d). This muscimol effect was abolished in the presence of  $1 \mu\text{M}$  picrotoxin (Fig. 4b).

#### $\text{Cl}^-$ equilibrium potential and $^{36}\text{Cl}^-$ fluxes

Collected averages for  $^{36}\text{Cl}^-$ ,  $[\text{H}_2\text{O}]$  and  $[\text{C}]$ sucrose distribution inside and outside

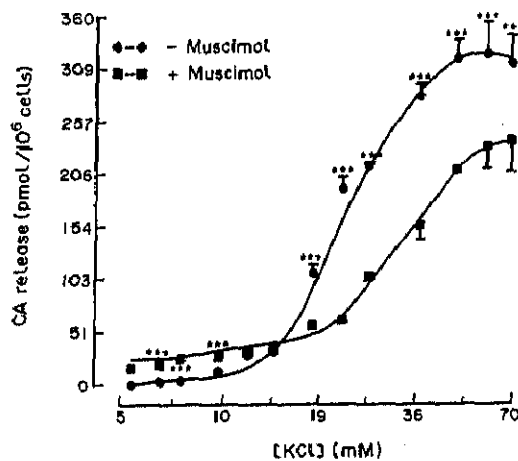


Fig. 3. Muscimol effect on the high  $\text{K}^+$ -evoked CA secretion. Experiments were performed, at least, in triplicate.  $***P < 0.001$ .

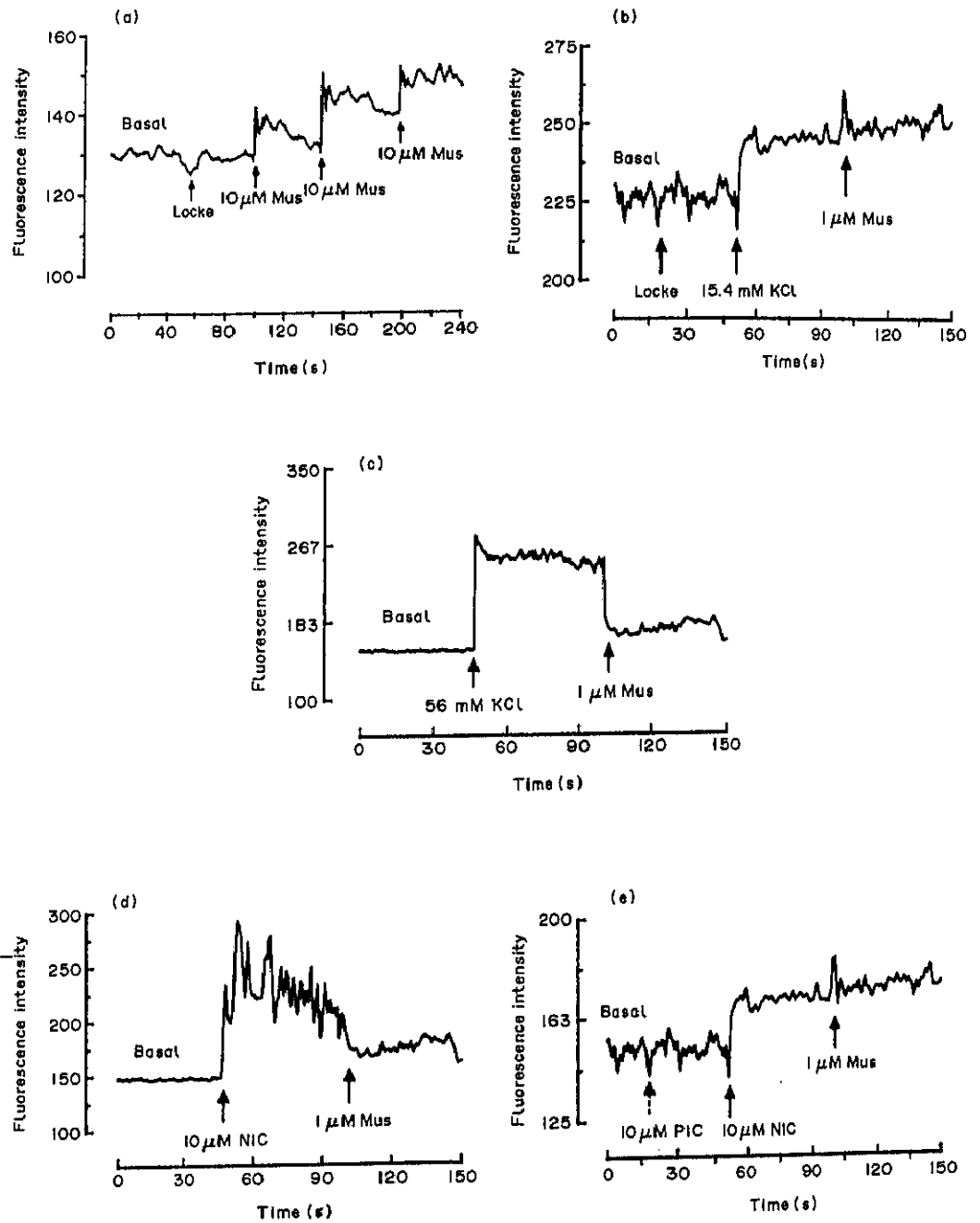


Fig. 4. Bisoxonol fluorescence as a function of: (a) muscimol (Mus) concentration; (b) and (c) effect of muscimol on bisoxonol fluorescence at different  $\text{K}^+$  concentrations. (d) Bisoxonol fluorescence in the presence of  $10\ \mu\text{M}$  nicotine (NIC) and a  $1\ \mu\text{M}$  muscimol. (e) As d but in the presence of  $1\ \mu\text{M}$  picrotoxin. Muscimol and picrotoxin were added at the time indicated by the arrow. Figure data corresponded to a representative experiment from those performed, with at least three sets of cells. The scale is given as arbitrary intensity fluorescence in bisoxonol fluorescence from the basal levels. L = Locke; M = muscimol,  $1\ \mu\text{M}$ .

Table 2. Equilibrium distribution of <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> across chromaffin cell membrane

	Supernatant	Pellet
<sup>36</sup> Cl/ <sup>3</sup> H label		
d.p.m. <sup>36</sup> Cl	671,812 ± 3638	6781 ± 202
d.p.m. <sup>3</sup> H	49,827 ± 1026	845 ± 38
Ratio <sup>36</sup> Cl/ <sup>3</sup> H	13.48 ± 0.2	8.03 ± 0.31
<sup>14</sup> C/ <sup>3</sup> H		
d.p.m. <sup>14</sup> C	252,879 ± 980	1664 ± 45
d.p.m. <sup>3</sup> H	66,828 ± 1070	842 ± 24
Ratio <sup>14</sup> C/ <sup>3</sup> H	3.78 ± 0.04	1.97 ± 0.05

Cells were incubated for 21 h with Locke containing <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O and either <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> or [<sup>14</sup>C]sucrose. Cells were centrifuged and the radioactivity of each isotope in pellets and supernatants determined. See Experimental Procedures for details. The values represent means ± S.E.M. of two experiments each performed in quintuplicate.

chromaffin cells after a long equilibrating period are shown in Table 2. The equilibrium potential for Cl<sup>-</sup> was estimated, from individual ratios <sup>36</sup>Cl/<sup>3</sup>H for each tube, as  $-51.4 \pm 2.1$  mV.

<sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> efflux from chromaffin cells was significantly stimulated by treatment with muscimol, as shown in Table 3. This efflux was reduced by picrotoxin, a selective blocker of the GABA receptor-associated Cl<sup>-</sup> channel. Furthermore, picrotoxin prevented the stimulatory effect of muscimol.

#### 6-Methoxy-N-(3-sulphopropyl)quinolinium fluorescence

Muscimol, at a concentration 10 μM, increases the fluorescence of SPQ when the K<sup>+</sup> concentration in the external medium was 5.4 mM (Fig. 5a). At a K<sup>+</sup> concentration of 25.4 mM, muscimol had no effect on SPQ fluorescence (Fig. 5b) and at 105 mM K<sup>+</sup>, muscimol decreased fluorescence (Fig. 5c). Muscimol (10 μM) decreased SPQ fluorescence when nicotine was present at 20 μM concentration (Fig. 5d).

#### DISCUSSION

The release of CAs from bovine chromaffin cells is triggered by [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> entry through voltage-dependent calcium channels.<sup>10,30</sup> These channels are opened by depolarizing the cells above -40 mV.<sup>13,14,17,38</sup> Our results show that muscimol-evoked CA release is driven by [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase due to calcium entry from extracellular medium. This [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> entry is attributed to activation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>v</sub> channels by GABA<sub>A</sub>-evoked depolarization of cells. This suggestion is based on the blocking action of the dihydropyridine nifedipine, which is known to block [Ca<sup>2+</sup>]<sub>v</sub> channels in chro-

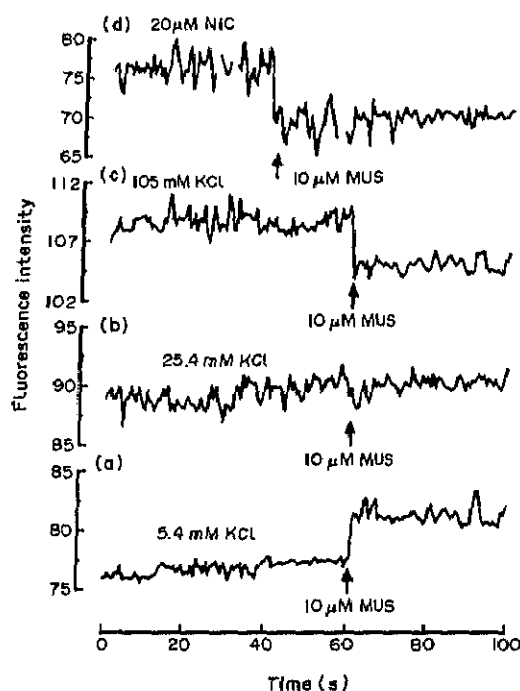


Fig. 5. Muscimol-induced changes in the intracellular fluorescence of chromaffin cells in the presence of 10 μM muscimol (MUS) at (a) 5.4 mM extracellular K<sup>+</sup>; (b) 25.4 mM K<sup>+</sup>; (c) 105 mM K<sup>+</sup> and (d) 20 μM nicotine (NiC). Muscimol was added as indicated by the arrow. The scale is given as arbitrary intensity fluorescence in SPQ fluorescence from the basal level. Original recordings were traced from a representative experiment which was chosen from those performed, with at least three sets of cells and with similar results.

maffin cells,<sup>31</sup> and on the proportionality between [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> rises and muscimol-evoked release. This proportionality has been shown to be maintained only when the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> rise is triggered by depolarization of the cells and not when [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> comes from internal stores.<sup>9,34</sup> The depolarizing effect produced by muscimol is also correlated with the muscimol effect on bisoxonol fluorescence since an increase is correlated with a depolarization.<sup>5</sup>

Although GABA is mainly an inhibitory transmitter, depolarized responses to GABA are not unknown. GABA-induced depolarizations have been recorded at sensory ganglion neurons and, interestingly, at sympathetic neurons,<sup>4</sup> which are closely related to chromaffin cells and into which they can be transformed.<sup>1</sup> This dual GABA action has been demonstrated in chromaffin cells with our bisoxonol experiments which indicate that membrane potential plays an important role in GABA action through its GABA<sub>A</sub> receptor, since the bisoxonol fluorescence increase (depolarization) or decrease (hyperpolarization) in the presence of muscimol according to the external K<sup>+</sup> concentration. These results are in accordance with our finding that muscimol can increase or decrease the CA secretion at different K<sup>+</sup>

Table 3. <sup>36</sup>Cl efflux induced by 10 μM muscimol, in the absence or presence of 10 μM picrotoxin

Conditions	Percentage efflux
Basal	100
Muscimol	128 ± 4
Muscimol + picrotoxin	78 ± 6

concentrations. Similar results were obtained with nicotine.

GABA<sub>A</sub> receptor is a chloride channel which opens upon binding of GABA.<sup>37,40</sup> Therefore, the direction of the potential change induced by GABA depends on the relative positions of the actual membrane potential and the  $E_{\text{GABA}}$ , which is, under physiological conditions, the equilibrium potential for Cl<sup>-</sup> ( $E_{\text{Cl}}$ ). Our results on <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> fluxes do not allow us to determine the direction of the net flux of Cl<sup>-</sup>, but clearly show that an early increase in the membrane permeability to Cl<sup>-</sup> is involved in the mechanism of action of muscimol. This hypothesis is confirmed with our SPQ results in which one can observe an increment in SPQ fluorescence (which means a Cl<sup>-</sup> efflux) by muscimol at K<sup>+</sup> concentrations lower than 25 mM and a decrease in SPQ fluorescence at 105 mM K<sup>+</sup> in the external medium, which indicates a higher intracellular Cl<sup>-</sup>. The estimation of the  $E_{\text{Cl}}$  in chromaffin cells, approx. -50 mV, is some millivolts above the reported resting potential for these cells, ranging from -80 mV to -55 mV.<sup>13,17,26</sup> This finding strongly supports a depolarizing effect for GABA<sub>A</sub> activation by muscimol in chromaffin cells.

It could be argued that  $E_{\text{Cl}}$  is still below the threshold for [Ca<sup>2+</sup>] channels activation. However,  $E_{\text{Cl}}$  is certainly not under the threshold for Na<sup>+</sup> channels, and GABA treatment of chromaffin cells induces repetitive firing of action potentials in these cells.<sup>35</sup> In this way a short-sized GABA<sub>A</sub>-induced depolarization can be amplified and eventually determination of [Ca<sup>2+</sup>] entry through voltage-activated channels. On the other hand, our estimation of  $E_{\text{Cl}}$  could be quite conservative. Indirect data of intracellular [Cl<sup>-</sup>] in chromaffin cells, approx. 34 mM,<sup>36</sup> would place  $E_{\text{Cl}}$  above -40 mV, and so in the range of a direct action of [Ca<sup>2+</sup>] channels.

The intermediate position of  $E_{\text{Cl}}$  plays a crucial role in our explanation of the dual effect of GABA<sub>A</sub> receptors on the control of CA release. On basal conditions, the opening of Cl<sup>-</sup> channels should depolarize the cells towards  $E_{\text{Cl}}$ . But, if the opening coincides with a stimulus depolarizing the membrane above the  $E_{\text{Cl}}$ , this action will be dampened by the increased permeability to Cl<sup>-</sup>, and a relative inhibition will be obtained. This is exactly the behavior observed in the interaction between muscimol and nicotine or KCl in evoking CA release and on bisoxonol and SPQ probes. Muscimol enhances the secretion evoked by a low stimulus, and then also enhances the bisoxonol and SPQ fluorescence, but inhibits the secretion and the bisoxonol fluorescence induced by higher ones. These results clearly demonstrated that GABA, through its GABA<sub>A</sub> receptor depolarizes or hyperpolarizes the chromaffin cells, and, as a consequence, GABA has an activating or inhibiting effect on CA secretion.

The point at which the muscimol and KCl curves cross gives the approximate membrane potential at which there is no driving force for Cl<sup>-</sup> ions. Figure 3

renders a cross point at about 12 mM KCl, which corresponds to about -50 mV using the Goldman equation and intracellular data for [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, and ratio P<sub>K</sub>/P<sub>Na</sub> from Friedman *et al.*<sup>17</sup> This finding together with that obtained with bisoxonol and SPQ strongly supports our proposal of the inversion of the Cl<sup>-</sup> driving force as the basis for the inversion of GABA<sub>A</sub> action on evoked CA release from chromaffin cells.

Our findings extend the results of a recent work from Kitayama *et al.*<sup>27</sup> They observed a more than additive enhancement by GABA of acetylcholine-induced release. However, they used a 3 μM concentration of acetylcholine to elicit secretion. As  $E_{\text{C}_50}$  for acetylcholine in chromaffin cells is higher than 50 μM, they were working in the low stimulus range where we also see a potentiation between cholinergic and GABAergic stimulation. In contrast they found that GABA inhibited the release induced by 25 μM veratridine, which is a quite big challenge according to our results. Our proposal of GABA<sub>A</sub> effects being dependent on  $E_{\text{Cl}}$  and permeability to Cl<sup>-</sup> is supported by the finding that Cl<sup>-</sup> replacement in the extracellular medium enhances GABA-induced release, while depletion of Cl<sup>-</sup> selectively abolishes GABA action.<sup>27</sup>

In view of the dual effect of GABA<sub>A</sub> receptor activation on evoked CA release, the contradictory actions of GABA in the adrenal glands<sup>18,24</sup> can be reconciled with a single mechanism of action. So, GABA enhances the basal CA release at the normal membrane potentials of chromaffin cells because when GABA is bound to its GABA<sub>A</sub> receptor it produces a cell depolarization by a Cl<sup>-</sup> efflux. This depolarization induces an elevation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and, as a consequence, a CA release.

GABA, on nicotine-evoked CA release, could produce an activatory effect on this CA secretion if the membrane potential, in the presence of nicotine, is lower than the  $E_{\text{Cl}}$  (low nicotine concentrations), but GABA decreases CA release induced by high nicotine concentrations because, in these conditions, the membrane potential produced by these nicotine doses is probably higher than the  $E_{\text{Cl}}$  and then GABA induces a hyperpolarizing effect on chromaffin cells. Consistent with a physiological role for GABA in the adrenal medulla, bicuculline, a GABA<sub>A</sub> antagonist, has been found to enhance secretory response to electrical stimulation<sup>18</sup> while inhibiting the spontaneous release of CAs,<sup>24</sup> probably by reducing the action of endogenous GABA within the glands.

*Acknowledgements*—This work was supported by grant CICYT PM88-0021 from the Spanish Ministry of Education and Science.

## REFERENCES

- 1 Anderson D. J. (1989) Cellular neoteny: a possible developmental basis for chromaffin cells plasticity. *Trends Genet.* **5**, 174-178.
- 2 Blader M. F., Ciesielski-Treska J., Thieme D., Hesketh J. E. and Aunis D. (1981) Immunocytochemical study of microtubules in chromaffin cells in culture and evidence that tubulin is not integral protein of the chromaffin granule membrane. *J. Neurochem.* **37**, 917-933.
- 3 Boron W. F. (1983) Transport of H<sup>+</sup> and ionic weak acids and bases. *J. Memb. Biol.* **72**, 1-16.
- 4 Flowers N. G. and Hill D. R. (1986) GABA mechanisms in autonomic ganglia. In *GABAergic Mechanisms in the Mammalian Periphery* (eds Erdo S. L. and Bowery N. G.), pp. 135-152. Raven Press, New York.
- 5 Brauner T., Hülser D. F. and Strasser R. J. (1984) Comparative measurement of membrane potentials with microelectrodes and voltage-sensitive dyes. *Biochem. biophys. Acta* **771**, 208-216.
- 6 Castro E., Oset-Gasque M. J., Cañadas S., Gimenez A. and Gonzalez M. P. (1988) GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> sites in bovine adrenal medulla membranes. *J. Neurosci. Res.* **20**, 241-245.
- 7 Castro E., Oset-Gasque M. J. and Gonzalez M. P. (1989) GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors are functionally active in the regulation of catecholamine secretion by bovine chromaffin cells. *J. Neurosci. Res.* **23**, 290-296.
- 8 Castro E. (1980) Mecanismos de modulación GABAérgicos en células cromafines bovinas. Ph.D. thesis. Universidad Complutense de Madrid.
- 9 Check T. R., O'Sullivan A. J., Moreton R. B. and Berridge M. J. (1989) Spatial localization of the stimulus-induced rise in cytosolic [Ca<sup>2+</sup>] in bovine adrenal chromaffin cells. *Fedn Eur. biochem. Soc. Lett.* **247**, 429-434.
- 10 Douglas W. W. and Rubin R. P. (1961) The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J. Physiol.* **159**, 40-57.
- 11 Engblom A. C., Holopainen I. and Akerman K. E. O. (1989) Determination of GABA receptor-linked C-fluxes in rat cerebellar granule cells using a fluorescent probe SPQ. *Neurosci. Lett.* **104**, 326-330.
- 12 Erdő S. L. (1985) Peripheral GABAergic mechanisms. *Trends Pharmac. Sci.* **6**, 205-208.
- 13 Fenwick E. M., Marty A. and Neher E. (1982) A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J. Physiol.* **331**, 577-597.
- 14 Fenwick E. M., Marty A. and Neher E. (1982) Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* **331**, 599-615.
- 15 Fernandez-Ramul J. M., Sanchez-Prieto J., Cañadas S. and Gonzalez M. P. (1982) Presence of glutamate decarboxylase in bovine adrenal medullary cells. *Rev. Esp. Fisiol.* **38**, 91-96.
- 16 Fernandez-Ramul J. M., Sanchez-Prieto J., Cañadas S. and Gonzalez M. P. (1983) GABA-T in bovine medulla cells: kinetic properties and comparison with GABA-T from other tissues. *Rev. Esp. Fisiol.* **39**, 299-304.
- 17 Friedman I. E., Lelkes P. I., Lavi E., Rosenheck K., Schneeweiss F. and Schneider A. S. (1985) Membrane potential and catecholamine secretion by bovine adrenal chromaffin cells: use of tetraphenylphosphonium distribution and carbocyanine dye fluorescence. *J. Neurochem.* **44**, 1391-1402.
- 18 Fujimoto M., Kataoka Y., Gindoffi A. and Hanbauer I. (1987) Effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor agonists and antagonists on the release of enkephalin containing peptides from dog adrenal gland. *J. Pharmac. exp. Ther.* **243**, 195-199.
- 19 Gonzalez M. P., Oset-Gasque M. J., Gimenez A. and Cañadas S. (1987) Succinic semialdehyde dehydrogenase activity in bovine adrenal medulla and blood platelets: a comparative study with the brain enzyme. *Comp. Biochem. Physiol.* **86B**, 489-492.
- 20 Greenberg A. and Zinder C. (1982)  $\alpha$  and  $\beta$  receptor control of catecholamine secretion from isolated adrenal medulla cells. *Cell Tissue Res.* **266**, 655-665.
- 21 Grynkiewicz G., Poenie M. and Tsien R. Y. (1985) A new generation of [Ca<sup>2+</sup>] indicators with greatly improved fluorescence. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450.
- 22 Gindoffi A. and Hanbauer I. (1986) In *GABA and Endocrine Function* (eds Racagni G. and Donoso A. O.), pp. 165-162. Raven Press, New York.
- 23 Kataoka Y., Cutman Y., Gindoffi A., Panula P., Wróblewski J., Cosenza-Murphy D., Wu J. Y. and Costa E. (1984) Intrinsic GABAergic system of adrenal chromaffin cells. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 3218-3222.
- 24 Kataoka Y., Fujimoto M., Alho M., Gindoffi A., Cieffard M., Kelly G. D. and Hanbauer I. (1986) Intrinsic gamma aminobutyric acid receptors modulate the release of catecholamine from canine adrenal glands *in situ*. *J. Pharmac. exp. Ther.* **239**, 584-590.
- 25 Kataoka Y., Ohara-Imazumi M., Ueki S. and Kumakura K. (1988) Stimulatory action of  $\gamma$ -aminobutyric acid on catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells measured by a real time monitoring system. *J. Neurochem.* **50**, 1765-1768.
- 26 Kudojoro Y. and Rütche A. K. (1980) Chromaffin cells action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. *J. Physiol.* **307**, 199-216.
- 27 Kitayama S., Morita K., Dohi T. and Tsujimoto A. (1990) Enhancement by GABA of the stimulation-evoked catecholamine release from cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac.* **341**, 414-418.
- 28 Kitayama S., Koyama Y., Morita K., Dohi T. and Tsujimoto A. (1986) Increase in catecholamine release and <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> uptake induced by GABA in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Eur. J. Pharmac.* **131**, 145-147.
- 29 Kitayama S. and Tsujimoto A. (1986) Involvement of GABAergic mechanisms in the catecholamine secretion from adrenal medulla. In *GABAergic Mechanisms in the Mammalian Periphery* (eds Erdo S. L. and Bowery N. G.), pp. 135-152. Raven Press, New York.
- 30 Knight D. E., Sugden D. and Baker P. F. (1988) Evidence implicating protein kinase C in exocytosis from electroporated bovine chromaffin cells. *J. Memb. Biol.* **104**, 21-34.
- 31 Ludona M. G., Aunis D., Gaudin E. and Garcia A. G. (1987) Dihydropyridine modulation of the chromaffin cell secretory response. *J. Neurochem.* **48**, 483-490.
- 32 Martinez P. M., Gimenez A., Castro E., Oset-Gasque M. J., Cañadas S. and Gonzalez M. P. (1987) GABA binding to adrenal medulla membranes is sensitive to baclofen. *Comp. Biochem. Physiol.* **88C**, 155-157.

33. Oset-Gasque M. J., Castro E. and González M. P. (1992) GABAergic mechanisms in bovine adrenal medulla chromaffin cells. In *Int. Symp. on Peripheral GABAergic Mechanisms*. Sat Symp to VIII ESN Meeting, Roma (in press).
34. O'Sullivan, A. J. and Burgoyne R. D. (1989) A comparison of bradykinin, angiotensin II and muscarinic stimulation of cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Biosci. Rep.* **9**, 243-252.
35. Peters J. A., Lambert J. J. and Cottrell G. A. (1989) An electrophysiological investigation of the characteristics and function of GABA-A receptors on bovine adrenomedullary chromaffin cells. *Eur. J. Physiol.* **415**, 95-103.
36. Pocock G. (1983) Ionic and metabolic requirements for stimulation of secretion by ouabain in bovine adrenal medullary cells. *Molec. Pharmac.* **23**, 671-680.
37. Pritchett D. B., Sontheimer H., Gorman C. M., Kettemann H., Seeburg P. H. and Schofield P. R. (1988) Transient expression shows ligand gating and allosteric potentiation of GABA-A receptor subunits. *Science* **242**, 1306-1308.
38. Rosario L. M., Soria B., Feuerstein G. and Pollard H. B. (1989) Voltage-sensitive calcium flux into bovine chromaffin cells occurs through dihydropyridine-sensitive and dihydropyridine- and  $\omega$ -conotoxin-insensitive pathway. *Neuroscience* **29**, 735-747.
39. Sangiah S., Borowitz J. L. and Yim G. K. W. (1974) Action of GABA, picrotoxin and bicuculline on adrenal medulla. *Eur. J. Pharmac.* **27**, 130-135.
40. Schofield P. R., Darlison M. G., Fujita N., Burt D. R., Stephenson F. A., Rodriguez H. and Rhee L. M. (1987) Sequence and functional expression of the GABA-A receptor shows a ligand-gated receptor superfamily. *Nature* **328**, 221-227.
41. Waggoner A. S. (1979) Dye indicators of membrane potential. *A. Rev. Biophys. Bioenerg.* **8**, 47-68.

(Accepted 3 September 1991)

# GABA<sub>B</sub> receptors modulate catecholamine secretion in chromaffin cells by a mechanism involving cyclic AMP formation

M.J. Oset-Gasque, M. Parramón & M.P. González

Instituto de Bioquímica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

- 1 The function of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA<sub>B</sub>) receptors in modulation of catecholamine secretion by chromaffin cells and the possible mechanism involved in this action have been examined.
- 2 The GABA<sub>B</sub> agonists (–)-baclofen and 3-aminopropylphosphinic acid (3-APPA) were found to induce a dose-dependent increase of basal catecholamine secretion. The EC<sub>50</sub>s were  $151 \pm 35 \mu\text{M}$  and  $225 \pm 58 \mu\text{M}$  for baclofen and 3-APPA, respectively. This stimulatory effect was specific since it could be blocked by 0.5  $\mu\text{M}$  of the specific GABA<sub>B</sub> antagonist CGP-35348.
- 3 In contrast, preincubation of chromaffin cells with the GABA<sub>B</sub> agonists was found to inhibit, in a dose-dependent manner, the catecholamine secretion evoked by 10  $\mu\text{M}$  nicotine and 200  $\mu\text{M}$  muscimol.
- 4 The effects of GABA<sub>B</sub> agonists on both basal and evoked catecholamine secretion were found to be accompanied by parallel changes in intracellular calcium concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). GABA<sub>B</sub> agonists produced a dose-dependent increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  which was partially blocked by CGP 35348, but they produced a strong inhibition of the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase induced by nicotine and muscimol.
- 5 The GABA<sub>B</sub> agonists also produced a dose-dependent increase in intracellular cyclic AMP levels, there being a direct correlation between both increase in catecholamine secretion and in intracellular cyclic AMP levels.
- 6 The pretreatment of chromaffin cells with pertussis toxin doubled the catecholamine secretion and increased by four times the intracellular cyclic AMP levels evoked by GABA<sub>B</sub> agonists.
- 7 The possible involvement of adenylate cyclase in the mechanism of GABA<sub>B</sub> receptor modulation of catecholamine secretion is discussed.

**Keywords:** GABA<sub>B</sub> receptors, catecholamine secretion, chromaffin cells; cyclic AMP; adrenal medulla

## Introduction

Different biochemical and physiological evidence concerning the regulation of catecholamine secretion by chromaffin cells show that, in addition to nicotinic cholinergic receptors (nAChR) whose role in adrenal medulla function is well established, there are other receptors implicated in the modulation of this response. These include muscarinic cholinergic receptors (Cheek & Burgoyne, 1985), opioid peptide (Lemaire *et al.*, 1981), substance P (Loven *et al.*, 1979), bradykinin (Owen *et al.*, 1989), histamine H<sub>1</sub> (Chahou *et al.*, 1991), dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> (Stauderman & Pruss, 1990; Huettl *et al.*, 1991), prostaglandin E<sub>2</sub> (Negishi *et al.*, 1989; Ito *et al.*, 1991), adenosine (Chern *et al.*, 1988), angiotensin II (Marley *et al.*, 1989; O'Sullivan & Burgoyne, 1989) and GABA<sub>A</sub> receptors (Castro *et al.*, 1989).

In relation to  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) regulation of chromaffin cell secretion, previous work by our group has demonstrated the presence of all the enzymes implicated in GABA metabolism in the bovine adrenal medulla (Fernández-Ranul *et al.*, 1982, 1983) as well as the existence of an active uptake (Oset-Gasque & Aunis, 1989), and an exocytotic release of this neurotransmitter (Oset-Gasque *et al.*, 1990). Moreover, the presence of the two subtypes of GABA receptors, one sensitive to muscimol (GABA<sub>A</sub>) and the other insensitive to muscimol but sensitive to baclofen (GABA<sub>B</sub>) has also been described (Castro *et al.*, 1988).

The function and molecular mechanism of GABA<sub>A</sub> receptors in the adrenal medulla is now well established. Our recent studies demonstrated that when GABA binds to GABA<sub>A</sub> receptors in the adrenal medulla it modulates catecholamine secretion by a mechanism dependent on the membrane potential (González *et al.*, 1992). Nevertheless the

function and mechanism of action of GABA<sub>B</sub> receptors in adrenal medulla function has not yet been investigated.

GABA<sub>B</sub> receptors have recently assumed additional importance because of evidence that they could mediate both pre- and postsynaptic actions in the brain (see Bowery, 1989 for a review). Their presence has also been demonstrated in peripheral tissues and enteric nerve terminals, where they appear to have a function in the regulation of the evoked release of excitatory neurotransmitters and hormones (Bowery *et al.*, 1980; Huston *et al.*, 1990), in the regulation of muscular contraction and tone (see Bowery, 1989, for a review) and in the facilitation of the induction of long-term potentiation (Mott & Lewis, 1991).

These actions seem to be mediated by molecular mechanisms involving the participation of second messenger systems such as adenylate cyclase, inositolphosphate turnover or regulation of Ca<sup>2+</sup> or K<sup>+</sup> conductance. However it is not clear whether or not these reactions occur sequentially or independently and which component is directly coupled with GABA<sub>B</sub> receptors.

In this paper we examine (1) the role of GABA<sub>B</sub> receptors in the regulation of chromaffin catecholamine secretion, (2) the possible interactions between this GABA<sub>B</sub> and other receptor systems known to regulate this process and (3) the possible molecular mechanism linked to these actions.

## Methods

### Cell isolation and culture

Bovine chromaffin cells were isolated from adrenal glands and cultured as described by Bader *et al.* (1981) with minor

\* Author for correspondence

modifications. Cell viability was checked with trypan blue and chromaffin cell purity was assessed by the specific incorporation of 3 mg ml<sup>-1</sup> neutral red, which dyes red specifically only the cells which contain catecholamines, to these cells. Viability and purity were always higher than 90%. Cells were suspended in DMEM containing 10% FCS, antibiotics (100 µg ml<sup>-1</sup> penicillin, 100 µg ml<sup>-1</sup> streptomycin and 40 µg ml<sup>-1</sup> gentamicin), and cytostatics (10 µM fluoro-deoxyuridine and 10 µM cytosine arabinoside), plated in 24 well Costar cluster dishes, at a density of 0.5 × 10<sup>6</sup> cells per well, and used 3–7 days after plating.

#### Measurement of catecholamine secretion

Chromaffin cells were washed twice, at 10 min intervals with 1 ml of a Krebs HEPES solution (Locke medium) containing (mM) NaCl 140, KCl 4.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, glucose 11, ascorbic acid 0.5 and HEPES 15, pH = 7.5, at 37°C. This medium was removed and cells were stimulated, during 10 min periods at 37°C, with 0.5 ml of a fresh Locke medium containing the different secretagogues used as indicated in each type of experiment. At the end of incubation the medium was removed and cells lysed with 0.4 M perchloric acid, and then scraped off the plates. Incubation medium and cell lysates were both used for the determination of catecholamine secretion and total catecholamine content, respectively. The catecholamine determination, in both sample types, adequately diluted and neutralized (see below), was performed with an electrochemical detector (Metrohm 641 VA-detector) adjusted to + 580 mV and registered in an LKB recorder model 2210, using for this calibration a standard curve with noradrenaline. Results are presented as a percentage of catecholamine released in the incubation medium in respect of the total catecholamine content (incubation medium + pellet).

#### Measurement of intracellular levels of cyclic AMP

Chromaffin cells, prepared as indicated above, were stimulated for 10 min with appropriate secretagogues as indicated. Cells were incubated in the presence of 0.5 mM isobutyl methyl xanthine (IBMX) in order to prevent adenosine 3':5'-cyclic monophosphate (cyclic AMP) degradation. The medium was removed, cells lysed with 200 µl of 0.4 M HClO<sub>4</sub>, and scraped off the plates. These cell lysates were neutralized with 1 M KOH, centrifuged in an Eppendorf centrifuge and supernatants were used for assay of cyclic AMP. Intracellular cyclic AMP measurements were performed by using the cyclic AMP Radioimmunoassay Kit of Amersham Int., as described in the manufacturer's instructions.

#### Measurement of cytosolic [Ca<sup>2+</sup>]

Changes in intracellular calcium concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) were monitored by measuring Fura 2AM fluorescence. Cells were washed twice with Locke medium and incubated with 5 µM Fura 2AM for 45 min at 37°C. Excess dye was removed by washing the cells twice with fresh Locke medium and suspended in this medium at 10<sup>6</sup> cells ml<sup>-1</sup>. Fluorescence (excitation wavelength = 380 nm, emission = 510 nm, slits, 5 nm exc. 10 nm em.) was monitored at 37°C in a well stirred cuvette containing 1 ml of this suspension with a Perkin-Elmer LS-50 spectrofluorimeter. At the end of each experiment 0.5% triton X-100 was added to permeabilize the cells, allowing the dye to gain access to the extracellular [Ca<sup>2+</sup>] ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub>). This [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> saturated the dye and provided a measure of the maximum fluorescence signal (F<sub>max</sub>). To determine the intensity of the minimum fluorescence signals (F<sub>min</sub>), 20 mM Tris base was added to raise the pH above 8.2

followed by 10 mM EGTA which reduced the [Ca<sup>2+</sup>] to less than 1 nM. The [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was calculated with the equation:

$$[Ca^{2+}]_i = K_D (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$$

the equilibrium dissociation constant (K<sub>D</sub>) for [Ca<sup>2+</sup>]-Fura being 224 nM.

#### Materials

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and foetal calf serum (FCS) were from GIBCO. Collagenase (E.C.3.4.4.19) and 8-(4-chlorophenylthio)-adenosine 3':5' cyclic monophosphate (pClp cyclic AMP), were obtained from Boehringer Mannheim S.A. (Barcelona, Spain). Muscimol, nicotine, forskolin, and 3-isobutyl-1-methyl xanthine (IBMX) were from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, U.S.A.). (-)-Baclofen, CGP 35348 (3-aminopropyl-diethoxymethylphosphinic acid) and 3-aminopropylphosphinic acid (3-APPA) were a gift from Ciba-Geigy (Basel, Switzerland). Faclofen was purchased from Tocris Neuramin (Essex, U.K.). The kit for cyclic AMP assay was from Amersham Int. (Bucks., U.K.) and Fura-2 AM was obtained from Molecular Probes (Cambridge, U.K.). All other chemicals were reactive grade products from Merck (Darmstadt, Germany).

#### Statistics

The data shown are means ± s.e.mean of at least three experiments each one performed in duplicate. Statistical significance was estimated with Student's *t* test for unpaired observations. A *P* value of less than 0.05 was considered significant. Linear regressions were made by the method of minimum squares and fittings of concentration-response curves for estimation of EC<sub>50</sub> or IC<sub>50</sub> values by a weighed non linear regression of minimum squares, using logistic curves.

#### Results

##### Effect of GABA<sub>B</sub> agonists on basal catecholamine secretion

Stimulation of GABA<sub>B</sub> receptors with their specific agonists baclofen and 3-APPA increase basal catecholamine secretion from chromaffin cells in culture. This effect was dose-dependent in both cases with EC<sub>50</sub>s of 151 ± 35 µM and 225 ± 58 µM for baclofen and 3-APPA, respectively (Figure 1). Maximal responses were achieved at concentrations between 0.5 and 1 mM of agonists and were 2.73 ± 0.52 and of 2.32 ± 0.44 times the basal catecholamine secretion for stimulation with 3-APPA and baclofen, respectively.

The stimulatory effect of GABA<sub>B</sub> agonists on basal catecholamine secretion was Ca<sup>2+</sup>-dependent and specific since it was inhibited between 75 and 95% in an extracellular medium containing 200 nM CaCl<sub>2</sub> and it could be blocked by the specific GABA<sub>B</sub> antagonist CGP 35348. At a dose of 0.5 mM this compound was able to inhibit the agonist response between 67 and 100%. In contrast, the antagonist faclofen was ineffective at the same dose (Figure 2). None of the antagonists had any significant effect on basal catecholamine secretion at doses between 10 µM and 1 mM (Figure 2).

To test the possible cell damage produced by GABA<sub>B</sub> agonists on chromaffin cells, experiments of trypan blue permeation and LDH release were carried out. These experiments showed no significant differences from controls (cellular viability between 90–95%, and LDH release of 3.98 ± 1.18% over total cellular content).

GABA<sub>B</sub> agonists were also able to evoke secretion of the intravesicular component dopamine-β-hydroxylase (DBH) in a similar percentage to that for catecholamines (0.5 mM 3-

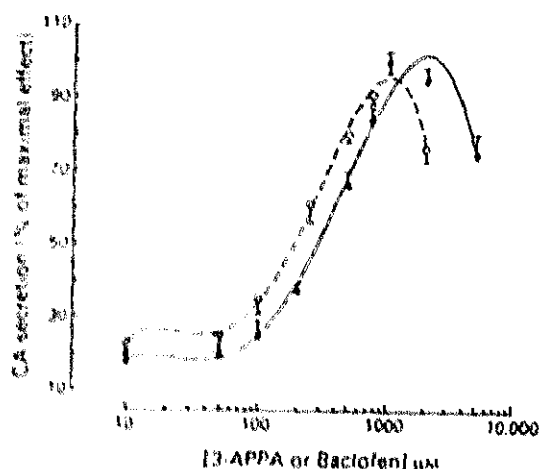


Figure 1 Dose-response curves for the effect of  $GABA_B$  agonists on basal catecholamine (CA) release by chromaffin cells. Cells were incubated with the indicated doses of 3-aminopropylphosphinic acid (3-APPA, ●) or baclofen (○) at  $37^\circ\text{C}$ . Catecholamine release over a 10-min period is expressed as percentage of maximal responses ( $6.84 \pm 0.52\%$  and  $5.8 \pm 0.44\%$  of total cellular catecholamine content for 3-APPA and baclofen, respectively) in which basal catecholamine secretion ( $2.58 \pm 0.55\%$  of total cellular catecholamine content) was subtracted. Release data are means  $\pm$  s.e. mean of three independent determinations each performed in duplicate.  $EC_{50}$  for 3-APPA =  $225 \pm 58 \mu\text{M}$  and for baclofen =  $151 \pm 35 \mu\text{M}$ .

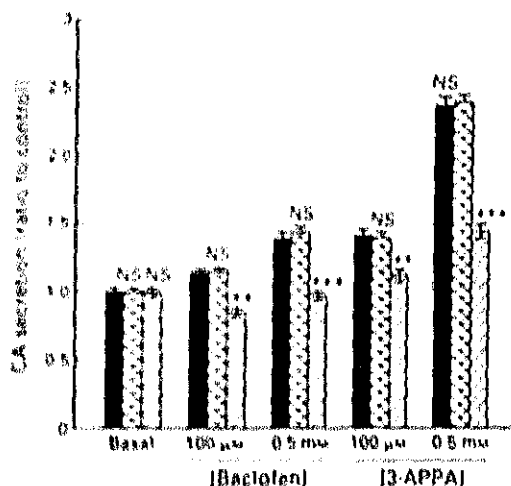


Figure 2 Effect of antagonists of  $GABA_B$  receptors on catecholamine (CA) secretion evoked by  $GABA_B$  antagonists. Cells were incubated with Locke solution (■) or the antagonists flaclofen ( $0.5 \text{ mM}$ ) (□) or CGP 35348 ( $0.5 \text{ mM}$ ) (▨) at  $37^\circ\text{C}$  for 10 min. The medium was removed and cells restimulated with a mixture of the indicated  $GABA_B$  agonists and antagonists. Results are expressed as ratios to their respective basal values, which were taken as the unit. Columns represent means and bars s.e. mean of three duplicate determinations. Significantly different from the corresponding controls without antagonists at \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ . Basal catecholamine secretion was Locke solution =  $2.5 \pm 0.1$ , CGP 35348 ( $0.5 \text{ mM}$ ) =  $2.47 \pm 0.09$  and flaclofen ( $0.5 \text{ mM}$ ) =  $2.61 \pm 0.16\%$  over total cellular catecholamine content.

APPA and  $0.5 \text{ mM}$  baclofen produced an increase in DBH release of  $2.01 \pm 0.11$  and  $1.69 \pm 0.09$  times, respectively, the control values).

#### Effect of $GABA_B$ agonists on evoked catecholamine secretion

In contrast to the effect of  $GABA_B$  agonists on basal catecholamine secretion, preincubation of chromaffin cells

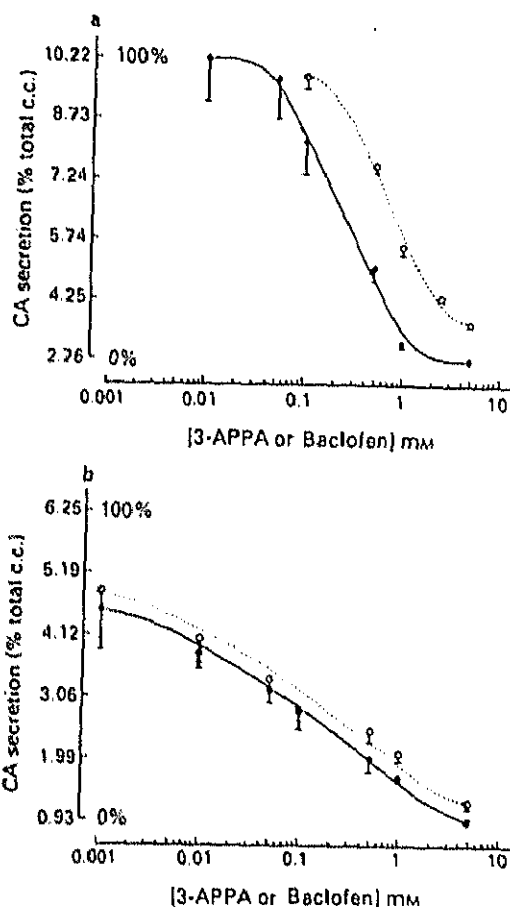


Figure 3 Concentration-dependent inhibition of (a) nicotine and (b) muscimol-evoked catecholamine (CA) release by  $GABA_B$  agonists. Chromaffin cells were incubated with the indicated concentrations of the  $GABA_B$  agonists (○, baclofen; ●, 3-aminopropylphosphinic acid) at  $37^\circ\text{C}$  for 10 min before stimulation with (a)  $10 \mu\text{M}$  nicotine or (b)  $200 \mu\text{M}$  muscimol. Results are expressed as percentages of catecholamine release over total cellular content (c.c.). Values represent means  $\pm$  s.e. mean of three experiments each one performed in duplicate. (a)  $IC_{50}$  for baclofen =  $354 \pm 98 \mu\text{M}$  and for 3-APPA =  $240 \pm 59 \mu\text{M}$ . (b)  $IC_{50}$  for baclofen =  $45 \pm 9 \mu\text{M}$  and for 3-APPA =  $21 \pm 7 \mu\text{M}$ .

with baclofen or 3-APPA inhibited catecholamine secretion evoked by  $10 \mu\text{M}$  nicotine. This effect was dose-dependent (Figure 3a) with an  $IC_{50}$  estimated by log-logit analysis of  $240 \pm 59 \mu\text{M}$  for 3-APPA and  $354 \pm 98 \mu\text{M}$  for baclofen.

An inhibitory effect was also observed in the case of the catecholamine secretion evoked by  $200 \mu\text{M}$  muscimol. The effect was dose-dependent the  $IC_{50}$  being  $21 \pm 7 \mu\text{M}$  for 3-APPA and  $45 \pm 9 \mu\text{M}$  for baclofen (Figure 3b), doses lower than those required for inhibition of 50% of nicotinic responses.

#### Effect of $GABA_B$ agonists on intracellular levels of calcium

The effect of  $GABA_B$  agonists on basal catecholamine secretion was accompanied by a dose-dependent increase in the intracellular calcium concentration. The  $EC_{50}$ s were  $25 \pm 6$  and  $60 \pm 10 \mu\text{M}$  for 3-APPA and baclofen, respectively (Figure 4). Maximal effects were obtained with  $0.5 \text{ mM}$  of the agonists and were  $250 \pm 40 \text{ nM}$  for 3-APPA and  $225 \pm 30 \text{ nM}$  for baclofen. This effect was partially blocked by the specific antagonist CGP 35348 which, at  $0.5 \text{ mM}$ , inhibited 50% of the effect evoked by  $0.5 \text{ mM}$  3-APPA (increase of about  $200 \text{ nM}$  in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). This increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was also depen-

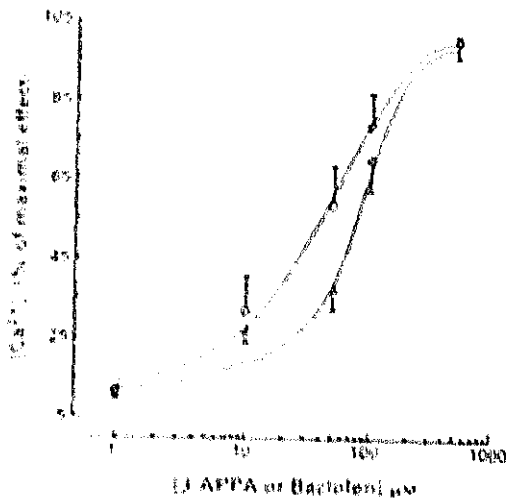


Figure 4. Dose response curves of the effect of GABA<sub>B</sub> agonists on intracellular calcium concentrations. Cytosolic calcium was measured, as indicated in Methods, after stimulation of cells with indicated doses of 3-aminopropylphosphonic acid (3-APPA, ○) or baclofen (△). [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> is expressed as percentage of maximal effects (250 ± 40 nM and 225 ± 50 nM for 3-APPA and baclofen, respectively) in which basal [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (125 ± 25 nM) was subtracted. Points are means ± s.e. mean of 4–5 independent determinations with three different cell batches. IC<sub>50</sub> for 3-APPA = 25 ± 6 μM and for baclofen = 60 ± 10 μM.

dent on Ca<sup>2+</sup> entry from extracellular medium since in a 200 nM Ca<sup>2+</sup> containing medium the increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was inhibited between 80 and 100%.

In addition, GABA<sub>B</sub> agonists decreased the rise in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induced by nicotine and muscimol. Figure 5a shows that 0.5 mM 3-APPA or baclofen was able to reduce by 80–90% the increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> evoked by 10 μM nicotine. Similar results were obtained in the case of stimulation of cells with 200 μM muscimol (Figure 5b).

*GABA<sub>B</sub> agonists increase intracellular levels of cyclic AMP*

Stimulation of cells with GABA<sub>B</sub> agonists produced a time-dependent increase in the intracellular concentration of cyclic AMP, reaching the maximum effect at 10 min of incubation (data not shown). This effect was dose-dependent (Figure 6a) with IC<sub>50</sub>s for baclofen of 210 ± 47 μM and 146 ± 20 μM determined in the absence or presence, respectively, of 0.5 mM IBMX, an inhibitor of phosphodiesterase used to prevent cyclic AMP degradation.

*Correlation between catecholamine secretion and intracellular cyclic AMP levels evoked by GABA<sub>B</sub> agonists*

Stimulation of GABA<sub>B</sub> receptors produced an increase in basal catecholamine secretion as well as in intracellular levels of cyclic AMP. As shown in Figure 6b both parameters are directly related either in the absence or presence of 0.5 mM IBMX. This compound did not have any effect on catecholamine secretion and did not interfere with cyclic AMP determination.

*Effect of forskolin and cyclic AMP analogues on catecholamine secretion and intracellular cyclic AMP levels evoked by GABA<sub>B</sub> agonists*

When cells were stimulated with 3-APPA or baclofen added together with forskolin, the intracellular levels of cyclic AMP increased significantly, as a result of an additive effect (Table 1). However, stimulation of cells with forskolin or pClp

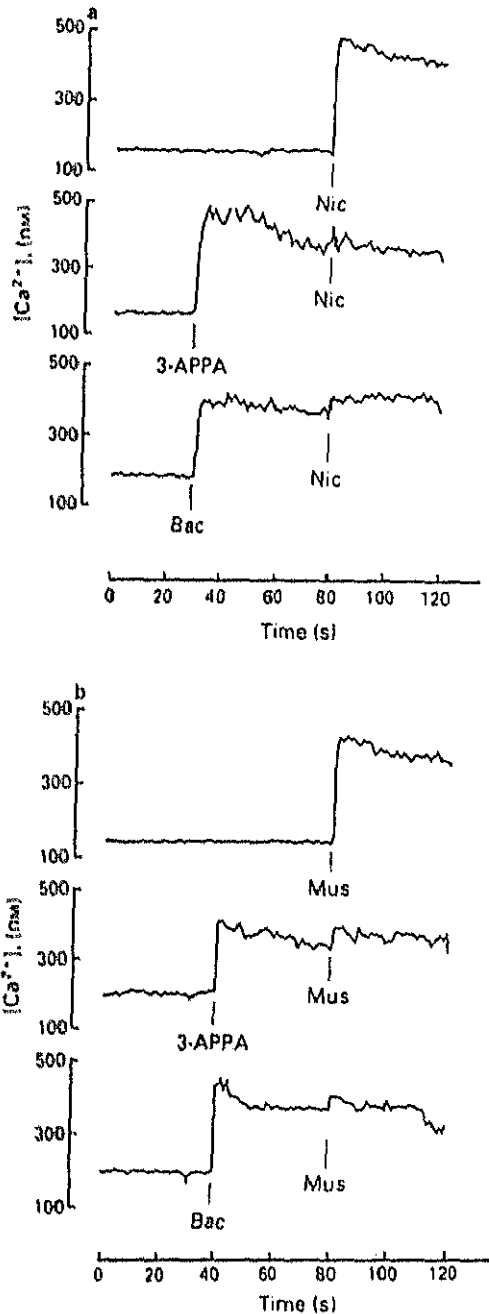
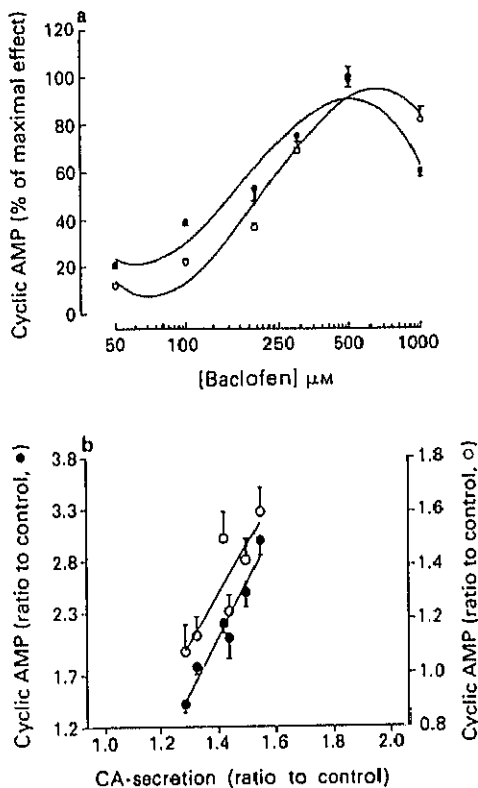


Figure 5. Effect of GABA<sub>B</sub> agonists on intracellular calcium concentrations evoked by nicotine and muscimol. Cytosolic Ca<sup>2+</sup> transients elicited by stimulation of chromaffin cells with (a) 10 μM nicotine and (b) 200 μM muscimol in the absence or presence of 0.5 mM 3-APPA or baclofen. Superimposed records from different cell samples are traced. Drugs were added at times indicated by the arrows. Nic, 10 μM nicotine; Mus, 200 μM muscimol; 3-APPA, 0.5 mM 3-aminopropylphosphonic acid; Bac, 0.5 mM baclofen. Similar records were obtained from different samples in three different cell batches.

cyclic AMP together with GABA<sub>B</sub> agonists, baclofen or 3-APPA, did not produce any further increase in catecholamine secretion but instead resulted in a reduction of secretion evoked by each agent independently (Table 1).

*Effects of preincubation with bacterial toxins on GABA<sub>B</sub> agonist-mediated responses in chromaffin cells*

To study the participation of G proteins in the mechanism of action of GABA<sub>B</sub> receptors, cells were preincubated with

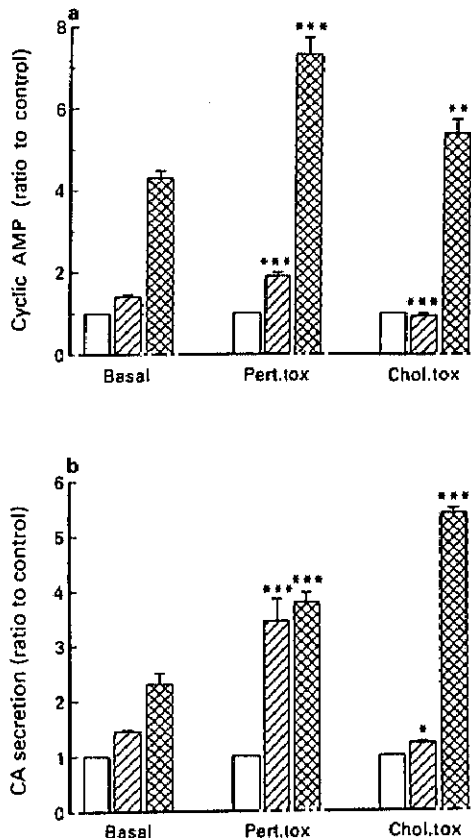


**Figure 6** Effect  $\text{GABA}_B$  agonists on intracellular levels of cyclic AMP in chromaffin cells. Cells were incubated with indicated concentrations of baclofen in the absence (○) or presence (●) of 0.5 mM isobutyl methylxanthine (IBMX) for 10 min and then cyclic AMP levels measured as indicated in Methods. (a) Dose-response curves at indicated doses of baclofen in the presence or absence of IBMX. Results are expressed as percentages of maximal effects ( $7.2 \pm 0.5$  and  $6.16 \pm 0.34$  pmol cyclic AMP/ $10^6$  cells for baclofen in the presence or absence, respectively of IBMX) in which basal [cyclic AMP] values ( $3.85 \pm 0.15$  pmol cyclic AMP/ $10^6$  cells in the absence and  $3.6 \pm 0.2$  pmol cyclic AMP/ $10^6$  cells in the presence of 0.5 mM IBMX) were subtracted. Values are means  $\pm$  s.e. mean of three independent determinations each performed in duplicate.  $\text{EC}_{50} = 146 \pm 20 \mu\text{M}$  in the presence of IBMX and  $210 \pm 47 \mu\text{M}$  in the absence of IBMX. (b) Correlation between catecholamine (CA) secretion and cyclic AMP level rises induced by  $\text{GABA}_B$  agonists. Data represent % of variation over the corresponding controls of catecholamine secretion ( $3.2 \pm 0.1\%$  of total cellular content) and of cyclic AMP levels ( $4.16 \pm 0.23$  pmol cyclic AMP/ $10^6$  cells). Rects were fitted by minimum squares and were of  $y = 5.18x - 5.18$ ;  $***P < 0.001$ ,  $n = 13$  (without IBMX); and  $y = 1.77x - 1.18$ ;  $**P < 0.01$ ,  $n = 16$  (with IBMX). In the absence of IBMX  $r = 0.87$  and in its presence  $r = 0.96$ .

cholera toxin (CTX) or pertussis toxin (PTX) for 4 h and then the effect of  $\text{GABA}_B$  agonists on catecholamine secretion and intracellular cyclic AMP levels determined.

Figure 7a shows that the effect of baclofen on cyclic AMP levels was approximately doubled in cells pretreated with PTX, but was inhibited by pretreatment with CTX. Moreover, pretreatment of cells with PTX increase by 4.5 times the catecholamine secretion evoked by baclofen but the effect of baclofen was not inhibited after pretreatment with CTX (Figure 7b).

The same effects on cyclic AMP levels and catecholamine secretion were shown with  $1 \mu\text{M}$  forskolin when cells were preincubated with PTX but was different when cells were pretreated with CTX. In the latter case there was a rise in intracellular levels of cyclic AMP and, as a consequence, an increase in catecholamine secretion (Figure 7a and b).



**Figure 7** Effect of bacterial toxins on (a) intracellular levels of cyclic AMP and (b) catecholamine (CA) secretion induced by baclofen and forskolin. Cells were incubated with Locke solution (control),  $300 \text{ ng ml}^{-1}$  choleric toxin or  $100 \text{ ng ml}^{-1}$  pertussis toxin for 4 h at  $37^\circ\text{C}$ . Then the medium was removed and cells incubated with normal Locke (□),  $100 \mu\text{M}$  baclofen (▨) or  $1 \mu\text{M}$  forskolin (▩) for 10 min and cyclic AMP levels (a) or catecholamine secretion (b) measured. Results are means  $\pm$  s.e. mean of three determinations each one performed in duplicate. Significantly different from the corresponding controls without toxins at  $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$  and  $***P < 0.001$ .

**Table 1** Effect of preincubation with forskolin on catecholamine secretion and cyclic AMP levels evoked by  $\text{GABA}_B$  agonists

Drug	Intracellular cyclic AMP (pmol/ $10^6$ cells)	Catecholamine secretion (% of total c.c.)
<b>- Forskolin</b>		
Control	$4.43 \pm 14$	$2.79 \pm 0.10$
Baclofen $100 \mu\text{M}$	$6.20 \pm 0.19^{***}$	$4.30 \pm 0.27^{***}$
Baclofen $500 \mu\text{M}$	$8.95 \pm 0.61^{***}$	$6.28 \pm 0.80^{**}$
3-APPA $100 \mu\text{M}$	$8.42 \pm 0.42^{***}$	$4.60 \pm 0.52^{**}$
3-APPA $500 \mu\text{M}$	$13.00 \pm 0.83^{***}$	$7.40 \pm 1.04^{**}$
<b>+ Forskolin <math>1 \mu\text{M}</math></b>		
Control	$25.36 \pm 1.97$	$6.13 \pm 0.47$
Baclofen $100 \mu\text{M}$	$30.25 \pm 0.52^*$	$2.34 \pm 0.05^{***}$
Baclofen $500 \mu\text{M}$	$33.70 \pm 1.97^{**}$	$3.42 \pm 0.05^{***}$
3-APPA $100 \mu\text{M}$	$34.10 \pm 0.50^*$	$3.18 \pm 0.04^{***}$
3-APPA $500 \mu\text{M}$	$38.09 \pm 0.98^{***}$	$2.62 \pm 0.18^{***}$

Cells were incubated with Locke solution (control) or  $\text{GABA}_B$  agonists at the indicated concentrations in the absence or presence of  $1 \mu\text{M}$  forskolin and then catecholamine secretion and [cyclic AMP] measured. Results are means  $\pm$  s.e. mean of three duplicate determinations. Significantly different from the corresponding controls (in the absence or presence of forskolin) at  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  and  $***P < 0.001$ . c.c. = cellular content.

## Discussion

Exocytotic release of catecholamines is a very complex event in the regulation of which numerous proteins are involved. A few years ago, the only receptor clearly linked to the stimulation of the exocytosis of catecholamine in bovine chromaffin cells was nAChR, but at present, a large number of other receptors are known to be able to stimulate catecholamine secretion by themselves or modulate nicotine-induced secretion (for a review see Burgoyne, 1991). At present, one of the most important neurotransmitters implicated in this regulation is GABA.

GABA has two binding sites in the adrenal medulla, characterized as GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors because of their capacity to be blocked with saturating concentrations of muscimol or baclofen, respectively and their sensitivity to Ca<sup>2+</sup> ions (Castro *et al.*, 1988). The function of GABA<sub>A</sub> receptors has been clearly established (Kataoka *et al.*, 1986; Kitayama *et al.*, 1986; Castro *et al.*, 1989). It is known that stimulation of cells by GABA<sub>A</sub> agonists depolarizes the chromaffin cell membrane producing an increase in Cl<sup>-</sup> efflux through the Cl<sup>-</sup> channel associated with the GABA<sub>A</sub> receptor and as a consequence, a membrane depolarization which culminates in an increase in basal catecholamine secretion (González *et al.*, 1992).

The function of GABA<sub>B</sub> receptors in adrenal chromaffin cells has not been studied before. Results in this paper show for the first time that the GABA<sub>B</sub> agonists baclofen and, the most potent agonist available, 3-APPA increase basal catecholamine secretion in a dose-dependent manner. The EC<sub>50</sub> of this effect was estimated as 225 ± 58 μM for 3-APPA and 151 ± 35 μM for baclofen, respectively. These doses are high compared with the concentrations of other agonists needed to stimulate 50% of catecholamine secretion (i.e. nicotine, muscimol and histamine have an EC<sub>50</sub> of 5–10 μM), and even higher than the doses required to stimulate other GABA<sub>B</sub> responses in the mammalian brain (i.e. between 10–100 μM in GABA<sub>B</sub> mediated inhibitory post-synaptic potentials or hyperpolarizations in the pyramidal cells of the hippocampus). However they are of the same order of magnitude as those required to stimulate GABA<sub>B</sub> responses in other peripheral tissues such as the inhibition of ileum peristalsis or inhibition of glutamate, acetylcholine and noradrenaline release in the peripheral nervous system (100–300 μM), although in all these cases GABA<sub>B</sub> responses were inhibitory. These findings together with the fact that GABA<sub>B</sub> responses on chromaffin cell catecholamine secretion represent between 40–50% of those obtained with nicotine at the same doses, seem to suggest either a low affinity of GABA<sub>B</sub> receptors or the existence of a low number of GABA<sub>B</sub> binding sites in adrenal medullary cells (Castro *et al.*, 1988).

Nevertheless, in spite of the high doses required to stimulate these receptors, the GABA<sub>B</sub>-mediated increase in catecholamine secretion from chromaffin cells seems to be a true exocytotic and specific effect. This is supported by the findings that (1) this effect was accompanied by a dose-dependent increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, measured by Fura-2 methods (Figure 5a) and was almost completely blocked when catecholamine secretion by these agonists was measured in a low Ca<sup>2+</sup>-containing medium (200 nM), (2) GABA<sub>B</sub> agonists were able to release other secretory granular components such as DBH to a similar extent as catecholamines and (3) their effects were able to be blocked by the specific GABA<sub>B</sub> antagonist CGP-35348, which, at a dose of 0.5 mM inhibited by 70 to 100% the agonist-evoked responses (Figure 2). Flaclofen, another specific GABA<sub>B</sub> antagonist, was unable to inhibit GABA<sub>B</sub> agonist responses. On the basis of the pharmacological classification of GABA<sub>B</sub> receptors of Dutar & Nicholl (1988), this insensitivity to flaclofen could mean that GABA<sub>B</sub> receptors in the adrenal medulla belong to a presynaptic type, although the finding that the same data were obtained with well characterized postsynaptic GABA<sub>B</sub>

receptors (Huston *et al.*, 1990) suggests that this rule may not be universally applicable. Flaclofen may be a non-specific and potent GABA<sub>B</sub> antagonist in some tissues. In fact this compound has been shown to have GABA<sub>B</sub> agonist behaviour in some responses (Michler & Erdö, 1989). Therefore, the precise nature, pre- or post-synaptic, of adrenal medullary GABA<sub>B</sub> receptors remains to be determined.

In addition to the effect of GABA<sub>B</sub> agonists on basal catecholamine secretion, stimulation of chromaffin cells by these compounds also has an effect on the catecholamine secretion evoked by nACh and GABA<sub>A</sub> agonists. When cells were preincubated with GABA<sub>B</sub> agonists before nicotine was added, these agonists strongly inhibited nicotine-evoked catecholamine secretion in a dose-dependent manner; the IC<sub>50</sub>s obtained were of the same order of magnitude as those for activation of basal catecholamine secretion (Figure 3a). This inhibitory effect was accompanied by a reduction in the intracellular Ca<sup>2+</sup> levels induced by nicotine, results which support the hypothesis of a true inhibitory modulation of nACh receptors by GABA<sub>B</sub> ones (Figure 5a). Similar results were also obtained for catecholamine secretion evoked by GABA<sub>A</sub> agonists (Figure 3b) and for increases in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Figure 5b).

With respect to the molecular mechanism by which GABA<sub>B</sub> agonists produce these effects in chromaffin cells it seems to be mediated by the activation of adenylate cyclase (AC). This conclusion is supported by the following experimental data: (1) GABA<sub>B</sub> agonists increase intracellular levels of cyclic AMP in a dose-dependent fashion, effects which are well correlated with increases obtained in catecholamine secretion (Figure 6). (2) Several activators of AC as well as forskolin and cyclic AMP analogues increase basal catecholamine secretion in a dose-dependent manner, a direct correlation existing between both parameters, intracellular cyclic AMP levels and catecholamine secretion (Oset-Gasque *et al.*, 1991). (3) Pretreatment of cells with PTX, which by ADP-ribosylation of G<sub>i</sub> proteins produces an inhibition of negative control of AC, potentiates cyclic AMP levels and catecholamine secretion induced by GABA<sub>B</sub> agonists as well as by forskolin (Figure 7a and b). (4) Pretreatment of cells with CTX, which permanently activates AC, does not produce additional increases in either the cyclic AMP levels or in catecholamine secretion induced by baclofen.

The inhibitory actions of GABA<sub>B</sub> agonists on catecholamine secretion evoked by nicotinic and GABA<sub>A</sub> receptors could also be explained by this mechanism. This conclusion seems to be supported both by our results which show that forskolin and pClp cyclic AMP have a dose-dependent inhibitory effect on catecholamine secretion evoked by nicotine and muscimol (Oset-Gasque *et al.*, 1991) and by other work showing that cyclic AMP, or agonists which activate AC, may produce an inactivation of nAChR and GABA<sub>A</sub> receptors by phosphorylation (Albuquerque *et al.*, 1986; Haganir *et al.*, 1986; Harrison & Lambert, 1989; Leidenheimer *et al.*, 1991). However, although GABA<sub>B</sub> agonists seem to mediate their effects on catecholamine secretion by a mechanism implicating cyclic AMP formation, we do not exclude the possibility of the existence of an additional mechanism for the action of these receptors.

Specific interactions between GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors have not been described until very recently (Hahner *et al.*, 1991). Our results seem to support a specific modulation of GABA<sub>A</sub> receptors by the GABA<sub>B</sub> ones, since the IC<sub>50</sub> required for inactivation of GABA<sub>A</sub> receptors by GABA<sub>B</sub> agonists was very much smaller than that required for inactivation of nAChR.

In conclusion, GABA through both its GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors, seems to play an important role in the modulation of chromaffin cell function and therefore, GABA could be added to the long list of neurotransmitters and hormones implicated in the modulation of this complex function. The physiological significance of the results presented here is not yet known. It could be possible that ionotropic

GABA receptors, as well as nACh receptors, play a major role in the initiation of catecholamine release *in vivo* while metabotropic receptors, including those for GABA<sub>B</sub>, have a more important role in the modulation of the secretion evoked by ionotropic receptors.

## References

- ALBURQUERQUE, E.X., DESHPANDE, S.S., ARAYACA, Y., ALKONDON, M. & DALY, J.M. (1986). A possible involvement of cyclic AMP in the expression of desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor. *FEBS Lett.*, **199**, 113–120.
- BADER, M.F., CIESIELSKI-TRESKA, J., THIERSE, D., HESKETCH, J.E. & AUNIS, D. (1981). Immunocytochemical study of microtubules in chromaffin cells in culture and evidence that tubulin is not an integral protein of the chromaffin granule membrane. *J. Neurochem.*, **37**, 917–933.
- BOWERY, N.G. (1989). GABA<sub>B</sub> receptors and their significance in mammalian pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.*, **10**, 401–407.
- BOWERY, N.G., HILL, D.R., HUDSON, A.L., DOBLE, A.A., MIDDLEMISS, D.N., SHAW, J. & TURNBULL, M.J. (1980). Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature*, **283**, 92–94.
- BURGOYNE, R.D. (1991). Control of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1071**, 174–202.
- CASTRO, E., OSET-GASQUE, M.J., CAÑADAS, S., GIMÉNEZ, A. & GONZÁLEZ, M.P. (1988). GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> sites in bovine adrenal medulla membranes. *J. Neurosci. Res.*, **20**, 241–245.
- CASTRO, E., OSET-GASQUE, M.J. & GONZÁLEZ, M.P. (1989). GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors are functionally active in regulation of catecholamine secretion by bovine chromaffin cells. *J. Neurosci. Res.*, **23**, 290–296.
- CHALISS, R.A.J., JONES, J.A., OWEN, P.J. & BOARDER, M.R. (1991). Changes in inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate mass accumulations in cultured adrenal chromaffin cells in response to bradykinin and histamine. *J. Neurochem.*, **56**, 1083–1086.
- CHEEK, T.R. & BURGOYNE, R.D. (1985). Effect of activation of muscarinic receptors on intracellular free calcium and secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, **846**, 167–173.
- CHERN, Y.J., KIM, K.T., STARLEY, 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.
- DUTAR, P. & NICOLL, R.A. (1988). A physiological role for GABA<sub>B</sub> receptors in the central nervous system. *Nature*, **332**, 156–158.
- FERNÁNDEZ-RAMIL, J.M., SÁNCHEZ-PRIETO, J. & GONZÁLEZ, M.P. (1982). Presence of glutamate decarboxylase in bovine adrenal medullary cells. *Rev. Esp. Fisiol.*, **38**, 91–96.
- FERNÁNDEZ-RAMIL, J.M., SÁNCHEZ-PRIETO, J., CAÑADAS, S. & GONZÁLEZ, M.P. (1983). GABA-T in bovine adrenal medulla cells. Kinetic properties and comparison with GABA-T from other tissues. *Rev. Esp. Fisiol.*, **39**, 299–304.
- GONZÁLEZ, M.P., OSET-GASQUE, M.J., CASTRO, E., BUGEDA, J., ARCE, C. & PARRAMÓN, M. (1992). Mechanism through which GABA<sub>A</sub> receptor modulates catecholamine secretion from bovine chromaffin cells. *Neuroscience*, **47**, 487–494.
- HAHNER, L., MAQUILKIN, S. & HARRIS, R.A. (1991). Cerebellar GABA<sub>B</sub> receptors modulate function of GABA<sub>A</sub> receptors. *FASEB J.*, **5**, 2466–2472.
- HARRISON, N.L. & LAMBERT, N.A. (1989). Modification of GABA<sub>A</sub> receptor function by an analog of cyclic AMP. *Neurosci. Lett.*, **105**, 137–142.
- HUETTL, P., GERHARDT, G.A., BROWNING, M.D. & MASSERANO, J.M. (1991). Effects of dopamine receptor agonists and antagonists on catecholamine release in bovine chromaffin cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **257**, 567–574.
- HUGANIR, R.L., DELCOUR, A.H., GREENGARD, P. & HESS, G.P. (1986). Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor regulates its rate of desensitization. *Nature*, **321**, 774–776.
- HUSTON, E., SCOTT, R.H. & DOLPHIN, A.C. (1990). A comparison of the effect of calcium channel ligands and GABA<sub>B</sub> agonists and antagonists on transmitter release and somatic calcium channel. *Neuroscience*, **38**, 721–729.
- ITO, S., MOCHIZUKI-ODA, N., HORI, K., OZAKI, K., MIYAKAWA, A. & NEGISHI, M. (1991). Characterization of prostaglandin-E<sub>2</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization in single bovine adrenal chromaffin cells by digital image microscopy. *J. Neurochem.*, **56**, 531–540.
- KATAOKA, Y., FUJIMOTO, M., ALHO, H., GUIDOTTI, A., GEFFARD, M., KELLY, G.D. & HANBAUER, I. (1986). Intrinsic gamma aminobutyric acid receptors modulate the release of catecholamine from canine adrenal gland *in situ*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **239**, 584–590.
- KITAYAMA, S., KOYAMA, Y., MORITA, K., DOHI, T. & TSUJIMOTO, A. (1986). Increase in catecholamine release and Ca<sup>2+</sup> uptake induced by GABA in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, **341**, 414–418.
- LEIDENHEIMER, N.J., BROWNING, M.D. & HARRIS, R.A. (1991). GABA<sub>A</sub> receptor phosphorylation: multiple sites, actions and artifacts. *Trends Pharmacol. Sci.*, **12**, 84–87.
- LEMAIRE, S., LIVETT, B.G., TSENG, R., MERCIER, P. & LEMAIRE, J. (1981). Studies on the inhibitory action of opiate compounds in isolated bovine adrenal chromaffin cells: non-involvement of stereospecific opiate binding sites. *J. Neurochem.*, **36**, 886–892.
- LIVETT, B.G., KOZOUSCK, V., MIZOBE, F. & DEAN, D.M. (1979). Substance P inhibits nicotine activation of chromaffin cells. *Nature*, **278**, 256–257.
- MARLEY, P.D., BUNN, S.J., WAN, D.C.C., ALLEN, A.M. & MENDELSON, F.A.O. (1989). Localization of angiotensin II binding sites in the bovine adrenal medulla using a labelled specific antagonist. *Neuroscience*, **28**, 777–787.
- MICHLER, A. & ERDŐ, A.L. (1989). Stimulation by phaclofen of inositol 1,4,5-triphosphate production in cultured neurons from chick tectum. *Eur. J. Pharmacol.*, **167**, 423–425.
- MOTT, D.D. & LEWIS, D.V. (1991). Facilitation of the induction of long-term potentiation by GABA<sub>B</sub> receptors. *Science*, **252**, 1718–1720.
- NEGISHI, M., ITO, S. & HAYASHI, O. (1989). Prostaglandin E receptors in bovine adrenal medulla are coupled to adenylate cyclase via Gi and to phosphoinositide metabolism in a pertussis toxin-insensitive manner. *J. Biol. Chem.*, **264**, 3916–3922.
- OSET-GASQUE, M.J. & AUNIS, D. (1989). Gamma-aminobutyric acid uptake in bovine chromaffin cells in culture. *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 2227–2232.
- OSET-GASQUE, M.J., CASTRO, E. & GONZÁLEZ, M.P. (1990). Mechanism of [<sup>3</sup>H] gamma-aminobutyric acid release by chromaffin cells in primary culture. *J. Neurosci. Res.*, **26**, 181–187.
- OSET-GASQUE, M.J., PARRAMÓN, M. & GONZÁLEZ, M.P. (1991). *XII Reunión del Grupo Español de la Célula Cromafín*, Salamanca, Spain.
- O'SULLIVAN, A.J. & BURGOYNE, R.D. (1989). A comparison of bradykinin, angiotensin II and muscarinic stimulation of cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Biosci. Rep.*, **9**, 243–252.
- OWEN, P.J., PLEVIN, R. & BOARDER, M.J. (1989). Characterization of bradykinin-stimulated release of noradrenaline from cultured bovine adrenal chromaffin cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **248**, 1231–1235.
- STAUDERMAN, K.A. & PRUSS, R.M. (1990). Different patterns of agonist-stimulated increase of [<sup>3</sup>H]-inositol phosphate isomers and cytosolic Ca<sup>2+</sup> in bovine adrenal chromaffin cells: comparison of the effects of histamine and angiotensin II. *J. Neurochem.*, **54**, 946–953.

(Received May 4, 1993  
Revised July 27, 1993  
Accepted August 23, 1993)

## Identification of GABA<sub>A</sub> receptor subunits expressed in bovine adrenal medulla

M. Parramón<sup>a</sup>, M.J. Oset-Gasque<sup>a,\*</sup>, M.P. Gonzalez<sup>a</sup>, F.A. Stephenson<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Instituto de Bioquímica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain*

<sup>b</sup>*Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, 29/39 Brunswick Square, London WC1N 1AX, UK*

Received 19 October 1993; Revised version received 27 December 1993; Accepted 27 December 1993

### Abstract

The GABA<sub>A</sub> receptor subunits expressed in adrenal medulla have been characterized by radioligand binding and by immunological methods. The receptors were purified by both benzodiazepine affinity chromatography and anti- $\alpha_1$  413–429 GABA<sub>A</sub> receptor antibody immunoaffinity chromatography. These preparations were screened by immunoblotting using GABA receptor  $\alpha$  subunit sequence-specific antibodies. Results showed the existence of the  $\alpha_1$  subunit. Thus, the GABA<sub>A</sub> receptors expressed in adrenal medulla are homogeneous with respect to their  $\alpha$  subunit complement and consistent with type BZ1 benzodiazepine receptor pharmacology.

**Key words:** GABA; GABA<sub>A</sub> receptor; Adrenal medulla; Benzodiazepine; Chromaffin cell

$\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA), the major inhibitory neurotransmitter in the vertebrate brain, mediates neuronal inhibition predominantly by opening a chloride channel which is integral to the GABA<sub>A</sub> receptor. The GABA<sub>A</sub> receptor is the target for a variety of therapeutically important drugs, which include the benzodiazepines, barbiturates and neurosteroids (for a review see [14]).

Molecular cloning of GABA receptor subunit genes has revealed an extensive family of highly homologous polypeptides. There are five distinct subunit types, designated  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  and  $\rho$  with different isoforms of four of these i.e.  $\alpha 1$ – $\alpha 6$ ,  $\beta 1$ – $\beta 4$ ,  $\gamma 1$ – $\gamma 3$ ,  $\rho 1$ – $\rho 2$  (reviewed in e.g. [4]). Combinations of these subunits, as yet unknown co-assemble, probably as pentameric structures to constitute the different functional and pharmacological properties of GABA<sub>A</sub> receptors in the brain [8].

In bovine adrenal medulla, the presence of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors has been shown [2,7]. Both types of receptors modulate catecholamine secretion [3]. GABA<sub>A</sub> receptor modulation of secretion is by a mechanism dependent on the membrane potential [6].

The aim of the present study was to characterize the GABA<sub>A</sub> receptors expressed in adrenal medulla to determine if this tissue, in contrast to the great heterogeneity found in the brain, expresses a homogeneous population of receptors.

Radioligand binding assays to adrenal medulla membranes were performed by a polyethylenimine method as previously described [5,11]. Briefly, membranes (1 mg protein/ml) were incubated with 100  $\mu$ l of unlabelled flunitrazepam and different concentrations of [<sup>3</sup>H]flunitrazepam (85 Ci/mmol) at 0°C for 1 h. Binding was stopped by filtration and radioactivity was measured by scintillation spectrometry.

Calf cerebral cortex and adrenal medulla were obtained from the local slaughterhouse and membranes were prepared as previously described [16]. The GABA<sub>A</sub> receptor was solubilized from both tissues with 0.5% (w/v) sodium deoxycholate in the presence of protease inhibitors and collected by centrifugation at 100,000 g for 75 min at 4°C [16]. Receptors were purified by Ro 7 1986/1 affinity chromatography followed by ion-exchange chromatography to remove the elution ligand, clorazepate (kindly provided by Boehringer Ingelheim, Bracknell, UK), all as previously described [15]. For ad-

\*Corresponding author. Fax: (34) (1) 5438649.

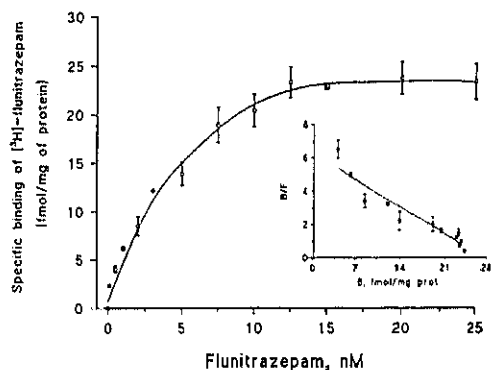


Fig. 1. The binding of [ $^3$ H]flunitrazepam to membranes prepared from bovine adrenal medulla. Membranes were prepared from bovine adrenal medulla and [ $^3$ H]flunitrazepam binding was carried out by a polyethyleneimine filtration assay. The figure shows the specific saturation curve with the Scatchard analysis of this in the inset. Results are means  $\pm$  S.E.M of three experiments performed in duplicate. The Scatchard plot was analysed by LIGAND which gave a best fit of a single high-affinity site with  $K_d = 4 \pm 0.6$  nM;  $B_{max} = 27 \pm 3$  fmol/mg protein.

renal medulla. 40 g wet weight tissue was used for each purification.

GABA $_A$  receptors were purified from sodium deoxycholate extracts of bovine adrenal medulla (20 g wet weight tissue) by immunoaffinity chromatography using a sheep anti-GABA $_A$  receptor  $\alpha_1$  413-429 subunit antibody affinity column [5].

So as to verify the absence of cross-contamination with brain tissue, affinity columns were pre-eluted twice with clorazepate (Ro 7 1986/1 column) or elution buffer (anti-GABA $_A$  receptor  $\alpha_1$  413-429 subunit antibody affinity column) [5].

Immunoblotting was carried out in 10% polyacrylamide slab gels under reducing and denaturing conditions, transferred to nitrocellulose membranes and with affinity-purified anti-GABA receptor subunit-specific antibodies. GABA $_A$  receptor sequence-directed antibodies were raised, characterized and purified on the respective peptide-CH Sepharose 4B affinity columns, as previously described [11].

Antigen-antibody reactions were visualized by the horseradish peroxidase-linked whole antibody followed by the ECL detection system (Amersham Int.) [5]. The specificity of the immune reaction was demonstrated by prior incubation of the antibody overnight at 4°C with the corresponding peptide that was used for animal immunization.

Specific benzodiazepine binding to membranes prepared from bovine adrenal medulla was observed with [ $^3$ H]flunitrazepam as the radioligand. Specific binding was linear with protein. Scatchard analysis of the saturation curve showed a single high affinity site with  $K_d = 4 \pm 0.6$  nM and  $B_{max} = 27 \pm 3$  fmol [ $^3$ H]flunitrazepam binding sites/mg protein ( $n = 6$ ) (Fig. 1). This  $K_d$  has

the same order of magnitude to that obtained in previous studies by Kataoka et al. [7].

Sodium deoxycholate solubilized specific [ $^3$ H]flunitrazepam binding sites but the yield was low. A typical value in a detergent extract of adrenal medulla membranes was  $310 \pm$  specific dpm measured at 2 nM [ $^3$ H]flunitrazepam final concentration. This corresponded to  $\approx 12$  fmol/mg of protein with an assumed  $K_d = 4$  nM, as above.

In initial experiments, membranes prepared from bovine adrenal medulla were screened for the expression of GABA $_A$  receptor subunits by immunoblotting using a panel of anti-GABA $_A$  receptor subunit-specific antibodies. However, no clear immunoreactive bands were obtained. Therefore, despite the low concentration of GABA $_A$  receptors present in the sodium deoxycholate extracts, the purification of these proteins was carried out by Ro 7 1986/1 affinity chromatography to attempt to increase the sensitivity of detection for the immunoblots. The ion-exchange chromatography fractions obtained at the end of the standard isolation procedure were assayed for specific [ $^3$ H]flunitrazepam binding sites however, no activity was detectable. The same fractions were analysed by immunoblotting using an anti-GABA receptor  $\alpha_1$  413-429 subunit-specific antibody. The results are shown in Fig. 2 where it can be seen that now anti- $\alpha_1$  413-429 immunoreactivity was detectable in ion-exchange fractions 2-4 (lanes 3-5). The immunoreactive band had a  $M_r$  53,000 and it was coincident with the  $\alpha_1$  subunit present in preparations of GABA $_A$  receptors isolated from bovine cerebral cortex (Fig. 2, lane 1). Note that no  $\alpha_1$  subunit immunoreactivity was detectable in

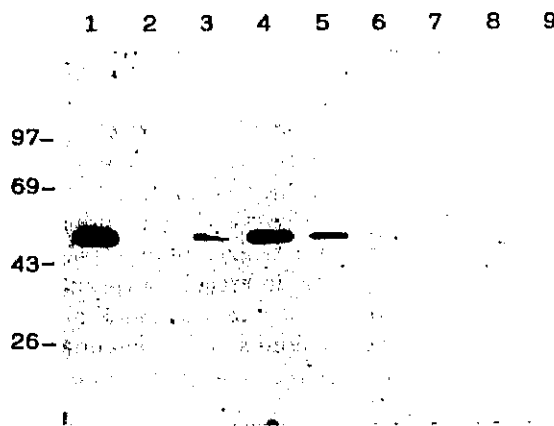


Fig. 2. Characterization by immunoblotting of the GABA $_A$  receptors purified from bovine adrenal medulla by benzodiazepine affinity chromatography. GABA $_A$  receptors were purified from adrenal medulla by sodium deoxycholate extraction, Ro7 1986/1 affinity chromatography followed by ion-exchange chromatography. The ion-exchange eluted fractions (50  $\mu$ l) were precipitated and analysed by immunoblotting using anti- $\alpha_1$  413-429 GABA $_A$  receptor subunit antibody (5  $\mu$ g/ml). Lane 1 is purified receptor from adult bovine cerebral cortex as control. Lanes 2 to 9 are ion-exchange fractions of adrenal medulla purified GABA $_A$  receptor in order of collection. Molecular weights (kDa) are shown on the left.

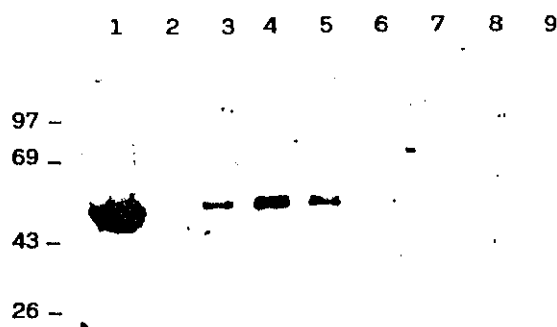


Fig. 3. Characterization by immunoblotting of the GABA<sub>A</sub> receptors purified from bovine adrenal medulla by anti- $\alpha_1$  413–429 antibody immunoaffinity chromatography. GABA<sub>A</sub> receptors were purified from adrenal medulla by sodium deoxycholate extraction and anti- $\alpha_1$  413–429 GABA<sub>A</sub> receptor antibody affinity chromatography. The pH 11.5 eluted fractions (50  $\mu$ l) were precipitated and analysed by immunoblotting using anti- $\alpha_1$  413–429 GABA<sub>A</sub> receptor subunit antibodies (5  $\mu$ g/ml). Lane 1 is purified receptor from adult bovine cerebral cortex as control. Lanes 2 to 9 are fractions of adrenal medulla immunoaffinity purified receptor in order of collection. Molecular weights (kDa) are shown on the left.

control samples where the Ro 7 1986/1 affinity column was preeluted with clorazepate.

To confirm the presence of  $\alpha_1$  subunit in adrenal medulla, GABA<sub>A</sub> receptors were purified by an alternative method of anti-GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha_1$  413–429 antibody immunoaffinity chromatography [11]. This procedure has the advantage that isolation is not dependent on the retention of ligand binding activity in detergent solution where loss of binding sites caused by detergent denaturation has been shown to occur [16]. Thus this method may give an increased yield of purified receptors which may be important for the detection of other GABA<sub>A</sub> receptor subunits (see below). As for the GABA<sub>A</sub> receptors purified by benzodiazepine affinity chromatography from adrenal medulla membranes, there was no detectable specific [<sup>3</sup>H]flunitrazepam binding activity in the fractions eluted from the antibody affinity column. However, analysis of the fractions by immunoblotting using anti- $\alpha_1$  413–429 antibodies showed immunoreactivity in fractions 2–8 with the peak in fractions 2–5 (Fig. 3, lanes 3–5). The immunoreactive band had a  $M_r$  of 53,000 and it was coincident with the  $\alpha_1$  subunit present in receptor preparations purified by benzodiazepine affinity chromatography from bovine cerebral cortex (Fig. 3, lane 1). The specificity of the immunoblotting experiments was demonstrated for both the purified preparations by the preincubation of the antibody used for the immunoblotting with the respective peptide used as antigen. Preincubation inhibited completely the signal obtained in immunoblots for both preparations (Fig. 4, lanes 4–5). Note that no anti- $\alpha_1$  413–429 antibody immunoreactivity was detected in pre-eluted fractions from the antibody affinity column.

The fractions containing the  $\alpha_1$  413–429 subunit immunoreactivity from both purified preparations were pooled and screened for immunoreactivity with anti-Cys  $\alpha_2$  414–424, anti-Cys  $\alpha_3$  454–467, anti- $\alpha_5$  1–16 Cys and anti- $\alpha_6$  1–15 Cys affinity-purified antibodies. No detectable signals were obtained in immunoblots (results not shown).

These results concur with those of [17] who found by Northern blotting  $\alpha_1$  but not  $\alpha_2$  or  $\alpha_3$  GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNA in bovine adrenal medulla. Ymer et al. [17] also found mRNAs for  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  and  $\beta_3$  subunits, and additionally, this group isolated the  $\gamma_2$  cDNA initially from a bovine adrenal medulla cDNA library [12]. The presence of a  $\beta$  and  $\gamma_2$  subunit together with the  $\alpha_1$  subunit is consistent with both the benzodiazepine radioligand binding properties found in adrenal medulla [7, and this study] and the functional effects of benzodiazepines and  $\beta$ -carbolines on GABA<sub>A</sub> receptors of chromaffin cells [10,1]. Preliminary studies using a  $\beta_2/\beta_3$  GABA<sub>A</sub>

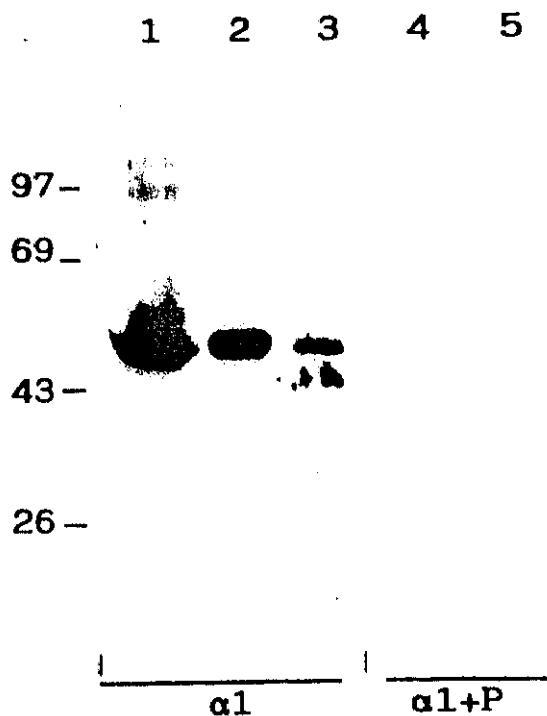


Fig. 4. Demonstration of the specificity of the immunoblotting experiments. Immunoblots of GABA<sub>A</sub> receptors purified by both benzodiazepine affinity chromatography and anti- $\alpha_1$  413–429 GABA<sub>A</sub> receptor antibody immunoaffinity chromatography were carried out using either anti- $\alpha_1$  413–429 GABA receptor antibody alone ( $\alpha_1$ ) or anti- $\alpha_1$  413–429 GABA receptor antibody preincubated overnight in the presence of  $\alpha_1$  413–429 peptide (1.25  $\mu$ g/ml final concentration) ( $\alpha_1$ +P) to show the specificity of the immune reaction. Lane 1 contains benzodiazepine affinity chromatography purified receptor from adult bovine cerebral cortex as antigen control. Lanes 2 to 5 are receptor purified from adrenal medulla by benzodiazepine affinity column chromatography (lanes 2 and 4) and by anti-GABA receptor  $\alpha_1$  413–429 antibody affinity chromatography (lanes 3 and 5). Molecular weights (kDa) are shown on the left.

receptor subunit monoclonal antibody and an anti- $\gamma_2$  1-15 Cys antibody have demonstrated the presence of the respective protein products in the purified preparations [9].

The results here suggest that GABA<sub>A</sub> receptors expressed in adrenal medulla are homogeneous with respect to their  $\alpha$  subunit complement. Moreover, the  $\alpha$  subunit class indicates that this receptor belongs to the so-called HZ1 subtype [13], with high affinity for, e.g., the  $\beta$ -carbolines. Indeed, we have found a specific displacement of [<sup>3</sup>H]flunitrazepam binding of 70-100% by different  $\beta$ -carbolines at 10 nM concentration (experiments in progress).

In conclusion, we have demonstrated by purification using two different methods, the presence of the GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha_1$  subunit in bovine adrenal medulla. This proposes a homogeneous receptor population and furthermore, provides insight into potential pharmacological modulation in this particular tissue.

This work was supported by Research Grants DGICYT PB92/0064 from Ministerio de Educación y Ciencia of Madrid and FISS 92/0241 from Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social de Madrid (Ministerio de Sanidad, Spain). M.P. was a recipient of a FEBS-Summer Fellowship. The authors thank Penny Noble and Simon Pollard for help in the production and characterization of the antibodies.

- [1] Bornmann, J. and Clapham, D.E.,  $\gamma$ -Aminobutyric acid receptor channels in adrenal chromaffin cells: a patch-clamp study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 (1985) 2168-2172.
- [2] Castro, E., Oset-Gasque, M.J., Cañadas, S., Giménez, A. and González, M.P., GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> sites in bovine adrenal medulla membranes. *J. Neurosci. Res.*, 20 (1988) 241-245.
- [3] Castro, E., Oset-Gasque, M.J. and González, M.P., GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors are functionally active in the regulation of catecholamine secretion by bovine chromaffin cells. *J. Neurosci. Res.*, 23 (1989) 299-306.
- [4] DeLorey, T.M. and Olsen, R.W.,  $\gamma$ -Aminobutyric acid<sub>A</sub> receptors. Structure and function. *J. Biol. Chem.*, 267 (1992) 16747-16750.
- [5] Duggan, M.J., Pollard, S. and Stephenson, F.A., Immunofluorescence purification of GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$ -subunit isoforms, *J. Biol. Chem.*, 266 (1991) 24778-24784.
- [6] González, M.P., Oset-Gasque, M.J., Castro, E., Bugeda, J., Arce, M.C. and Parramón, M., Mechanism through which GABA<sub>A</sub> receptor modulated catecholamine secretion from bovine chromaffin cells. *Neuroscience*, 47 (1992) 487-494.
- [7] Kataoka, Y., Gutman, Y., Guidotti, A., Panula, P., Wroblewski, J., Costenza-Murphy, D., Wu, J.Y. and Costa, E., Intrinsic GABAergic mechanism of adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 (1984) 3218-3222.
- [8] Olsen, R.W. and Tobin, A.J., Molecular biology of GABA<sub>A</sub> receptors. *FASEB J.*, 4 (1990) 1469-1480.
- [9] Parramón, M., Oset-Gasque, M.J., González, M.P. and Stephenson, F.A., Subunit composition of GABA<sub>A</sub> receptor from bovine adrenal medulla. 16th Annu. Meeting Eur. Neurosci. Assoc., Madrid, Spain, 1993, Suppl. 6, Eur. J. Neurosci. Abstr., 862.
- [10] Peters, J.A., Lambert, J.J. and Cottrell, G.A., An electrophysiological investigation of the characteristics and function of GABA<sub>A</sub> receptors on bovine adrenomedullary chromaffin cells. *Pflügers Arch.*, 415 (1989) 95-103.
- [11] Pollard, S., Duggan, M.J. and Stephenson, F.A., Further evidence for the existence of  $\alpha$  subunit heterogeneity within discrete  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor subpopulations. *J. Biol. Chem.*, 268 (1993) 3753-3757.
- [12] Pritchett, D., Sontheimer, H., Shivers, B.D., Ymer, S., Kettenmann, H., Schofield, P.R. and Seeburg, P.H., Importance of a novel GABA<sub>A</sub> receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature*, 338 (1989) 582-585.
- [13] Sieghart, W., Multiplicity of GABA<sub>A</sub>/benzodiazepine receptor. *Trends Pharmacol. Sci.*, 10 (1989) 407-411.
- [14] Sieghart, W., GABA<sub>A</sub> receptors: ligand-gated Cl<sup>-</sup> ion channels modulated by multiple drug-binding sites. *TIPS*, 13 (1992) 446-450.
- [15] Sigel, E., Stephenson, F.A., Mamalaki, C. and Barnard, E.A., A  $\gamma$ -aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex of bovine cerebral cortex. *J. Biol. Chem.*, 258 (1983) 6965-6971.
- [16] Stephenson, F.A., Watkins, A.E. and Olsen, R.W., Physicochemical characterization of detergent-solubilized  $\gamma$ -aminobutyric acid and benzodiazepine receptor proteins from bovine brain. *Eur. J. Biochem.*, 123 (1982) 291-298.
- [17] Ymer, S., Schofield, P.R., Draghun, A., Werner, P., Köhler, M. and Seeburg, P.H., GABA<sub>A</sub> receptor  $\beta$  subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNAs. *EMBO J.*, 8 (1989) 1665-1670.

# CELL SIGNAL TRANSDUCTION, SECOND MESSENGERS, AND PROTEIN PHOSPHORYLATION IN HEALTH AND DISEASE

Edited by

Angel Martín Municio, *Real Academia de Ciencias, Madrid, Spain* and  
M Teresa Miras-Portugal, *Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain*

## MECHANISMS OF GABAergic REGULATION OF NEUROSECRETION IN CHROMAFFIN CELLS

Mónica Parramón, M<sup>a</sup> Jesús Oset-Gasque, M<sup>a</sup> Pilar González, and M<sup>a</sup> Teresa Herrero

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II (Centro mixto C.S.I.C.-  
U.C.M.)  
Facultad de Farmacia. Universidad Complutense  
28040- Madrid  
Spain

### INTRODUCTION

$\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA), the major inhibitory neurotransmitter in the Central Nervous System (CNS), is also present in several peripheral tissues, where it has a functional role in the regulation of muscle contraction or hormonal secretion (for a review, see Tanaka & Taniyama, 1992).

Chromaffin cells from adrenal medulla are considered to be typical post-synaptic catecholaminergic neurons, because they have several embryological, structural, and functional properties in common with catecholaminergic neurons from brain. Like neurons, these cells originate from neural crest, a tissue of ectodermic origin, and possess secretory vesicles, i.e., the chromaffin granules. These granules synthesize, store, and release catecholamines (CAs) and a number of neuropeptides to the blood by calcium-dependent exocytotic mechanisms.

CA secretion is a process physiologically stimulated by acetylcholine (ACh), released from splanchnic nerves which supply the adrenal medulla. When ACh binds to nicotinic receptors located on the plasma membrane of chromaffin cells, it induces an entry of  $\text{Na}^+$  through receptor-associated  $\text{Na}^+$  channels which depolarizes the cells and allows the activation of voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels. The subsequent  $\text{Ca}^{2+}$  entry triggers the extrusion of the CA granule content to the extracellular space (Douglas, 1968).

However, the recent identification of several neurotransmitters in chromaffin cells, such as opioid peptides, substance P, somatostatin, vasoactive intestinal peptide, histamine, angiotensin, neuropeptide Y, atrial natriuretic peptide, and GABA (for a review, see Burgoyne, 1991), suggests a more complex picture of CA secretion by chromaffin cells, since, together with nicotinic ACh (nACh) receptors, these neurotransmitters could act as physiological modulators of CA secretion.

In relation to GABA regulation of chromaffin cell secretion, previous work by our group has demonstrated the presence of all enzymes implicated in GABA metabolism in the bovine adrenal medulla (Fernández-Ramil et al., 1982; 1983) as well as the existence of an active uptake (Oset-Gasque & Aunis, 1989), and exocytotic release of this neurotransmitter (Oset-Gasque et al., 1990). Moreover, the presence of the two subtypes of GABA receptors, one sensitive to muscimol (GABA<sub>A</sub>) and the other insensitive to muscimol but sensitive to baclofen (GABA<sub>B</sub>) has also been described (Castro et al, 1988), both having a role in the regulation of CA secretion by chromaffin cells (Figure 1).

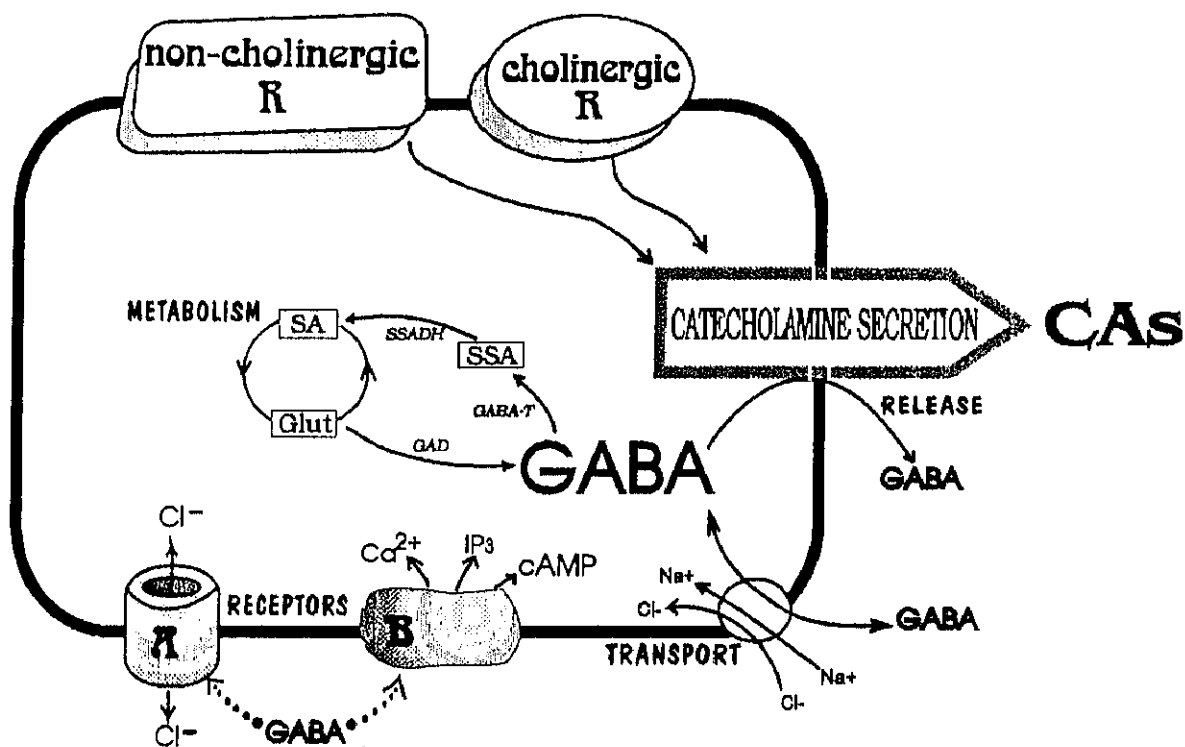


Figure 1. In adrenal chromaffin cells, all enzymes implicated in GABA metabolism (GAD, GABA-T and SSADH) are present. GABA is released by two mechanism, one calcium-dependent (exocytotic release) and other calcium-independent and sodium-dependent (inversion of GABA carrier). Both types of GABA receptors (GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub>) exist, which modulate CA secretion. In addition to that, other receptors of different neurotransmitter systems are present in the plasma membrane (see text). GABA-T, 4-aminobutyrate-2-oxoglutarate aminotransferase; SSADH, semialdehyde succinic acid dehydrogenase; GAD, glutamate decarboxylase; SSA, succinic semialdehyde; SA, succinic acid; Glut, glutamate.

In this review we present our recent results concerning GABAergic modulation of CA secretion in chromaffin cells explaining the mechanisms by which both, ionotropic GABA<sub>A</sub> and metabotropic GABA<sub>B</sub> receptors exert such a regulatory action.

### COEXISTENCE OF GABA<sub>A</sub> AND GABA<sub>B</sub> RECEPTORS IN ADRENAL MEDULLA MEMBRANES

The first evidence showing the possibility that adrenal medulla contains receptors for GABA was obtained by Kataoka et al. (1984), who found binding of [<sup>3</sup>H]muscimol to

chromaffin cells in culture, and by Martínez et al. (1987), who observed that binding of [<sup>3</sup>H]GABA was specifically displaced by muscimol and (-)-baclofen. These results suggested that the adrenal medulla contained both GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors. Castro et al. (1988) showed that specific binding of [<sup>3</sup>H]GABA to adrenal medulla membranes was biphasic, as reflected in the curved Scatchard plot, with a low and a high affinity component. These binding sites were specifically blocked by treatment with muscimol (low affinity) and baclofen (high affinity), respectively, indicating the existence of GABA<sub>A</sub> low affinity binding sites and GABA<sub>B</sub> high affinity binding sites. Computer-assisted analysis of data from blockade and nonblockade experiments gave kinetic constants of  $Kd_1=139\pm 22$  nM and  $B_{max}=3.2\pm 0.4$  pmol/mg protein for GABA<sub>A</sub> sites of low affinity and  $Kd_2=41\pm 6$  nM and  $B_{max}=0.35\pm 0.26$  pmol/mg protein for the GABA<sub>B</sub> sites of high affinity.

The existence of both sites was confirmed by experiments on calcium-sensitivity of binding. Specific [<sup>3</sup>H]GABA binding obtained after muscimol blockade (GABA<sub>B</sub> sites), was enhanced when Ca<sup>2+</sup> was added to the incubation medium, the effect reaching its maximum level at a Ca<sup>2+</sup> concentration of 1 mM; however, [<sup>3</sup>H]GABA binding obtained after blockade with (-)-baclofen (GABA<sub>A</sub> sites) was not significantly modified by Ca<sup>2+</sup> ions until 1 mM (Castro et al., 1988).

## FUNCTION AND MECHANISM OF ACTION OF GABA<sub>A</sub> RECEPTORS IN BOVINE CHROMAFFIN CELLS

Sangiah et al. (1974) reported for the first time that GABA caused release of CAs from isolated perfused bovine adrenals. Kitayama et al. (1984) found that GABA produced CA release from isolated perfused dog adrenals, this process being Ca<sup>2+</sup>-dependent and independent of external Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>.

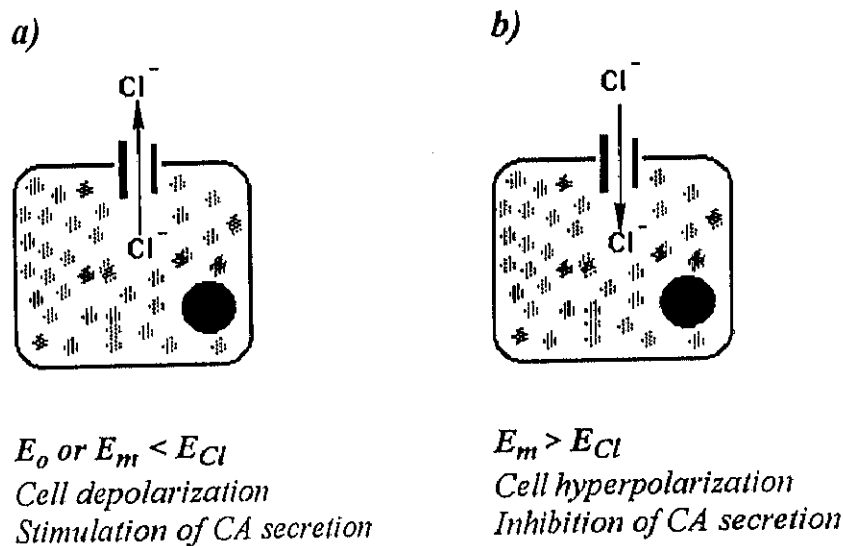
According to our results on bovine chromaffin cells (Castro et al., 1989), GABA stimulates basal CA release from these cells in a concentration-dependent manner. This release represents about 70 % of that obtained by the same doses of nicotine under similar experimental conditions. The fact that GABA stimulates basal CA release and that this stimulation can be mimicked by muscimol, a GABA<sub>A</sub> agonist, and partially blocked by bicuculline, a GABA<sub>A</sub> antagonist, indicates that this action is mediated in part by GABA<sub>A</sub> receptors. The EC<sub>50</sub> for the effect of GABA on basal CA secretion was  $7.2\pm 1.1$  μM, which is well in line with GABA concentrations necessary to stimulate the GABA<sub>A</sub> receptor in brain preparations in vitro (Allan & Harris, 1986).

The CA release elicited by GABA was Ca<sup>2+</sup>-dependent and was inhibited in the absence of Ca<sup>2+</sup> in the extracellular medium and by blockers of the L-type of voltage-dependent calcium channels, such as nifedipine and Cd<sup>2+</sup>, but not by blockers of the T-type voltage-dependent calcium channels, such as Ni<sup>2+</sup> (Castro et al., 1989). This pattern of inhibition is in agreement with the known pathways for Ca<sup>2+</sup> entry into chromaffin cells (Ladona et al., 1987). In addition, GABA and muscimol increased the intracellular concentration of Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>), as measured by fluorescent probe Fura-2AM. This increase was specifically blocked by the GABA<sub>A</sub> antagonist bicuculline and the calcium channel blocker nifedipine.

These results suggest that GABA evokes CA secretion in chromaffin cells by producing a depolarization due, maybe, to an increase in the membrane conductance to Cl<sup>-</sup>, as occurs when the neurotransmitter binds to its specific site on the GABA receptor/Cl<sup>-</sup> channel complex in brain. Our results about Cl<sup>-</sup> fluxes measured by two independent methods, <sup>36</sup>Cl

uptake and SPQ fluorescence probes showed that muscimol induces an increase in the efflux of  $\text{Cl}^-$  from cells in culture. This effect was blocked by picrotoxin, a specific blocker of the  $\text{Cl}^-$  channel associated with the  $\text{GABA}_A$  receptor (González et al., 1992).

In addition to the GABA effect on the basal CA secretion, GABA, through its  $\text{GABA}_A$  receptors, increases the CA release evoked by submaximal doses of nicotine but has an inhibitory effect on the nicotine-evoked CA secretion when nicotine is given in maximal doses (Castro et al., 1989). This is also true in the case of KCl-evoked CA secretion by chromaffin cells. Thus, at low concentration of KCl (between 5 and 15 mM) the effect of muscimol is excitatory but at higher concentrations the effect is inhibitory (González et al., 1992).



**Figure 2.** (a) When GABA is bound to its  $\text{GABA}_A$  receptor in chromaffin cells at resting membrane potential ( $E_o$ ) or at a  $E_m$  below  $E_{Cl}$  ( $E_{Cl} = -51 \pm 2.1$  mV) a  $\text{Cl}^-$ -efflux is produced and, as consequence, a membrane depolarization and a stimulation of CA release occur. (b) By contrast, if chromaffin cells are depolarized, presenting a  $E_m$  above  $E_{Cl}$  (experimentally achieved by stimulation with high KCl or nicotine concentrations), GABA causes a  $\text{Cl}^-$ -influx and, as a result, a membrane hyperpolarization and an inhibition of CA secretion.

These apparent contradictory effects could be explained by our results on the muscimol effect on membrane potential, measured by the fluorescent bisoxonol probe (Di-BAC 4(3)), and estimations of resting potential and equilibrium potential for  $\text{Cl}^-$  (González et al., 1992). At membrane potentials lower than the equilibrium potential for  $\text{Cl}^-$  (in our study  $-51 \pm 2.1$  mV), muscimol induced a depolarization of chromaffin cells and, consequently, a stimulatory effect on CA secretion. Maximal stimulation was obtained when muscimol effect was assayed at resting conditions (in our study the resting membrane potential ( $E_o$ ) was about  $-65$  mV). However, when cells were stimulated by muscimol at membrane potentials greater than the equilibrium potential for  $\text{Cl}^-$  (obtained by high KCl or nicotine concentrations), the effect of the  $\text{GABA}_A$  agonist was inhibitory (González et al., 1992) (Figure 2).

# FUNCTION AND MECHANISM OF ACTION OF GABA<sub>B</sub> RECEPTORS IN BOVINE CHROMAFFIN CELLS

## GABA<sub>B</sub> agonists modulate basal and nACh and GABA<sub>A</sub>-receptor-stimulated CA secretion

The function of GABA<sub>B</sub> receptors in adrenal chromaffin cells has not been studied before. Our results show for the first time that the GABA<sub>B</sub> agonist baclofen and the most potent agonist available, 3-APPA increase basal CA secretion in a dose-dependent manner ( $EC_{50}=225\pm58 \mu\text{M}$  for 3-APPA and  $151\pm35 \mu\text{M}$  for baclofen, respectively), this effect representing between 40-50 % of that obtained with nicotine at the same doses.

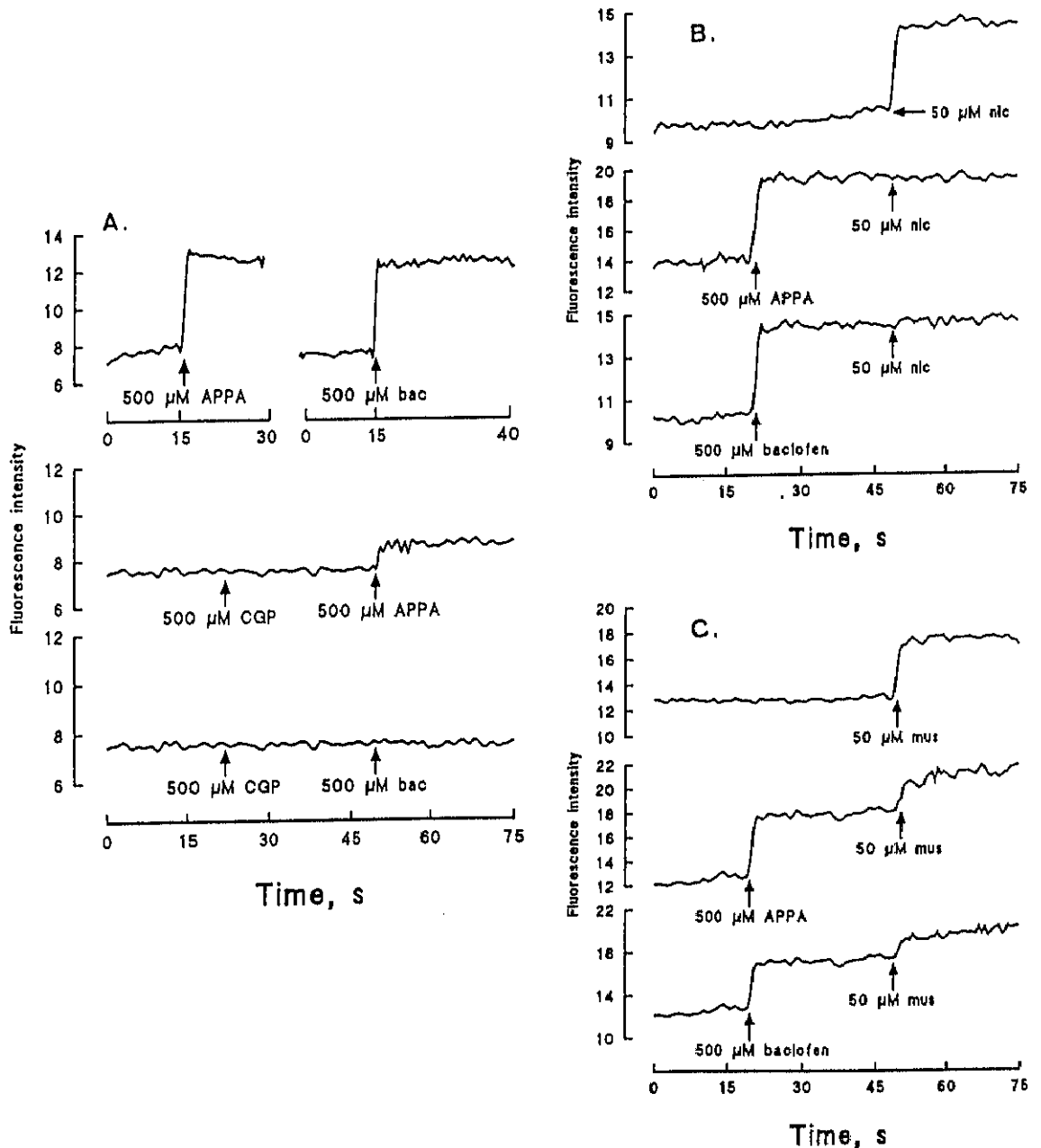


Figure 3. A.) Both GABA<sub>B</sub> agonists, 3-APPA and baclofen, increase membrane potential. This effect is blocked by pretreatment with the specific antagonist CGP 35348. The depolarization caused by GABA<sub>B</sub> agonists decreased or even blocked the nicotine (B) and GABA<sub>A</sub> agonist-induced depolarizations (C)

GABA<sub>B</sub> effect on CA secretion seems to be a true exocytotic and specific release. This is supported by the findings that:

(1) It was accompanied by a dose-dependent increase in  $[Ca^{2+}]_i$ , with a  $EC_{50}=25\pm 6$   $\mu M$  and  $60\pm 10$   $\mu M$  for 3-APPA and baclofen, respectively. Maximal increases in  $[Ca^{2+}]_i$  are shown in Figure 5. The effect was almost completely blocked when CA secretion by these agonists was measured in a low  $Ca^{2+}$ -containing medium (200 nM).

(2) GABA<sub>B</sub> agonists depolarize the cells by increasing membrane potential in a specific form, since the effect was blocked by the specific antagonist CGP 35348 (Figure 3A).

(3) GABA<sub>B</sub> agonists were able to release other secretory granular components such as DBH to a similar extent as CAs, and

(4) Their effects are blocked by the specific antagonist CGP 35348, which at dose 0.5 mM inhibited 70 % to 100 % the agonist-evoked responses.

In addition to the effect of GABA<sub>B</sub> agonists on basal CA secretion, stimulation of chromaffin cells by these compounds also has an effect on the CA secretion evoked by nACh and GABA<sub>A</sub> agonists. When cells are preincubated with GABA<sub>B</sub> agonists before nicotine is added, these agonists strongly inhibit nicotine-evoked CA secretion in a dose-dependent manner. The  $IC_{50}$  are of the same order of magnitude than those for activation of basal CA secretion ( $354\pm 98$   $\mu M$  for baclofen and  $240\pm 59$   $\mu M$  for 3-APPA). This inhibitory effect was accompanied by a reduction of the increase of  $[Ca^{2+}]_i$  (Oset-Gasque et al., 1993) and membrane potential induced by nicotine (Figure 3B), results which support the hypothesis of a true inhibitory modulation of nACh receptors by GABA<sub>B</sub> ones. Similar results were obtained for CA secretion evoked by GABA<sub>A</sub> agonists ( $IC_{50}=45\pm 9$   $\mu M$  for baclofen and  $21\pm 7$   $\mu M$  for 3-APPA) as well as for increases in  $[Ca^{2+}]_i$  (Oset-Gasque et al., 1993) and in membrane potential (Figure 3C).

### GABA<sub>B</sub> agonists increase cAMP levels

The molecular mechanism by which GABA<sub>B</sub> agonists modulate CA secretion in chromaffin cells seem to be mediated by the activation of the adenylate cyclase (AC). This conclusion is supported by the following experimental data:

(1) GABA<sub>B</sub> agonists increase intracellular levels of cyclic AMP (cAMP) in a dose-dependent fashion, effects which are well correlated with increases obtained in CA secretion (Figure 4).

(2) Several activators of AC including forskolin as well as cAMP analogues (pClp-cAMP) increase basal CA secretion in a dose-dependent manner, a direct correlation existing between both parameters, intracellular cAMP levels and CA secretion (Oset-Gasque et al., 1991)

(3) Pretreatment of cells with Pertussis toxin, which produces an inhibition of negative control of AC by ADP-ribosylation of Gi proteins, potentiates by 2 times cAMP levels and 4.5 times CA secretion induced by GABA<sub>B</sub> agonists (Oset-Gasque et al., 1993).

(4) Pretreatment of cells with Choleric toxin, which permanently activate AC, does not produce additional increases in either the cAMP levels or in the CA secretion induced by baclofen, indicating the activation of a common intracellular target, the Gs protein.

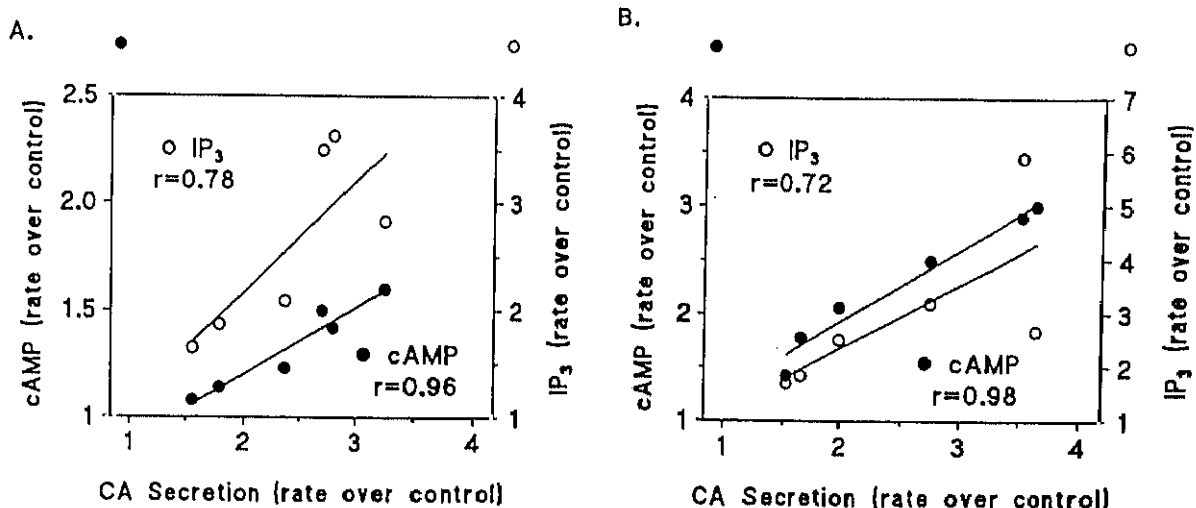


Figure 4. Correlation between the rates of CA secretion and cAMP or IP<sub>3</sub> levels induced by 3-APPA (A) or baclofen (B) in adrenal chromaffin cells. Data are means of 4 experiments performed in duplicate. A) (●) cAMP,  $y = 0.66x \pm 0.60$ ,  $r = 0.98$ ,  $P < 0.001$ ; (○) IP<sub>3</sub>,  $y = 1.18x \pm 0.004$ ,  $r = 0.72$ , ns. B) (●) cAMP,  $y = 0.31x \pm 0.57$ ,  $r = 0.96$ ,  $P < 0.01$ ; (○) IP<sub>3</sub>,  $y = 1.04x \pm 0.08$ ,  $r = 0.78$ , ns.

The inhibitory actions of GABA<sub>B</sub> agonists on CA secretion evoked by nicotinic and GABA<sub>A</sub> receptors could also be explained by this mechanism. This conclusion seems to be supported by both results which show that forskolin and pClp-cAMP have a dose-dependent inhibitory effect on CA secretion evoked by nicotine and muscimol (Oset-Gasque et al., 1991) and by others showing that cAMP or agonists that activate AC may produce an inactivation of nACh and GABA<sub>A</sub> receptor by phosphorylation (Albuquerque et al., 1986; Haganir et al., 1986; Harrison & Lambert, 1989; Leidenheimer et al., 1991). However, although GABA<sub>B</sub> agonists seem to mediate their effects on CA secretion by a mechanism implicating cAMP formation, we do not exclude the possibility of the existence of additional mechanisms for the action of these receptors (see below).

#### GABA<sub>B</sub> agonists mobilize calcium from intracellular stores and increase IP<sub>3</sub> levels in chromaffin cells

In order to determine the origin of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increased by GABA<sub>B</sub> agonists we measured the mobilization of calcium in response to GABA<sub>B</sub> agonist stimulation under different conditions, which are the absence of extracellular calcium or the blockade of different types of voltage-dependent calcium channels with specific antagonists. Results from Figure 5 show that the absence of calcium in the extracellular medium or its chelation by addition of EGTA reduces [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase by GABA<sub>B</sub> agonists in about a 70%. The same result was obtained by specific blockade of L-type voltage-dependent calcium channels with nifedipine, while ω-conotoxin, a specific blocker of N-type calcium channels did not produce any inhibition of calcium entry. These results seem to indicate that the 70% of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase produced by GABA<sub>B</sub> agonists come from extracellular pools, but suggest that an additional mobilization of intracellular calcium pools could exist.

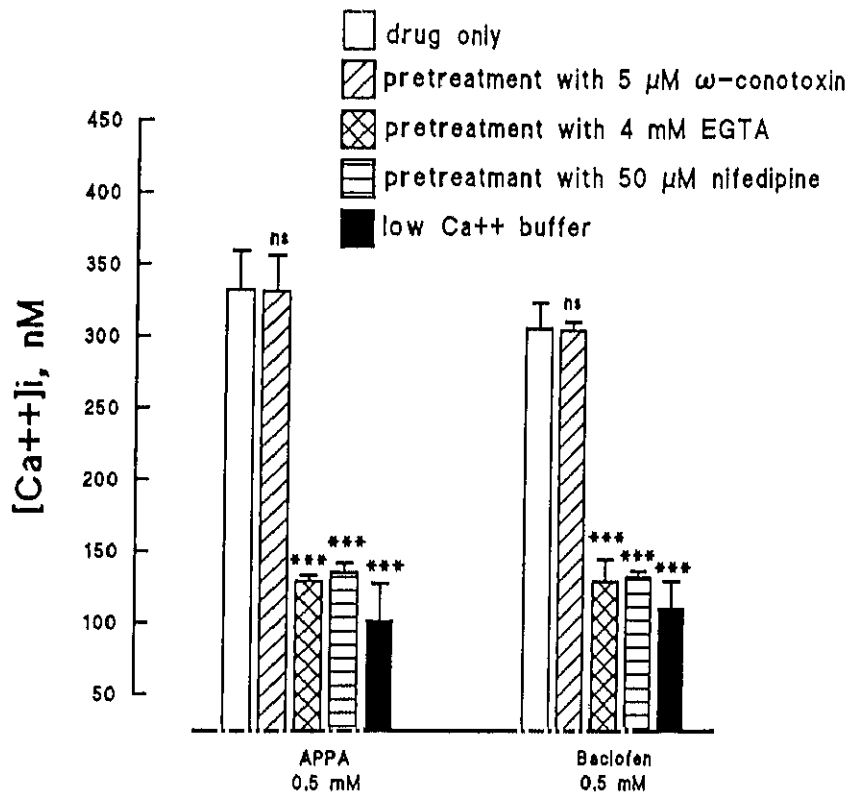


Figure 5. Effect of GABA<sub>B</sub> receptor agonists, 3-APPA and baclofen over [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> under different conditions as specified above. Data are means ±S.E.mean of 10 experiments. ns, non significant; \*\*\*, P<0.001.

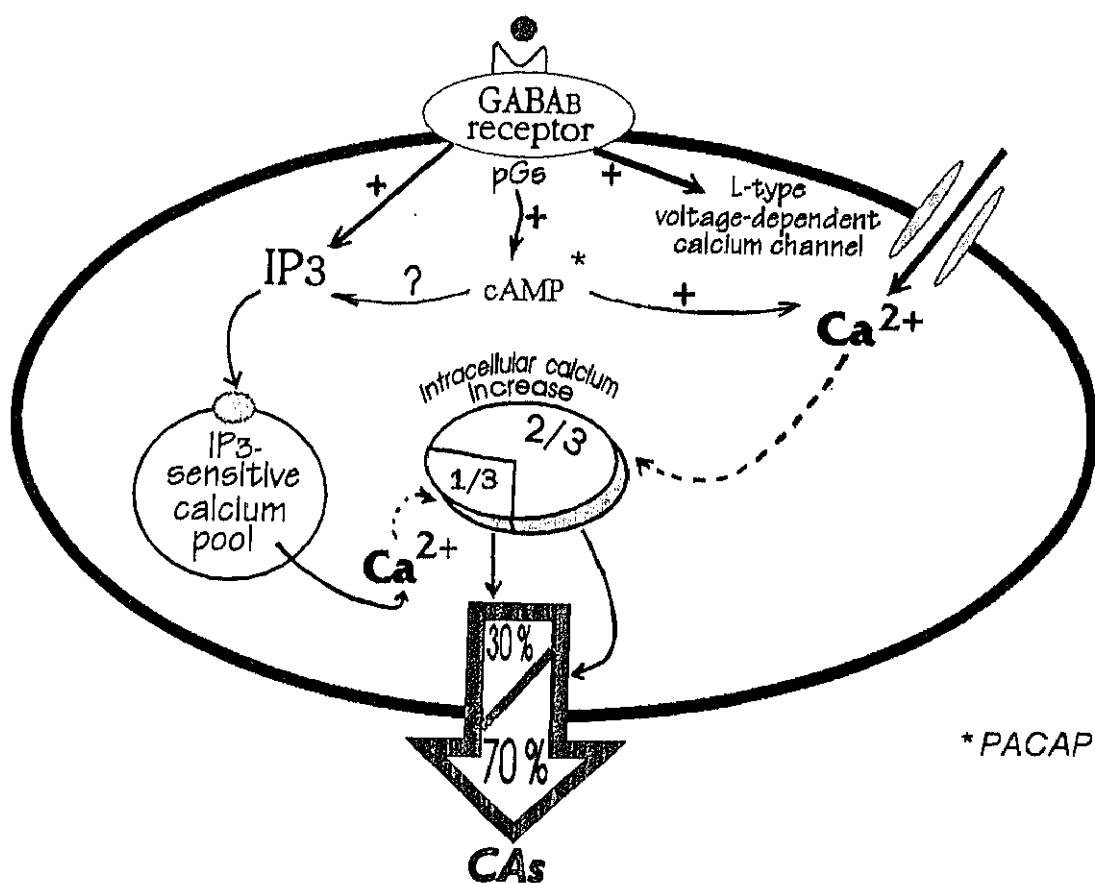
So as to test the last possibility, we performed two types of experiments. First, we examined the intracellular calcium mobilization by GABA<sub>B</sub> agonists in an extracellular calcium-free medium previous depletion of caffeine and IP<sub>3</sub>-sensitive stores. In these conditions, GABA<sub>B</sub> agonists were unable to produce any increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Moreover, after caffeine pretreatment alone, 3-APPA was able to induce a little increase of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Parramón et al., paper in preparation). Secondly, we examined whether GABA<sub>B</sub> agonists stimulate phospholopase C to produce IP<sub>3</sub>. GABA<sub>B</sub> agonists cause a significant dose-dependent increase in IP<sub>3</sub> levels, reaching maximal effects at 100 μM concentration (Parramón et al., paper in preparation).

Taken together, results from intracellular calcium mobilization and IP<sub>3</sub> levels demonstrate that in addition to a very high extracellular calcium entry (70 %) mainly through L-type voltage-dependent calcium channel, there is an additional intracellular calcium mobilization, which could be implicated in the regulation of the GABA<sub>B</sub> evoked CA secretion (Figure 6). This contribution is minority and non-specific since in the absence of extracellular calcium although a little CA secretion exists, it is not dose-dependent. Moreover, the correlation between CA secretion in the presence of calcium and IP<sub>3</sub> levels is not statistically significant (Figure 4).

## CONCLUDING REMARKS

The above results demonstrate that GABA, when binds to GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors on the plasma membrane of chromaffin cells, can modulate both basal and evoked CA secretion, enhancing basal CA secretion and inhibiting secretagogue-evoked release.

The effect of GABA<sub>A</sub> modulation of CA secretion by chromaffin cells depends on the membrane potential, being depolarizing, excitatory, or hyperpolarizing, inhibitory, depending on the degree of change in the membrane potential produced by the stimulatory agent, below or above the equilibrium potential for Cl<sup>-</sup> (Figure 2). These opposite actions could be mediated by an increase in the efflux or influx of Cl<sup>-</sup> through Cl<sup>-</sup> channel, respectively. The intermediate position of the E<sub>Cl</sub> plays a crucial role in the dual effect of GABA<sub>A</sub> receptors on the control of the CA release on basal conditions. The opening of Cl<sup>-</sup> channels depolarize the cells towards E<sub>Cl</sub>, but if the opening coincides with a stimulus depolarizing the membrane above the E<sub>Cl</sub>, this action will be dampened by the increased permeability to Cl<sup>-</sup>, and a relative inhibition will be obtained.



**Figure 6.** GABA<sub>B</sub> receptor activation produces an opening of L-type voltage-dependent calcium channels that is about two thirds the total [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induced by these agonists. This [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> is the responsible of at least 70 % of GABA<sub>B</sub>-evoked CA secretion. GABA<sub>B</sub> agonists produce also a calcium release from intracellular stores. Moreover, GABA<sub>B</sub> agonists produce an increase of cAMP levels. Since cAMP has similar effects over [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and subsequent CA secretion, we could hypothesize that cAMP is the main second messenger involved in GABA<sub>B</sub> receptor function in chromaffin cells. Similar effects on Ca<sup>2+</sup>, IP<sub>3</sub> and CA secretion has been observed with PACAP (Pituitary Adenylate-Cyclase-Activating Polypeptide) in porcine adrenal medullary chromaffin cells (Isobe et al., 1993).

GABA<sub>B</sub> receptors mediate CA secretion by a completely different mechanism (Figure 6). GABA<sub>B</sub> receptor stimulation produces an increase of calcium entry from extracellular space mainly through the L-type of voltage-dependent calcium channels (70 %) but also mobilize calcium from intracellular stores (30 %). Moreover, GABA<sub>B</sub> stimulation presumably activates AC and PLC producing cAMP and IP<sub>3</sub>, respectively. Since (1) in the case of cAMP a direct correlation with CA secretion exists but the correlation between IP<sub>3</sub> and CA secretion is not significant, and (2) in the absence of extracellular calcium, although a little secretion of CA exists, it is not dose-dependent, we can hypothesize that both, calcium entry from extracellular medium and cAMP messenger system are two main signalling cascades which trigger GABA<sub>B</sub>-stimulation of CA secretion. IP<sub>3</sub> production could be secondary to the calcium-dependent activation of PLC (Parramón et al., paper in preparation).

Moreover, cAMP can phosphorylate nACh and GABA<sub>A</sub> receptors, producing an inhibitory control of their actions on CA secretion. GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors could interact each other in order to regulate CA secretion. In fact, our results seem to support a specific modulation of GABA<sub>A</sub> receptors by GABA<sub>B</sub> ones, since the IC<sub>50</sub> for the inhibition of GABA<sub>A</sub> receptor action by GABA<sub>B</sub> agonists was very much smaller than that for inhibition of nACh receptor action (Oset-Gasque et al., 1993).

In conclusion, GABA through both its GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors, seems to play an important role in the modulation of chromaffin cell function and therefore, GABA could be added to the long list of neurotransmitters and hormones implicated in the modulation of this complex function. The physiological significance of the results presented here is not known yet. It could be possible that ionotropic GABA<sub>A</sub> receptors, as well as nACh receptors, play a major role in the initiation of CA release *in vivo* while metabotropic receptors, including those for GABA<sub>B</sub>, have a more important role in the modulation of the secretion evoked by ionotropic receptors.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Research Grants CAM C168/91 from Comunidad Autónoma de Madrid and FISS 92/0241 from Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social of Madrid (Ministry of Health, Spain).

## REFERENCES

- Albuquerque, E.X., Deshipande, S.S., Aravaca, Y., Alkondon, M. and Daly, J.M., 1986, A possible involvement of cyclic AMP in the expression of desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor. *FEBS Lett.* 199: 113-120.
- Allan, A.M. and Harris, R.A., 1986,  $\gamma$ -Aminobutyric acid agonist and antagonists alter chloride flux across brain membranes. *Mol. Pharmacol.* 29: 497-505.
- Burgoyne, R.D., 1991, Control of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1071: 174-202.
- Castro, E., Oset-Gasque, M.J., Cañadas, S., Giménez, A. and González, M.P., 1988, GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> sites in bovine adrenal medulla membranes. *J. Neurosci. Res.* 20: 241-245.
- Castro, E., Oset-Gasque, M.J. and González, M.P., 1989, GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors are functionally active in regulation of catecholamine secretion by bovine chromaffin cells. *J. Neurosci. Res.* 23: 290-296.
- Douglas, W.W. and Rubin, R.P., 1968, The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J. Physiol.* 331: 577-597.

- Fernández- Ramil, J.M., Sánchez-Prieto, J. and González, M.P., 1982, Presence of glutamate decarboxylase in bovine adrenal medullary cells. *Rev. Esp. Fisiol.* 38:91-96.
- Fernández- Ramil, J.M., Sánchez-Prieto, J., Cañadas, S. and González, M.P., 1983, GABA-T in bovine adrenal medulla cells. Kinetic properties and comparison with GABA-T from other tissues. *Rev. Esp. Fisiol.* 39: 299-304.
- González, M.P., Oset-Gasque, M.J., Castro, E., Bugada, J., Arce, C. and Parramón, M., 1992, Mechanisms through which GABA<sub>A</sub> receptor modulate catecholamine secretion from bovine chromaffin cells. *Neuroscience*, 47: 487-494.
- Harrison, N.L. and Lambert, N.A., 1989, Modification of GABA<sub>A</sub> receptor function by an analog of cyclic AMP. *Neurosci. Lett.*, 105: 137-142.
- Huganir, R.L., Delcour, A.H., Greengard, P. and Hess, G.P., 1986, Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor regulates its rate of desensitization. *Nature* 321: 774-776.
- Isobe, K., Nakai, T. and Takuwa, Y., 1993, Ca<sup>2+</sup>-dependent stimulatory effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on catecholamine secretion from cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells. *Endocrinology* 132:1757-1765.
- Kataoka, Y., Gutman Y., Guidotti, A., Panula, P., Wroblewski, J., Cosenza-Murphy, D., Wu, J. and Costa, E., 1984, Intrinsic GABAergic system of adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81 : 3218-3222.
- Kitayama, S., Morita, K., Dohi, T. and Tsujimoto, A., 1984, The nature of the stimulatory action of  $\gamma$ -aminobutyric acid in the isolated perfused dog adrenals. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 326: 106-110.
- Ladona, M.G., Aunis, D., Gandia, L. and García, A., 1987, Dihydropyridine modulation of the chromaffin cell secretory response. *J. Neurochem.* 48: 483-490.
- Leidenheimer, N.J., Browning, M.D. and Harris, R.A., 1991, GABA<sub>A</sub> receptor phosphorylation: multiple sites, actions and artifacts. *Trends Pharmacol. Sci.* 12: 84-87.
- Martínez, P.M., Giménez, A., Castro, E., Oset-Gasque, M.J., Cañadas, S. and González, M.P., 1987, GABA binding to adrenal medulla membranes is sensitive to baclofen. *Comp. Biochem. Physiol.* 88C: 155-157.
- Oset-Gasque, M.J. and Aunis, D., 1989, Gamma-aminobutyric acid uptake in bovine chromaffin cells in culture. *Biochem. Pharmacol.* 38: 2227-2232.
- Oset Gasque, M.J., Castro, E., and González, M.P., 1990, Mechanisms of [<sup>3</sup>H]  $\gamma$ -aminobutyric acid release by chromaffin cells in primary culture. *J. Neurosci. Res.* 26: 181-187.
- Oset-Gasque, M.J., Parramón, M. and González, M.P., 1991, XII Reunión del Grupo Español de la Célula Cromafin. Salamanca, Spain.
- Oset-Gasque, M.J., Parramón, M. and González, M.P., 1993, GABA<sub>B</sub> receptors modulate catecholamine secretion in chromaffin cells by a mechanism involving cyclic AMP formation. *Br. J. Pharmacol.* 110: 1586-1592.
- Sangiah, S., Borowitz, J.L. and Yim, G.K. W, 1974, Action of GABA, picrotoxin and bicuculline on adrenal medulla. *Eur. J. Pharmac.* 27: 130-135.
- Tanaka, C. and Taniyama, K., 1992, The role of GABA in the Peripheral Nervous System. In "GABA outside the Central Nervous System". Erdő, S.L., ed. Springer Verlag pp 3-17.

Secretario  
Dr. Manuel Benito  
Vocales:  
Dr. Gaberlin Cerna  
Dr. Salvador Vivier  
Dr. M<sup>te</sup> Angeles Ufano  
Secretario  
Dr. M<sup>te</sup> Teófilo Ufano

Excmo. Sr. Jefe de la Sala  
Sr. Secretario  
Dr. Manuel Benito  
Dr. Gaberlin Cerna  
Dr. Salvador Vivier  
Dr. M<sup>te</sup> Angeles Ufano  
do 10 94  
El Secretario del Tribunal